



UNIVERSIDAD MICHOACAN
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGIA

***“EFECTO DE LA GLUCOSA A CONCENTRACIONES
ELEVADAS SOBRE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL A LA
FENILEFRINA EN AORTA TORÁCICA DE RATA”***

TESIS QUE PRESENTA

ELISEO ESTRADA SUÁREZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS

D.C DANIEL GODÍNEZ HERNADEZ

MORELIA MICHOACÁN, AGOSTO DEL 2010

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Lista de abreviaturas	7
Resumen	9
I.- INTRODUCCIÓN.....	10
1.- Hiperglucemia: Definición y causas	10
1.1.- Causas de Hiperglucemia.....	10
2.- Diabetes Mellitus: Definición y perspectiva actual.....	11
2.1.- Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	12
3.- Vasos sanguíneos	13
3.1.- Estructura de la pared vascular	14
3.2.- Endotelio.....	15
3.3.- Funciones del endotelio.....	16
4.- Regulación del tono vascular.....	17
4.1.- Fisiopatología- Disfunción endotelial.....	20
5.- Antecedentes específicos	20
5.1.- Daños vasculares por hiperglucemia aguda.....	20
5.2.- Contribución de la hiperglucemia aguda a un estrés oxidativo y al aumento del tono vascular.....	22

5.3.- Inflamación vascular y adhesión de células en hiperglucemia	27
5.4.- Efectos de la elevación de glucosa, in vitro, sobre la presión de perfusión en riñón de rata	28
6.- Justificación	31
II.- HIPÓTESIS	32
III.- OBJETIVOS	32
1.- Objetivo general	32
2.- Objetivos particulares	32
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL	33
a).- Animales	33
b).- Preparación del tejido	33
c).- Curvas concentración-respuesta a fenilefrina	33
d).- Reactivos	38
e).- Análisis de resultados	38
V.-RESULTADOS	39
1.- Efecto de la glucosa sobre los anillos de aorta torácica	39
2.- Efecto del manitol sobre los anillos de aorta torácica	40
3.- Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta con y sin endotelio en presencia de glucosa	42
a).- Curva concentración-respuesta en aorta torácica con endotelio en presencia de 100mg/dl de glucosa (curva control)	42

b).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa.....	43
c).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa.....	45
d).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa.....	47
4.- Determinación de áreas bajo la curva.....	49
a).- Áreas bajo la curva controles.....	50
b).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 180mg/dl de glucosa.....	51
c).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 318mg/dl de glucosa.....	52
d).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 569mg/dl de glucosa.....	53
VI.- DISCUSIÓN.....	54
VII.- CONCLUSIONES.....	57
IX.- REFERENCIAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Estructura arterial.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2.- Capas de la pared arterial.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3.- Célula endotelial.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4.- Fisiopatología de la hiperglucemia postprandial.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5.- Efecto de la glucosa sobre la relajación vascular inducida por acetilcolina en anillos de aorta aislada de rata pre contraídas con fenilefrina.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 6.- Efecto de la infusión de glucosa intravascular sobre la presión arterial en rata anestesiada.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7.- Curva concentración-respuesta a concentraciones crecientes de glucosa en riñón aislado y perfundido de rata.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 8.- Curva dosis respuesta a la fenilefrina en riñón aislado y perfundido de rata en presencia de una concentración normal y en presencia de glucosa 11.2mM.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 9.- Cámara para órgano aislado.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 10.- Equipo para órgano aislado.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11.- Ejemplo de un registro.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 12.- Efecto de contracción en los anillos de aorta con y sin endotelio a las diferentes concentraciones crecientes de glucosa.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 13.- Efecto de contracción sobre anillos de aorta sin endotelio por efecto del Manitol.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 14.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 100mg/dl de glucosa (concentración control).....</i>	<i>42</i>

<i>Figura 15.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 16.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica sin endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 17.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 18.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica sin endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 19.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 20.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica sin endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 21.- Áreas bajo la curva controles.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 22.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 180mg/dl de glucosa.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 23.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 569mg/dl de glucosa.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 24.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 569mg/dl de glucosa.....</i>	<i>53</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.- Cantidades de reactivos en gramos para la preparación de la solución krebs.....</i>	<i>38</i>
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>NOM</i>	<i>Norma oficial Mexicana</i>
<i>DM</i>	<i>Diabetes Mellitus</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>IDF</i>	<i>Fundación Internacional de Diabetes</i>
<i>ENSA</i>	<i>Encuesta Nacional de Salud</i>
<i>CE</i>	<i>Célula Endotelial</i>
<i>MLV</i>	<i>Musculo Liso Vascular</i>
<i>NO</i>	<i>Oxido Nítrico</i>
<i>EDRF</i>	<i>Factor de Relajación Derivado del Endotelio</i>
<i>PGI2</i>	<i>Prostaciclina</i>
<i>EDHF</i>	<i>Factor hiperpolarizante derivado del endotelio</i>
<i>ET-1</i>	<i>Endotelina 1</i>
<i>TX-A2</i>	<i>Tromboxano A2</i>
<i>PGH2</i>	<i>Prostaglandina H2</i>
<i>NOS</i>	<i>Oxido Nítrico sintetasa</i>
<i>eNOS</i>	<i>Oxido Nítrico sintetasa endotelial</i>
<i>iNOS</i>	<i>Oxido Nítrico sintetasa inducible</i>
<i>AMPc</i>	<i>Adenosina monofosfato cíclico</i>
<i>GMPc</i>	<i>Guanosina monofosfato cíclico</i>

<i>ATP</i>	<i>Adenosina trifosfato</i>
<i>ADN</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosina difosfato</i>
<i>M</i>	<i>Molar</i>
<i>mM</i>	<i>mili Molar</i>
<i>mm Hg</i>	<i>milímetros de mercurio</i>
<i>WKY</i>	<i>Wistar Kyoto</i>
<i>CE₅₀</i>	<i>Concentración efectiva 50</i>
<i>E_{max}</i>	<i>Efecto máximo</i>

RESUMEN

La hiperglucemia es el aumento de la concentración de glucosa en sangre por arriba de los niveles máximos normales (>110mg/dl). Aun que la hiperglucemia se presenta de manera normal después de la ingesta de alimentos esta puede ser signo de enfermedades. La hiperglucemia se da por la disminución de la entrada de glucosa a las células, por la disminución de la utilización de glucosa por varios tejidos y por el aumento en la producción de glucosa por el hígado. Aun que son diversas las causas que pueden generar hiperglucemia las principales son la ingesta excesiva de alimentos de alto contenido en hidratos de carbono, sobre todo azúcares simples y la Diabetes Mellitus. Esta última se caracteriza por una hiperglucemia sostenida que es el factor determinante dentro de esta fisiopatología. Las personas con diabetes son 4 veces más propensas para desarrollar enfermedades cardiovasculares y 40 veces más propensos de requerir amputaciones de los miembros inferiores que una persona sin diabetes. Además se sabe que la elevación de la glucosa en sangre es un factor desencadenante para la aparición de múltiples efectos dañinos para el cuerpo humano, como lo son procesos de inflamación, estrés oxidativo, afecciones cardiovasculares (aumento de presión arterial), así como daño a múltiples órganos y tejidos (Riñones, ojos, nervios y vasos sanguíneos). En el presente trabajo se analizó el efecto de diferentes concentraciones elevadas de glucosa sobre la respuesta contráctil a fenilefrina (agonista adrenérgico α_1) en anillos de aorta torácica de rata simulando diferentes estados hiperglucémicos agudos. Los resultados mostraron que la glucosa por si misma produce un efecto contráctil sobre los anillos de aorta, siendo este efecto presor más fuerte en los anillos sin endotelio. Adicionalmente se incubaron los anillos de aorta con manitol (una sustancia análoga a la glucosa que tiene la misma osmolaridad) a las mismas concentraciones con las que se uso la glucosa y también se observó un efecto presor. En cuanto a la respuesta contráctil a fenilefrina en las diferentes condiciones de glucosa se tomaron dos criterios de graficación debido a la respuesta contráctil producida por la glucosa. En el primer criterio se graficaron los deltas ignorando la previa contracción producida por la glucosa y de esta manera se observó que la contracción en respuesta a la fenilefrina parece disminuir. En el segundo criterio se tomó en cuenta la contracción producida por la glucosa y debido a esto se observó en las graficas que la respuesta a fenilefrina se ve aumentada en las primeras concentraciones. Con base en los resultados anteriores podemos concluir que el efecto presor de la glucosa sobre los anillos de aorta torácica de rata es debido a un fenómeno osmótico producido por las altas concentraciones de glucosa. La disminución aparente en la respuesta contráctil a la fenilefrina al graficar bajo el criterio uno es debido a que al realizar las curvas en presencia de las diferentes concentraciones de glucosa se partió de un basal mayor debido a la contracción previa provocada por la glucosa.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- HIPERGLUCEMIA: DEFINICIÓN Y CAUSAS

Se define a la hiperglucemia como el aumento de la concentración de glucosa en sangre por arriba de los niveles máximos normales (NOM-015-SSA2-1994).

Parámetros:

Hiperglucemia en ayuno, a la elevación de la glucosa por arriba de lo normal (>110 mg/dl), durante el periodo de ayuno. Puede referirse a la glucosa alterada en ayuno, o a la hiperglucemia compatible con diabetes, dependiendo de las concentraciones de glucosa según los criterios especificados en esta Norma (NOM-015-SSA2-1994).

Hiperglucemia postprandial, a la glucemia > 140 mg/dl, dos horas después de la comida (NOM-015-SSA2-1994).

1.1.- CAUSAS DE HIPERGLUCEMIA

La hiperglucemia puede ser signo de muchas enfermedades (Diabetes Mellitus), sin embargo siempre se da después de una comida pero se regula por medio de la insulina que lleva la glucosa a los tejidos para su almacenamiento ya que es el principal combustible celular. La hiperglucemia se da por la disminución de la entrada de glucosa a las células, por la disminución de la utilización de glucosa por varios tejidos y por el aumento en la producción de glucosa por el hígado.

Otras causas de Hiperglucemia son:

- *Abuso de los alimentos de alto contenido en hidratos de carbono, sobre todo azúcares simples.*
- *Abandono de la medicación, en caso de enfermedades como la Diabetes.*

- *Falta de ejercicio físico.*
- *Aparición de enfermedades infecciosas, sobre todo las que producen fiebre, como pulmonías, diarrea, gripe, etc.*
- *Situaciones de estrés grave, emocional, o por enfermedad, como infarto de corazón o cerebral.*
- *Toma de medicamentos que pueden elevar el azúcar bruscamente (Corticoides).*
- *Cirugías, accidentes (traumatismos, quemados, etc.)*

(Higashida, 2001).

2.- DIABETES MELLITUS: DEFINICIÓN Y PERSPECTIVA ACTUAL.

*La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos que comparten el fenotipo de la **hiperglucemia**. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y elecciones respecto al modo de vida. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la **hiperglucemia** pueden comprender una disminución de la secreción de insulina, una disminución del consumo de glucosa y un aumento de la producción de glucosa. El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos (Powers A, 2002).*

Se estima que el total de personas con diabetes en el mundo se verá incrementado de 171 millones que hubo en el año 2000 a más de 366 millones para el año 2030. Las personas con diabetes son 4 veces más propensos para

desarrollar enfermedades cardiovasculares y 40 veces más propensos de requerir amputaciones de los miembros inferiores que una persona sin diabetes. Además la diabetes es una de las principales causas de pérdida de la agudeza visual, ceguera completa y fallo renal en adultos. Diabetes es la cuarta causa principal de muerte en el mundo, más de un millón de personas murieron por diabetes en el año 2005 y casi el 80% de estas muertes fueron en países de bajo y medio desarrollo (Khuwaja A. K. 2009).

La mayoría de las personas con diabetes en países en desarrollo están por debajo de los 64 años, mientras que en países desarrollados la diabetes se presenta en grupos de personas con edades mucho mayores. La aparición de la diabetes a edades tempranas o a edades en las que las personas deberían ser más productivas tiene un gran impacto en la economía de los países en desarrollo (Khuwaja A. K. 2009).

En México, la prevalencia de Diabetes mellitus tipo 2 en adultos mayores de 20 años de edad, aumento de 6.7% en el año 1993 a 7.5% en el año 2000, y se calcula que podrá tener un alza de 12.3% (11.7 millones) para el 2025 (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 identificadas como factores ambientales para el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como la hipertensión y la diabetes mellitus (ENSA 2000).

2.1.- CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS

*Aun que todas las formas de DM se caracterizan por la **hiperglucemia**, los mecanismos por los que esta se produce son diversos. Algunas formas de DM se caracterizan por un déficit absoluto de insulina o un defecto genético que provoca*

una secreción defectuosa de insulina, mientras que otras formas tienen en común la resistencia a la insulina. Los dos grandes grupos de DM se designan como Diabetes tipo 1 y tipo 2. La diabetes mellitus tipo 1A es el resultado de la destrucción autoinmunitaria de las células β , que suele provocar déficit de insulina. La DM de tipo 1B también se caracteriza por déficit de insulina, sin embargo los individuos con DM tipo 1B carecen de marcadores inmunológicos que indiquen un proceso destructor autoinmunitario de las células β (Powers A, 2002).

La DM de tipo 2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se suelen caracterizar por grados variables de resistencia a la insulina, alteración de la secreción de insulina, y un aumento de la producción de glucosa (Powers A, 2002).

3.- VASOS SANGUINEOS

*Los vasos sanguíneos son estructuras tubulares que forman parte del sistema circulatorio y transportan sangre a través del cuerpo por acción del corazón. Hay tres principales tipos de vasos sanguíneos; **las arterias**, las cuales distribuyen la sangre que sale del corazón al cuerpo, **los capilares**, los cuales hacen posible el intercambio de agua y químicos entre la sangre y los tejidos, y **las venas** que transportan la sangre de los capilares de regreso al corazón (Higashida, 2001).*

Las arterias están constituidas por tres túnicas o capas, la túnica interior o íntima formada por tejido endotelial, tejido conjuntivo areolar y tejido elástico; la túnica media es de tejido muscular liso con fibras elásticas y la túnica exterior o adventicia formada por tejido fibroso. Esta constitución permite que se contraigan o dilaten disminuyendo o aumentando su diámetro (Higashida, 2001).

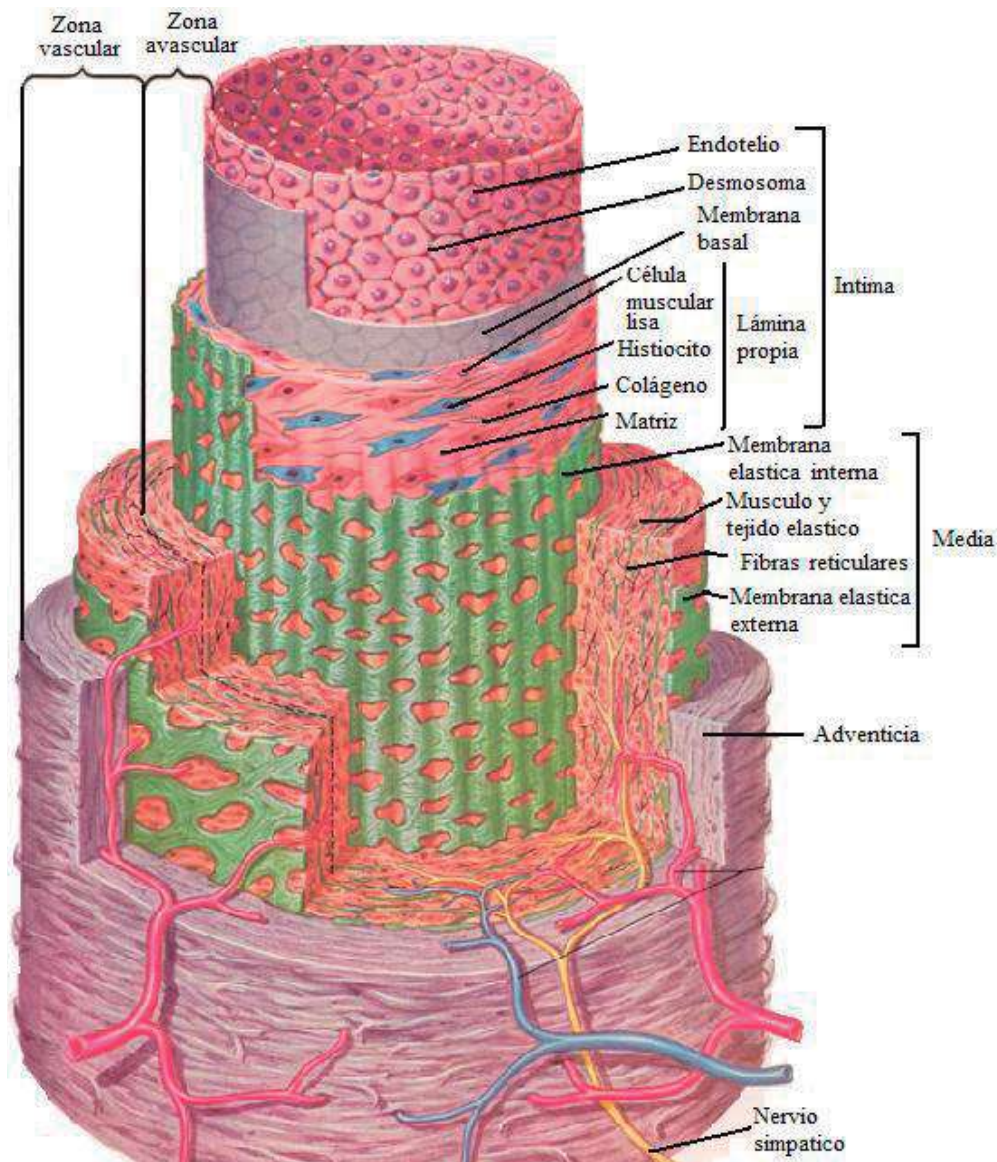


Figura 1.- Estructura arterial. Las arterias están formadas por tres capas principales: La íntima, la media y la adventicia. (Tomado y modificado de Netter F. 2006).

3.1.-ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

Los elementos que constituyen la pared vascular son las células y la matriz extracelular. Las células representan el 20% del peso seco de la pared. Las células más importantes son las células endoteliales (CE), con una vida media de

30 años y las células del musculo liso vascular (MLV). La matriz comprende 4 grupos de macromoléculas: elastina, colágeno, proteoglucanos y las glucoproteínas estructurales como fibronectina y laminina (Lermoli, 2003).

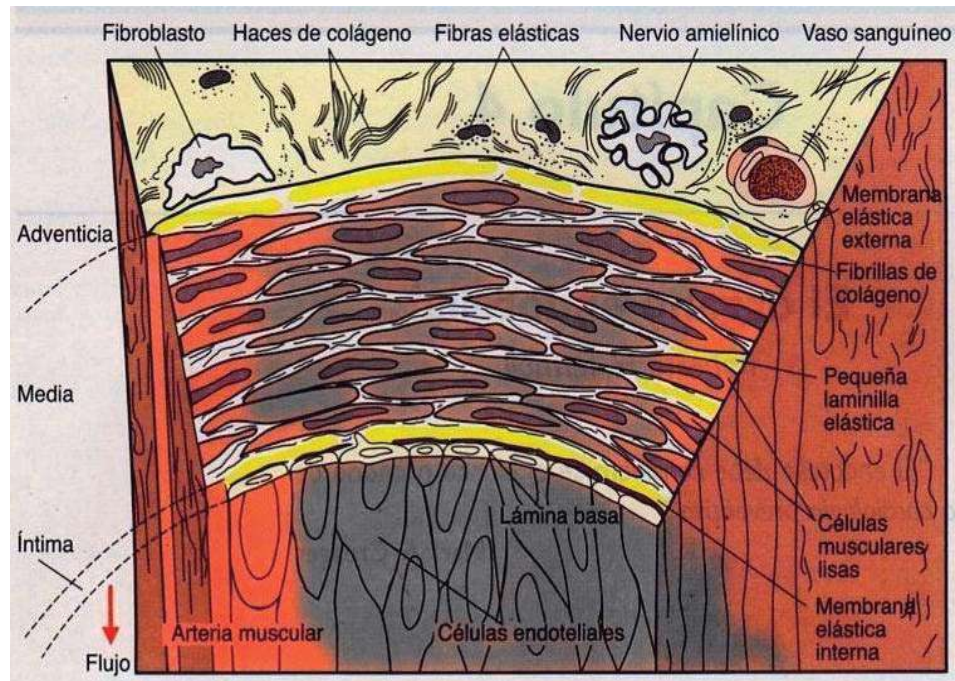


Figura 2.- Capas de la pared arterial. Las células endoteliales están en contacto estrecho con las células musculares lisas (Tomado de Best y Taylor, 2003).

3.2.- ENDOTELIO

El endotelio es una película diáfana, de una sola capa de células, que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos. Tapiza todos los vasos del organismo y es la estructura más importante para la comunicación entre el flujo sanguíneo y la pared vascular. El endotelio intacto es una de las condiciones más importantes para evitar la trombosis arterial, la aterosclerosis y la vasoconstricción que se presenta en los síndromes isquémicos agudos. Es probable que la mayoría de las enfermedades cardiovasculares refleje una disminución endotelial (Lermoli, 2003).

El endotelio es un órgano regulador, un sensor, un transductor, que además de sus obvias funciones de barrera y transporte, afecta su entorno a través de una serie de mediadores biológicamente activos, que regulan el tono vascular, la interacción con células (plaquetas, monocitos y otros leucocitos), la coagulación y el crecimiento del musculo liso vascular (MLV). El principal mediador de la función endotelial normal es el oxido nítrico (NO), conocido también como factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) (Lermoli, 2003).

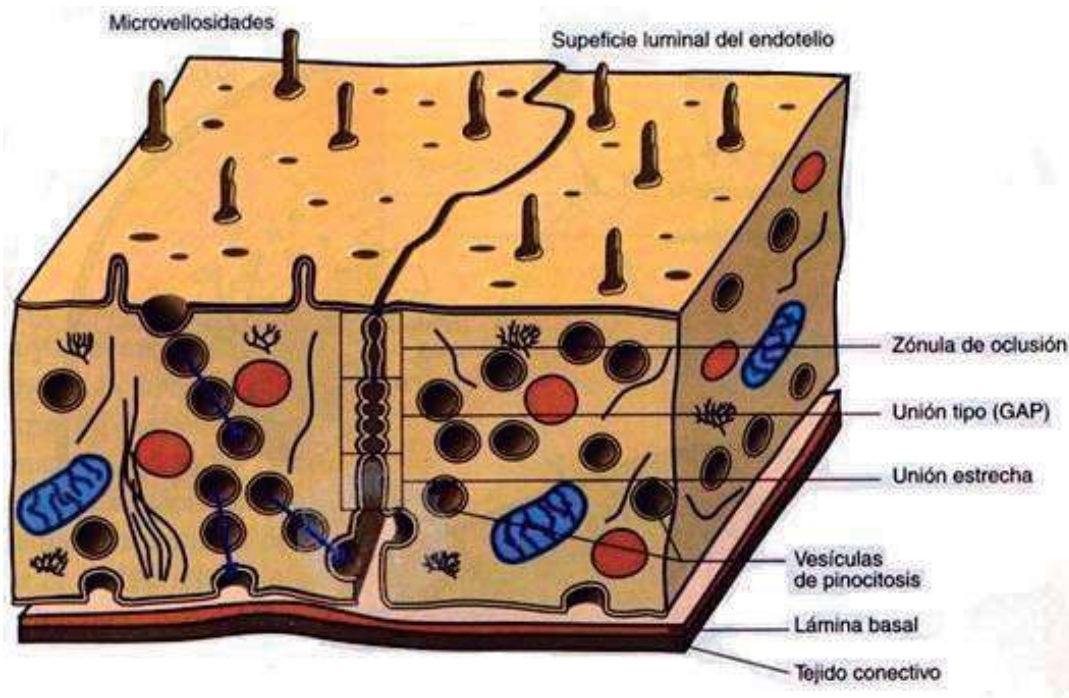


Figura 3.- Célula endotelial (Tomado de Best & Taylor, 2003).

3.3.- FUNCIONES DEL ENDOTELIO.

Las principales funciones son:

- *Barrera con permeabilidad selectiva. Interviene en mecanismos de pinocitosis y fagocitosis.*

- *Regula el tono vascular a través de sustancias **vasodilatadoras**: EDRF-NO, prostaciclina (PGI₂), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y **vasoconstrictoras**: endotelina 1 (ET-1), tromboxano A₂ (TX-A₂), prostaglandina H₂ (PGH₂).*
- *Interviene en la interacción con leucocitos, mediante la participación de moléculas de adhesión como las selectinas (P-selectinas, E-selectina, L-selectina), la superfamilia de inmunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1), la secreción de moléculas quimiotácticas (MCP-1, IL-8).*
- *Controla el crecimiento del musculo liso vascular. Las CE secreta factores que inhiben el crecimiento (heparina, glucosaminoglucanos, EDRF-NO) y factores que lo promueven (PDGF, IGF-I, IL-1, FGF, ET-1).*
- *Antiagregante, antitrombótica. En condiciones normales evita la adherencia de plaquetas.*
- *Participa en la hemostasia.*
- *Interviene en la conversión de angiotensina I en angiotensina II.*
- *También participa en el desarrollo y el remodelado de los vasos sanguíneos (angiogénesis).*
- *Interviene en el metabolismo de los lípidos plasmáticos. La lipasa de lipoproteínas está ligada a la superficie de las CE por los heparansulfatos. (Lermoli, 2003).*

4.-REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR.

El endotelio controla el tono vascular al producir factores de relajación (Vasodilatadores) y factores de contracción (vasoconstrictores). En condiciones normales predomina la acción vasodilatadora mientras que en algunas enfermedades esta propiedad se altera y aparece una tendencia al vasoespasmo. La CE secreta sustancias vasoactivas tanto hacia la luz vascular como hacia la

pared. Las principales moléculas vasodilatadoras son **PGI₂**, **EDRF-NO** y **EDHF** mientras que un ejemplo de una sustancia vasoconstrictora es la **endotelina 1** (ET-1) (Lermoli, 2003).

La PGI₂ descubierta en 1976, es uno de los principales miembros de la familia de las prostaglandinas. Es el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico, a través de la ciclooxygenasa de la pared vascular. Es vasodilatadora e inhibe la agregación plaquetaria a través de la adenilatociclasa, al aumentar el AMPc intracelular. Se sintetiza en las células endoteliales y del MLV. La presión pulsátil, la fuerza de fricción o rozamiento, los mediadores endógenos (bradicinina, trombina, serotonina, PDGF y nucleótidos de adenina) y algunos fármacos (antagonistas cálcicos, captopril, nitratos y estreptocinasa) estimulan su producción. Es un débil antagonista de los efectos vasculares de la endotelina.

La capacidad del tejido vascular para generar prostaciclina disminuye en los ancianos, diabéticos y fumadores (la nicotina y el humo del cigarro inhiben la producción), mientras que el magnesio aumenta la producción de PGI₂. (Lermoli, 2003).

En cuanto al **factor de relajación derivado del endotelio (EDRF-NO)** su liberación se da por acción de sustancias endógenas al unirse a su receptor en la célula endotelial; tales como la Acetilcolina, Histamina, Bradicinina, Serotonina, nucleótidos de adenina y trombina. Otros factores que estimulan su liberación son la presión pulsátil, el estiramiento, el estrés de la pared y la hipoxia.

En conclusión los estímulos pueden ser mecánicos, metabólicos o mediados por receptores. Se forma a partir de la L-arginina por una acción catalizada por la oxidonitrico sintetasa (NOS) (Lermoli, 2003).

El **NO** se libera en forma continua y es el responsable de mantener el tono vascular con predominio de una vasodilatación. También previene la adhesión de plaquetas y leucocitos a la superficie endotelial. Los niveles circulantes son muy bajos y el compuesto es muy lábil. Tiene una vida media de 6-10 segundos y es

difícil de medir. Cuando se determina in vitro, se determina las cantidades de sus metabolitos oxidados estables, nitrilo y nitrato. El NO se oxida con rapidez a nitrito y luego a nitrato, por acción de la hemoglobina oxigenada, el anión superóxido y el oxígeno molecular, y así se excreta por la orina. Su acción es destruida por el anión superóxido.

*El efecto vasodilatador se da por que el **NO** actúa a través de la guanilatociclasa, para aumentar el GMPc. LA guanilatociclasa produce una desfosforilación de la cadena liviana de la miosina (Lermoli, 2003).*

*Otra molécula que produce vasodilatación es el Factor **hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)**. Produce hiperpolarización y relajación por activación de los canales de K^+ ATP sensibles o ATPasa Na-K. La hiperpolarización contribuye a la relajación dependiente del endotelio o reduce la sensibilidad del MLV al estímulo vasoconstrictor. Es un metabolito lábil del ácido araquidónico. Su producción aumenta por acción de la Bradicinina (Lermoli, 2003).*

*En cuanto a las sustancias vasoconstrictoras tenemos a la **Endotelina-1**, que se sintetiza en el endotelio vascular y en células del MLV. Los niveles plasmáticos están en el rango de 0,26-5 pg/mL. Es la sustancia vasodilatadora más potente del organismo (10 veces superior a la angiotensina II) y el riñón es 10 veces más sensible a su acción que otros lechos vasculares. También es producida por neuronas y astrocitos en el sistema nervioso central, células endometriales, hepatocitos, células mesangiales, células de Sertoli y células epiteliales de la mama. Su vida media plasmática es de 4-7 minutos y hasta el 75% de la secreción, obtenida a partir de células endoteliales se dirige al MLV. Estimulan su formación y liberación la hipoxia, la angiotensina II, las LDL-oxidadas, la trombina y las catecolaminas. Es un factor mitogénico que promueve la proliferación del MLV, fibroblastos y células mesangiales.*

La endotelina actúa a través de receptores específicos A y B. La ET-1, a través de estos receptores, activa la fosfolipasa C y produce aumentos de trifosfato de inositol y diacilglicerol. El primero lleva a un incremento del Ca^{2+}

intracelular, que provoca la vasoconstricción. El diacilglicerol y el Ca^{2+} estimulan la proteincinasa C, que media la acción mitogénica de la ET-1 (Lermoli, 2003).

4.1.- FISIOPATOLOGIA-DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

El concepto de disfunción endotelial es uno de los más importantes desarrollados en los últimos 10 años, dentro de la biología vascular. Es un poderoso determinante de prácticamente todas las enfermedades cardiovasculares. Consiste en la pérdida de la integridad funcional del endotelio y aparece precozmente en los pacientes hipercolesterolémicos, diabéticos (hiperglucemia), fumadores e hipertensos. (Lermoli, 2003).

De manera global, la disfunción del endotelio se manifiesta por los siguientes mecanismos:

- *Aumento del tono vascular (vasoconstricción).*
- *Hipercoagulabilidad.*
- *Interacción endotelio-células (reclutamiento y adhesión de células).*
- *Proliferación del músculo liso vascular*

(Lermoli, 2003).

5.- ANTECEDENTES ESPECIFICOS

5.1.- DAÑOS VASCULARES POR HIPERGLUCEMIA AGUDA

Como ya se menciona las causas que pueden producir una hiperglucemia son variadas, sin embargo el abuso en la ingesta de alimentos de alto contenido de

hidratos de carbono (hiperglucemia postprandial) y un descontrol en los niveles de glucosa debido al padecimiento de Diabetes, son las principales causas de hiperglucemias agudas.

La hiperglucemia postprandial es caracterizada por picos hiperglucémicos que inducen **disfunción endotelial, reacciones de inflamación y estrés oxidativo**, el cual puede conducir a la progresión de aterosclerosis y finalmente a la aparición de eventos cardiovasculares como trombosis e infartos. La hiperglucemia postprandial es por lo tanto uno de los estados fisiopatológicos más importantes que contribuyen a la insuficiencia vascular, y en consecuencia, el control de la hiperglucemia postprandial debe ser el foco de la investigación clínica del futuro como un objetivo potencial para prevenir la disfunción vascular (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

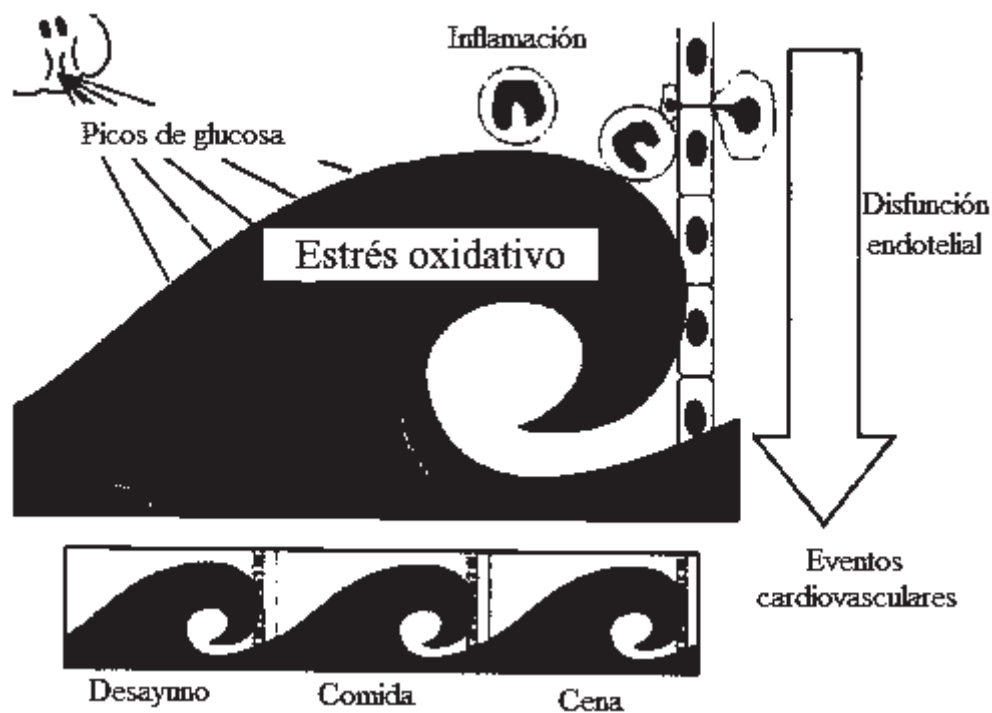


Figura 4.- Fisiopatología de la hiperglucemia postprandial. Picos hiperglucémicos por ingesta de comida excesiva inducen estrés oxidativo, disfunción endotelial y reacciones de inflamación (Tomado y modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

5.2.- CONTRIBUCIÓN DE LA HIPERGLUCEMIA AGUDA A UN ESTRÉS OXIDATIVO Y UN AUMENTO DEL TONO VASCULAR.

Se define al estrés oxidativo como una desregulación del estado redox celular, el cual juega un papel fundamental en la patogénesis del fallo vascular, especialmente en la disfunción endotelial vascular debido a una sobre producción de aniones superóxido los cuales afectan directamente al NO. Por tanto la disfunción endotelial es caracterizada por una alteración en la producción y biodisponibilidad de los factores de relajación dependientes del endotelio, particularmente el óxido nítrico (NO) generado por la NO sintetasa endotelial (eNOS) (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

El anión superóxido es formado por una reducción monovalente del oxígeno molecular y a pesar de que varias enzimas son involucradas en la generación de aniones superóxido Incluyendo la Xantina oxidasa, NADH/NADPH oxidasa, la lipoxigenasa y NOS, las mitocondrias son la fuente principal de la producción del anión superóxido in vivo. Aniones superóxido se reducen al peróxido de hidrógeno de forma espontánea o por dismutación catalizada enzimática. La transición metálica catalizada por interacciones entre hierro o cobre y peróxido de hidrógeno producen radicales hidroxilo altamente tóxicos. Estudios recientes demuestran que la hiperglucemia induce un exceso de producción de aniones superóxido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Una sobre producción de superóxido es acompañada por el incremento de la producción de NO, causada por un estado de desacoplamiento entre eNOS y la NOS inducible (iNOS), un fenómeno que favorece la formación de un fuerte oxidante, peroxinitrito, el cual daña el ADN. El daño al ADN es un estímulo

obligatorio para la activación de la enzima nuclear poly polimerasa (ADP-ribosa). La activación de ADP-ribosa a su vez, reduce la concentración intracelular de su sustrato NAD⁺, resultando en una disminución en la tasa de glicolisis, transporte de electrones y formación de ATP, conduciendo a una ribosilación de ADP de la reducción de gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa. Este proceso resulta en una disfunción endotelial aguda en los vasos sanguíneos de los diabéticos que contribuye abiertamente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Por otra parte hay evidencia directa que soporta el hecho de que la hiperglucemia aguda promueve el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en sujetos con tolerancia a la glucosa dañada debido a la producción de estrés oxidativo durante una hiperglucemia postprandial ya que los niveles de marcadores de estrés oxidativo tales como nitrotirosina y 8-iso-prostaglandina F_{2α} se ven aumentados (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Los radicales libres de oxígeno reaccionan con el óxido nítrico para formar peroxinitrito, un potente oxidante que puede directamente oxidar proteínas, lípidos y el ADN a través de un nitronio como intermediario, lo que resulta en la formación de carbonilos de cadena lateral y la ruptura del enlace péptido. El peroxinitrito tiene afinidad por los residuos de tirosina, por lo que se produce nitrotirosina de su unión. Evidencia de muchos estudios soportan el hecho de que la hiperglucemia tiene un rol directo en la promoción de la sobre generación de nitrotirosina debido a que la formación de nitrotirosina que ha sido detectada en las paredes de las arterias de monos durante una hiperglucemia, en el plasma de sujetos sanos durante un estado hiperglucémico e incluso en pacientes con diabetes mellitus durante un aumento hiperglucémico postprandial, siendo la producción de nitrotirosina dependiente del nivel de glucemia. La hiperglucemia incluso fue observada acompañada por el depósito de nitrotirosina en trabajos de perfusión de corazón de rata, que parecía estar relacionado con el desequilibrio en la producción de NO y el anión superóxido causado por la sobre expresión de iNOS. (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Ha sido demostrado que la formación de nitrotirosina está acompañada por el desarrollo de disfunción endotelial tanto en sujetos sanos como en arterias coronarias de corazones perfundidos. Este efecto se explica debido a que la nitrotirosina es directamente nociva para las células endoteliales (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Por otra parte la determinación de un isómero específico de isoprostano tal como 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ en orina ha sido propuesto como marcador de estrés oxidativo. El isoprostano es colectivamente formado a partir de radicales libres de oxidación mediada del ácido araquidónico. Como este ácido graso es distribuido ubicuamente en las membranas celulares, la medición de isoprostanos urinarios probablemente provén un mejor reflejo de estrés oxidativo en todo el cuerpo. Muchos estudios han demostrado que la hiperglucemia es asociada con un incremento de la tasa de formación y excreción urinaria de 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

La tasa de excreción urinaria de 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ ha sido reportada con un incremento significativo en pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con sujetos sanos de edad similar. Además fue observada una significativa correlación entre la glucosa en sangre y la 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ urinaria, sugiriendo que un incremento en el estrés oxidativo puede ser relacionado, al menos en parte para los factores determinantes del control diabético. Estos resultados son consistentes con hallazgos in vitro de una mayor formación y liberación de 8-iso-prostaglandina $F_{2\alpha}$ por células del músculo liso vasculares de la especie porcina cultivadas bajo condiciones de hiperglucemia (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Debido a la información anterior se puede decir que los problemas de relajación endotelio dependientes en hiperglucemia son debidos a una reducción de la biodisponibilidad del NO por acción de su inhibidor el anión superóxido y no por reducción en su producción. Por lo cual este estado anormal puede ser asociado con una predominancia de los factores de vaso contricción y producirse

un aumento en el tono vascular. Por otra parte, también es asociado que la presencia de altas concentraciones de glucosa puede reducir la vasodilatación dependiente del endotelio por acetilcolina.

Sin embargo, estudios realizados por Villafaña et al., donde al exponer anillos de aorta torácica de rata Wistar a concentraciones 11.7 mM (control) y 46.8mM de glucosa durante 30 minutos y después contraerlas con fenilefrina (10^{-6} M) y realizar una curva de relajación debido a la administración de concentraciones crecientes de acetilcolina (10^{-9} M a 10^{-5} M), encontraron que la glucosa no cambio significativamente la relajación vascular. Aun que esto puede ser explicado debido a que el tiempo de exposición a la glucosa fue por un periodo de tiempo cortó, ya que existen reportes de que la relajación disminuye cuando el tejido es incubado durante 6 o 7 horas con la concentración de glucosa elevada (Villafaña S. et al. 2004).

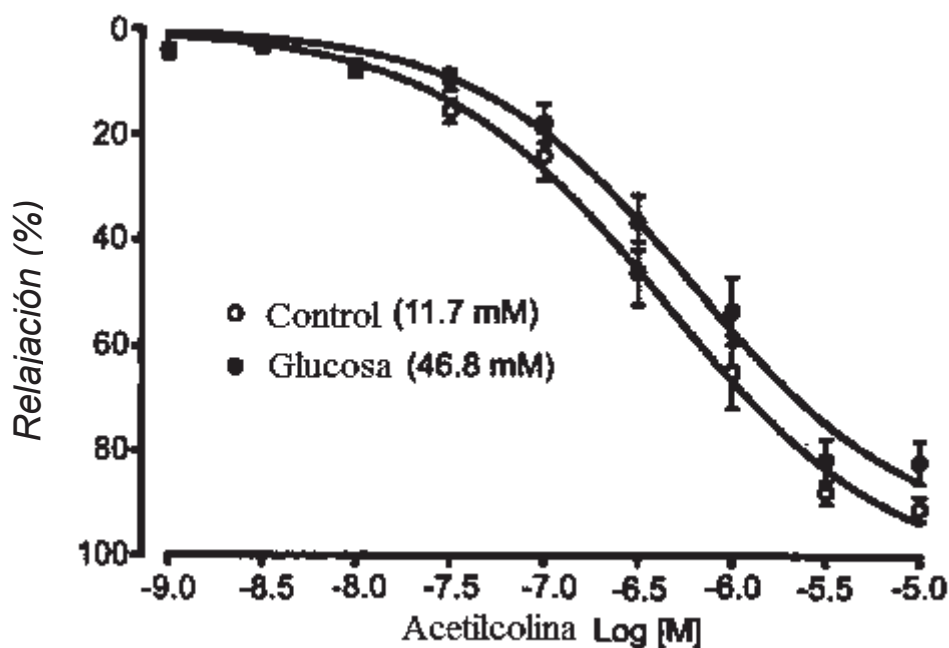


Figura 5.- Efecto de la glucosa sobre la relajación vascular inducida por acetilcolina en anillos de aorta aislada de rata pre contraídas con Fenilefrina (Tomado y modificado de Villafaña S, Huang F, Hong E, 2004).

Adicionalmente en este mismo estudio realizado por Villafaña et al., se evaluó el efecto de la glucosa a una concentración elevada sobre la presión arterial y se observó que la infusión de glucosa administrada incremento la presión arterial 40mm Hg sobre la presión arterial basal. Esto puede ser asociado también a que la hiperglucemia afecta la relajación vascular probablemente por la acumulación de sorbitol, el agotamiento de myo-inositol, la producción de radicales libres o por la activación de la proteína cinasa C, además existen reportes de que la hiperglucemia estimula al sistema nervioso simpático, tal vez por la activación de neuronas del hipotálamo conduciendo a un incremento en la liberación de noradrenalina. Por lo cual esto sugiere que la hiperglucemia puede participar en el desarrollo de hipertensión (Villafaña S. et al. 2004).

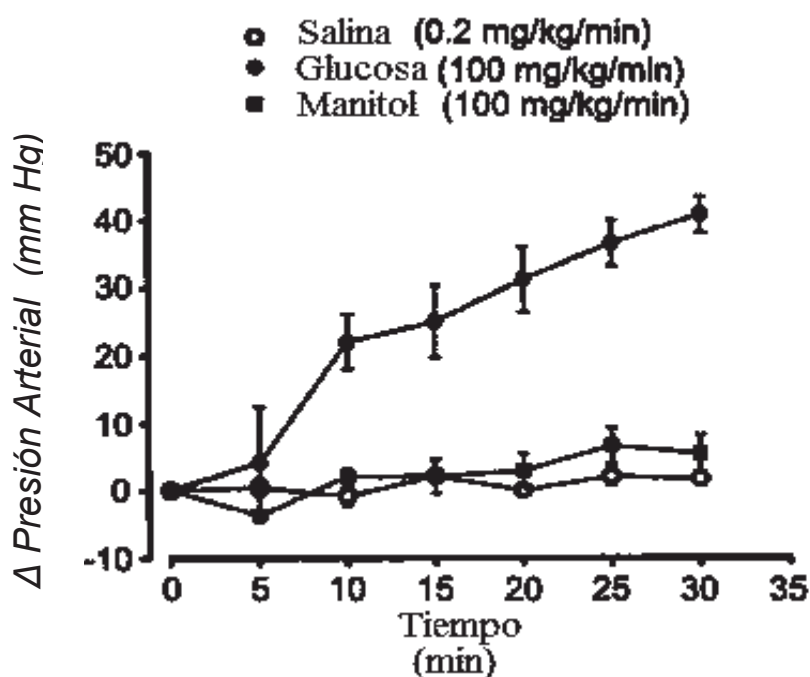


Figura 6.- Efecto de la infusión de glucosa intravascular sobre la presión arterial en rata anestesiada (Tomado y modificado de Villafaña S, Huang F, Hong E, 2004).

5.3.- INFLAMACIÓN VASCULAR Y ADHESIÓN DE CÉLULAS POR HIPERGLUCEMIA.

Es bien establecido que la inflamación es un factor mayor en la patogénesis del fallo vascular. La inflamación en enfermedades como la diabetes ha sido grandemente evaluada y considerada por la medición de varios marcadores de inflamación tal como la proteína C reactiva de alta sensibilidad. También es bien sabido que varias células inflamatorias y sus mediadores juegan un esencial papel en el proceso de inflamación, con iniciación y progresión de aterosclerosis siendo caracterizada por la captación de leucocitos tales como monocitos y linfocitos-T hacia el endotelio de la pared vascular. Moléculas de adhesión regulan esta interacción entre el endotelio y los leucocitos. De varias moléculas de adhesión, moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1) han sido encontradas incrementadas en sujetos con enfermedad vascular e incluso en sujetos con diabetes con o sin enfermedad vascular en comparación con los niveles de estas mismas moléculas en sujetos sanos (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

En adición también ha sido demostrado que la hiperglucemia aguda en sujetos sanos y diabéticos, es un suficiente estímulo para el aumento en la circulación de ICAM-1, por el cual se activa una de las primeras etapas del proceso aterogénico. Aun que la mayoría de las investigaciones se centran en monocitos y linfocitos-T como los tipos predominantes de células inflamatorias implicadas en la aterosclerosis, hay evidencia creciente de que la activación de neutrofilos es también un participante importante en el proceso de inflamación, particularmente durante la respuesta inflamatoria aguda. Por lo cual el recuento de neutrofilos ha demostrado ser un mejor indicador de futuros eventos cardiovasculares en pacientes con alto riesgo de enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

Los neutrofilos periféricos son la fuente más importante de producción de especies oxidativas reactivas, por lo que especies de neutrofilos activados

contribuyen marcadamente al estrés oxidativo e inflamación en la diabetes tipo 2. Una molécula de adhesión, la β 2-integrina Mac-1, es esencial para la adhesión firme de neutrofilos y monocitos en las células endoteliales vasculares; además ha sido observado que esta molécula de adhesión se encuentra aumentada en pacientes con diabetes tipo 2, lo cual sugiere que incrementos agudos en los niveles de glucosa en plasma pueden alterar la función de los neutrofilos de una forma inactivada a una forma potencialmente activada en pacientes con hiperglucemia (Modificado de Koichi Node, Terio Inoue, 2009).

5.4.- EFECTOS DE LA ELEVACIÓN DE GLUCOSA, *in vitro*, SOBRE LA PRESIÓN DE PERFUSIÓN EN RIÑÓN DE RATA.

Experimentos recientes de nuestro laboratorio donde al trabajar con riñón aislado y perfundido de rata en una preparación tipo Lagendorff demostraron que la presión de perfusión del riñón se ve aumentada en presencia de concentraciones crecientes de glucosa.

Adicionalmente, al realizar curvas dosis repuesta a fenilefrina en el mismo órgano en presencia de una concentración del doble de glucosa que el utilizado como control en la solución de perfusión (solución Krebs), se observó que hay una mayor reactividad a la fenilefrina en esta condición en comparación con el control y esta hiperreactividad se mantuvo hasta alcanzar el efecto máximo (Cruz Medina J, 2010).

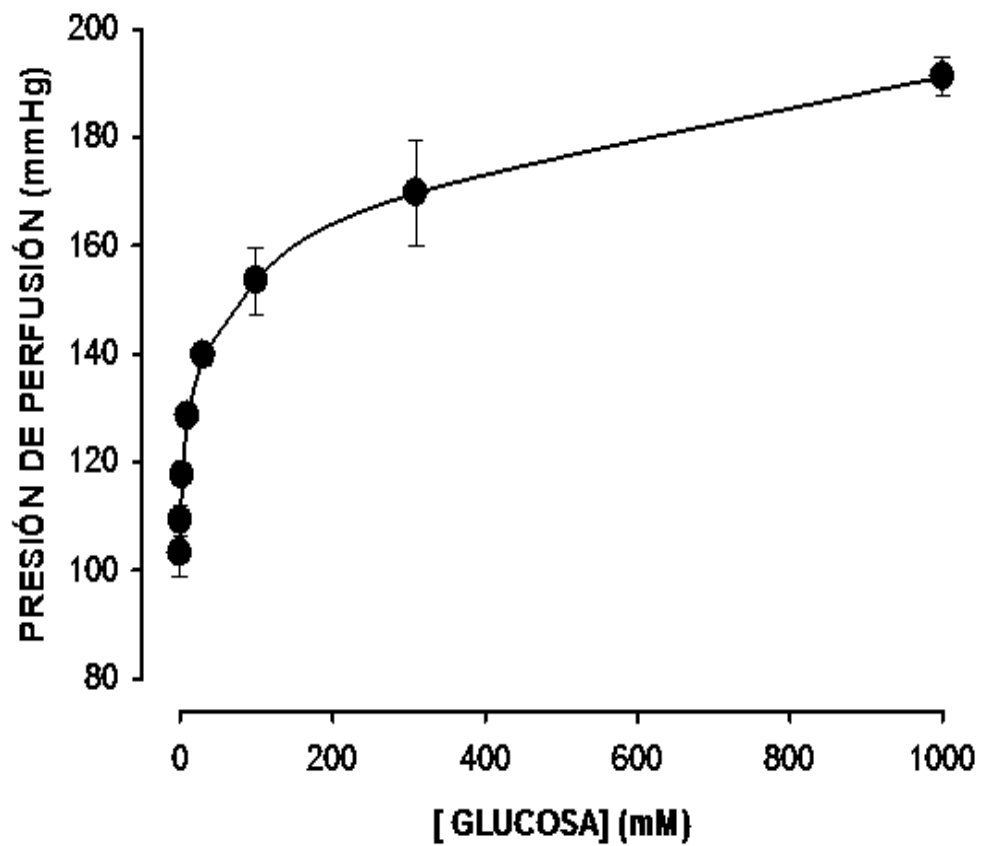


Figura 7.- Curva concentración-respuesta a concentraciones crecientes de glucosa (1mM, 3.1mM, 10mM, 31mM, 100mM, 310mM, 1M) en riñón aislado y perfundido de rata. Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 3 experimentos (Tomado y modificado de Cruz Medina J, 2010).

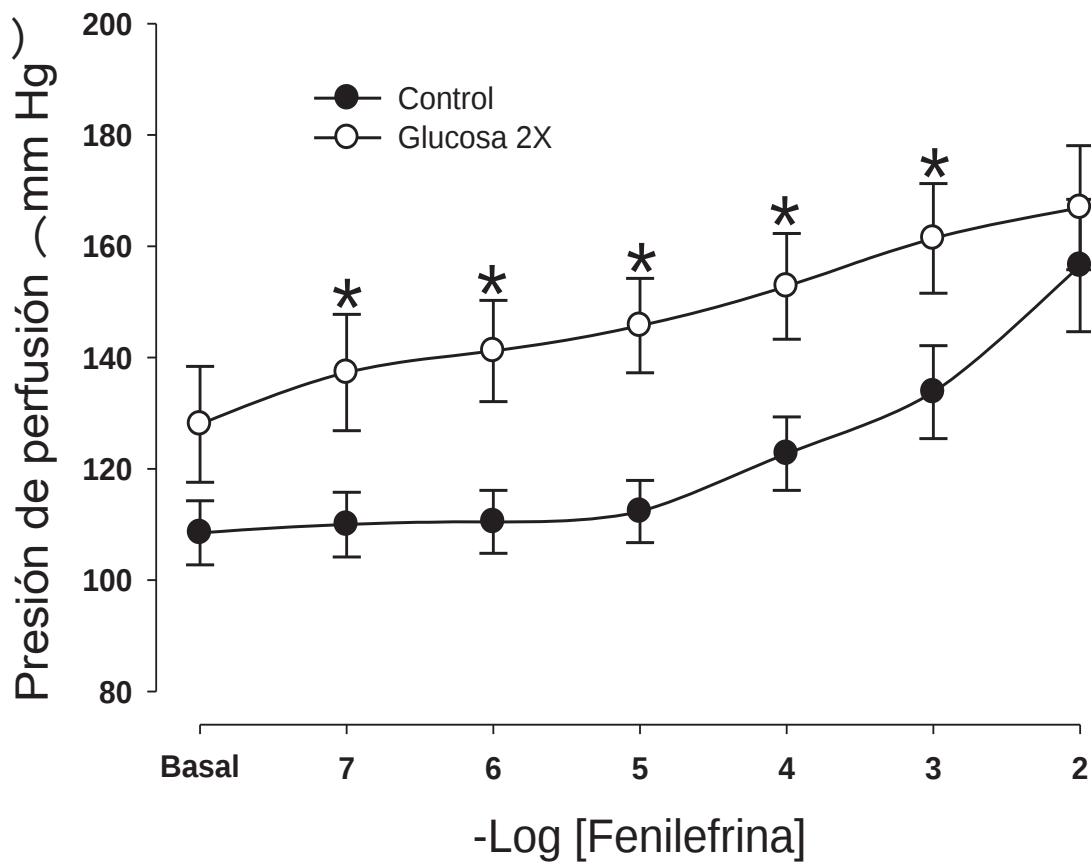


Figura 8.- Curva dosis respuesta a la fenilefrina en riñón aislado y perfundido de rata, en presencia de una concentración de glucosa normal y en presencia de glucosa 11.2 mM (glucosa 2X). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.005$ vs. Control (Tomado y modificado de Cruz Medina J, 2010).

6.- JUSTIFICACIÓN

Resulta evidente que la elevación de la glucosa en sangre (hiperglucemia) es un factor desencadenante de la aparición de múltiples efectos dañinos para el cuerpo humano, como lo son procesos de inflamación, estrés oxidativo, afecciones cardiovasculares (aumento de presión arterial), así como daño a múltiples órganos y tejidos (Riñones, ojos, nervios y vasos sanguíneos).

La hiperglucemia se presenta de manera normal después de la ingesta de alimentos y es regulada por la insulina, que es una hormona que transporta la glucosa hacia los tejidos para su almacenamiento y posterior utilización para generar energía, sin embargo también puede ser generada por múltiples factores como la ingesta excesiva de comidas ricas en hidratos de carbono (hiperglucemia postprandial), falta de ejercicio, medicamentos como glucocorticoides y enfermedades tal como la Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus se caracteriza por una hiperglucemia sostenida que es el factor determinante dentro de esta fisiopatología.

Debido a que en la actualidad más de 171 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad (Diabetes) y además de que se estima que para el año 2030 este número se verá duplicado, es de suma importancia el estudio de los efectos patológicos que desencadena esta enfermedad.

En base a lo anterior, el presente trabajo se centra en explorar los efectos de la glucosa, in vitro, sobre tejido vascular.

II.- HIPÓTESIS

Las concentraciones elevadas de glucosa producen un efecto contráctil mayor en respuesta a la fenilefrina debido a que los factores de relajación son atenuados en estas condiciones.

Es posible que la glucosa produzca híper-reactividad de los vasos sanguíneos en respuesta a agentes adrenérgicos.

III.- OBJETIVOS

1.- OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la glucosa, in vitro, sobre anillos de aorta torácica de rata.

2.- OBJETIVOS PARTICULARES

2.1.- Aprender la técnica de disección y montaje de la aorta torácica de rata.

2.2.- Determinar el efecto de la glucosa a diferentes concentraciones elevadas sobre los anillos de aorta torácica de rata.

2.3.- Determinar si la glucosa a concentraciones elevadas modifica la respuesta contráctil adrenérgica a fenilefrina en los anillos de aorta torácica de rata.

IV.- MATERIALES Y MÉTODO

1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

a).- ANIMALES

En este estudio se emplearon ratas Wistar Kyoto (WKY) macho de 400 ± 30 g que estuvieron en jaulas con acceso libre a agua y alimento.

b).- PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Los animales se sacrificaron y mediante una incisión abdominal se procedió al identificado y exposición de la arteria aorta torácica. La arteria se diseco y se limpio de tejido conectivo y graso. Posteriormente la arteria se corto en anillos de 4-6mm de longitud. Adicionalmente se procedió a la remoción del endotelio a la mitad de los anillos frotando suavemente la superficie interna de los anillos de aorta con un dispositivo metálico rugoso.

c).- CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA

Los anillos se introdujeron en cámaras para órgano aislado que contenían 10 ml de solución de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl, 11.8; KCl, 4.7; KH_2PO_4 , 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5; NaHCO_3 , 25.0; dextrosa, 5.8; EDTA, 0.026.

Las cámaras para órgano aislado se mantuvieron a 37°C , pH 7.4 y con burbujeo constante con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 . Cada anillo arterial se montó en dos ganchos de nikrom; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), que estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), para registrar cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales (Godínez et al., 2005)¹⁰.



Figura 9.- Cámara para órgano aislado. En esta imagen se muestra un anillo de aorta sostenido con dos ganchos de níquel; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión.

Una vez montados los anillos se les dio una tensión inicial de 3g y se dejaron estabilizar por un lapso de 30 minutos. Después se sensibilizó los anillos 3 veces a intervalos de 30 minutos con una concentración submáxima de fenilefrina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$). Lo anterior permitió que la arteria se contrajera y se estabilizara la respuesta al estímulo exógeno. En la última sensibilización se probó la presencia de endotelio, al observar la respuesta vaso relajante del tejido cuando se expuso a una solución de carbacol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$).



Figura 10.- Equipo para órgano aislado. En esta imagen se observan las cámaras para órgano aislado y los transductores de tensión. Adicionalmente se observa el matraz balón de doble fondo que suministra la solución Krebs.

Posterior a la sensibilización del tejido se dio un lapso de 30 minutos para que el tejido se restableciera; durante este periodo se hicieron lavados cada 15 minutos con solución Krebs. Una vez que la tensión del tejido regresara a su basal el tejido fue incubado durante 30 minutos con 100 μ l de rawolscina (1×10^{-6} M) y 100 μ l de propanolol (1×10^{-6} M) que son antagonistas adrenérgicos α_2 y β , respectivamente. Después de la incubación se construyeron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina empezando con una concentración de 1×10^{-9} M y terminando con una concentración 1×10^{-5} M.

Terminada la curva (control) se lavo el tejido con solución Krebs 3 ocasiones a intervalos de 15 minutos. Después se procedió a incubar los anillos de aorta durante 30 minutos con diferentes concentraciones elevadas de glucosa para simular hiperglucemia. Durante este periodo también fueron incubados los anillos con 100µl de rawolscina ($1 \times 10^{-6}M$) y 100µl de propanolol ($1 \times 10^{-6}M$). Pasado este tiempo se realizo la segunda curva concentración-respuesta a fenilefrina en las diferentes concentraciones de glucosa.

Las concentraciones de glucosa para simular hiperglucemia fueron:

- 100mg/dl para el control
- 180mg/dl, 318mg/dl y 569mg/dl para simular diferentes estados hiperglucemicos agudos.

Cabe resaltar que las concentraciones utilizadas para simular la hiperglucemia siguen una proporcionalidad de un $\frac{1}{4}$ de logaritmo en su concentración:

$$100\text{mg/dl} = 1 \times 10^{-2.25}M$$

$$180\text{mg/dl} = 1 \times 10^{-2}M$$

$$318\text{mg/dl} = 1 \times 10^{-1.75}M$$

$$569\text{mg/dl} = 1 \times 10^{-1.5}M.$$

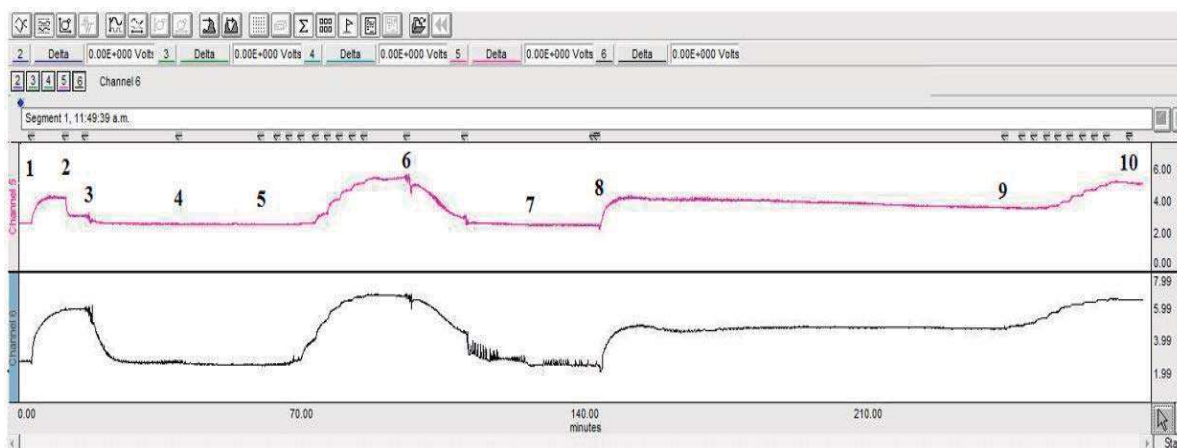


Figura 11.- Ejemplo de un registro. En esta imagen se observan dos registros de dos anillos de aorta, el registro de color rosa es un anillo de aorta con endotelio, mientras que el registro de color negro es de un anillo de aorta al cual se le removió el endotelio. En el punto **1)** Se observa el efecto de contracción a la última sensibilización con fenilefrina. **2)** en este punto se le agrego Carbacol para inducir una relajación dependiente del endotelio, la cual solo se observa en el registro del anillo con endotelio. **3)** Se hacen lavados a los anillos con solución krebs y se observa que en los dos registros los anillos vuelven a su basal. **4)** se observa que los anillos se mantienen en su basal ya por 30 minutos y se les agrega rauwolscine y propanolol. **5)** se comienza a realizar la curva control a fenilefrina (1×10^{-9} a 1×10^{-5} M). **6)** se observa el efecto máximo y se lava nuevamente los anillos. **7)** Se observa que los anillos han regresado a su basal. **8)** En este punto se adiciona krebs con una concentración elevada de glucosa (569mg/dl en este caso) y se observa que los anillos contraen. **9)** La contracción provocada por la glucosa se mantiene y bajo estas condiciones se procede a realizar la segunda curva a fenilefrina. **10)** Se observa el efecto máximo a la fenilefrina en estas condiciones. NOTA: A lo largo de todo el registro se observa que el anillo sin endotelio (registro color negro) presenta respuestas más grandes a los diferentes estímulos.

d).- REACTIVOS

Fármacos utilizados:

Fenilefrina, Carbacol, Propanolol y Rauwolscine adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones de estos fármacos se disolvieron en agua destilada.

Solución Krebs: Manitol, NaCl, KCl, KH_2PO_4 cristal, $\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adquiridos en J.T Baker. Dextrosa en Fermont. NaHCO_3 en Mallinckrodt. EDTA en Reproquifin.

Preparación de solución krebs:

SUSTANCIA	0.5 L	1 L	2 L
Dextrosa	0.525g	1.05g	2.1g
NaHCO_3	1.05g	2.1g	4.2g
KCl	0.175g	0.35g	0.7g
MgSO_4	0.145g	0.29g	0.58g
KH_2PO_4	0.08g	0.16g	0.32g
Ca EDTA Na_2	0.005g	0.01g	0.02g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.185g	0.37g	0.74g
NaCl	3.45g	6.9g	13.8g

Tabla 1.- Cantidades de reactivos en gramos para la preparación de la solución krebs

e).- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se agruparon y se grafico el promedio $\pm$ el error estándar utilizando el programa Sigma Plot versión 11.0. Para graficar el efecto de la fenilefrina se efectuaron curvas concentración-respuesta y para representar el efecto contráctil de la glucosa sobre los anillos de aorta se utilizo graficas de

barras. Se utilizó el programa Origin 6.0 Professional para calcular el área bajo la curva y la CE_{50} . **Análisis estadístico.**- Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías. Prueba Tukey.

V.-RESULTADOS

1.- Efecto de la glucosa sobre los anillos de aorta torácica

Al utilizar las diferentes concentraciones crecientes de glucosa en la solución Krebs, se observó que la glucosa produjo un efecto vasoconstrictor sobre los anillos de aorta, y esta contracción se dio con más intensidad en los anillos a los cuales se les removió el endotelio.

A 100mg/dl de glucosa (control) la contracción es nula en ambos anillos (con y sin endotelio)

A 180mg/dl de glucosa en el anillo con endotelio la contracción fue de 0.6g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 1.9g.

A 318mg/dl de glucosa en el anillo con endotelio la contracción fue de 0.6g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 1.3g.

A 569mg/dl de glucosa en el anillo con endotelio la contracción fue de 0.9g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 2.7g.

Es de resaltar que las contracciones en los anillos sin endotelio fueron de más del doble que en los anillos con endotelio

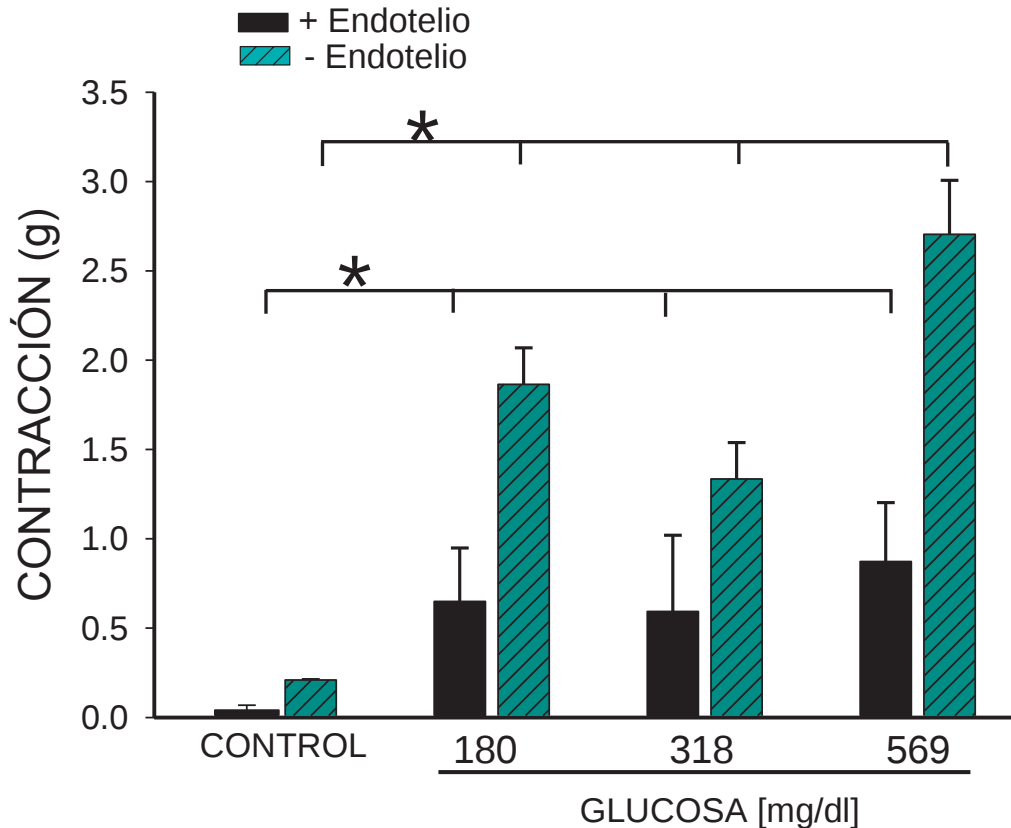


Figura 12.- Efecto de contracción en los anillos de aorta con y sin endotelio a las diferentes concentraciones de glucosa. Se grafico el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos. $*p < 0.05$ vs control, prueba Tukey.

2.- Efecto del manitol sobre los anillos de aorta torácica.

Después haber observado que la glucosa produjo contracción, la cuestión inmediatamente fue saber por medio de que mecanismo la producía. Para saber si esto era debido a un efecto osmótico se procedió a incubar los anillos a las mismas concentraciones que se usaron para la glucosa con Manitol que es una molécula que tiene la misma osmolaridad que la glucosa.

Al realizar la incubación con manitol se observó que este también tuvo un efecto contráctil sobre los anillos de aorta.

A 100mg/dl de manitol (control) la contracción es nula en ambos anillos (con y sin endotelio)

A 180mg/dl de manitol en el anillo con endotelio la contracción fue de 0.3g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 2.2g.

A 318mg/dl de manitol en el anillo con endotelio la contracción fue de 1.1g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 0.9g.

A 569mg/dl de manitol en el anillo con endotelio la contracción fue de 1.3g, mientras que en el anillo sin endotelio fue de 2.6g.

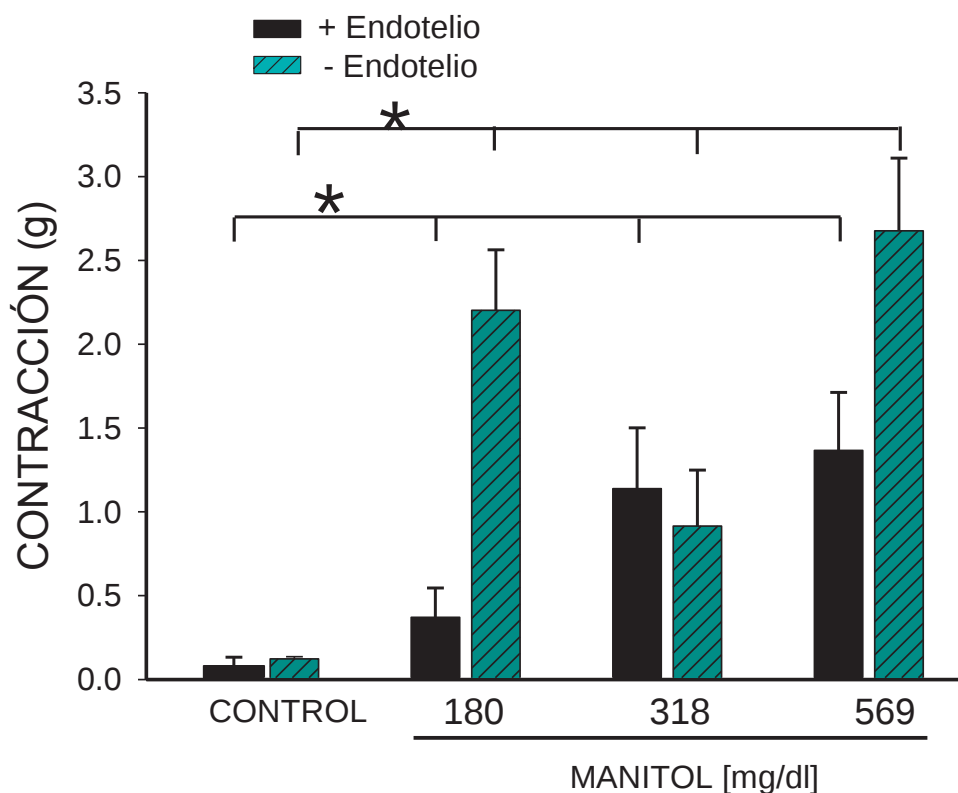


Figura 13.- Efecto de contracción en los anillos de aorta con y sin endotelio a las diferentes concentraciones de manitol. Se grafico el promedio $\pm$ el error estándar de 3 experimentos.

3.- Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta con y sin endotelio en presencia de glucosa.

Para analizar los efectos de la glucosa sobre la respuesta presora adrenérgica, se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de diferentes concentraciones que simularon diferentes estados hiperglucémicos agudos.

a).- Curva concentración-respuesta en aorta torácica con endotelio en presencia de 100mg/dl de glucosa (curva control).

En esta condición control se observa una respuesta clásica de contracción en respuesta a fenilefrina, en la cual las dos curvas realizadas no presentan diferencias significativas.

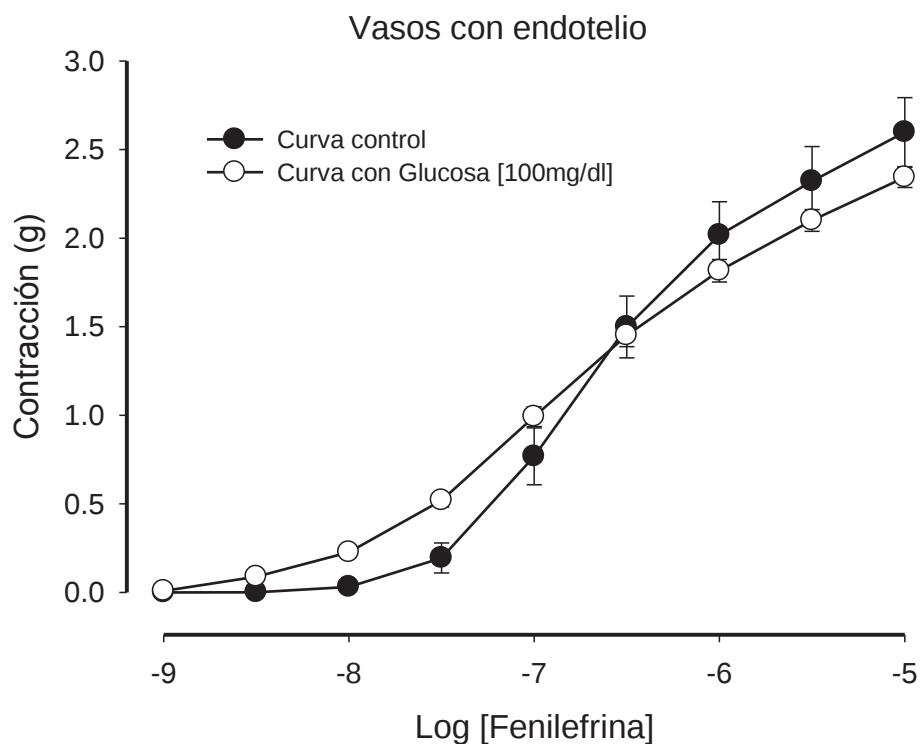


Figura 14.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 100mg/dl de glucosa (concentración control). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

b).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa.

Debido al efecto contráctil producido por la glucosa se procedió a graficar los incrementos en respuesta a la fenilefrina bajo 2 criterios diferentes:

1).- Se graficaron los deltas ignorando el efecto contráctil producido por la glucosa y se comenzó la lectura partiendo del nuevo basal producido por la contracción de la glucosa.

2).- Se graficaron los deltas tomando en cuenta el efecto contráctil producido por la glucosa por lo cual la lectura de registro se comenzó del basal inicial del experimento.

Grafica usando el criterio 1. En esta grafica se observa una disminución en la respuesta presora a fenilefrina en presencia de 180mg/dl en comparación con el control correspondiente (presencia o ausencia de endotelio) para cada curva (Figura 15).

Grafica usando el criterio 2. En esta grafica se observa un alza significativa en la respuesta a fenilefrina en las primeras 3 concentraciones en comparación con el control, sin embargo las respuestas en las siguientes concentraciones se igualan al control y se mantienen hasta llegar al efecto máximo. Cabe resaltar que se observan respuestas más pronunciadas cuando no hay presencia de endotelio (Figura 16).

GLUCOSA [180mg/dl]

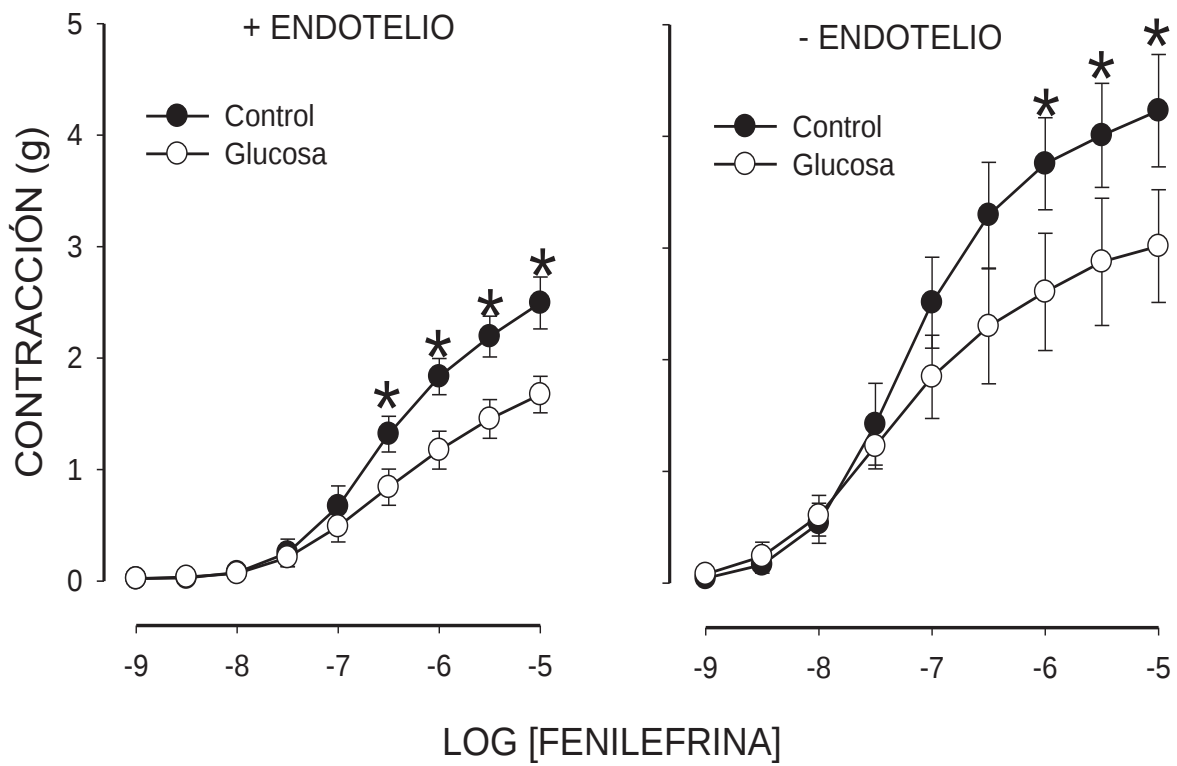


Figura 15.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa (criterio 1). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos. * $p < 0.05$ vs control, prueba Tukey.

GLUCOSA [180mg/dl]

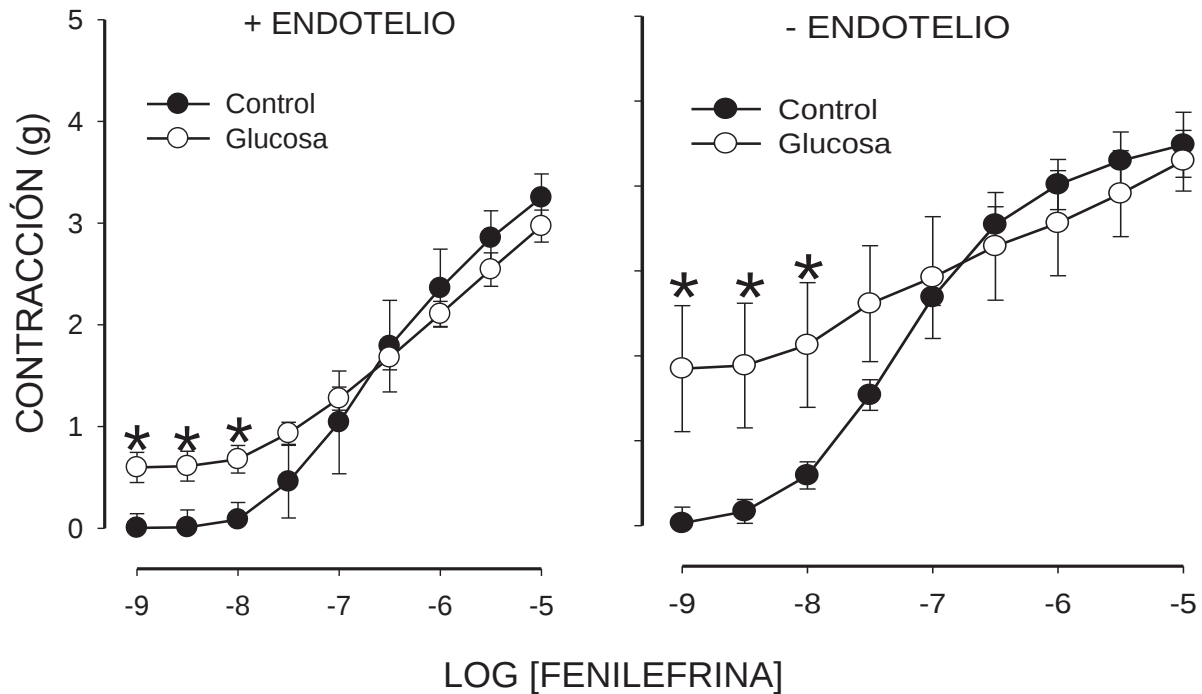


Figura 16.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 180mg/dl de glucosa (criterio 2). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

c).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa.

Grafica usando el criterio 1. En estas curvas se observa de nuevo la tendencia de disminución del efecto presor en respuesta a la fenilefrina, sin embargo no es tan agudo como en la concentración de 180mg/dl de glucosa (figura 17).

GLUCOSA [318mg/dl]

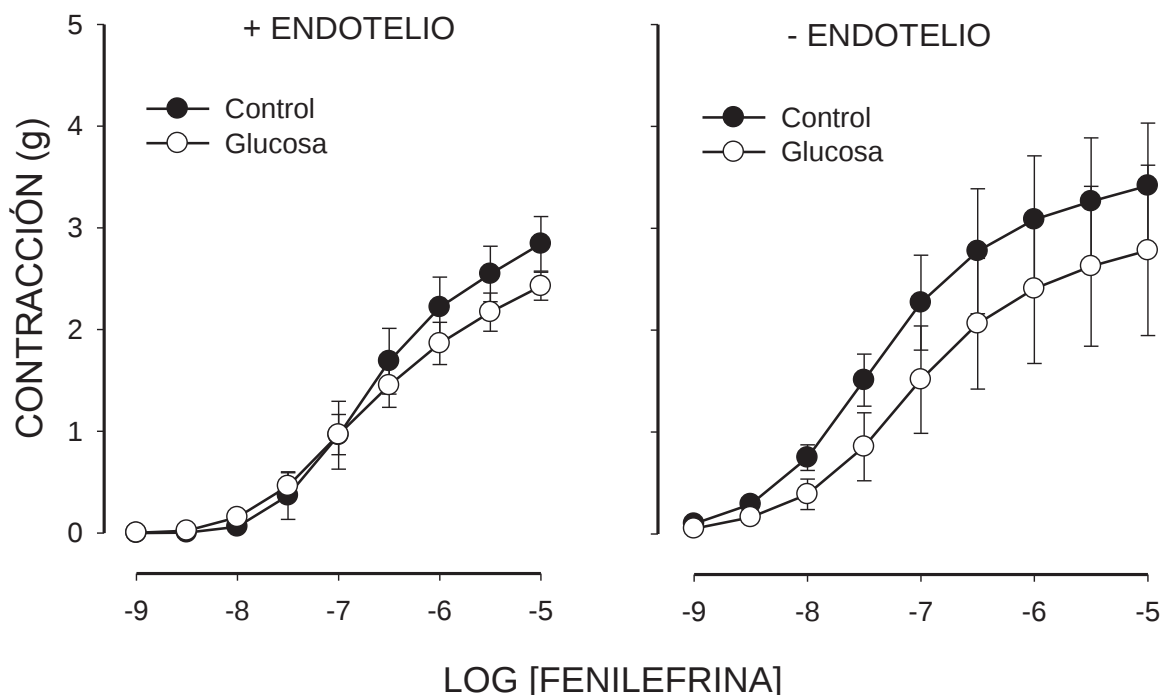


Figura 17.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa (criterio 1). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

Grafica usando el criterio 2. En esta grafica se observa un alza significativa en la respuesta a fenilefrina en las primeras 5 concentraciones para los anillos de aorta con endotelio en comparación con el control mientras que solo se observa un alza significativa en las 3 primeras concentraciones para los anillos sin endotelio, después de los puntos mencionados las respuestas en las siguientes concentraciones se igualan al control y se mantienen hasta llegar al efecto máximo. Las respuestas son mayores en los anillos a los que se les removió el endotelio, así de esta manera se observa que el efecto máximo es mayor (Figura 18).

GLUCOSA [318mg/dl]

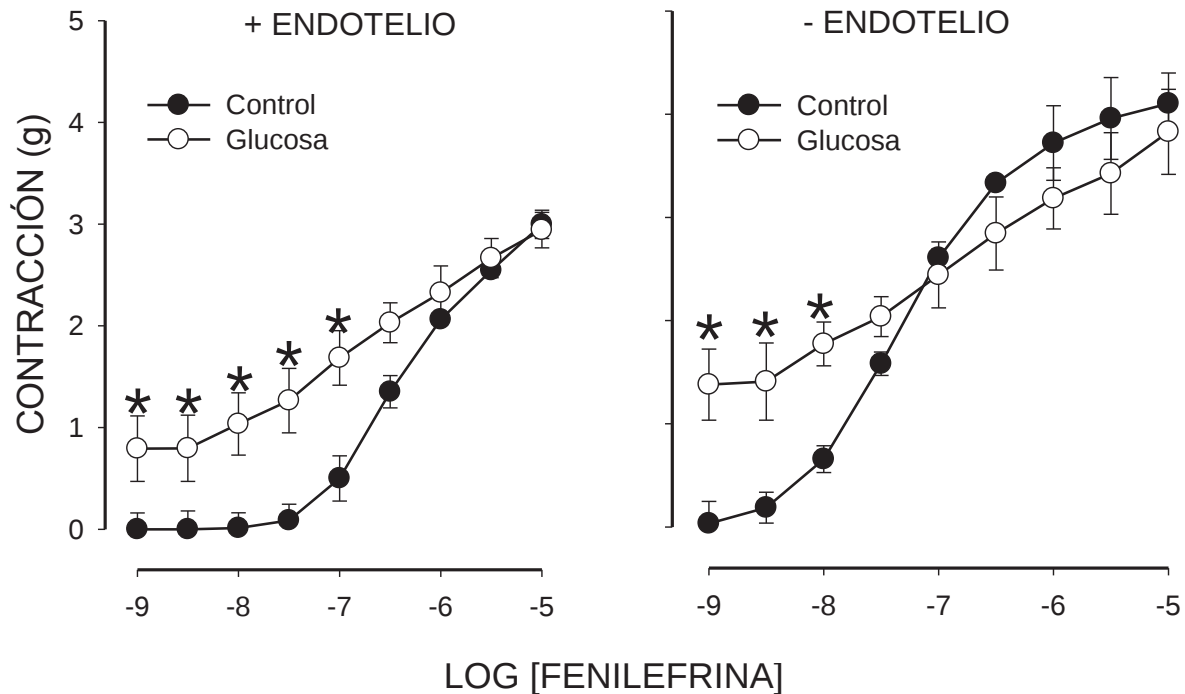


Figura 18.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica sin endotelio en presencia de 318mg/dl de glucosa (criterio 2). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

d).- Curvas concentración-respuesta en aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa.

Grafica usando el criterio 1. A esta concentración de glucosa se observa una mayor disminución en la respuesta presora a fenilefrina en comparación con las curvas controles. Se observa una disminución considerable a partir de la sexta concentración de fenilefrina en los vasos con endotelio, mientras que en la curva

de los vasos sin endotelio esta diferencia se observa desde la cuarta concentración (figura 19).

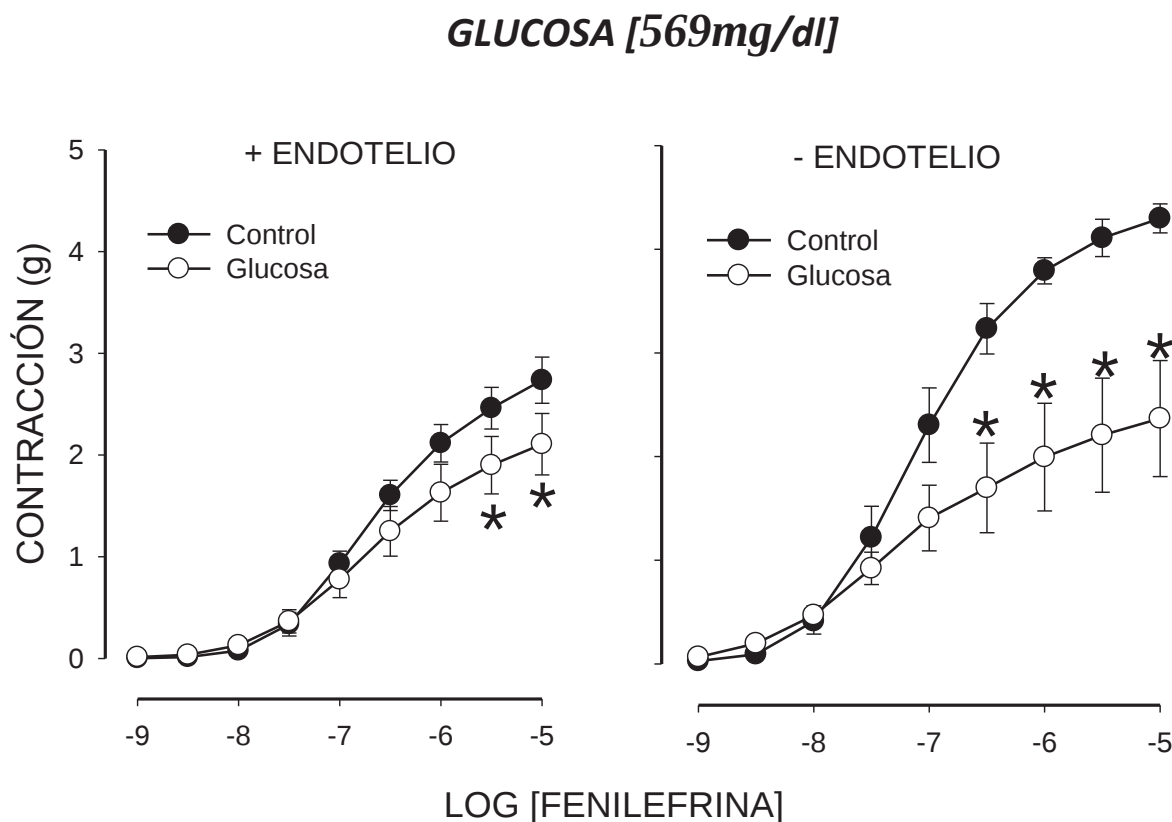


Figura 19.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa (criterio 1). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos. * $p < 0.05$ vs control; prueba Tukey.

Grafica usando el criterio 2. En esta grafica se observa un aumento al igual que las graficas anteriores (graficas criterio 2), sin embargo este aumento es de mayor intensidad para ambos casos (anillos con y sin endotelio). (Figura 20).

GLUCOSA [569mg/dl]

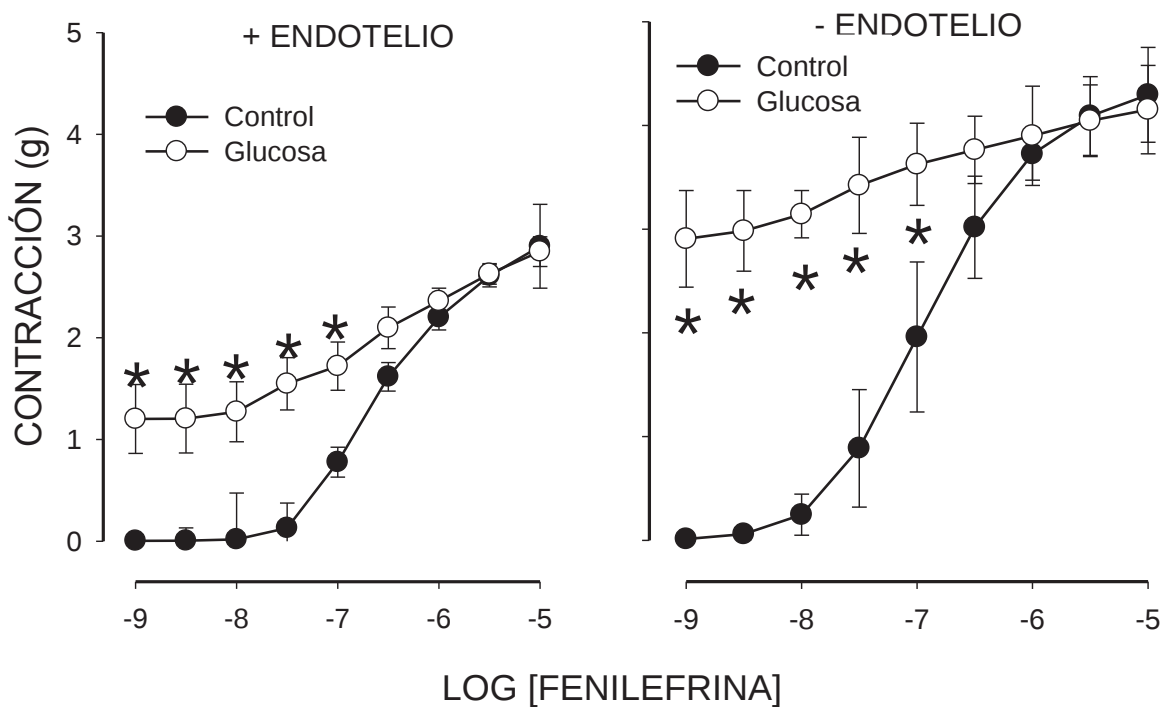


Figura 20.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta torácica con y sin endotelio en presencia de 569mg/dl de glucosa (criterio 2). Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos. * $p < 0.05$ vs control; prueba Tukey.

4.- Determinación de áreas bajo la curva.

Se realizó la determinación de áreas bajo la curva a manera de poder visualizar mejor las diferencias al comparar los dos tipos de criterios usados para graficar las respuestas a fenilefrina.

a).- Áreas bajo la curva controles.

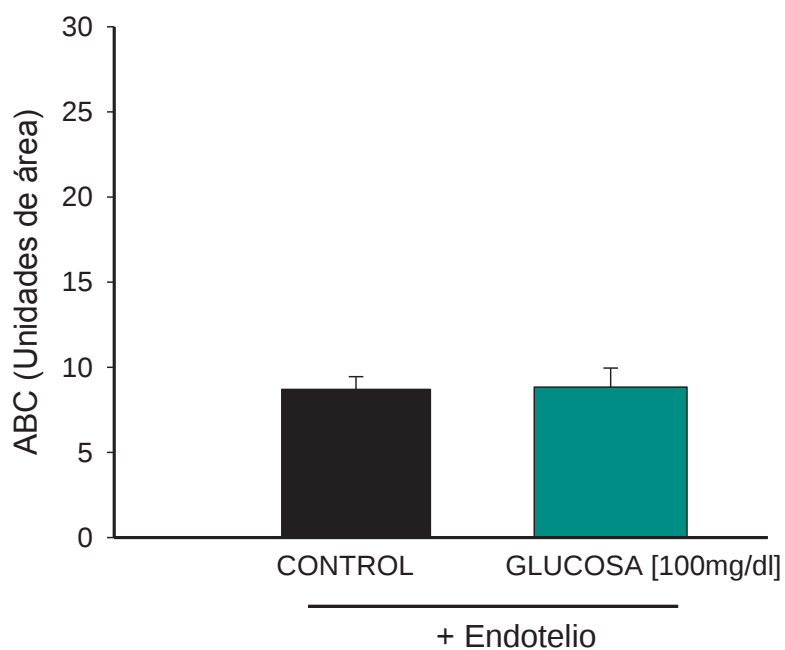


Figura 21.- Áreas bajo la curva controles. En esta grafica se observa que no hay cambios en área bajo la curva en la segunda curva a la fenilefrina en presencia de 100mg/dl de glucosa (concentración control).). Cada barra es el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

b).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 180mg/dl de glucosa.

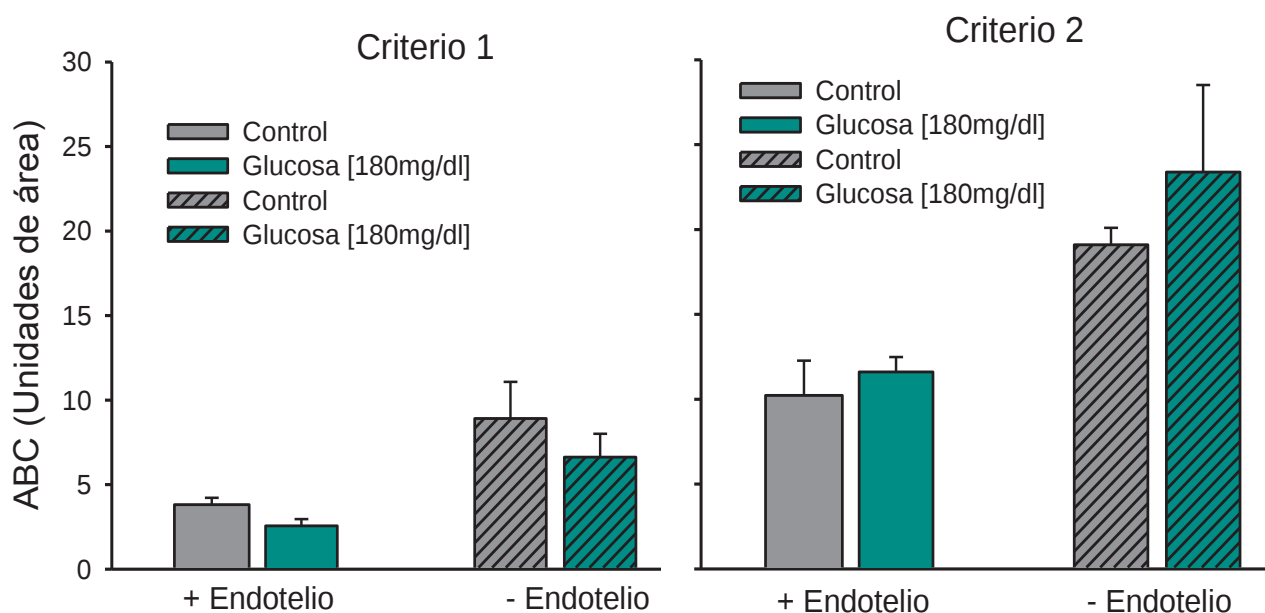


Figura 22.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 180mg/dl de glucosa. Cada barra es el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos..

c).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 318mg/dl de glucosa.

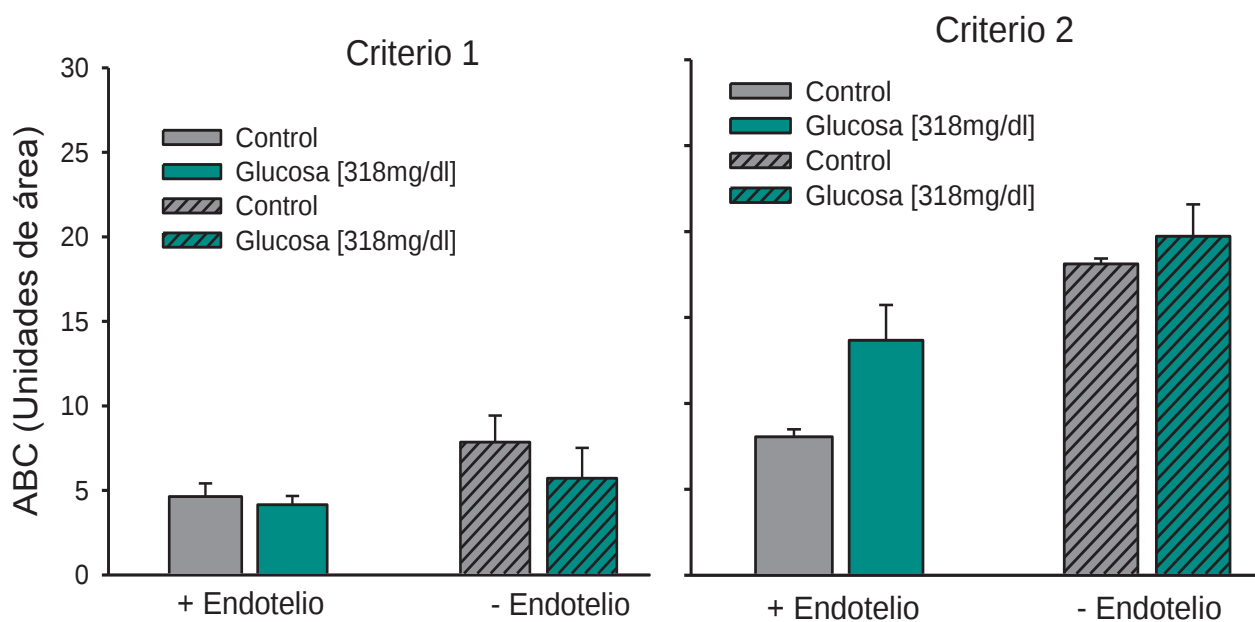


Figura 23.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 318mg/dl de glucosa. Cada barra es el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

d).- Áreas bajo la curva para los dos criterios de graficación en presencia de 569mg/dl de glucosa.

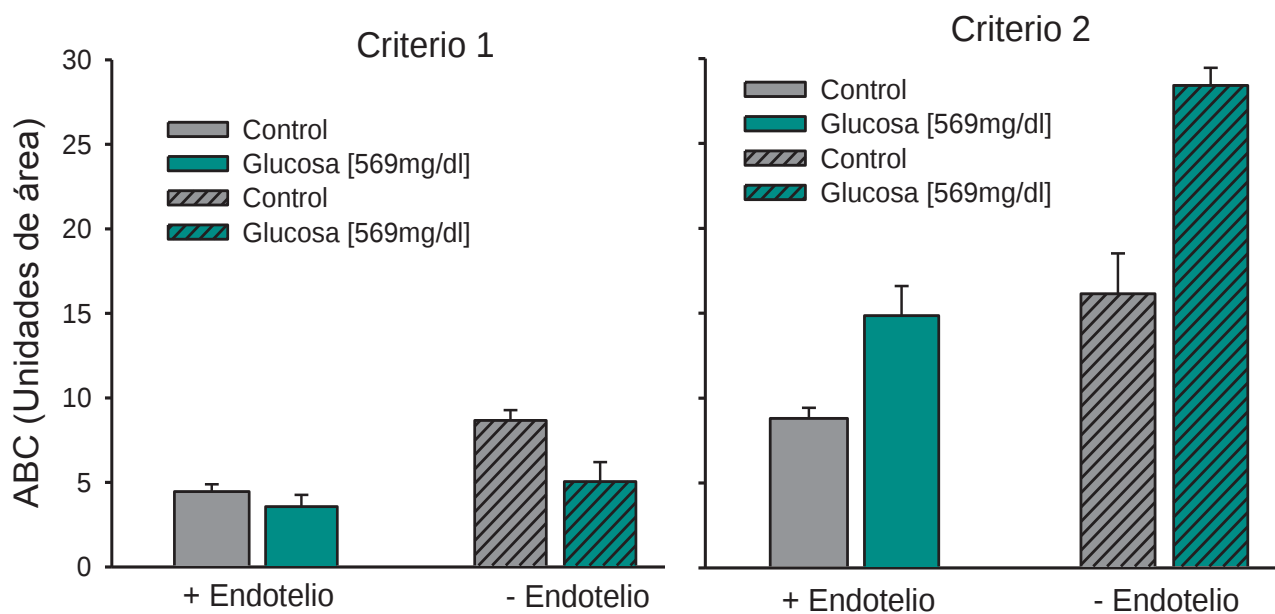


Figura 24.- Áreas bajo la curva para los dos criterios en presencia de 569mg/dl de glucosa. Cada barra es el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

VI.- DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son:

- a).- Se observó que la glucosa a concentraciones que simulan hiperglucemias agudas produce por sí misma contracción en los anillos de aorta torácica de rata.*
- b).- Al incubar los anillos de aorta torácica de rata con manitol a las mismas concentraciones que las usadas con glucosa se produjo de igual manera contracción.*
- c).- Se observó que la contracción debida a la glucosa es del más del doble en los anillos de aorta sin endotelio en comparación con los anillos con endotelio.*
- d).- La contracción producida por la glucosa se sostiene por más de una hora. Esta contracción se sostiene sin decaimiento alguno lo cual indicó que los anillos de aorta no regresarían a su tensión basal.*
- e).- Bajo el criterio uno de graficación se observó una aparente disminución en el efecto contráctil adrenérgico en respuesta a la fenilefrina.*
- f).- Bajo el criterio dos de graficación se observa que hay una mayor respuesta contráctil en las primeras concentraciones de fenilefrina.*

La hiperglucemia está asociada en el desarrollo de hipertensión debido a que se ha comprobado que la presión arterial se ve incrementada hasta 40mm Hg en respuesta a infusiones con concentraciones elevadas de glucosa en experimentos en el animal completo, esto puede ser asociado a que la hiperglucemia afecta la relajación vascular probablemente por la acumulación de sorbitol, el agotamiento de myo-inositol, la producción de radicales libres o por la activación de la proteína cinasa C, además existen reportes de que la hiperglucemia estimula al sistema nervioso simpático, tal vez por la activación de neuronas del hipotálamo conduciendo a un incremento en la liberación de noradrenalina (Villafaña S. et al. 2004)⁸, sin embargo con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos

asociar que una alza en la presión arterial producida por hiperglucemia puede ser en parte debido a que se produce una fuerte contracción vascular que se sostiene sin decaimiento alguno por acción de la glucosa misma en concentraciones elevadas. Al haber una contracción disminuye el diámetro arterial y aumenta la resistencia periférica del flujo sanguíneo lo que resulta en un alza de la presión arterial.

Por otra parte, debido a que el manitol es una sustancia que tiene la misma osmolaridad que la glucosa y que esta produjo de igual manera contracción en los anillos de aorta torácica, podemos proponer que el mecanismo por el cual la glucosa produce vasoconstricción es debido a un efecto de tipo osmótico que solo se da cuando las concentraciones de glucosa son elevadas.

La vasoconstricción en el organismo se da por acción de estímulos por parte del sistema nervioso que producen liberación de catecolaminas que tienen acción sobre receptores adrenérgicos en los vasos sanguíneos, sin embargo la constricción es regulada por agentes biológicamente activos que producen vasodilatación. Estos agentes son producidos por las células endoteliales que forman una mono capa que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos (Lermoli, 2003)⁶. De esta manera el resultado observado de que los anillos de aorta torácica sin endotelio presentaron una contracción de más del doble en comparación con los anillos de aorta con endotelio por efecto de la glucosa se explica debido a que por la ausencia de endotelio (en este caso debido a la remoción física de la capa interna del vaso por un dispositivo metálico rugoso) los factores de relajación que contrarrestan la vasoconstricción (principalmente óxido nítrico) no están presentes.

El óxido nítrico es el principal factor de relajación que produce el endotelio, sin embargo es un compuesto muy lábil ya que se oxida con rapidez a nitrito y luego a nitrato por acción de la hemoglobina oxigenada, el anión superóxido y el oxígeno molecular, y así se excreta por la orina. La hiperglucemia está asociada al fallo vascular debido a que esta produce un aumento de estrés oxidativo el cual se

refleja en una sobre producción de aniones superóxido y otros radicales libres que afectan directamente al NO inhibiendo su función. Por tanto la disfunción endotelial es caracterizada por una alteración en la producción y biodisponibilidad de los factores de relajación dependientes del endotelio, particularmente el óxido nítrico (Koichi Node, Terio Inoue, 2009)⁷, de esta manera era de esperarse que la respuesta vasoconstrictora a un agente adrenérgico (en nuestro caso a Fenilefrina) en presencia de concentraciones elevadas de glucosa se viera aumentada debido a la falta de NO disponible que mediara la respuesta, sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la respuesta contráctil a la fenilefrina no se ve aumentada. Una posible explicación de por qué la respuesta contráctil a fenilefrina no se ve aumentada en presencia de glucosa, es debió a que el tiempo de incubación con las concentraciones elevadas de glucosa antes de realizar la curva concentración-respuesta fue durante un periodo de tiempo corto (1 hora), ya que se ha reportado que después de incubar los anillos de aorta entre 5-6 horas si se ve aumentada la respuesta.

Por otra parte la disminución aparente en la respuesta contráctil a la fenilefrina bajo el criterio uno es debido a que al realizar las curvas concentración-respuesta en presencia de las diferentes concentraciones de glucosa se partió de un basal mayor debido a la contracción provocada por la glucosa, sin embargo en todos los casos el efecto máximo de contracción obtenido al agregar la última concentración de fenilefrina es igual al alcanzado en la curva control.

VII.- CONCLUSIÓN

La glucosa a concentraciones elevadas produce contracción vascular y esto es debido a un efecto osmótico.

Los resultados obtenidos sugieren que una elevación de la glucosa puede ser asociada con la elevación de la presión arterial debido a que los vasos sanguíneos presentan vasoconstricción.

Las concentraciones elevadas de glucosa no producen aumento en la respuesta contráctil a fenilefrina.

REFERENCIAS

- 1.- Norma Oficial Mexicana, NOM-015-SSA2-1994, "Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria". Disponible en www.salud.gob.mx
- 2.- Higashida B. "Ciencias de la salud". Cuarta edición. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana; 2001.
- 3.- Powers Alvin C. Diabetes Mellitus en Harrison, Principios de Medicina Interna. Volumen II. México, D.F: McGraw-Hill; 2002. Pág. 2467-2499.
- 4.- Khuwaja A. K, Khowaja L. A, Cosgrove P. The economic costs of diabetes in developing countries: some concerns and recommendations. Diabetologia. Springer-Verlag. 2009.
- 5.- Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003. Disponible en www.insp.mx/ensa/ensa_tomo2.pdf Consultado el 20 Abril 2010.
- 6.-Lermoli R. Capítulo 4. Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª edición. Montevideo, Uruguay; Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág.53-72.
- 7.- Koichi Node, Terio Inoue. Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure. Cardiovascular Diabetology. Departamento de Medicina cardiovascular y renal, Universidad de Medicina. Saga, Japón. 29 de Abril 2009. Disponible en <http://www.cardiab.com/content/8/1/23>
8. - Villafaña Santiago, Huang Fengyang, Hong Enrique. Role of the sympathetic and renin angiotensin systems in the glucose-induce increase of blood pressure in rats. Departamento de farmacología, CINVESTAV-IPN. México, DF. Octubre 2004. Disponible en www.sciencedirect.com
- 9.- Juan Carlos Cruz Medina. Efecto de la hiperglucemia sobre la presión de perfusión renal. Morelia, Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2010.
- 10.- Daniel Godínez Hernández. Efecto del captopril sobre la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 vasculares durante la génesis de la hipertensión

arterial en la rata. México, D.F. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 2005.

11.- Frank H. Netter. Colección Ciba de ilustraciones medicas. Tomo V Corazón. Barcelona, España. Editorial Salvad; 1983.