



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DE LAS PROSTAGLANDINAS
ENDOTELIALES EN LA AORTA ABDOMINAL DURANTE LA DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL EN LA RATA”**

Tesis que presenta

Xóchitl Leticia Ruiz Pérez

Para obtener el Título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Directores de la Tesis:

D.C. Daniel Godínez Hernández

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

M.C. Héctor Urquiza Marín

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Morelia.Mich.

Noviembre del 2008.

ÍNDICE

RESUMEN	4
1.- INTRODUCCIÓN	
1.1 DIABETES MELLITUS	
a. DEFINICIÓN	5
b. CLASIFICACIÓN	5
1.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA	7
1.3 METABOLISMO DE LA GLUCOSA DURANTE LA DIABETES MELLITUS	8
1.4 INCIDENCIA EN MÉXICO	9
1.5 SÍNTOMAS Y COMPLICACIONES	11
a. ALTERACIONES EN MÚSCULO LISO	11
b. DAÑO ENDOTELIAL	13
1.6 ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUINEOS	14
1.7 PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR	15
a. ÓXIDO NÍTRICO	16
b. PROSTAGLANDINAS	18

2.- ANTECEDENTES DIRECTOS	20
3.- JUSTIFICACIÓN	22
4.- HIPÓTESIS	23
5.- OBJETIVO GENERAL	23
6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
7.- METODOLOGÍA	
7.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	24
7.2 DESARROLLO DEL PROTOCOLO	
a. INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS	24
b. PREPARACIÓN DEL TEJIDO	25
c. CAMARAS DE ÓRGANO AISLADO	25
d. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA	26
e. EVALUACION DE LA PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DE LAS PROSTAGLANDINAS.	27
8.- RESULTADOS	
8.1 INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	29

8.2	CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA	30
8.3	EFEECTO DEL L-NAME EN LA RESPUESTA CONTRÁCIL A LA FENILEFRINA	32
8.4	EFEECTO DE LA INDOMETACINA EN LA RESPUESTA CONTRACTIL A LA FENILEFRINA	36
9.- DISCUSIÓN		
9.1	MODELO EXPERIMENTAL	39
9.2	DAÑO ENDOTELIAL	40
10.- CONCLUSIONES		
	CONCLUSIONES	43
	ANEXOS	44
	REFERENCIAS	45

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que durante su curso genera daños a diversos órganos. Esta enfermedad se caracteriza por la alta concentración de glucosa en sangre, desencadenando alteraciones en los vasos sanguíneos. Se cree que estas alteraciones se relacionan con los cambios en la función endotelial, ocasionando un déficit en la liberación de sustancias vasodilatadoras y un aumento en la liberación de sustancias vasoconstrictoras. En este trabajo se pretende estudiar la liberación del óxido nítrico (NO) y de las prostaglandinas (PGs) durante la DM, mediante su inducción en forma química con estreptozotocina. La hipótesis es que durante la DM ocurre una modificación en la liberación de agentes vasoactivos como el NO y PGs.

Materiales y Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho de 6 semanas de edad, de las cuales se hicieron 2 grupos. El primer grupo es el grupo control al cual solo se le trato con un vehiculo. Al segundo grupo se le indujo DM mediante la administración de estreptozotocina a razón de 55mg/Kg vía intraperitoneal. 24hrs después de la inducción se midió la glucosa en sangre y solo las ratas que mostraban una concentración >200mg/dL se consideraban como diabéticas. La glucosa era evaluada periódicamente. Se tomaron anillos de los dos grupos de ratas y se colocaron en cámaras para órgano aislado. Se realizó una curva concentración-respuesta a Fenilefrina, en ausencia y presencia de Indometacina (un inhibidor de la síntesis de Prostaglandinas) y L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO), además de bloqueadores de receptores α y β .

Resultados y Discusión: La fenilefrina produjo en todos los casos una contracción dependiente de su concentración, así como también la remoción del endotelio desplazo las curvas a la izquierda. La incubación con L-NAME imita la remoción endotelial tanto en las ratas diabéticas como en las control. La incubación con indometacina disminuyó el efecto contráctil de la fenilefrina tanto en ratas diabéticas como en las control. Los vasos de las ratas diabéticas mostraron un deterioro importante en la respuesta contráctil.

Conclusión: La DM altera la liberación de factores endoteliales, contribuyendo a la disfunción endotelial. Los daños ocasionados por la disfunción endotelial parecieran ser dependientes del tiempo de duración de la DM.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES MELLITUS

a. DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que presenta desordenes en el metabolismo de carbohidratos, de lípidos y de proteínas, se caracteriza principalmente por la alta concentración de glucosa en sangre (hiperglucemia) y por un aumento del riesgo de complicaciones por enfermedad vascular (Davis y Granner, 2003). En esta enfermedad además se presenta una deficiencia en la secreción de insulina, en su efecto biológico o en ambas.

b. CLASIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud existen tres tipos de Diabetes:

- 1) Diabetes Mellitus tipo 1, anteriormente llamada Insulino dependiente o de comienzo juvenil.

Existen dos clases de este tipo de diabetes, la idiopática (de causa desconocida) que se presenta en menos del 10% de los casos y la autoinmune que se presenta en más del 90% (Tierney et al., 2006). La diabetes tipo 1 se presenta mayormente en individuos jóvenes, aunque puede aparecer en cualquier etapa de la vida y se caracteriza por la nula producción de insulina debida a la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas mediadas por las células T. El tratamiento para este tipo de diabetes consiste en

administración exógena de insulina, dieta balanceada, actividad física, control de presión arterial y colesterol.

Este tipo de diabetes puede causar diferentes problemas, pero existen tres complicaciones principales:

1. Hipoglucemia - niveles bajos de glucosa en la sangre; algunas veces se le llama reacción a la insulina y ocurre cuando el glucosa en la sangre baja en exceso.
2. Hiperglucemia - niveles altos de glucosa en la sangre; ocurre cuando los niveles de glucosa en la sangre son demasiado altos y puede ser una señal de que la diabetes no está bien controlada.
3. Cetoacidosis - coma diabético; es la pérdida del conocimiento debido al tratamiento incorrecto o diabetes no tratada.

Las personas que tienen de 5 a 10 años con la enfermedad presentan un ligero incremento en la presión sanguínea, rigidez en las arterias, aún cuando la excreción urinaria de albúmina sea normal (Schalkwijk et al., 2005)

2) Diabetes Mellitus tipo 2.

Es un desorden metabólico que resulta de la incapacidad del cuerpo de producir suficiente insulina o usarla apropiadamente. Sin la cantidad suficiente de insulina, el cuerpo no puede llevar a la glucosa dentro de las células. Es una enfermedad crónica y aun no existe cura. Es el tipo más común de diabetes, corresponde a un 90 a un 95% de los casos de diabetes. Se desconoce la causa exacta de la diabetes de tipo 2. Sin embargo, parecería existir un factor genético que causa su aparición, pero por lo general deben existir otros factores como la

obesidad y sedentarismo, para que la enfermedad se desarrolle. Su tratamiento depende del curso de la enfermedad y tolerancia a medicamentos, sin embargo la administración de insulina no es indispensable para controlar los niveles de glucosa en sangre.

3) Diabetes Gestacional.

Es aquella que aparece durante el embarazo.

1.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA

En los humanos, la principal fuente de energía para las células proviene de los carbohidratos, por lo que estos niveles deben permanecer estables en un rango de 70-100 mg/dl en sangre, esto se logra a través de la interrelación coordinada de diversos nutrimentos, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo (Davis y Granner, 2003). La elevación de la glucosa se produce inmediatamente después de la ingesta de algún alimento rico en carbohidratos, esto pone en funcionamiento los mecanismos homeostáticos que promueven la captación de glucosa, estimulando la secreción de insulina y suprimiendo la de glucagon (Mathews et al., 2003). Así la insulina toma su papel hipoglucemiante, antilipolítico y anabólico proteico, permitiendo controlar la captación, utilización y almacenamiento de la glucosa y algunos otros nutrimentos celulares (Davis y Granner, 2003; Best y Taylor, 2003).

La insulina es una hormona secretada por las células β del islote de Langerhans del páncreas, se encarga de regular los niveles de glucosa en la sangre y fue descubierta por Banting y Best (Davis y Granner, 2003). La glucosa es el principal estímulo para la secreción de insulina y es un factor permisivo esencial en los efectos de muchos otros secretagogos. No se entiende completamente el mecanismo por el cual la glucosa estimula la secreción de insulina, pero se requiere de su entrada en la células β (Matchinsky, 1996).

Los efectos específicos de la insulina consisten en el aumento de la captación de la glucosa, activación de la glucólisis en el hígado y el desplazamiento de transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática para facilitar la captación de la glucosa para el catabolismo o para la síntesis de glucógeno. Cuando las concentraciones de glucosa en sangre empiezan a caer, la secreción de insulina se hace más lenta y la secreción de glucagón aumenta. Esto promueve la movilización del glucógeno en el hígado y se activa la degradación de triacilglicerolos en los adipositos, generando ácidos grasos (Mathews, 2003).

1.3 METABOLISMO DE LA GLUCOSA DURANTE LA DIABETES MELLITUS

Durante la DM la glucosa está presente en cantidades excesivas (hiperglucemia), esto se debe a que el estímulo hormonal para su utilización, es decir, la insulina; es deficiente (Mathews, 2002).

Las alteraciones en la secreción de insulina y glucagón originan profundas acciones sobre el metabolismo de lípidos, de cetonas y de proteínas. A

concentraciones por debajo de las necesarias para estimular la captación de glucosa, la insulina inhibe a la lipasa sensible a la hormona en el tejido adiposo y así, bloquea la hidrólisis de triglicéridos almacenados en los adipocitos (Davis y Granner, 2003).

La insulina disminuye la glucemia al inhibir la producción de glucosa en el hígado y al estimular la captación de glucosa y el metabolismo de la misma por músculo y tejido adiposo (Davis y Granner, 2003). Durante la DM se produce una deficiencia en la producción de insulina, lo que provoca un déficit en la captación de glucosa y por consiguiente la acumulación de esta en sangre. El fracaso de la insulina para actuar normalmente, provoca que las células hepáticas generen más glucosa mediante la estimulación de la gluconeogénesis, esto incrementa aun más los niveles de la glucosa sanguínea. Las concentraciones excesivas de glucosa provoca que los riñones no sean capaces de reabsorber toda la glucosa que le llega en el infiltrado de la sangre, y se pierde glucosa en la orina, a veces en cantidades que se aproximan a los 100g diarios (Mathews, 2002).

1.4 INCIDENCIA EN MÉXICO

La población mexicana tiene una especial predisposición a desarrollar síndrome metabólico (obesidad, diabetes e hipertensión), Diabetes Mellitus tipo 2 y a varios tipos de dislipidemias. Esto se debe a una dieta rica en grasa y en carbohidratos refinados, al consumo de tabaco y de alcohol; además de un estilo de vida sedentario de la gran mayoría de la población mexicana.

En el año de 1999, de 443,950 fallecimientos se registraron 45,632 por Diabetes, precedidos únicamente por las enfermedades cardiovasculares y los tumores malignos, es decir, aproximadamente el 10 % de los fallecimientos fueron ocasionados por la DM.

En el año 2000, el INEGI reportó que de 435,486 fallecimientos, 46,525 fueron causados por DM, es decir, un porcentaje del 10.7, este dato sugiere que uno de cada diez mexicanos pierde la vida por causa de la DM, precedido de enfermedades isquémicas del corazón, cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado.

En el año 2003, según estadísticas de la Secretaría de Salud, en México se registraron 59,119 fallecimientos a causa de la DM, es decir, del total de muertes en ese año el 12,6 % fueron causadas por esta enfermedad.

Como se puede observar los niveles de fallecimientos ocasionados por DM incrementan cada año, lo que coloca a esta enfermedad como uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad. Su alta prevalencia la ha colocado como: la tercera causa de muerte en general, la primera causa de amputaciones no traumáticas, la primera causa de ceguera, la primera causa de enfermedades renales y la segunda causa de enfermedades cardiovasculares.

1.5 SÍNTOMAS Y COMPLICACIONES

En sus inicios la DM cursa asintóticamente pero, más tarde, como resultado de la alta concentración de glucosa en sangre comienzan a aparecer complicaciones y es hasta entonces cuando se diagnostica.

Los primeros síntomas que se presentan son: poliuria (eliminación excesiva de orina), debido al efecto diurético osmótico de la glucosa en el túbulo renal, polidipsia (ingestión excesiva de agua), debido a la deshidratación ocasionada por la poliuria, polifagia (ingestión excesiva de alimentos), pérdida de peso y astenia (falta de energía).

Las complicaciones generadas por la hiperglucemia crónica son: las neuropatías (daño a sistema nervioso), las retinopatías (daño ocular) y las nefropatías (daño renal), aunque el principal padecimiento que se presenta son las enfermedades cardiovasculares.

Además, la deficiencia en la secreción de insulina produce alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos, las cetonas y los aminoácidos. Las alteración del metabolismo de los lípidos durante la DM ocasiona hipertensión, aterosclerosis y dislipidemia, lo que incrementa la incidencia de cardiopatías y vasculopatías (Hernández y Olaíz, 2002).

a. ALTERACIONES EN MÚSCULO LISO

Entre las complicaciones de la DM, las alteraciones vasculares constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes diabéticos (Stamler *et al.*, 1993).

Las alteraciones vasculares que aparecen durante el curso de esta enfermedad (macroangiopatía y microangiopatía) afectan tanto a la estructura como a la funcionalidad de los vasos sanguíneos pudiendo modificar el tono normal del músculo liso vascular y contribuir al desarrollo de otras complicaciones a largo plazo como son cardiopatías, accidentes cerebro-vasculares, hipertensión, retinopatías, neuropatías y nefropatías (García et al., 1974; Crepaldi y Nosadini, 1988; Kastrup, 1988; Jarret, 1989).

La DM se ha asociado a hiperreactividad del músculo liso, este fenómeno se atribuye a un aumento en la respuesta contráctil a diversos agentes adrenérgicos, debido a un incremento en la actividad de los canales de calcio en células del músculo liso vascular (Agrawal y McNeil, 1987), a una alteración de la distribución de Ca_{+2} subcelular o a un aumento de anión superóxido O_2^- (Fleischhecker et al., 1999), aunque estas alteraciones también pueden estar asociadas a la sobreproducción de factores angiogénicos y citocinas por parte del hígado, desarrollando aterosclerosis (Takumara et al., 2004).

También se ha publicado que estas alteraciones pueden ser producto de la reducción en el efecto relajante por la liberación de prostaglandinas vasoconstrictoras derivadas del endotelio (Carvalho y Coelho, 2004)

Por otra parte, se ha observado que la DM provoca una acumulación excesiva de colágeno en la pared arterial como consecuencia de la estimulación de la síntesis del mismo (Hamlin *et al.*, 1975) y del aumento de la glucosilación no enzimática del colágeno que se produce en las arterias (Rosenberg *et al.*, 1979; Brownlee y Cerami, 1981; Brownlee *et al.*, 1986). Además, las fibras de colágeno

que se forman en los tejidos diabéticos son generalmente más rígidas y resistentes a la solubilización y digestión enzimática. Por todo lo anterior, la secreción aumentada de colágeno por los fibroblastos en respuesta a altas concentraciones de glucosa contribuye de forma importante a los cambios estructurales y funcionales que se producen en el músculo liso de diabéticos (Kennedy y Baynes, 1984). El engrosamiento del músculo liso arterial produce una disminución del gradiente de oxígeno transarterial (Santilli *et al.*, 1993) y, consecuentemente, se produce una hipoxia en la pared arterial que también contribuye a la formación de lesiones arterioscleróticas, así como al desarrollo de complicaciones no vasculares tales como la neuropatía y la nefropatía.

b. DAÑO ENDOTELIAL

En condiciones normales el endotelio mantiene en balance las actividades antifibrinolítica y protrombogénica, inhibe la adhesión de plaquetas y de leucocitos en la pared vascular y regula la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Durante la DM, el endotelio sufre alteraciones que impiden su correcto funcionamiento, ocasionando daño vascular y finalmente deterioro de los órganos. A estas alteraciones se les conoce como síndrome de disfunción endotelial (Goligorsky *et al.*, 2001).

1.6 ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUINEOS

Todos los vasos sanguíneos, excepto los capilares; están constituidos básicamente por tres capas (figura 1):

1. Túnica íntima: formada por células endoteliales recubiertas por una delgada capa de tejido conectivo.
2. Túnica media: compuesta por células de músculo liso vascular y es la responsable de la fuerza mecánica y contráctil de los vasos.
3. Túnica adventicia: organizada a manera de un revestimiento de tejido conectivo que sirve para mantener los vasos sanguíneos en su lugar.

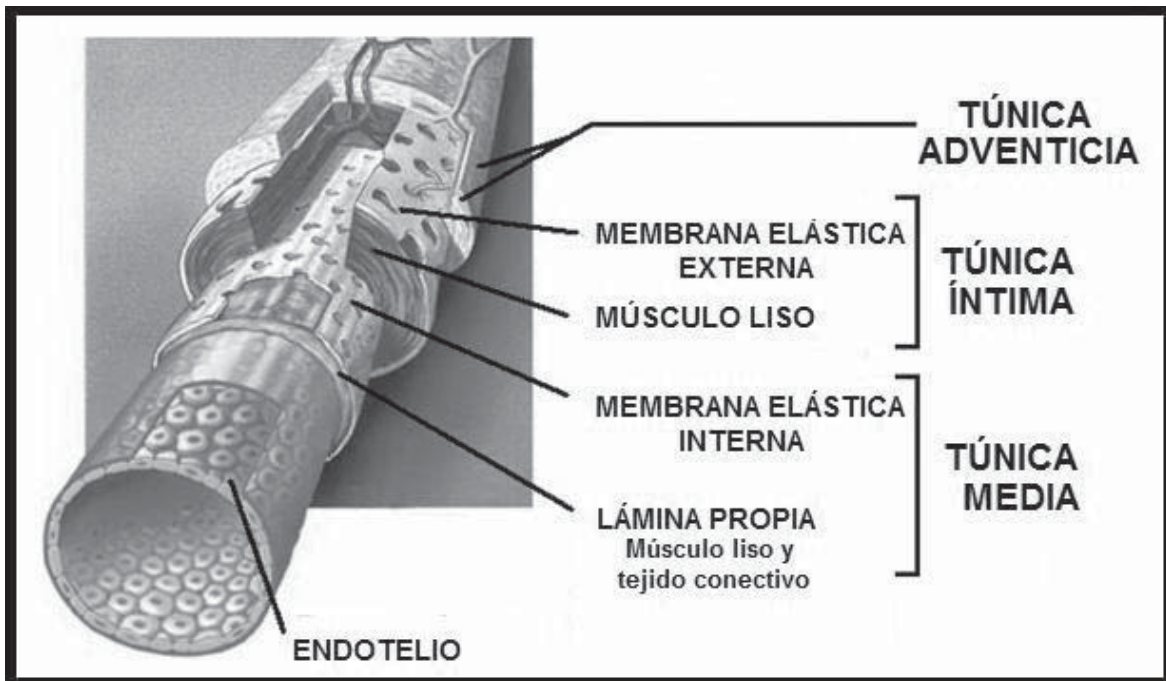


Figura 1. Estructura anatómica de un vaso sanguíneo donde se muestran las diferentes capas que lo constituyen.

1.7 PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR

Las células endoteliales juegan un papel crucial en el control del tono vascular del músculo liso, participando directamente en la síntesis y liberación de muchos mediadores vasoactivos.

Al endotelio, anteriormente se le consideraba como una monocapa de células que delimitaba el interior de los vasos sanguíneos y que actuaba como barrera entre el plasma y el tejido y cuya única función era evitar el desgaste del músculo liso vascular, pero fue hasta el siglo XX que se le reconoció como un importante regulador de la función vascular (Hurairah y Ferro, 2004).

Unas de las primeras investigaciones que sugerían que el endotelio tenía una función más allá que la de servir como una simple barrera entre los compartimentos intravasculares e intersticial fue la realizada por Furchgott y colaboradores (1980), quienes reportaron que anillos de aorta torácica de conejo con endotelio mostraban relajación, de manera dependiente de la concentración, a la acetilcolina (ACh) en presencia de endotelio y respuesta nula en ausencia de endotelio. Esto dio origen a la hipótesis de que el endotelio liberaba una sustancia responsable de la relajación inducida por la ACh a la cual llamaron “factor relajante derivado del endotelio”.

Sin embargo, 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).

Más tarde, Furchgott y colaboradores (1984) demostraron que el tono vascular podía ser modificado por una gran variedad de sustancias relajantes producidas por el endotelio, a las cuales llamaron “vasodilatadores dependientes del endotelio”.

El factor relajante derivado del endotelio descrito por Furchgott fue identificado después como óxido nítrico (NO) por dos grupos independientes Ignarro y Moncada (Ignarro, 1987; Moncada, 1987).

Ahora se reconoce que el endotelio es un órgano responsable de regular procesos hemodinámicos, metabólicos, sintéticos, inflamatorios, antitrombogénicos, protrombogénicos y de remodelado vascular (Goligorsky et al., 2001) capaz de producir factores relajantes (óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado del endotelio y prostglandinas I₂) y factores contráctiles (endotelinas, angiotensina II, aniones superóxido, tromboxano A₂ prostaglandinas 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).

a. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El NO es un vasodilatador que es sintetizado a partir de la L-Arginina y oxígeno molecular, produciendo NO y L-Citrulina. Esta reacción es catalizada por

la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se han identificado tres isoenzimas diferentes de la NOS (Moncada *et al.*, 1997):

NOS1: También conocida como óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), se encuentra predominantemente en el sistema nervioso central y periférico, en las células epiteliales del pulmón, el hígado y el estómago, en las plaquetas y en las células del islote pancreático.

NOS2: Es la forma inducible del óxido nítrico sintasa (iNOS) se encuentra predominantemente en macrófagos, neutrófilos y en menor proporción en hepatocitos y células del músculo liso.

NOS3: Es la óxido nítrico sintasa de tipo endotelial (eNOS), se encuentra en células endoteliales y en menor proporción en miocitos cardíacos, células del mesangio renal y osteoblastos. Se encuentra constitutivamente en las células endoteliales y es la responsable de la síntesis de NO de manera basal y en respuesta a estímulos vasoconstrictores.

El NO puede ser sintetizado por las células del endotelio en respuesta a un estímulo físico (cambios en la presión arterial) o a mensajes químicos (acetilcolina, ácido araquidónico y agonistas β -adrenergicos como catecolaminas). La mayoría de las acciones fisiológicas del NO ocurren por la activación de la forma soluble de la guanilato ciclasa en las células blanco (plaquetas, células del músculo liso vascular), por unión al grupo hemo de esa enzima. La activación de la guanilato ciclasa produce la acumulación del segundo mensajero GMPc (guanilil monofosfato cíclico), que a su vez activa a la proteína cinasa dependiente de

GMPc y como consecuencia final se produce la relajación del músculo liso vascular y el decremento de las concentraciones del Ca^{+2} intracelular.

Los efectos biológicos del NO en el control del tono vascular son atenuados por la presencia de especies reactivas derivadas del oxígeno, en particular el anión súperoxido (O_2^-) y en menor proporción el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-). Las células endoteliales pueden liberar O_2^- , generado por varias enzimas incluyendo propia NOS, cuando la cantidad de L-Arginina es deficiente. El O_2^- es convertido en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El O_2^- reacciona rápida y espontáneamente con el NO produciendo peroxinitrito (ONOO^-), un particularmente poderoso agente citotóxico. (Hurairah y Ferro, 2004).

b. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandina I_2 (PGI_2) es conocida como prostaciclina. Fue descubierta por Vane y colaboradores a mediados de 1970 y se produce por las células endoteliales y la túnica íntima. PGI_2 es un derivado del ácido araquidónico y se forma a partir del sistema de las ciclooxigenasas (COX).

Actualmente se conocen tres tipos de isoformas:

COX1: Se expresa constitutivamente en diversos tejidos, entre ellos el endotelio. Esta isoforma es la encargada de la producción de PGI_2 .

COX2: Se creía que esta isoforma es de naturaleza inducible pero se localiza en el riñón de manera constitutiva. Es la responsable de la sobreproducción de prostaglandinas en condiciones patológicas como la inflamación crónica.

COX-3: Recientemente descubierta en corteza cerebral canina. Esta isoforma es inhibida por drogas antipiréticas y analgésicas, por lo que podría estar involucrada en el mecanismo central primario por el cual ejercen su acción (Chandrasekaran, 2002).

Tanto COX-1 como COX-2 catalizan los dos primeros pasos de la síntesis de prostaglandinas, la oxidación del ácido araquidónico que produce el hidroperoxi-endoperóxido PGG₂ y su reducción a hidroxí-endoperóxido PGH₂. La PGH₂ se transforma por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos en prostanoides primarios (PGE₂, PGF_{α2}, PGD₂, PGI₂ y tromboxano A₂ (Vane et al., 1998)

La PGI₂ ejerce sus efectos vasodilatadores vía proteína G al estimular receptores específicos llamados IP. La estimulación de los receptores IP activa a la enzima intracelular adenilato ciclasa, lo que incrementa los niveles de AMPc intracelular. AMPc activa a la proteína cinasa A (dependiente de AMPc) con la consecuente decremento de la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) causando vasodilatación. PGI₂ también activa un receptor nuclear, el receptor activado por el proliferador de peroxisomas α (PPARα). La activación del receptor PPARα junto con la estimulación del receptor IP pueden producir la vasodilatación en la vasculatura. (Hurairah y Ferro, 2004).

2.- ANTECEDENTES DIRECTOS

Como se ha visto anteriormente, el endotelio juega un papel fundamental en la regulación contráctil de los vasos sanguíneos, debido a su capacidad de sintetizar sustancias vasoactivas y a la sensibilidad que presenta ante agentes contráctiles. En este sentido, se ha observado que la remoción del endotelio en arterias y venas aumenta la sensibilidad del músculo liso a diferentes agentes contráctiles (Criscione et al., 1984; Egleme et al., 1984; Bullock et al., 1986). La disminución de la contracción en arterias con endotelio se atribuye a la liberación del óxido nítrico, ya que la inhibición de su síntesis imita los efectos de la remoción del endotelio (Dohi et al., 1996; Dowell et al., 1999; Matsuda et al., 2000).

Zhu y colaboradores (2001), reportaron que las respuestas contráctiles a la fenilefrina en aorta de rata diabética cambia con el curso de la DM y que la cantidad de calcio intracelular y extracelular es la responsable de las alteraciones de la respuesta contráctil en DM.

Durante la DM se observa una disminución en la síntesis de óxido nítrico, como consecuencia del daño endotelial sufrido durante esta patología. Por lo que la remoción del endotelio podría simular el daño endotelial y por consiguiente la disminución en la producción del óxido nítrico. Lo que lleva a proponer que la disminución de la síntesis de óxido nítrico, está relacionada con el incremento de la resistencia periférica y con las complicaciones vasculares asociadas a la DM.

En la DM experimental en ratas se produce un aumento en la contracción de arteria aorta, debido principalmente al aumento de adrenoreceptores α_{1D} y posiblemente α_{1B} (Castro-Moreno, 2006).

Fabiano (2002) encontró que en ratas con DM experimental de una semana, no hay diferencia en el efecto máximo y en la sensibilidad a fenilefrina respecto a los controles, sin embargo; a las 4 semanas de diabetes se incrementan dichos valores. Por otro lado, al utilizar indometacina en las ratas de 4 semanas con DM, se reduce el pD2 y el Emax. Estos resultados sugieren que la DM induce cambios dependientes del tiempo en la reactividad vascular a fenilefrina. Aunque dicha respuesta no parece estar relacionada con la reducción de NO (contrariamente, parece deberse a un aumento), pero puede deberse a un incremento en las prostaglandinas H_2 (PGH₂)/ Tromboxano A₂ y/o un aumento en flujo extracelular de Ca⁺².

La DM puede modificar selectivamente la liberación de prostaglandinas desde el músculo liso vascular, la conservación basal de prostanoïdes vasodilatadores y la abolición en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores estimulados por agonistas adrenérgicos (Carvalho, 2003).

Trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio mostraron que en ratas diabéticas se incrementa el efecto máximo (Emax) y la sensibilidad a fenilefrina (pD2). Los resultados indican que la DM altera la expresión de los receptores α_1 , sugiriendo que el aumento en la respuesta contráctil en arterias de ratas diabéticas se debe a un incremento en los receptores α_{1D} y posiblemente α_{1B} . En estos resultados se descarta la influencia de sustancias vasoactivas (PG y NO).

3.- JUSTIFICACIÓN

La DM como consecuencia de la hiperglucemia crónica conduce a diversas complicaciones como neuropatías, retinopatías o nefropatías, aunque el principal padecimiento que se presenta son las enfermedades cardiovasculares. La incidencia de esta enfermedad va en aumento de tal manera que se le ha llegado a considerar como un grave problema de salud pública.

Existen innumerables trabajos que señalan que el aumento de glucosa es el principal determinante del daño en los vasos sanguíneos, provocando un aumento en la respuesta contráctil a diversos agentes, como los adrenérgicos, sin embargo; se conoce poco acerca de los mecanismos intracelulares que contribuyen a su alteración.

Por consiguiente, en este trabajo se determinó la funcionalidad endotelial inhibiendo óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasas para evaluar el daño a nivel vascular durante la DM, a corto y largo plazo.

4.- HIPÓTESIS

La participación del óxido nítrico y de las prostaglandinas endoteliales se altera durante la diabetes mellitus experimental en la rata.

5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del óxido nítrico y de las prostaglandinas en aorta abdominal de ratas diabéticas de diferentes edades.

6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.1. Reproducir el modelo de Diabetes Mellitus experimental en ratas, utilizando estreptozotocina.

6.2. Evaluar la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en aorta con y sin endotelio de rata diabética en presencia de L-NAME.

6.3. Evaluar la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en aorta con y sin endotelio de rata diabética y control en presencia de indometacina.

7.- METODOLOGÍA

7.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se tomaron 24 ratas Wistar macho de 6 semanas de edad y se dividieron en dos grupos de 12 ratas. Al primer grupo se le inyectó estreptozotocina y se le denominó DM y al segundo grupo se le llamó control. Las ratas se sacrificaron en atmósfera de CO₂. Se les aisló la aorta abdominal, seccionándola y colocándolas en cámaras para tejido asilado. Posteriormente se realizó una curva concentración-respuesta a fenilefrina, midiendo la contracción con ayuda de un transductor de tensión.

7.2 DESARROLLO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

a. INDUCCIÓN DE DIABETES

La inducción de DM se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (55mg/Kg), este agente químico, actúa destruyendo las células β -pancreáticas por lo que provoca diabetes tipo 1. El efecto tóxico está relacionado con alteraciones morfológicas de la membrana de las células β -pancreáticas y con un aumento de la permeabilidad de dicha membrana celular (Weaver *et al.*,1978; Bell y Hye, 1983).

Las ratas controles fueron tratadas con solución salina al mismo volumen. Sólo se consideraron como diabéticas a las ratas que presentaban un concentración de glucosa en sangre >200 mg/dl.

Se estudiaron las arterias de ratas con 7 y 18 semanas con diabetes. Los niveles de glucosa en sangre se monitorearon periódicamente hasta el día del sacrificio.

b. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Los animales fueron sacrificados en atmósfera de CO_2 , Después se realizó una incisión vertical en el abdomen de la rata, quedando descubiertos los órganos y permitiendo la extracción de la arteria aorta. Una vez aislada la arteria se limpio de tejido conectivo y grasa, después se seccionó en anillos de 3-5mm de longitud y a la mitad de los anillo se les removió el endotelio con un dispositivo metálico rugoso, frotando la parte interna de la arteria (Furchgott y Zawadzki, 1980); con lo anterior se evita la participación de factores vasoactivos provenientes del endotelio.

c. PREPARACIÓN DE ÓRGANO AISLADO

Las cámaras para órgano aislado (figura 2) permiten proporcionar las condiciones necesarias para mantener viable el tejido, esto se logró manteniendo el tejido a una temperatura de 37°C , adicionando en cada cámara 10ml de solución Krebs (ver anexo, Tabla 1) y burbujeo constante de carbógeno (Ibarra et al., 2000). Los anillos de aorta se colocaron en las cámaras con ayuda de ganchos de nikrom. Estos ganchos sujetaron al anillo por la parte inferior a la base de la

cámara y por la parte superior al transductor de tensión (figura 2) que a su vez está acoplado a un sistema de adquisición de datos que registra los cambios en la tensión isométrica que se produce en los anillos de la arteria.

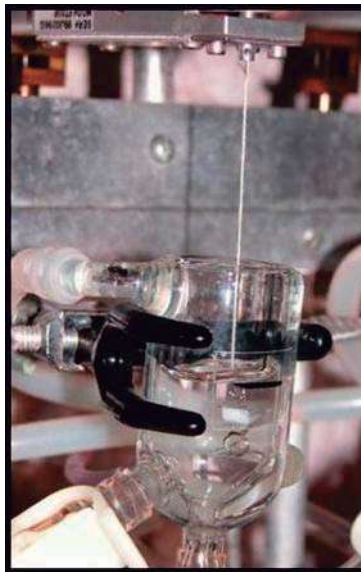


Figura 2. Cámara para órgano asilado. Permite proporcionar las condiciones necesarias para mantener viable el tejido. El anillo es sujetado por la parte superior con ganchos de nikrom que están conectados a un sistema de trasducción de tensión y por la parte inferior se sujeta a la cámara.

d. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA FENILEFRINA

Antes de comenzar con la curva concentración-respuesta a los anillos se les dió una tensión inicial de 3g y se dejó reposar el tejido por 20 minutos. Después se sensibilizó el tejido con fenilefrina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) en tres ocasiones a

intervalos de 30 minutos y lavando con solución Krebs entre cada sensibilización. En la tercera ocasión se adicionó carbacol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) para confirmar la ausencia o presencia de endotelio y su integridad (Furchgott y Zawadzki, 1980).

Terminada la sensibilización se hicieron 2 lavados a intervalos de 15 minutos con solución Krebs, esto para reestablecer el tejido. Transcurrido este tiempo se ajustó a 10ml el volumen de Krebs contenido en las cámaras y se adicionaron 100 μl de rawolscina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) y 100 μl de propranolol (1×10^{-6}) que son antagonistas adrenérgicos α_2 y β , respectivamente. Las preparaciones se dejaron en incubación por 30 minutos y posteriormente se inició con la curva control, comenzando con la solución de fenilefrina $1 \times 10^{-9} \text{M}$ y terminando con $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

Terminada la curva control se lavó el tejido con solución Krebs en 2 ocasiones a intervalos de 15 minutos cada uno. Nuevamente se ajustó el volumen de las cámaras a 10ml de solución Krebs y se adicionó rauwalcina y propranolol ambas soluciones a $1 \times 10^{-6} \text{M}$ y dejando incubar el tejido por 30 min. Pasado este tiempo se comenzó con la curva concentración-respuesta adicionando indometacina (inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas; $1 \times 10^{-5} \text{M}$) y L-NAME (inhibidor no selectivo de las óxido nítrico sintasas; $1 \times 10^{-4} \text{M}$), cada uno de estos inhibidores se probó en anillos con y sin endotelio.

e. EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DE LAS PROSTAGLANDINAS.

Para medir la participación del óxido nítrico y de las prostaglandinas en la modulación de la contracción, se usaron inhibidores de las enzimas que sintetizan estas sustancias vasoactivas. Para el óxido nítrico se utilizó L-NAME y para el

caso de las prostaglandinas se usó indometacina. Estos inhibidores se usaron en arterias con y sin endotelio de ratas control y diabéticas.

8.- RESULTADOS

8.1 INDUCCIÓN DE DIABETES

Una vez inducida la diabetes se consideraron como diabéticas a las ratas que presentaban un concentración de glucosa en sangre >200 mg/dl.

El peso y la glucosa en sangre de las ratas fueron registrados desde el día de la inducción de DM y hasta el día del sacrificio, obteniéndose los siguientes valores.

Tabla 1. Muestra el registro de valores de glucosa sanguínea (mg/dL) y peso (g) de ratas wistar macho controles y diabéticas de 7 y 18 semanas de edad. $n=6$ por grupo; $*p < 0.05$ vs. control.

	GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL)	PESO (g)
CONTROL		
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*

Se puede observar que el peso de las ratas control aumentó casi el doble a las 18 semanas, con respecto a las 7 semanas; mientras que en las ratas diabéticas se observó que prácticamente no aumentaron de peso a las 18 semanas, incluso hubo una ligera disminución del 3%.

Las ratas de 7 semanas, tanto las ratas controles como las diabéticas no presentaron diferencia significativa de peso. Por otro lado, se observó una

dramática disminución de peso de un 40% en las ratas diabéticas a las 18 semanas en comparación con las controles.

Además, se mostró claramente que los niveles de glucosa de las ratas control de 7 y 18 semanas permanecen dentro de los valores normales, mientras que las ratas diabéticas presentaron un incremento en los valores de hasta un 500% en comparación con las ratas control.

8.2 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA FENILEFRINA

La fenilefrina produjo, en todos los casos, una contracción dependiente de la concentración, es decir, se observó una clara relación entre la contracción de la aorta abdominal y la concentración de la fenilefrina agregada hasta alcanzar el efecto máximo. Por otro lado, se evidenció la participación del endotelio en la modulación de la contracción, ya que se observó una desviación de la curva hacia la izquierda en arterias sin endotelio con respecto a las arterias con endotelio. Lo anterior es un indicador de un aumento en la sensibilidad a la fenilefrina en ausencia del endotelio.

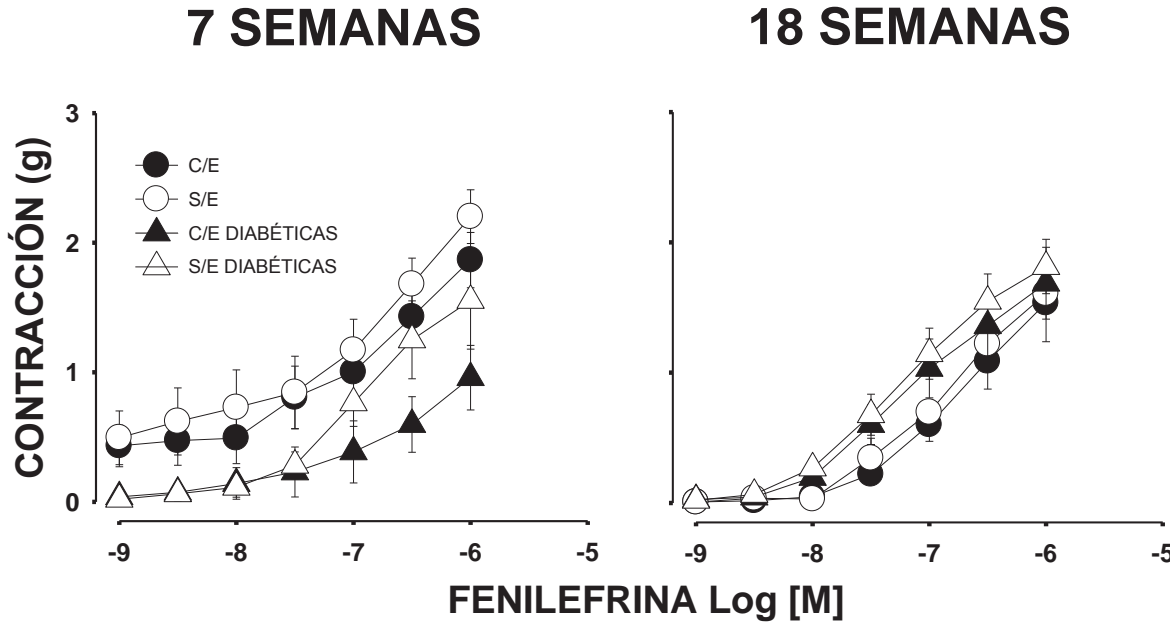


Figura 3. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta abdominal, con y sin endotelio, de ratas controles y diabéticas de 7 y 18 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm e.e. 4-6 anillos arteriales.

Las arterias de las ratas de 7 semanas, tanto controles como diabéticas, fueron más sensibles a la fenilefrina, ya que comenzaron a contraer desde 1×10^{-9} M; mientras que las arterias de las ratas de 18 semanas comenzaron a contraer hasta la concentración $1 \times 10^{-7.5}$ M. Las arterias de las ratas controles de 7 semanas mostraron actividad contráctil mayor en comparación con las arterias de las ratas controles de 18 semanas. Las arterias de las ratas diabéticas mostraron un ligero incremento en la sensibilidad a la fenilefrina, mientras que las arterias de las ratas controles perdieron sensibilidad (figura 3).

En general, las arterias de ratas tanto controles como diabéticas presentaron una sensibilidad menor a la fenilefrina con el transcurso del tiempo, esto puede ser debido a la presencia de disfunción endotelial debida a la edad (Figura 3).

8.3 EFECTO DEL L-NAME EN LA RESPUESTA CONTRÁCTIL A LA FENILEFRINA

Para evaluar el efecto de la inhibición del NO en la respuesta contráctil se usaron arterias, con y sin endotelio, de ratas control y diabéticas de 7 y 18 semanas, en presencia de L-NAME y se realizó una curva concentración-respuesta a la fenilefrina. Se observó que la contracción de las arterias es dependiente de la concentración de fenilefrina y que las arterias sin endotelio contrajeron más que las arterias con endotelio, evidenciando nuevamente la participación del endotelio en la modulación del tono vascular.

La adición de L-NAME eliminó el efecto vasodilatador compensatorio que ejerce el NO en respuesta a estímulos vasoconstrictores, lo que se traduce en un incremento en la contracción de las arterias. Este efecto se observó tanto en ratas control como diabéticas.

A las 7 semanas, las arterias de las ratas control comenzaron a contraer desde la concentración $1 \times 10^{-9} \text{M}$, mientras que las arterias de las ratas diabéticas lo hicieron hasta la concentración de $1 \times 10^{-7.5} \text{M}$; lo que indicó que las arterias de las ratas control presentan mayor sensibilidad a la fenilefrina que las diabéticas. Las curvas de las arterias incubadas con L-NAME tanto de las ratas control como de las diabéticas se desplazaron a la izquierda, es decir, la inhibición del óxido nítrico incrementó la sensibilidad a la fenilefrina e imitó la remoción del endotelio. La diferencia en la actividad contráctil entre las arterias de las ratas control y las diabéticas muestra el daño endotelial ocasionado por la DM (figura 4).

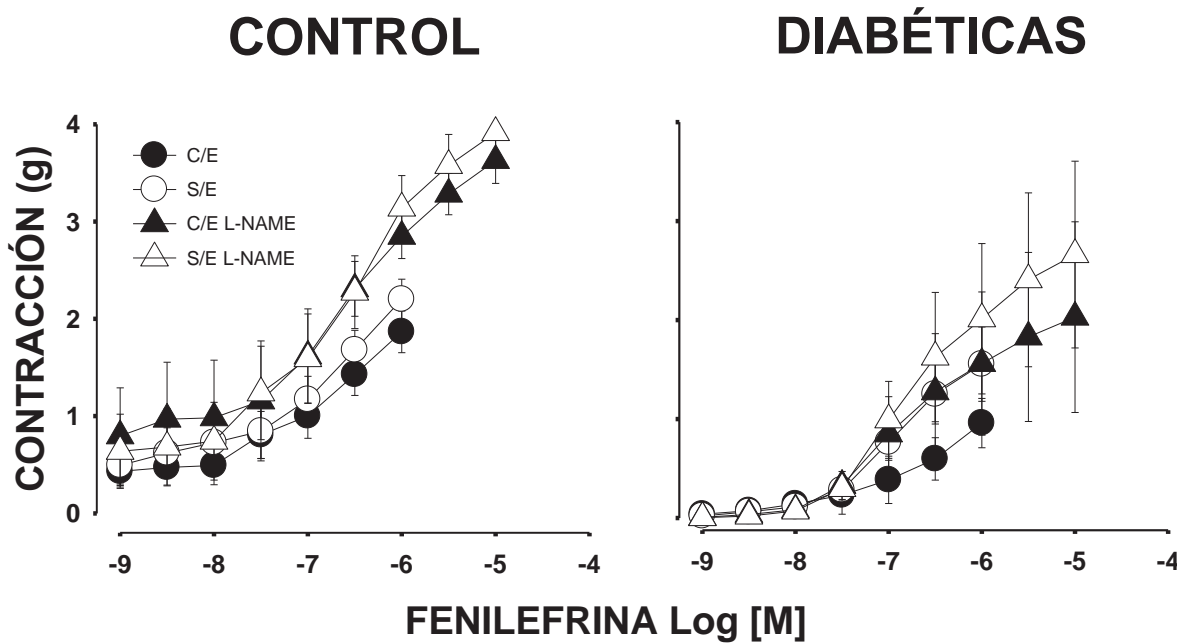


Figura 4. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta abdominal, con y sin endotelio, en presencia y en ausencia de L-NAME provenientes de ratas controles y diabéticas de 7 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm e.e. 4-6 anillos arteriales.

Por otro lado, a las 18 semanas se observó que las arterias de ratas control comenzaron a contraer a concentración de 1×10^{-8} M y las arterias de ratas diabéticas lo hicieron a concentración de 1×10^{-9} M. En la aorta de las ratas control de 7 semanas se observó que la contractilidad en los anillos con y sin endotelio no presentó diferencias, de igual manera, la presencia de L-NAME no modificó la respuesta contráctil. En cuanto a las ratas diabéticas, la ausencia del endotelio aumentó la sensibilidad y el efecto máximo a la fenilefrina (figura 5).

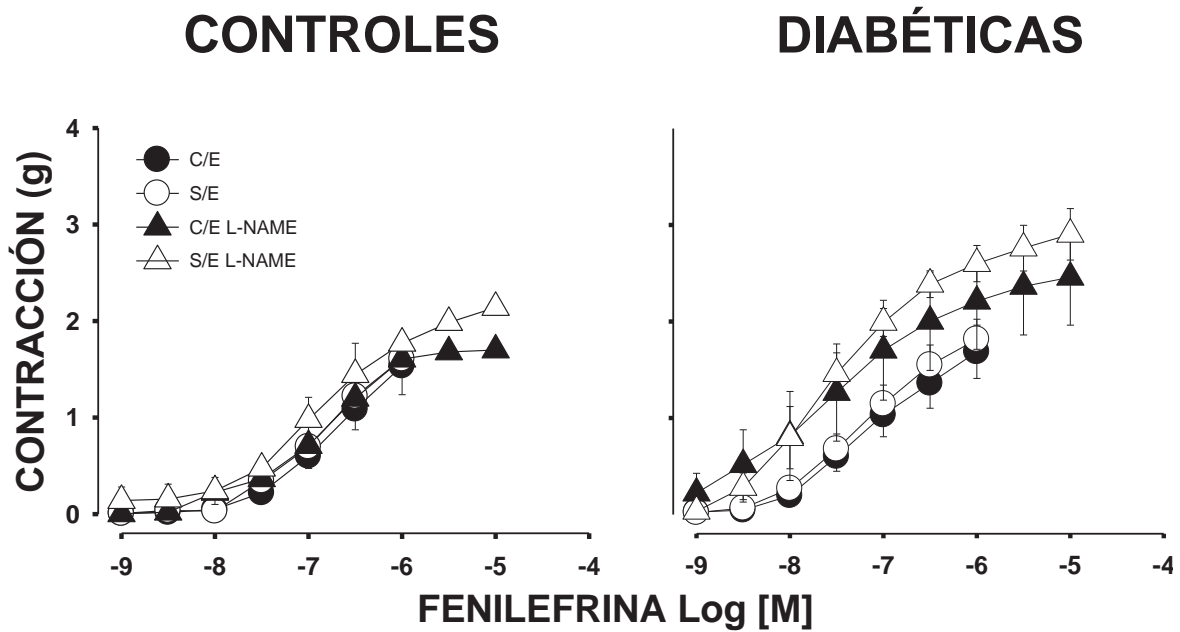


Figura 5. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta abdominal, con y sin endotelio, en presencia y en ausencia de L-NAME provenientes de ratas controles y diabéticas de 18 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm e.e. 4-6 anillos arteriales.

A las 7 semanas se observó que tanto la sensibilidad como el efecto máximo fueron mayores en los vasos, con y sin endotelio, provenientes de ratas control en presencia de L-NAME, al ser comparados con los de las ratas diabéticas. Sin embargo, esa diferencia fue mínima en los vasos de animales de 18 semanas posteriores a la inducción de la diabetes (figura 6).

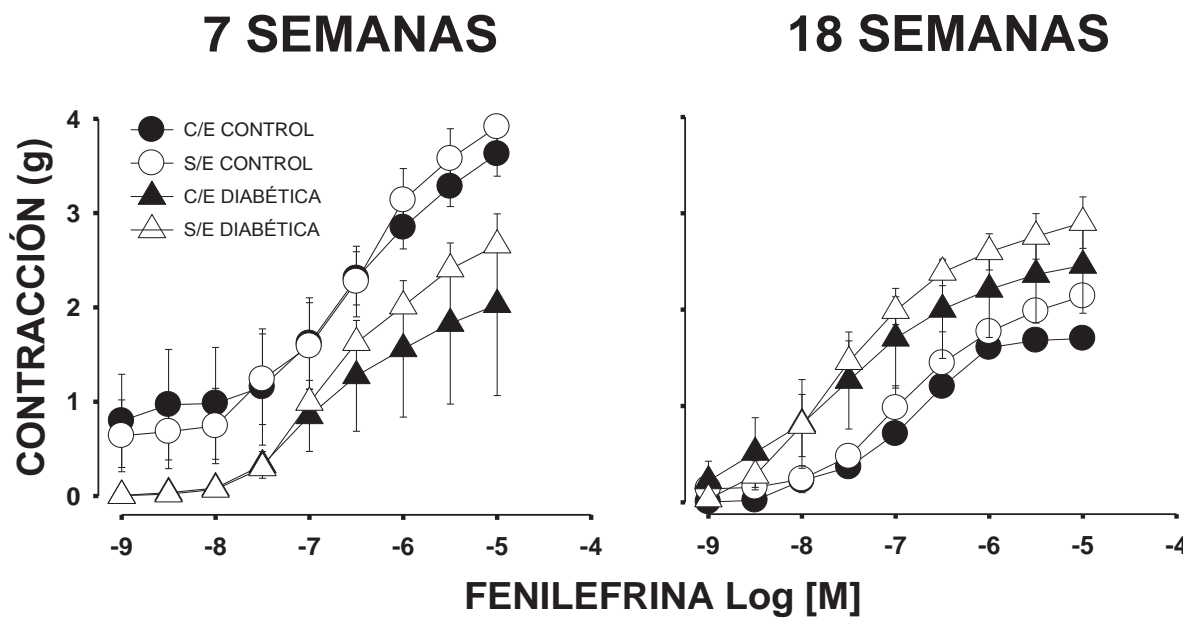


Figura 6. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en la aorta abdominal, con y sin endotelio y en presencia de L-NAME, de ratas de 7 (izquierda) y 18 semanas (derecha) posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm el e.e. de 4-6 anillos arteriales.

8.4 EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL.

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de las ciclooxygenasas, se empleó la indometacina en la respuesta contráctil de arterias de ratas control y diabéticas, con y sin endotelio, de 7 y 18 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Se observó que la adición de la indometacina eliminó la participación de las prostaglandinas en la regulación del tono vascular, tanto a las 7 (figura 7) como a las 18 semanas (figura 8), es decir, se presentaron curvas desplazadas hacia la derecha y no alcanzaron los efectos máximos, con respecto a sus controles, siendo este efecto más marcado en los vasos de los animales control.

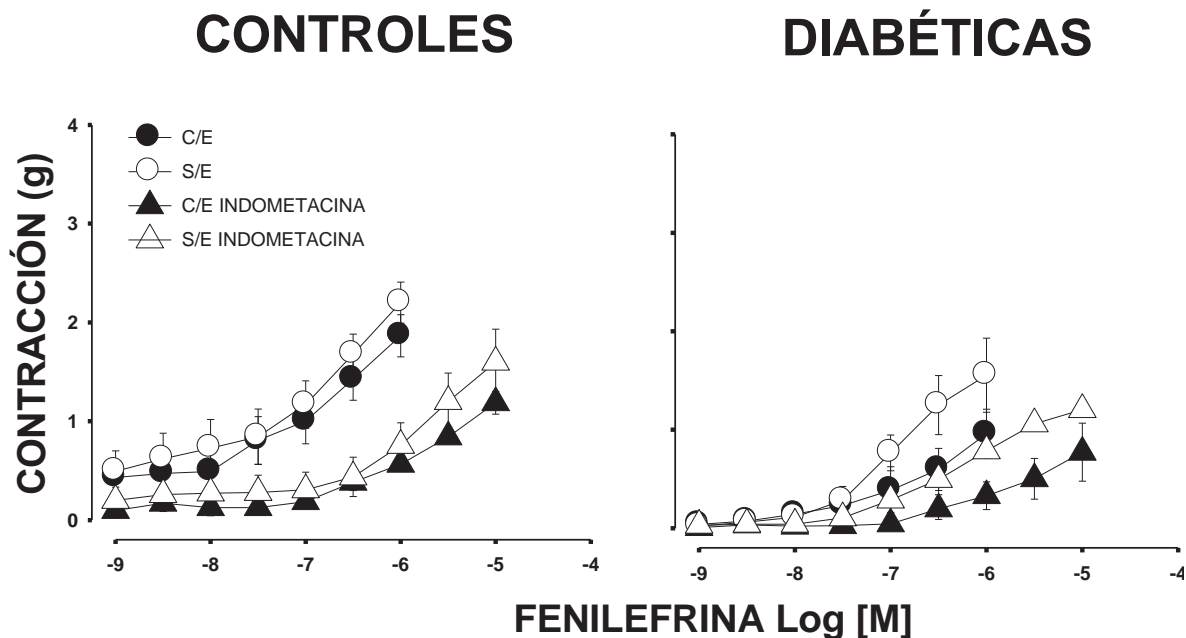


Figura 7. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta abdominal, con y sin endotelio, en presencia y en ausencia de indometacina provenientes de ratas controles y diabéticas de 7 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm e.e. 4-6 anillos arteriales.

Llama la atención que los anillos sin endotelio también muestran un desplazamiento lo cual puede sugerirnos la producción de un factor contráctil, dependiente de las COXs en el músculo liso y del el endotelio (figuras 7 y 8). Por otro lado, se apreció un desplazamiento de las curvas hacia la derecha en los vasos de animales diabéticos al compararlos con los de los controles a las 7 semanas (figura 7), mientras que las ratas de 18 semanas no presentaron gran diferencia entre las ratas control y las diabéticas (figura 8).

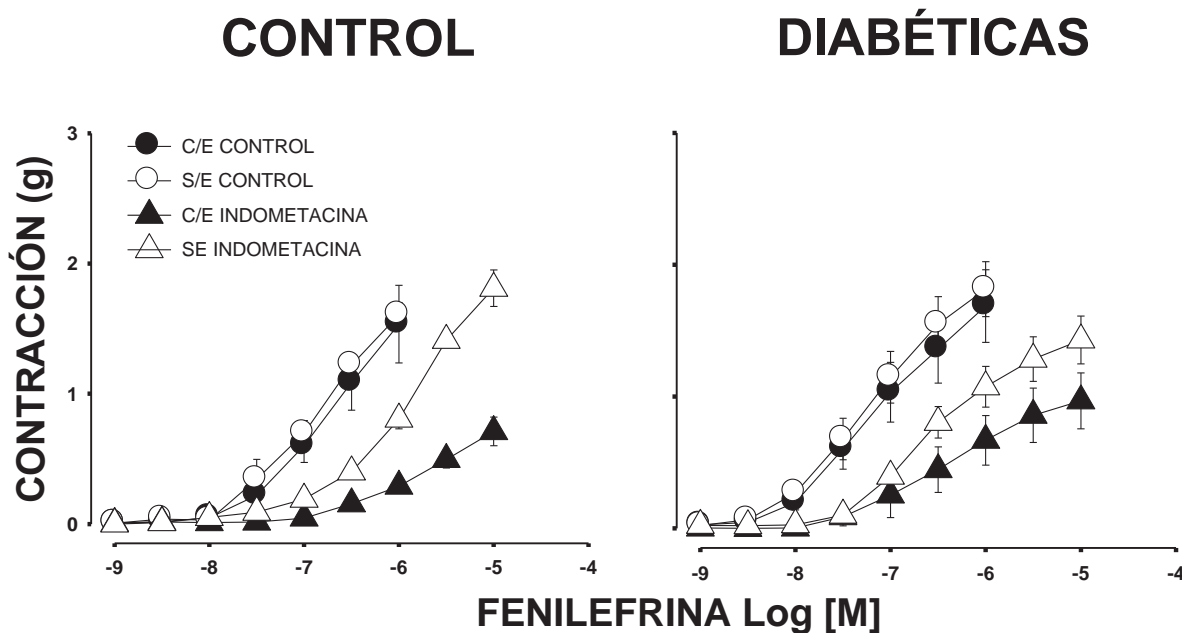


Figura 8. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta abdominal, con y sin endotelio, en presencia y en ausencia de indometacina provenientes de ratas controles y diabéticas de 18 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm e.e. 4-6 anillos arteriales.

Tanto las arterias de ratas control como diabéticas con y sin indometacina, el umbral de respuesta a la fenilefrina fue a la concentración de $1 \times 10^{-7.5} \text{M}$ y al comparar sólo las respuestas de los vasos con indometacina, a las diferentes edades, estos no mostraron diferencias significativas entre sí, ni en cuanto al efecto máximo ni en cuanto a la sensibilidad a la fenilefrina (figura 9).

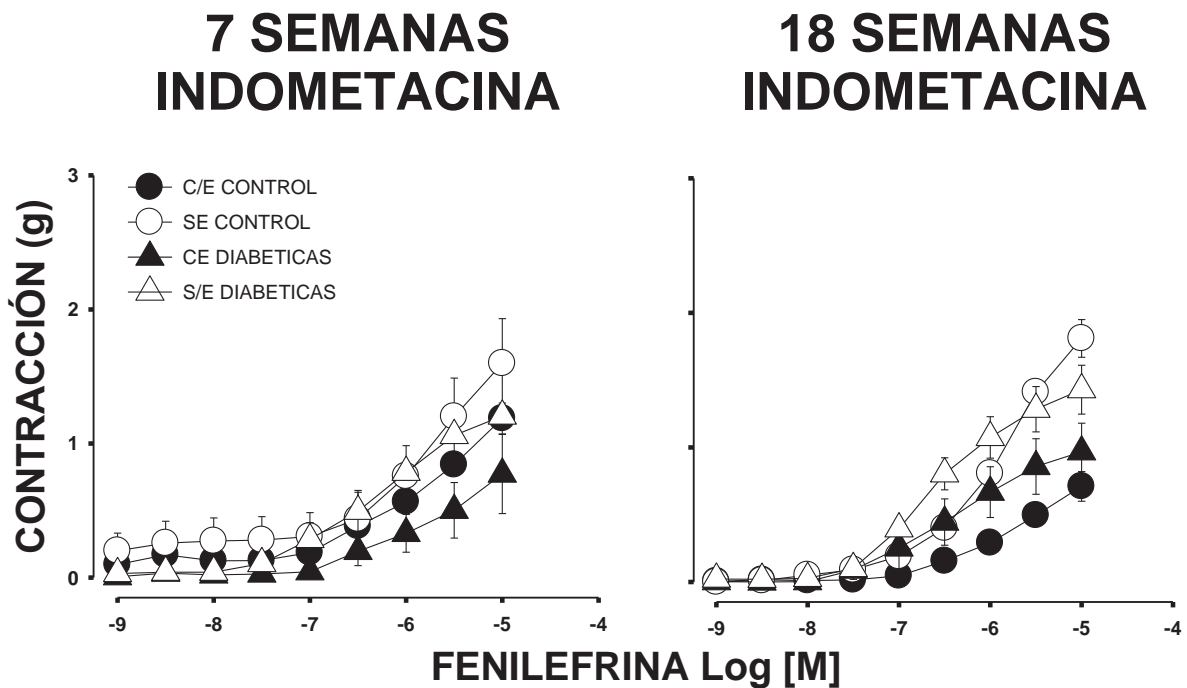


Figura 9. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en la aorta abdominal, con y sin endotelio y en presencia de indometacina, de ratas de 7 (izquierda) y 18 semanas (derecha) posteriores a la inducción de la diabetes. Cada punto representa el promedio \pm el e.e. de 4-6 anillos arteriales.

9.- DISCUSIÓN

9.1 MODELO EXPERIMENTAL.

En el presente trabajo se utilizó un modelo de diabetes química inducida experimentalmente en la rata, mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina.

Los animales tratados con estreptozotocina presentan la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, neuropatías, disfunciones arteriales coronarias, alteraciones hepáticas, traqueales, del tejido conectivo, gastrointestinales, pérdida de peso etc. (Öztürk et al., 1996).

Durante la DM, además de la hiperglucemia, el animal experimenta polidipsia, poliuria, polifagia y un descenso en su peso en comparación con los animales del grupo control, lo cual pone en evidencia el éxito de la inducción de la diabetes (tabla 1).

La disminución de peso entre las ratas control y diabéticas es consistente con lo establecido en la literatura, donde se indica que durante la DM ocurre una disminución idiopática en el peso del animal e incluso en los humanos. Para estudiar los efectos de la DM se han realizado diversas técnicas experimentales de inducción de diabetes, como pancreatectomía total o parcial y el uso de agentes químicos inductores de diabetes, de los cuales los más usados son el aloxano y la estreptozotocina que actúan específicamente sobre las células β .

9.2 DAÑO ENDOTELIAL

Como se mencionó anteriormente, el endotelio juega un papel fundamental en la regulación de la contracción vascular manteniendo el equilibrio entre las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras y dado que durante la DM ocurre lo que se conoce como disfunción endotelial (Goligorsky et al., 2001), era de esperarse que los niveles de NO y PGs sufrieran alteraciones, contribuyendo al incorrecto funcionamiento del endotelio. Sin embargo, en el presente trabajo no se determinaron las concentraciones de ON ni de PGs, sino que sólo se vio su efecto de manera indirecta, por la inhibición de su síntesis.

Las células endoteliales pueden influir, de manera importante, en la contracción de los vasos sanguíneos; de esta manera, la remoción del endotelio de arterias y venas aumenta la sensibilidad del músculo liso vascular a diferentes agentes contráctiles (Criscione et al., 1984; Egleme et al., 1984; Bullock et al., 1986). Esto se hace evidente cuando las curvas de arterias sin endotelio aparecen desplazadas hacia la izquierda con respecto a las arterias con endotelio intacto, es decir, las arterias sin endotelio contrajeron más que las arterias con endotelio.

La disminución de la contracción en arterias con endotelio se atribuye a la liberación del óxido nítrico (Dohi et al., 1996; Dowell et al., 1999; Matsuda et al., 2000), así que la remoción del endotelio, la disfunción endotelial y la inhibición de su síntesis debe incrementar la contracción en las arterias. Esto se evidenció cuando las curvas de las arterias incubadas con L-NAME se desplazaban hacia la izquierda con respecto a las arterias en condiciones control, es decir, las arterias

en las cuales se inhibió la síntesis de NO incrementaron la contracción inducida por la fenilefrina.

Estudios *in vitro* han demostrado que la acción de distintos vasoconstrictores puede verse potenciada por la ausencia de endotelio, sugiriendo que de alguna forma, el endotelio modula la respuesta contráctil del músculo liso vascular a través de la liberación de NO, el cual contrarrestaría parcialmente la acción del vasoconstrictor (Brian y Kennedy, 1993).

Los anillos con y sin endotelio de ratas control y DM mostraron un desplazamiento hacia la derecha, en presencia de indometacina, lo cual puede sugerirnos la producción de un factor contráctil, dependiente de las COXs en el músculo liso y del endotelio (figuras 6 y 7). Al igual que el NO, las PGs no se sintetiza de forma exclusiva en el endotelio ya que también las células musculares lisas pueden sintetizarlas (Hassid y Williams, 1983).

Numerosos estudios han descrito, en la DM, la existencia de una alteración de la respuesta vascular a diferentes estímulos, que puede estar relacionada con cambios en la sensibilidad de los receptores vasculares a ciertos agonistas, con cambios en la población de receptores (cantidad, tipos, etc.) o con cambios en los mecanismos reguladores de la respuesta vascular a determinados estímulos.

Por otro lado, existen varios trabajos que muestran que la vasodilatación mediada por NO está alterada en humanos y animales en las fases tempranas de

la diabetes (Gupta *et al*, 1992; Elliot *et al*, 1993; Diederich, 1997). Se ha sugerido que la diabetes podría afectar la función moduladora del NO a tres niveles: 1) modificando la síntesis del NO en las células endoteliales; 2) disminuyendo la biodisponibilidad del NO una vez liberado, como consecuencia de su inactivación por productos derivados de la glucosilación avanzada o por radicales libres; y 3) modificando la sensibilidad del "receptor", es decir, de la guanilatociclasa de la célula muscular lisa (Chan *et al.*, 2000).

10.- CONCLUSIONES

La DM altera la liberación de factores endoteliales contribuyendo a la disfunción endotelial.

Los daños ocasionados por la disfunción endotelial parecen ser dependientes de la duración de la DM.

ANEXOS

ANEXOS

- **TABLA 1**

Preparación de solución Krebs a pH 7.4 a 37°C.

COMPUESTOS	mM
KCl	4.7
NaCl	11.1
KH ₂ PO ₄	1.2
Mg ₂ SO ₄	1.2
CaCl ₂	2.5
EDTA	0.026
GLUCOSA	11.1

- **TABLA 2**

APARATO	MODELO
Trasductor de tensión	FT03 Grass forcedisplacement transducer. Astro-Med, Inc. West Wawick, RI USA.
Sistema adquisición de datos	MP100; Biopac systems Inc. Santa Barbara, CA, EUA

REFERENCIAS

Agrawal DK, Bhimji S, Mcneill JH, 1987. Effect of chronic experimental diabetes on vascular smooth muscle function in rabbit carotid artery. *J.Cardiovasc. Pharmacol.* 9: 584-593.

Bell RH, Hye RJ, 1983. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 35: 433-460.

Brian JR, Kennedy RH, 1993. Modulation of cerebral arterial tone by endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 264: H1245-H1250.

Brosky G, Logothetopoulos J, 1968. Streptozotocin induced diabetes in the mouse and guinea pig. *Fed Proc*, 27: 547.

Brownlee M, Cerami A, 1981. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50: 385-432.

Brownlee M, Vlassara H, Klooney A, Ulrich P, Cerami A, 1986. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking. *Science* 232: 1629-1632.

Chandrasekharan N.V., Hu Dai, Turepu R. L.K., Evanson K. n., Tomsik j., Elton S. T and Simmons L.D. 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 99(21): 13926-13931.

Chan NN, Vallance P, Colhoun M, 2000. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia* 43: 137-147.

Crepaldi G, Nosadini R, 1988. Diabetic cardiomyopathy: is it a real entity? *Diabetes Metab Rev* 4: 273-288.

Criscione L, Muller K, Prescott MF, 1984. Endothelial cell loss enhances the pressor response in resistance vessels. *Journal of hypertension*, 2(suppl 3):441-444.

Davis S.N. y Granner D.K. "Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. Tomado de Goodman y Gilman, Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Hardman J.G.; Limbird L.E.; Molinoff R. W.; Gilman A.G. Décima edición, Editorial MacGraw Hill; Cap 61, vol II, 2003.

Diederich D, 1997. Nitric oxide in diabetic nephropathy. En: *Nitric oxide and the kidney*, editado por M.S. Gologorski and S.S. Gross. New York: Chapman and Hall. 349-367.

Dohi Y, Kojima M, Sato K. 1996. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats, *Hypertension*, 28:732-737.

Elliot TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM, 1993. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci (Colch)* 85: 687-693.

Furchgott RF, Zawadzki JV, 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.

García MJ, McNamara P, Gordon T, Kannell WB, 1974. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 105-111.

- Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR, 1988. Mediators produced by the endothelial cell, *Hypertension*, 12:530-548.
- Gupta S, Sussman I, McArthur CS, Tornheim K, Cohen RA, Ruderman NB, 1992. Endothelium-dependent inhibition of Na⁺-K⁺ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 90: 727-732.
- Hamlin CR, Kohn RR, Luschin J, 1975. Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. *Diabetes* 24: 902-904.
- Hassid A, Williams C, 1983. Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 245: C278-C282.
- Hurairah, Ferro, 2004. The role of the endothelium in the control of vascular function. *Blackwell Publishing Ltd Int J Clin Pract*, 58, 2, 173-183.
- Jarret RJ, 1989. Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 5: 547-558.
- Kastrup J, 1988. The diabetic arteriole: the impact of diabetic microangiopathy on microcirculatory control. *Dan Med Bull* 35: 334-345.
- Kennedy L, Baynes JW, 1984. Non-enzymatic glycosylation and chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 26: 93-98.
- Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, Von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M, Bühler FR, 1990. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 66: 1088-1094.
- Matchinsky, F.M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45:223-241, 1996.
- Mathews C.K., Holde K.E y Ahern K.G. BIOQUÍMICA. Tercera edición. Editorial Pearson Addison Wesley. Cap 23, 931-944, 2002.
- Moncada S, Higgs A, Furchgott R, 1997. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.* 49:137-142.
- Moncada S, Palmer RMJ, Ferrige AG. 1987. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA, 1991. Nitric oxide: physiology, patophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Öztürk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N, 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 48: 69-112.
- Rosenberg CR, Modrak JB, Hassing JM, Al-Turk WA, Sthos SH, 1979. Glycosylated collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 91: 498-501.
- Santilli SM, Fiegel VD, Knighton DR, 1993. Alloxan diabetes alters the rabbit transendothelial wall oxygen gradient. *J Vasc Surg* 18: 227-233.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Went-Worth D, 1993. The multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16: 434-444.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM, 1998. Cyclooxygenases 1 and 2: Annual review of pharmacology and toxicology, 38:97-120.

Weaver DC, McDaniel ML, Naber SP, Barry D, Lacy PE, 1978. Alloxan stimulation and inhibition from isolated rat islets of Langerhans. Diabetes 27: 1205-1214.