

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

ESTUDIO DE LA FUNCION CARDIOVASCULAR EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTRIGLICERIDEMIA E
HIPERTENSION EN RATA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL PRESENTA:

Biól. Exp. Karla Guadalupe Carvajal Aquilera.

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Guadalupe Baños de Mac Carthy.

ASESOR INTERNO: Dr. Rubén Román Ramos.

ASESOR EXTERNO. Dr. Jorge Suárez Munguía.

LUGAR DE REALIZACION: Depto. de Bioquímica, Instituto Nacional de
Cardiología "Ignacio Chávez".

México, D.F.

septiembre de 1997.

DEDICATORIAS

A toda mi familia, especialmente a mis padres Abigail y Fernando y a mi hermana Mara, que con su entereza frente a la vida me han enseñado, que a pesar de la adversidad, vale la pena luchar por un ideal.

A la memoria del más fiel y leal compañero: Tufi, dondequiera que estés ...

CONTENIDO

Resumen	v
Abreviaturas	vii
 I. AGRADECIMIENTOS	 1
II. INTRODUCCION	3
III. MARCO TEORICO	5
Definición de hipertensión	5
Triglicéridos y lipoproteínas	7
Daño por isquemia y reperfusión	10
IV. ANTECEDENTES	16
V. JUSTIFICACION	28
VI. OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Particulares	29
VII. HIPOTESIS	30
VIII. METODOLOGIA	31
Inducción de hipertrigliceridemia	31
Muestras sanguíneas	31
Determinación de triglicéridos	32
Medición de presión arterial	32
Isquemia/reperfusión <i>in vivo</i>	32
Respuesta cardiaca <i>in vitro</i>	33
Determinaciones enzimáticas	38
Cuantificación de lipoperoxidación	38
Determinación de proteínas	39

Análisis morfológico	B. A. M. IZTAPALAPA ESCOBAR	40
Análisis estadístico		40
IX. RESULTADOS		42
Actividad mecánica y eléctrica del miocardio		42
Isquemia/reperfusión <i>in vitro</i>		45
Isquemia/reperfusión <i>in vivo</i>		47
Análisis morfológico.		58
X. DISCUSION		59
XI. CONCLUSIONES		67
XII. BIBLIOGRAFIA		68

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (EC) son la principal causa de muerte en los países con estilo de vida occidental. Numerosos estudios han destacado el papel de los distintos factores de riesgo que están implicados en la patogénesis de las EC. Sin embargo, la participación de algunos de ellos, como la hipertrigliceridemia (HTG) o aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), permanece aún en controversia.

Estudios preliminares en ratas con HTG, inducida por la administración de una dieta alta en carbohidratos, han demostrado que en este estado patológico se desarrolla hipertensión arterial (HTA) y otras alteraciones de la función endotelial vascular. Otras manifestaciones involucradas en la patogénesis de EC, como resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y aumento de tejido adiposo abdominal, han sido también observadas en este modelo.

El presente trabajo tiene como meta principal la aportación de elementos que ayudan a evaluar el papel de la HTG como factor de riesgo que aunado a la HTA favorecerían el desarrollo de formas graves de EC que se manifiestan frente a estrés agudo como isquemia y reperfusión. Con este fin se han evaluado la función cardíaca *in vivo* e *in vitro* de animales a los que se les ha inducido HTG e HTA.

Para tal efecto, se utilizaron ratas Wistar de uno u otro sexo recién destetadas a las que se les indujo HTG e HTA administrándoles sacarosa comercial al 30% en el agua de bebida durante 20-25 semanas. Los animales así tratados se utilizaron para evaluar la función cardíaca, **a)** *in vitro*, utilizando los corazones de los animales en un sistema de tipo Lagendorff, en donde se evaluó la función mecánica (presión de perfusión e intraventricular) así como la actividad eléctrica (intervalo aurículo-ventricular) y la respuesta a estrés agudo por isquemia-reperfusión (incidencia de arritmias y recuperación del trabajo ventricular) y **b)** función cardíaca *in vivo*, donde se evaluó la respuesta cardíaca (presencia de arritmias y liberación de enzimas marcadoras de daño tisular) al estrés producido por isquemia-reperfusión, con o sin el uso de agentes protectores. La cuantificación de triglicéridos y registro de la presión arterial se realizaron rutinariamente. Ratas de igual peso, sexo y edad con alimentación estándar fueron utilizadas como controles y sometidas a los mismos procedimientos. El número de animales utilizados para cada experimento, fue de 6-8 ratas por cada grupo, y las diferencias se tomaron como significativas cuando se obtuvo una $p \leq 0.05$.

La evaluación de la función cardíaca llevada a cabo en el sistema de órgano aislado, mostró que los corazones de ratas HTG machos tienen un desarrollo mecánico menor que los controles; no así las ratas HTG hembras, quienes demostraron incluso un desarrollo mayor que los controles. En ambos casos, se observaron diferencias en la actividad eléctrica, en donde las ratas HTG manejan intervalos menores que los controles. En este mismo sistema, el proceso de isquemia-reperfusión en los corazones de ratas HTG machos produjo un daño mayor, reflejado en una mayor incidencia de arritmias y menor recuperación mecánica después de la reperfusión. Los efectos de la isquemia y reperfusión *in vivo*, utilizando ketorolac, de acción ionofórica para calcio, como agente protector (1 mg/Kg i.v), fueron también más severos en las ratas HTG machos, ya que las arritmias producidas por la reperfusión no fueron revertidas por el fármaco y la liberación de creatin cinasa y lactato deshidrogenasa no disminuyó, contrario a lo observado en las ratas controles. En las ratas hembras sometidas a este mismo procedimiento, se observó recuperación del ritmo sinusal, aunque en un periodo más largo que en las controles. Sin embargo cuando se utilizó un agente protector como el PBN (56 mg/Kg i.v), un atrapador de radicales libres, las arritmias producidas durante la reperfusión fueron revertidas. Así mismo, la cuantificación de MDA, reveló una disminución de la lipoperoxidación durante la reperfusión cuando se usó PBN. En un análisis histológico de arterias se han observado algunos cambios morfológicos en las ratas HTG, como disminución de la luz vascular, aumento de núcleos y tamaño de las células.

Estos resultados sugieren que existe una diferencia en la actividad del miocardio de las ratas HTG con respecto a las normales. Los cambios en el sistema de conducción sugieren alteraciones a distintos niveles como por ejemplo en la composición de las membranas celulares por las cuales se transmite el impulso eléctrico, lo cual favorecería la generación de las arritmias durante la reperfusión. Algunas vías metabólicas podrían también verse afectadas, impidiendo la reenergización adecuada del

corazón isquémico. La protección observada con el PBN lleva a presumir que los procesos oxidativos durante la reperfusión están intensificados en los corazones HTG, de modo que la utilización de un modulador del calcio, como el ketorolac, no es suficiente para revertir el daño. Puede decirse que el estado patológico de los animales HTG contribuye a la alteración de la actividad mecánica y eléctrica del miocardio, lo que favorecería el desarrollo de desórdenes cardiovasculares mayores e intensificaría el daño producido por estrés agudo como la isquemia y reperfusión. Quedan aún por esclarecer los mecanismos y funciones celulares directamente afectados. La diferencia observada en las ratas hembras puede atribuirse a un efecto protector por los estrógenos.

ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina).
Aco	Acetil coenzima A.
Ach	Acetilcolina.
AD	Adenosina.
All	Angiotensina II.
BHT	Butil-hidroxi-tolueno.
Bk	Bradicinina.
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico.
CK	Creatín cinasa.
EC	Enfermedades cardiovasculares.
ECA	Enzima conversora de la angiotensina.
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio.
ES	Error estándar
ET	Edotelina.
EXV	Extrasístoles ventriculares.
FCBF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos.
FCDP	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
FV	Fibrilación ventricular.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (high density lipoproteins).
HS	Heparán sulfato.
HTA	Hipertensión arterial.
HTG	Hipertrigliceridemia.
IAV	Intervalo aurículo ventricular.
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (intermediate density lipoproteins).
KET	Ketorolac
L-arg	L-arginina.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins).
MDA	Malondialdehído.
Mlv	Músculo liso vascular.
NADH	Dinucleótido de adenina-niacina reducido.

NO	Oxido nítrico
i.p.	intraperitoneal.
PBN	N-fenil-butilnitrona.
PGI ₂	Prostaciclina.
PI	Presión intraventricular.
PP	Presión de perfusión.
PSD	Presión sanguínea diastólica .
RHTG	Ratas hipertrigliceridémicas.
SHR	Rata espontáneamente hipertensa (Spontaneously hypertensive rat).
SOD	Superóxido dismutasa.
TBA	Acido tiobarbitúrico.
TG	Triglicéridos.
TGF β	Factor- β transformante de crecimiento.
Thr	Trombina.
TV	Taquicardia ventricular.
TXA ₂	Tromboxano A ₂ .
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoproteins).

I. AGRADECIMIENTOS

La maestría de Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana cuenta con el apoyo de CONACyT según el convenio PFPN/66/92 .

Mi reconocimiento al CONACyT por la beca con el número de registro 92047 otorgada durante el desarrollo de la maestría.

El sistema de adquisición de datos para corazón aislado fué diseñado por el maravilloso personal del departamento de Instrumentación y Desarrollo Tecnológico del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” . Por su amable colaboración, muchas gracias.

Gracias también al departamento de Patología y al Biólogo David Cruz Robles por el apoyo prestado para la realización de los cortes y análisis de las laminillas.

Agradezco al departamento de Endocrinología por su colaboración en la determinación del perfil lipídico.

Gracias al Dr, Gustavo Sánchez Miranda por su asesoramiento en el análisis y descripción de los electrocardiogramas.

Mi más profundo agradecimiento, respeto y admiración a mi Director de Tesis y a mis asesores : la Dra. Guadalupe Baños de Mac Carthy, el Dr. Rubén Román Ramos y el Dr, Jorge Suárez Munguía. Gracias por su dedicación y paciencia.

Muchas gracias al departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. A todos los que han estado, los que están y estarán compartiendo la maravillosa tarea de hacer investigación y que de una u otra forma han contribuído a mi formación profesional y humana. Gracias al Dr. Edmundo Chávez Cossío y al Dr. Rafael Moreno Sánchez por darme la oportunidad de incorporarme y descubrir el mundo de la ciencia.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-unidad Iztapalapa, a mis profesores y compañeros, mi más sincero agradecimiento por confiar en mí y darse a la difícil tarea de formar un estudiante, un profesionista y un ser humano de calidad. Espero no defraudarlos.

A Mayela y Ana, por su fraternal compañía y apoyo durante toda mi vida universitaria, muchas gracias.

Gracias a Cheny por su perseverante amistad que durante tantos años me ha acompañado.

II. INTRODUCCION

La enfermedad coronaria es la principal causa de muerte en los países industrializados de Occidente. En nuestro país, las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de morbi-mortalidad, y se prevee que las cifras de casos se elevarán significativamente en los próximos años. A su vez, la mayoría de los casos de enfermedad coronaria aparecen como consecuencia de una patología primaria: la aterosclerosis, o acumulación de depósitos grasos en las paredes de las arterias. El crecimiento de estos depósitos o placas ateroscleróticas provoca la formación de coágulos que impiden el flujo sanguíneo. Si un coágulo llega a ocluir una de las estrechas arterias coronarias que riegan el corazón, se produce un infarto del miocardio, o ataque al corazón (Stamler J et al, 1985).

Se conocen ya algunas causas de la aterosclerosis y de la enfermedad coronaria. La presión sanguínea elevada, la diabetes, el hábito de fumar y otros factores parecen aumentar la probabilidad de una enfermedad coronaria prematura. Las dietas ricas en colesterol y en grasas saturadas contribuyen a la elevación de los niveles de lípidos en la sangre y a la progresión de la aterosclerosis. La constitución genética del individuo desempeña también cierto papel: algunas personas pueden ingerir cantidades enormes de grasa en su dieta durante períodos prolongados sin que se produzca una elevación del colesterol de la sangre, abundan quienes, con valores de colesterol extraordinariamente elevados, jamás padecerán de

enfermedad coronaria, y por último, sí pueden sufrirla aquéllos que, por su perfil de riesgo, los médicos considerarían "a salvo" (Lawn RM, 1992).

Las causas de las enfermedades cardiovasculares son múltiples y variadas. La interrelación de los factores de riesgo presentes en un individuo juega un papel muy importante en la aparición de estos desórdenes: factores como el sexo y la edad son determinantes en el desarrollo de enfermedad cardíaca, sin embargo, la presencia de otros factores como los desórdenes metabólicos puede acelerar el proceso o bien, desencadenarlo precipitadamente (Larasson B et al, 1993) . El grado con el que cada factor de riesgo participa en la patogénesis de estas enfermedades no puede ser establecido fácilmente, ya que su contribución parece estar estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de otros factores de riesgo, haciendo el origen de estos padecimientos una entidad de componentes bastante compleja. Por otro lado, los desórdenes metabólicos que se han asociado a la aparición de enfermedades cardiovasculares, pueden deberse a factores meramente genéticos, a la contribución de factores ambientales como la dieta y hábitos de vida, o bien a una interacción de ambos (Descovich GC et al, 1993).

En el presente trabajo se hace un estudio de la participación de las dislipidemias en la patofisiología de las enfermedades cardiovasculares, se trata de establecer el efecto de la hipertrigliceridemia sobre algunas funciones cardiovasculares y su relación, interacción e implicación con otros factores de riesgo como el sexo y la hipertensión.

III. MARCO TEORICO

DEFINICION DE HIPERTENSION.-

Los riesgos a largo plazo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular aumentan con cada incremento de la presión sanguínea. El grado de riesgo para enfermedades coronarias y cerebrales vasculares es aproximadamente dos veces más elevada en adultos con presión sanguínea diastólica (PSD) por arriba de 90 mm de Hg en comparación con los que tienen PSD por debajo de 80. La definición de hipertensión por lo regular se basa en la PSD, pero los niveles sistólicos están inclusive más íntimamente correlacionados con el riesgo. La hipertensión sistólica aislada, por lo general presente en pacientes de más de 65 años de edad, se asocia con un riesgo significativamente mayor.

Con base en el aumento relativo en los riesgos, la hipertensión puede definirse como niveles promedio sostenidos por arriba de 140/90 mm de Hg en pacientes adultos. Aquéllos con PSD por debajo de los 90 pero con presión sistólica por arriba de 160 son definidos como con hipertensión sistólica aislada.

En la práctica clínica típica, el 95 % de los adultos hipertensos de 18 a 65 años de edad no tendrá causa identificable, por lo tanto su hipertensión debe definirse como primaria, esencial o idiopática. La causa específica de la hipertensión primaria es desconocida. Se ha demostrado una predisposición genética con una incidencia

aproximadamente dos veces mayor en aquellos individuos con padres que son hipertensos. Los factores ambientales que incrementan la incidencia incluyen:

*Obesidad, particularmente de la parte superior del cuerpo. .

*Estrés psicogénico.

*Ingesta elevada de sodio.

*Ingesta de alcohol mayor a una onza por día.

La presión sanguínea puede elevarse como consecuencia de un aumento, ya sea en el gasto cardíaco o en la resistencia vascular periférica. Aunque el gasto cardíaco puede ser alto inicialmente, la hipertensión generalmente persiste a causa de la resistencia vascular periférica. Esta, a la vez, puede elevarse tanto por el estrechamiento funcional como por el engrosamiento estructural de los vasos de resistencia. Factores múltiples pueden ser los responsables. La resistencia a las acciones de la insulina en los músculos periféricos ha sido demostrada en individuos hipertensos y la hiperinsulinemia puede servir como un estímulo para la hipertrofia vascular. Se están descubriendo muchos otros factores presores e hipertrofiantes: el factor relajante derivado del endotelio, óxido nítrico (NO) y la endotelina son dos que probablemente estén involucrados en la hipertensión humana (Kaplan NM, 1994).

El aumento de la resistencia vascular periférica es una de las alteraciones que con mayor frecuencia se observa en la hipertensión esencial; podría afirmarse que es la disfunción más

constante en este padecimiento. El músculo liso vascular es el responsable de la regulación de la resistencia vascular periférica, por lo tanto, cualquier alteración en el tono muscular se reflejaría en ese parámetro. El aumento de la resistencia vascular periférica puede atribuirse a cambios en la estructura y funcionamiento del sistema vascular, que ciertamente, se han observado en la hipertensión (Bohr DF et al, 1984).

TRIGLICERIDOS Y LIPOPROTEINAS.-

Los triglicéridos son el medio por el cual los ácidos grasos de cadena larga son almacenados en el cuerpo como una fuente de energía y son la forma en la que estos ácidos grasos son transportados desde el intestino delgado y el hígado hacia las células periféricas. Las moléculas de triglicéridos son producidas en el retículo sarcoplásmico de las células del hígado y del intestino delgado. En asociación con apolipoproteínas específicas, las moléculas de triglicéridos son ensambladas en partículas ricas en triglicéridos: las lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado y los quilomicrones en el intestino delgado. Los dos tipos de partículas migran hacia el aparato de Golgi donde son concentrados en vesículas de secreción y liberados hacia el torrente sanguíneo (Ahumada AM, 1991). Estas partículas, conocidas como lipoproteínas, están formadas por un núcleo hidrofóbico constituido por triglicéridos y ésteres de colesterol. Este núcleo se encuentra rodeado de una monocapa anfipática constituida por moléculas de fosfolípidos, colesterol y proteínas asociadas conocidas como apolipoproteínas o simplemente apoproteínas, que caracterizan e

identifican a cada tipo de partícula. La proporción de cada uno de los componentes anteriores, así como la presencia de las distintas apolipoproteínas confieren propiedades fisicoquímicas y fisiológicas específicas a cada partícula, lo que ha servido para su clasificación.

Las principales categorías en las que estas partículas han sido agrupadas son: quilomicrones, que transportan triglicéridos y ésteres de colesterol provenientes de la dieta desde el intestino a los tejidos periféricos; lipoproteínas remanentes, recuperan el colesterol cedido por las lipoproteínas de baja densidad y lo transportan al hígado; lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, por sus siglas en inglés, que transportan los triglicéridos (TG) y colesterol endógenos hacia los tejidos extrahepáticos; lipoproteínas de densidad intermedia o IDL, de las cuales una escasa proporción transporta colesterol y TG a los hepatocitos y el resto se convierte en LDL; lipoproteínas de baja densidad o LDL, son las encargadas de transportar el colesterol sintetizado en el hígado a los tejidos extrahepáticos; y las lipoproteínas de alta densidad o HDL, que se encargan de transportar el colesterol endógeno desde los tejidos hasta el hígado. Las principales características físicas de las lipoproteínas y sus componentes se enumeran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clases y características de las lipoproteínas plasmáticas.

CLASE	DENSIDAD (g/ml)	DIAMETRO (Å)	PRINCIPALES APOPROTEINAS	MASA (Kd)
QUILOMICRON	<0.95	800-5000	AI, AII, B48, CI, CII, CIII, E	400 000
REMANENTES	<1.006	>300	AI, AII, B48, E	< 400 000
VLDL	<1.006	300-800	B100, CI, CII, CIII, E	10-80 000
IDL	1.006-1.019	250-350	B100, CIII, E	5-10 000
LDL	1.019-1.063	180-280	B100	2 300
HDL	1.063-1.125	90-120	AI, AII, CI, CII, CIII, D, E	175-360

Las VLDL son sintetizadas en el hígado, su núcleo está constituido principalmente por triglicéridos, pero también contiene una pequeña cantidad de ésteres de colesterol, fosfolípidos y en su superficie se encuentran las apolipoproteínas B100, CI, CII, CII y E (cuadro 1). El exceso de carbohidratos de la dieta también puede ser convertido en triglicéridos en el hígado y éstos son exportados en forma de VLDL. Estas lipoproteínas se transportan por la sangre desde el hígado hasta el músculo y el tejido adiposo en donde la activación de la lipoproteína lipasa por la CIII libera ácidos grasos de los triglicéridos de las VLDL. Los adipocitos captan estos ácidos grasos, resintetizan triglicéridos con los mismos y

almacenan los productos en gotículas líquidas intracelulares, mientras que los miocitos los oxidan principalmente para suministrar energía. La mayor parte de los restos de VLDL se eliminan de la circulación por los hepatocitos, vía captación mediada por el receptor para la apo E y degradación lisosómica (Lehninger AL et al, 1993).

El catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos ocurre en dos pasos. Primero, las partículas de lipoproteínas son degradadas a "remanentes" por la acción de enzimas lipoproteínas-lipasas en los tejidos periféricos. Específicamente, las lipasas que actúan sobre los componentes localizados en el núcleo de las lipoproteínas convierten las moléculas de triglicéridos en monoglicéridos y ácidos grasos. Se cree que las partículas remanentes de las lipoproteínas de muy baja densidad son las lipoproteínas de densidad intermedia. Segundo, una fracción de las lipoproteínas de densidad intermedia entra en el hígado y el resto es metabolizado más adelante, lo que resulta en la formación de las partículas de lipoproteínas de baja densidad. A pesar de que este proceso no es completamente comprendido, se sabe que casi todo el núcleo de triglicéridos es removido de las partículas de VLDL, dejando una predominancia de colesterol y formándose las partículas de LDL. Además sólo la apolipoproteína B permanece cuando las LDL se forman (Austin M, 1989).

DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSION.-

Se denomina isquemia miocárdica al proceso en el cual se reduce la presión de perfusión sanguínea en un área del músculo cardíaco y que

condiciona una privación de oxígeno tisular y evita la remoción de sus productos catabólicos. La restitución del flujo sanguíneo en el área tisular isquémica constituye el proceso de reperfusión (Guadalajara JF, 1995). Asociadas a este fenómeno, se encuentran varias alteraciones como son: edema tisular, arritmias por reperfusión, formación de bandas de contracción y lisis celular, entre otras (Téllez F et al, 1996). La isquemia miocárdica aguda causa una serie de cambios metabólicos, iónicos y neurohumorales que son el resultado de fenómenos tales como: a) la ausencia del flujo arterial que produce hipoxia y una fuga considerable de sustratos metabólicos que favorecen un metabolismo anaeróbico, así como la hidrólisis de fosfatos de alta energía; b) la falta del flujo venoso conduce a la acumulación de los productos finales del metabolismo anaeróbico en el espacio extracelular y c) la activación de los reflejos neurohumorales produce un aumento de los neurotransmisores circulantes del tejido cardíaco (Gettes LS et al, 1991).

Las evidencias clínicas y experimentales que se han acumulado en los últimos años indican un posible daño secundario a la reperfusión miocárdica, sin embargo todavía no se sabe exactamente si la reperfusión por sí misma es la que produce el daño, o bien si acelera el daño producido en las células durante la isquemia. El daño ha sido bien caracterizado, se han descrito sus características metabólicas, electrofisiológicas, morfológicas y funcionales. Se han propuesto algunas teorías para explicar el daño celular secundario a la reperfusión. Existen dos corrientes que tratan de explicarlo, una de ellas considera que el agente más importante es el calcio y que una sobrecarga de este ion en la célula produce el daño (Fig 1); la otra

corriente considera a los radicales libres derivados del oxígeno como los principales agentes que participan en el daño celular secundario a la reperfusión, aunque, probablemente estos dos agentes se encuentren interactuando (Opie et al, 1985) .

Uno de los fenómenos observados durante la reperfusión es la aparición de arritmias que incluyen taquicardia y fibrilación ventriculares. En diversos estudios ha sido demostrado que las oscilaciones en el contenido de calcio intracelular en la fase de reperfusión coinciden con la aparición de arritmias; el incremento de calcio durante la reperfusión pudiera tener efectos electrofisiológicos que incluyen la aparición de ritmos cardiacos anormales. Consecuentemente, el uso de agentes que modifiquen los movimientos de calcio en los depósitos intracelulares, tendrá un impacto significativo en las anomalías metabólicas, iónicas y eléctricas que caracterizan este tipo de daño (Gettes LS et al, 1991).

La readmisión de sangre y oxígeno en los tejidos isquémicos promueve la liberación de radicales libres derivados del oxígeno, como el hidroxilo . Además, la isquemia causa disturbios en el manejo del oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial y en algunas enzimas como la xantina oxidasa. Existe también una marcada actividad de radicales, probablemente amplificada por iones metálicos que se liberan por las células miocárdicas durante la isquemia. Los radicales libres se producen en los primeros momentos de la reperfusión y muy probablemente el lugar donde se producen sea en el espacio intercelular (Maxwell SRJ, 1995).

MECANISMOS ASOCIADOS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSION

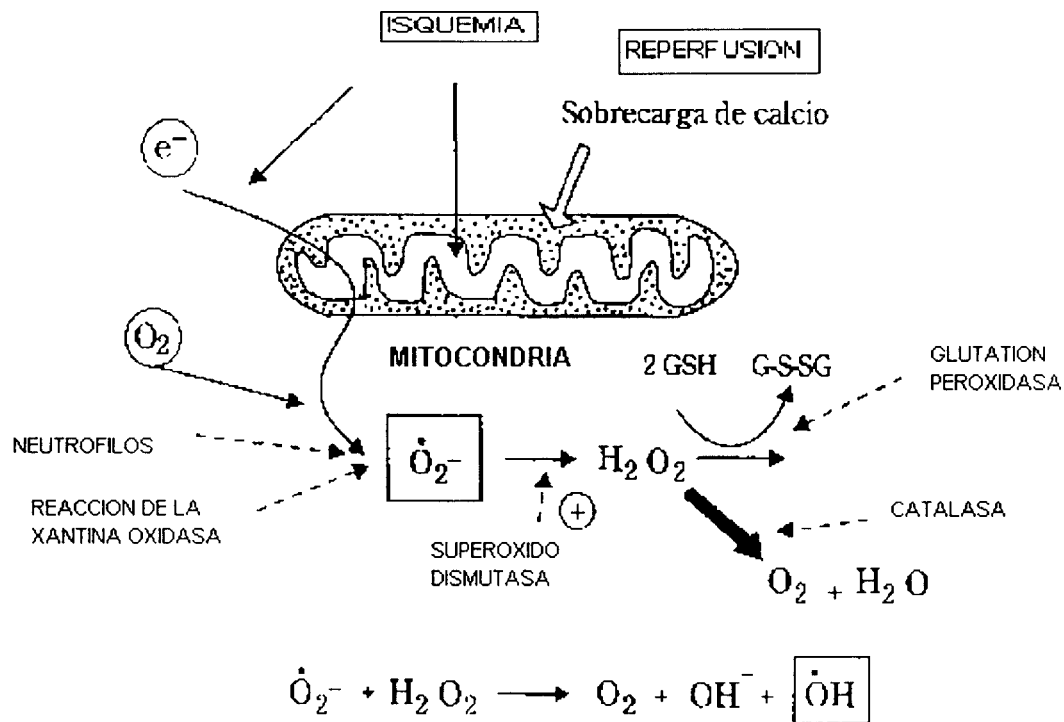


Figura 1. Daños asociados al daño por ischemia y reperfusion. Se ilustran las dos teorias principales que explican el daño: la sobrecarga de calcio mitocondrial y la producción de radicales libres.

El "no reflujo" con daño vascular es otro de los acontecimientos asociados a la reperfusion; ocurre cuando a pesar de ser removida la oclusion coronaria no se restaura el flujo sanguíneo, este fenómeno ha sido observado ampliamente en modelos animales. Existen algunas explicaciones para este evento, primeramente se habla de que el daño microvascular y la migración de los neutrófilos producen edema celular endotelial y como consecuencia, el "no reflujo"; otro

mecanismo propuesto es la formación de agregados de plaquetas y de trombos. Por último se menciona que la contractura isquémica del miocardio puede comprimir las arterias coronarias impidiendo así el reflujo (Engler RL et al, 1986).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios encaminados a la utilización de agentes farmacológicos con el propósito de disminuir el daño por reperfusión. Se han utilizado bloqueadores de calcio, como la nifedipina y el verapamil; agentes antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), el ascorbato y el alfa-1-tocoferol, entre otros. El mecanismo propuesto para el efecto cardioprotector de los bloqueadores de canales de calcio es complejo, pero incluye el ahorro de energía, disminución en la elevación de la adrenalina endógena y del calcio intracelular (Nayler WG et al, 1991).

Otro tipo de fármaco recientemente estudiado ha sido la ciclosporina, fármaco utilizado como inmunosupresor, del que se aprovecha su propiedad de bloquear canales inespecíficos de calcio en la membrana mitocondrial, observándose que disminuye la liberación de enzimas marcadoras de daño miocárdico y la aparición de arritmias (Arteaga D et al, 1992). En esta misma línea, se ha evaluado el efecto protector del Ketorolac, analgésico no esteroideo, que además se ha probado tiene la capacidad de actuar como ionóforo de calcio en algunos sistemas como mitocondrias (Chávez R et al, 1993) y disminuye la severidad del daño

producido durante la reperfusión postisquémica (Pichardo J et al, 1994), reduciendo la aparición de arritmias, la liberación de enzimas marcadoras de daño celular y las alteraciones histológicas del tejido cardiaco. Se cree que el efecto protector de este fármaco es el de contribuir principalmente a evitar la acumulación masiva de calcio intracelular. (Chávez E, 1996) . Otros fármacos utilizados con el mismo fin han sido los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), adenosina, α_1 , α_2 y β_1 bloqueadores adrenérgicos, entre otros, los cuales tienen acciones específicas sobre los mecanismos involucrados en el daño por reperfusión previamente descritos.

IV. ANTECEDENTES

Actualmente, existe un vasto número de evidencias que indica la participación de los desórdenes lipídicos en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (EC) (Reaven P, 1996). Sin embargo, los mecanismos involucrados en su desarrollo y la interacción con otros factores de riesgo permanece aún controversial.

La investigación relacionada con la fisiología y patofisiología cardiovascular experimentó un gran impulso a principios de los años 80, en razón de los descubrimientos relacionados con la función endotelial, los que vinieron a revolucionar el área y abrieron una nueva perspectiva para el esclarecimiento de las incógnitas que rodean la etiopatogenia de la hipertensión, de manera que se ha postulado que este padecimiento es de hecho una enfermedad del endotelio.

En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que la relajación inducida por acetilcolina en preparaciones aisladas de arterias precontraídas por la adición exógena de un agente estimulante como norepinefrina, es estrictamente dependiente de la presencia de las células endoteliales.

El descubrimiento del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) dependiente de acetilcolina, abrió un nuevo campo de

investigación sobre los factores vasoactivos derivados del endotelio. Se ha establecido que un número de agentes vasoactivos induce indirectamente la relajación del músculo liso vascular actuando sobre el endotelio para inducir la generación y liberación del EDRF. Esta sustancia es de vida corta, difunde hacia el músculo liso donde activa a la guanilato ciclasa soluble. Esto resulta en un aumento de la concentración intracelular de GMPc, resultando en relajación del músculo liso vascular (mlv) (Fig. 2). Sin embargo, la vía final en la vasodilatación inducida por el EDRF es la misma que siguen otros nitrodilatadores, los cuales generan óxido nítrico ya sea espontáneamente (como el nitroprusiato) o vía interacción con componentes del tejido (como la nitroglicerina) y finalmente causa una activación de la guanilato ciclasa soluble (Marshall JJ, 1990).

Además de acetilcolina, muchos otros vasodilatadores o estímulos físicos pueden desencadenar relajaciones dependientes del endotelio en diferentes especies incluyendo a los humanos. El endotelio también puede reducir los efectos de las sustancias vasoconstrictoras a través de la liberación basal o estimulada de EDRF (Fig. 2).

Evidencias recientes han demostrado que el óxido nítrico tiene relación con la actividad biológica del EDRF, de hecho, en la aorta intacta de conejo se libera óxido nítrico bajo la

estimulación con acetilcolina. El precursor más probable del óxido nítrico en el endotelio es la L-arginina (Dohi Y et al, 1990).

Evidencias farmacológica y química sugieren que el EDRF es NO o alguna especie relacionada. Además del endotelio, el NO es producido por el cerebro, macrófagos y otros tipos de células (Nathan C, 1992). El NO es sintetizado por la oxidación de un átomo de nitrógeno guanidino de la L-arginina por la enzima sintetasa del óxido nítrico (Palmer RMJ et al, 1988).

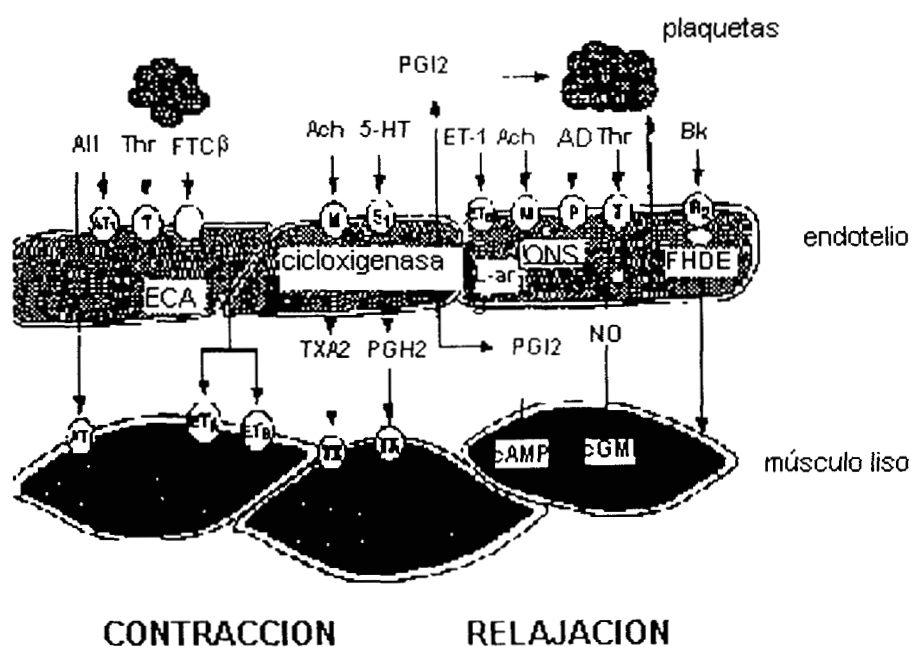


Figura. 2. Sustancias vasoactivas derivadas del endotelio. El endotelio produce factores relajantes (derecha) y constrictores (izquierda). All: angiotensina II, ACh: acetilcolina, AD: adenosina, Bk: bradicinina, cAMP/cGMP: monofosfato de adenosina/guanosina cíclico, ECA: enzima convertidora de la angiotensina, FHDE: factor hiperpolarizante derivado del endotelio, 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina), ET: endotelina-1, L-arg. L-arginina, NO: óxido nítrico, ONS: sintetasa del óxido nítrico, PGI2: prostaciclina, FTCβ: factor transformante de crecimiento, Thr: trombina, TXA₂: tromboxano A₂. Los círculos representan los receptores.

El mecanismo regulador ejercido por el endotelio vascular en la modulación del tono vascular se ve disminuido en hipertensión arterial, tal como ha sido demostrado por ensayos en arterias de ratas hipertensas (Fig 3) (Lüscher TF et al, 1988). En muchos modelos de rata hipertensa, obtenidos por daño renal llevado a cabo por diferentes métodos (estrechamiento de la arteria renal, compresión del parénquima renal o con mineralocorticoides), se ha visto también que existe una reducción de la actividad endotelial en la relajación de anillos de aortas (Van de Voore J y Leusen I, 1986).

Algunos estudios han demostrado que otros padecimientos pueden también afectar la relajación dependiente del endotelio, como puede ser la isquemia renal y reperfusión provocada experimentalmente en ratas (Lieberthal W et al, 1989). Todos estos datos sugieren que tanto la hipertensión como otros padecimientos relacionados con el sistema cardiovascular, de alguna manera dañan el endotelio vascular disminuyendo el control que ejerce sobre el tono muscular. Entre los principales daños morfológicos que ocurren en los vasos sanguíneos durante el desarrollo de la hipertensión, se encuentran las lesiones ateroscleróticas, caracterizadas por la formación de placas de células con un alto contenido de colesterol intracelular, que cristaliza y endurece la pared vascular, existe además calcificación y un aumento en general de la resistencia vascular.

Recientemente se han publicado los resultados de varios protocolos de prevención primaria y secundaria de la morbi-mortalidad por aterosclerosis a través de medidas dietéticas y farmacológicas destinadas a disminuir la concentración del colesterol plasmático. Los resultados de estos importantes estudios, no sólo han confirmado los beneficios del tratamiento hipolipemiante, sino que aportan una evidencia contundente del papel de los lípidos en

FUNCION MODULADORA DEL ENDOTELIO

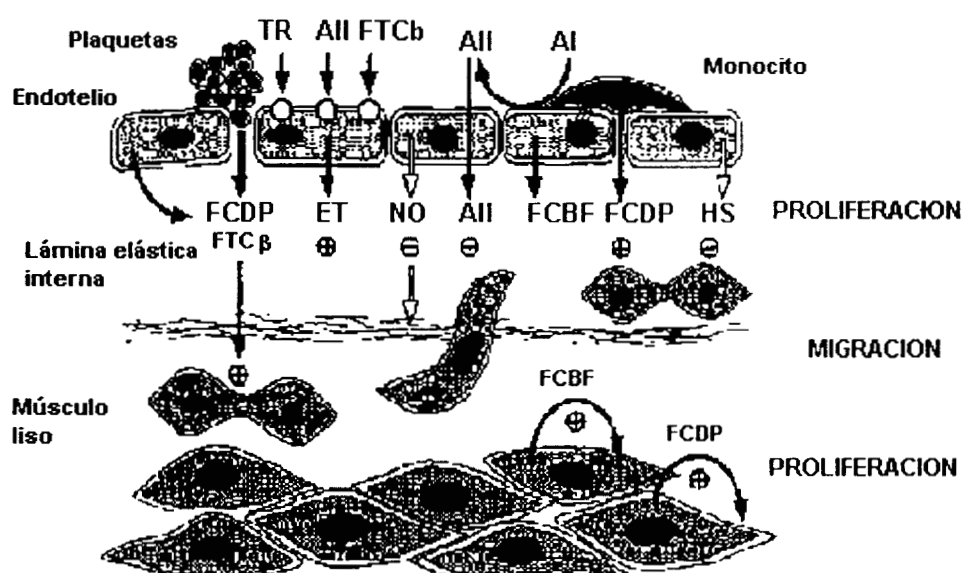


Figura 3. Modulación endotelial de la estructura vascular. Normalmente el endotelio ejerce un efecto inhibitorio neto sobre la agregación plaquetaria, la activación de monocitos y la migración y proliferación del músculo liso vascular (flechas blancas ⊖). Cuando existe disfunción endotelial, los monocitos y las plaquetas se adhieren a las paredes de los vasos y liberan factores de crecimiento al igual que el propio endotelio (flechas negras ⊕). AII: angiotensina II, ET: endotelina, FCDP: factor de crecimiento derivado de las plaquetas, FCBF: factor de crecimiento básico de fibroblastos, FTCβ: factor-β transformante de crecimiento, NO: óxido nítrico, HP/HS: heparán sulfatos, TR: trombina.

el desarrollo de la aterosclerosis y sus complicaciones (Treasure C et al, 1995).

A pesar de que una gran cantidad de investigaciones ha sido llevada a cabo en los últimos 30 años, el significado de los niveles elevados de triglicéridos en plasma como factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares permanece aún controversial (Austin M, 1989). Para unos autores, la hipertrigliceridemia constituye un verdadero riesgo en las enfermedades cardiovasculares, según los datos epidemiológicos, en los que se destaca la presencia de hipertrigliceridemia en pacientes, previa a la incidencia de infartos o enfermedades cardiovasculares (Sirtori CR et al, 1990). Pero para otros, también con base en estudios epidemiológicos, la hipertrigliceridemia es un padecimiento ulterior a los trastornos cardiovasculares (Schwandt P, 1990; Castelli WP, 1992).

Existe evidencia considerable que indica que los hipertensos no tratados muestran anormalidades en el metabolismo de los carbohidratos y de la insulina en comparación con testigos normotensos. Sin embargo, aún no está claro el papel de estos trastornos (Reaven GM, 1990). Por otro lado, se ha demostrado que la alta ingesta de carbohidratos conduce a un aumento de los triglicéridos circulantes y concomitantemente a un cambio en el perfil lipídico. La inducción de hipertrigliceridemia mediante la administración de dietas ricas en carbohidratos ha sido ya reportada (Hwang IS et al, 1987), teniendo como dato relevante, que además de la elevación de los triglicéridos circulantes, los animales que son tratados de esta manera desarrollan también una elevación significativa de la presión

arterial (Martínez FJ et al, 1994). En este sentido, se ha desarrollado una línea de hipertrigliceridemia en rata derivada de la cepa Wistar, en la cual mediante la administración de fructosa, se ha seleccionado a los animales que desarrollan hipertrigliceridemia e hipertensión, dando como resultado un nuevo modelo experimental para el estudio de este padecimiento (Vrána A y Kazdová L, 1990). El estudio de esta línea experimental de hipertrigliceridemia hereditaria en ratas, en la cual se presenta una marcada elevación de la presión arterial, ha demostrado que este factor tiene una estrecha correlación con disturbios metabólicos en los triglicéridos y ácido úrico sanguíneo, demostrando también que estas características cosegregan genéticamente en esta línea de animales (Kunes J et al, 1995).

Con base en los trabajos realizados por Reaven y colaboradores (Reaven G, 1991), se ha desarrollado un modelo de hipertrigliceridemia en rata. En este modelo, la hipertrigliceridemia se induce mediante la administración de una dieta rica en carbohidratos, (azúcar comercial al 30% en el agua de bebida). Después de varias semanas de estar bajo este régimen, de 20 a 25 semanas, los animales muestran una elevación significativa de los niveles de triglicéridos séricos, así como de presión arterial. Se ha determinado también que además de estas alteraciones, se presenta resistencia a la insulina, cuyo efecto se ve reflejado, por ejemplo en nuestro modelo, en que a pesar de que las ratas tratadas con sacarosa consumen casi el doble de contenido energético que los controles, no tienen un incremento significativo de peso, sino que incluso, presentan una curva de crecimiento ligeramente por debajo de los

controles. Estos trastornos metabólicos son semejantes a los que constituyen el llamado "síndrome X" o síndrome plurimetabólico, definido también por Reaven (Reaven GM, 1991).

Dentro de la caracterización de este modelo, hemos estudiado también la reactividad vascular, la cual, como ha sido demostrado en varios trabajos, se ve afectada en la hipertensión, generalmente en cuanto se refiere a la respuesta dependiente de la liberación de óxido nítrico (Ciriaco, et al, 1993). En las ratas hipertrigliceridémicas, hemos encontrado que esta respuesta está disminuida, y más aún, hemos ensayado también el efecto de los sueros de estas ratas sobre esta reactividad, encontrando que la presencia de sueros con niveles altos de triglicéridos disminuye aún más la respuesta relajante del endotelio, y ejerce un efecto potenciador sobre la acción de agentes vasoconstrictores, como la norepinefrina. Sin embargo, al estudiar el efecto de otros agonistas que ejercen su acción por mecanismos no mediados por endotelio, tales como bloqueadores α_1 , α_2 y β_1 adrenérgicos, o calcio-antagonistas, o mediante la despolarización con potasio, no se ha encontrado diferencia entre las respuestas de los anillos de arterias aisladas de ratas hipertensas-hipertrigliceridémicas y ratas normales, lo que sugiere que existe un daño a nivel endotelial y algún factor circulante presente en los sueros de ratas hipertrigliceridémicas que agravan aún más la funcionalidad del endotelio en este estado patológico (Baños G et al, 1997). En este estudio, se encontró también un aumento de la vasoconstricción inducida por norepinefrina cuando se utilizó indometacina, sugiriendo una elevación de derivados prostanoides

constrictores producidos en anillos de arterias de ratas hipertriglicéridémicas. Resultados semejantes han sido reportados en ratas con hipertensión espontánea (Ibarra M et al, 1995), en donde además se encontró un aumento de productos de la cicloxigenasa relacionado con la edad de los animales, indicando la participación del metabolismo del ácido araquidónico en el desarrollo de la hipertensión.

Se ha demostrado que las diferentes fracciones lipoproteicas del suero, así como cambios en la composición de fosfolípidos afectan la respuesta dependiente de endotelio en anillos de aortas (Takahashi M et al, 1990). Sin embargo, no se ha determinado aún si existe diferencia entre las fracciones obtenidas de sueros hiper o normotriglicéridémicos. Se conoce que en las dislipidemias existen cambios en la composición de las fracciones, y que estos cambios tienen efectos sobre la fisiología y metabolismo celulares (Gianturco SH, et al, 1988).

Por otro lado, la función cardíaca en modelos de hipertensión, producida por distintos métodos, ha sido relativamente poco estudiada. Sin embargo, algunos datos que se han obtenido, sobre todo en el estudio de la actividad mecánica del corazón en modelos con órgano perfundido, han demostrado que existe una marcada disminución de la función ventricular, así como de la presión de perfusión (Takeda K et al, 1992). En estos mismos sistemas se ha visto también que la disfunción endotelial repercute en la respuesta del corazón, disminuyendo principalmente la actividad contráctil de éste y la respuesta a distintos agentes vasoactivos (Fort S et al, 1993). Estos

efectos han sido también evaluados en modelos animales con disturbios en el metabolismo de lípidos, como hipercolesterolemia; en este caso, se ha visto, por ejemplo, que existe una disfunción en la relajación dependiente de endotelio en las arterias coronarias, y una tendencia a la producción de sustancias vasoconstrictoras, como prostaglandinas, en respuesta a distintos agentes como bradicidina y sustancia P (Woditsch I y Schror K, 1994). De esta forma, puede decirse que el endotelio del miocardio ejerce una importante modulación de la función cardíaca a través de una vía parácrina en la que participan agentes tales como el óxido nítrico, la endotelina-1 y derivados prostanoides.

Las células endoteliales pueden también influenciar la función cardíaca modificando los niveles locales de angiotensina y bradicininas (Fig.3). En situaciones patológicas, tanto la liberación de factores endoteliales como la respuesta del miocardio a estos factores pueden estar alteradas. Se ha sugerido la producción de algunos factores como el NO y endotelina por los mismos miocitos en algunos estados patológicos. El endotelio trabaja en conjunto e interactúa con otros mecanismos moduladores del sistema cardiovascular, como el sistema neurohumoral, fenómenos físicos como la ley de Starling, la frecuencia cardíaca, la perfusión coronaria y el gasto cardíaco (Shah AM, 1996).

Uno de los factores endoteliales involucrados en el daño producido durante la isquemia y la reperfusión que se ha estudiado es la endotelina. Se sabe que este péptido, además de ser un potente vasoconstrictor, ejerce efectos inotrópico y cronotrópico positivos (Yanagisawa M, 1988). Estudios clínicos y experimentales han demostrado que los niveles

plasmáticos de endotelina-1 se elevan durante la isquemia miocárdica y durante un infarto (Fig. 4). Se ha visto también que el efecto vasopresor de este péptido se ve potenciado en modelos de hipertensión deficientes en producción de óxido nítrico, sugiriendo que la liberación basal de NO inhibe la liberación y el efecto vasoconstrictor de la endotelina por lo que este péptido podría estar fuertemente involucrado en situaciones patofisiológicas con una deficiencia en la producción de NO (Richard V et al, 1995).

Otra alteración importante que ha sido descrita, en modelos de hipertensión, y que está estrechamente relacionada con la función cardíaca, es el desarrollo de hipertrofia miocárdica. Se sabe que durante la hipertrofia muscular, las modificaciones histológicas inducen un estado parcial de isquemia y existe un aumento en las demandas de oxígeno en respuesta a cambios hemodinámicos. De esta forma, se ha demostrado que existe un aumento en la disfunción diastólica, el cual se correlaciona, en forma importante, con la hipersensibilidad del corazón hipertrófico a daños hipóxicos (Viallard JF et al, 1993).

Es posible que la disfunción cardíaca presente en individuos con trastornos en el metabolismo de lípidos, tenga serias implicaciones en la respuesta fisiológica del corazón frente a distintos tipos de estrés, tales como la isquemia y el estrés oxidativo que se produce durante la reperusión. Más aún, este estado podría disminuir el efecto protector de algunos fármacos, según el mecanismo por el cual ejerzan su acción protectora, ya que involucran

procesos metabólicos como son el manejo del calcio, respuesta endotelial, producción de sustancias vasoactivas y estabilidad de la membrana plasmática en el miocardio, los cuales, ciertamente están afectados en padecimientos como la hipertensión (Alcocer L et al, 1993)

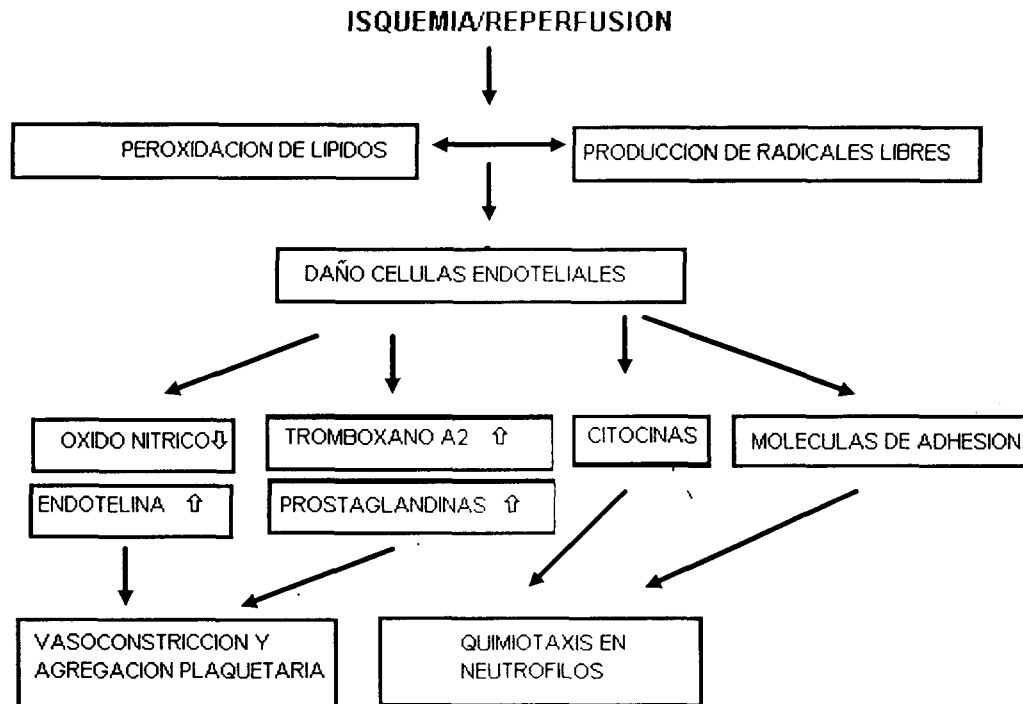


Figura. 4. Daño producido durante la isquemia y reperfusión sobre las células endoteliales. Existe un aumento en la producción de sustancias vasoconstrictoras y una disminución en las vasodilatadoras. Los factores de crecimiento y adhesión se ven también afectados.

V. JUSTIFICACION

El papel de las diferentes fracciones de lipoproteínas del suero, como son las lipoproteínas de alta (HDL), baja (LDL), y de muy baja (VLDL) densidad, en la etiopatología de algunas enfermedades cardiovasculares, ha sido parcialmente determinado, sin embargo, existen algunos aspectos de su influencia sobre el metabolismo que quedan aún por resolver. Un claro ejemplo es la controversia que existe acerca del punto en el cual una concentración elevada de triglicéridos circulantes, o VLDLs, puede constituir un factor de riesgo para la aterosclerosis e hipertensión, sobre todo si provienen de individuos con alguna dislipidemia, que cambie la composición y proporción de estas fracciones.

Una de las principales características de la aterosclerosis y la hipertensión, es sin duda, la alteración del metabolismo del calcio, a la cual se atribuye un importante papel en el desarrollo de disfunciones de ciertos organelos e incluso células. Se conocen varios aspectos, como el papel del colesterol sobre la contractilidad vascular, o la acumulación del calcio en los tejidos de vasos ateroscleróticos, pero la contribución de los triglicéridos a la disfunción celular de este tipo no ha sido aún determinada.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de los efectos provocados por la hipertrigliceridemia e hipertensión sobre la funcionalidad del sistema cardiovascular. Para ello se pretenden los siguientes:

OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar el efecto de la disfunción vascular y alteraciones en la composición lipídica, causada por la hipertrigliceridemia, sobre la función cardíaca en corazones aislados de ratas con este padecimiento.

Evaluar la respuesta cardíaca de ratas hipertigliceridémicas e hipertensas, al daño producido por isquemia y reperfusión.

Investigar el efecto de agentes protectores en el daño producido por isquemia y reperfusión en ratas hipertrigliceridémicas e hipertensas *in vitro* e *in vivo*.

VII. HIPOTESIS

La hipertrigliceridemia ocasiona cambios en la composición de fracciones lipoproteicas como las VLDL, alterando el perfil lipídico y afectando de esta forma al sistema cardiovascular. Las alteraciones que se producen pueden ocurrir a distintos niveles tales como el sistema vascular periférico, contribuyendo de manera importante al incremento de la presión arterial, o bien, afectando al propio corazón, lo que puede reflejarse en alteraciones de la reactividad vascular y de la función del músculo cardíaco.

La disfunción vascular y la presencia de factores circulantes, así como la alteración en la composición lipídica, pueden también contribuir a una disfunción de la actividad cardíaca, que puede evidenciarse frente a estados de estrés agudo como la isquemia/reperfusión.

VIII. METODOLOGIA

INDUCCION DE HIPERTRIGLICERIDEMIA.

Se utilizaron ratas Wistar machos a las que se les dio azúcar comercial al 30% en el agua de bebida. El tratamiento comenzó desde el destete (21 días de edad) y se continuó durante 20-25 semanas, de acuerdo al tiempo necesario para producir presiones arteriales de 140 mm de Hg o mayores en al menos el 80% de los animales. Ratas de igual peso y edad fueron utilizadas como controles y recibieron alimentación estándar de laboratorio. El alimento sólido fue administrado *ad libitum* en ambos grupos. Mediante la obtención periódica de sangre, se llevó un control del aumento de triglicéridos. La presión arterial y el peso de los animales se midieron al final del periodo de evolución.

MUESTRAS SANGUINEAS.-

Los animales se mantuvieron en ayuno por lo menos cuatro horas antes de tomar la muestra de sangre. Bajo anestesia con pentobarbital sódico (55 mg/Kg i.v.) se canuló la vena femoral de la rata y se obtuvo 1 ml de sangre. El suero se separó por centrifugación y se conservó a -70°C hasta que se hicieron las determinaciones correspondientes.

222866

DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS.

Los triglicéridos se cuantificaron por hidrólisis enzimática y determinación subsiguiente del glicerol formado de acuerdo al método descrito por Nälgene (Nälgene U et, al 1984). Se utilizó un kit comercial de Boehringer-Manheim y un analizador bicromático Abbot VP serie II. Las mediciones se hicieron en el suero obtenido de las ratas, tanto controles como HTG.

MEDICION DE LA PRESION ARTERIAL.

La presión arterial de las ratas se midió por el método indirecto (Tail-Cuff) utilizando un transductor neumático, un electroesfingomanómetro y un fisiógrafo de Narco Bio-System. Para evitar variaciones circadianas, la toma de la presión arterial se llevó a cabo siempre entre las 9 y 12 am horas del día.

ISQUEMIA/REPERFUSION *IN VIVO*.

Las ratas HTG y controles fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (55 mg/Kg i.p). Se mantuvieron con respiración asistida a través de una bomba tipo Palmer para especies menores, por medio de una entubación endotraqueal. Mediante una toracotomía lateral izquierda se expuso el corazón, y se localizó la arteria coronaria izquierda, la cual se ligó con una seda negra trenzada, calibre 6-0. El periodo de oclusión

duró cuatro minutos y medio, punto en el que se retiró la ligadura para dar comienzo a la reperfusión, con una duración de cinco minutos y medio. Registros electrocardiográficos y de presión arterial fueron obtenidos para monitorear los cambios durante las fases de isquemia y reperfusión. La arteria femoral de una de las extremidades fue canulada con un catéter conectado a un transductor de presión hidrostática. Los registros se tomaron en un polígrafo tipo Grass. Al final del experimento se tomaron muestras sanguíneas del ventrículo izquierdo para las determinaciones enzimáticas (Pichardo J et al, 1994). Los agentes protectores fueron administrados vía intravenosa antes de iniciar la isquemia, y se dejaron circular de 5 a 30 minutos de acuerdo al tipo de agente de que se trataba; Ketorolac, 30 minutos, n-fenil-butilnitrona (PBN) , 5 minutos, de acuerdo a los métodos ya descritos (Pichardo J et al, 1994; Arteaga D et al, 1992; Yu PB, 1994). En la figura 5 se esquematiza el modelo utilizado para los experimentos de isquemia y reperfusión *in vivo*.

RESPUESTA CARDIACA *IN VITRO*.

Para los ensayos *in vitro*, se utilizó el método de corazón aislado según el modelo descrito por Langendorff. Por este método se evaluó la respuesta cardiaca general, en donde se midió la presión intraventricular (PI), presión de perfusión (PP) y el intervalo aurículo-ventricular (IAV). Las ratas utilizadas, HTG y controles, se anestesiaron con pentobarbital sódico, (55 mg/Kg i.p.) y se les administró por la misma vía 200 U de heparina para evitar coagulación, fueron entonces entubadas endotraquealmente, para recibir respiración asistida

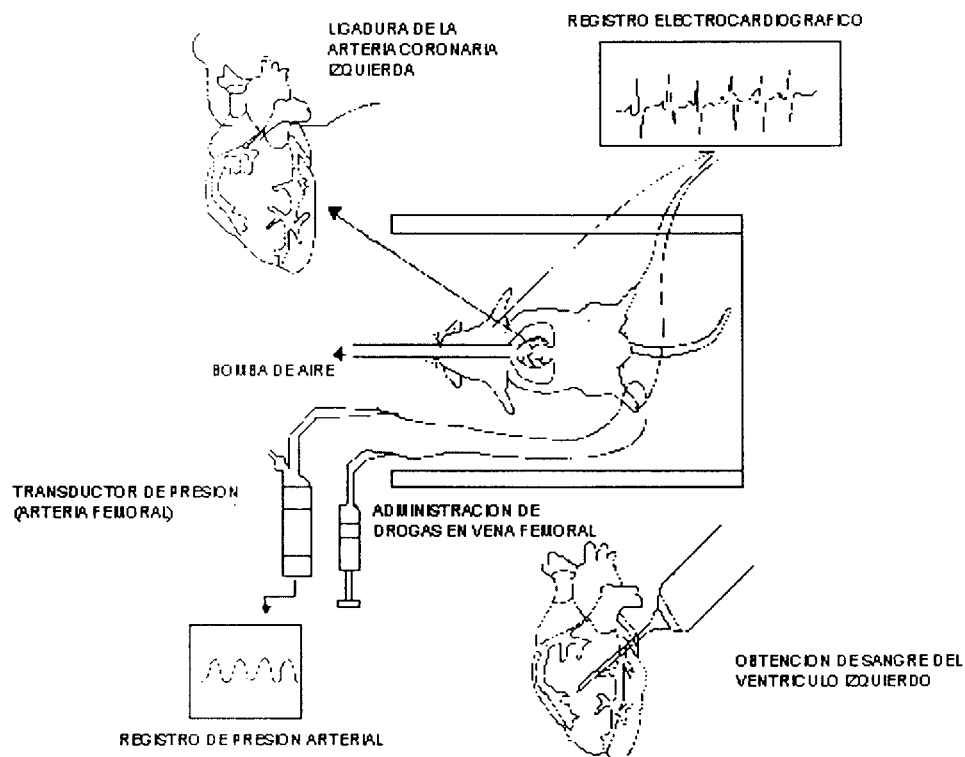


Figura. 5. Diagrama representativo del modelo de ischemia y reperfusión *in vivo*. La ischemia se produce mediante la ligadura de la arteria coronaria izquierda, después de 5 minutos, se retira y se inicia la reperfusión. Registros de electrocardiograma y presión arterial son tomados durante todo el procedimiento.

mediante una bomba tipo Palmer para especies menores. Posteriormente, se practicó una toracotomía central, removiendo la parte frontal de las costillas y el esternón a modo de dejar expuesto el corazón. Se localizó la aorta ascendente, por la que se hizo pasar una seda como referencia mediante la cual se separó el corazón del cuerpo del animal y se colocó en solución de perfusión fría para inmovilizarlo y prevenir la existencia de preconditionamiento isquémico (Minhaz U et al, 1995). Con la mayor rapidez posible se transfirió a la

cánula del sistema de Langendorff, y se reperfundió con solución Krebs-Henseleit de la siguiente composición (mM): NaCl 124.6, KCl 5.0, MgCl₂ 1.11, CaCl₂ 1.18, NaH₂PO₄ 1.03, NaHCO₃ 2.49 y glucosa 11.1, a un pH de 7.4 y manteniendo una temperatura de 37 °C (Suárez J y Rubio R, 1991). La perfusión se inició con una presión constante de 80 cm de agua, que equivale a un flujo cardíaco de 20 ml/minuto y a una presión hidrostática de 70 mm de Hg. Se dejó latir el corazón espontáneamente durante 10-15 minutos. Al cabo de este tiempo se redujo el flujo a 10 ml/min y se dejó estabilizar en estas condiciones durante 20 min. Para realizar los registros de los parámetros a evaluar se conectaron dos electrodos de estimulación y se estimuló a un voltaje suficiente para sobrepasar al doble la intensidad estimuladora del marcapaso (5-7 volts). La presión sistólica se midió introduciendo un balón de látex lleno de solución fisiológica en el ventrículo izquierdo, el cual se conectó a un electrodo de presión hidrostática. Una vez conectado, el balón se llenó de solución fisiológica hasta alcanzar una presión diastólica estable equivalente a 10 mm de Hg. La presión de perfusión (PP) se midió con un electrodo similar conectado al paso de la solución unos centímetros antes de alcanzar el corazón. El flujo coronario se midió colectando el efluente del corazón a distintos intervalos y midiendo el volumen en una probeta. Los parámetros a evaluar para la función cardíaca se estimaron mediante la elaboración de curvas de frecuencia de estimulación teniendo como respuestas la presión intraventricular (PV), y el intervalo A-V (IAV), el cual es medido mediante dos electrodos conectados, uno en la aurícula derecha y el otro en el ventrículo izquierdo, o viceversa (Döring HJ y Dehner H, 1988). La figura 6 esquematiza el sistema utilizado para los experimentos de isquemia y reperfusión *in vitro*.

En este mismo sistema, y con el mismo montaje, se evaluó también la respuesta a estrés agudo, induciendo un periodo de isquemia global, con la suspensión del flujo de solución de perfusión, durante 30 minutos, y un periodo de reperfusión de 30 minutos. Durante todo el procedimiento se tomaron registros de PV, PP e IAV. La presión ventricular desarrollada durante la perfusión inicial antes de la isquemia se tomó como el 100 % para cada corazón, y la presión desarrollada durante el periodo de reperfusión se tomó como el porcentaje de recuperación del valor preisquémico correspondiente. Todos los valores fueron normalizados de acuerdo a la frecuencia cardiaca desarrollada en cada intervalo. Alícuotas del líquido efluyente del corazón fueron colectadas, antes, durante y después de la isquemia para la determinación de enzimas marcadoras de daño (Ashraf M et al, 1994). En los experimentos de isquemia y reperfusión *in vitro* se omitió la excitación externa para evitar artefactos de la estimulación, dejando latir el corazón espontáneamente.

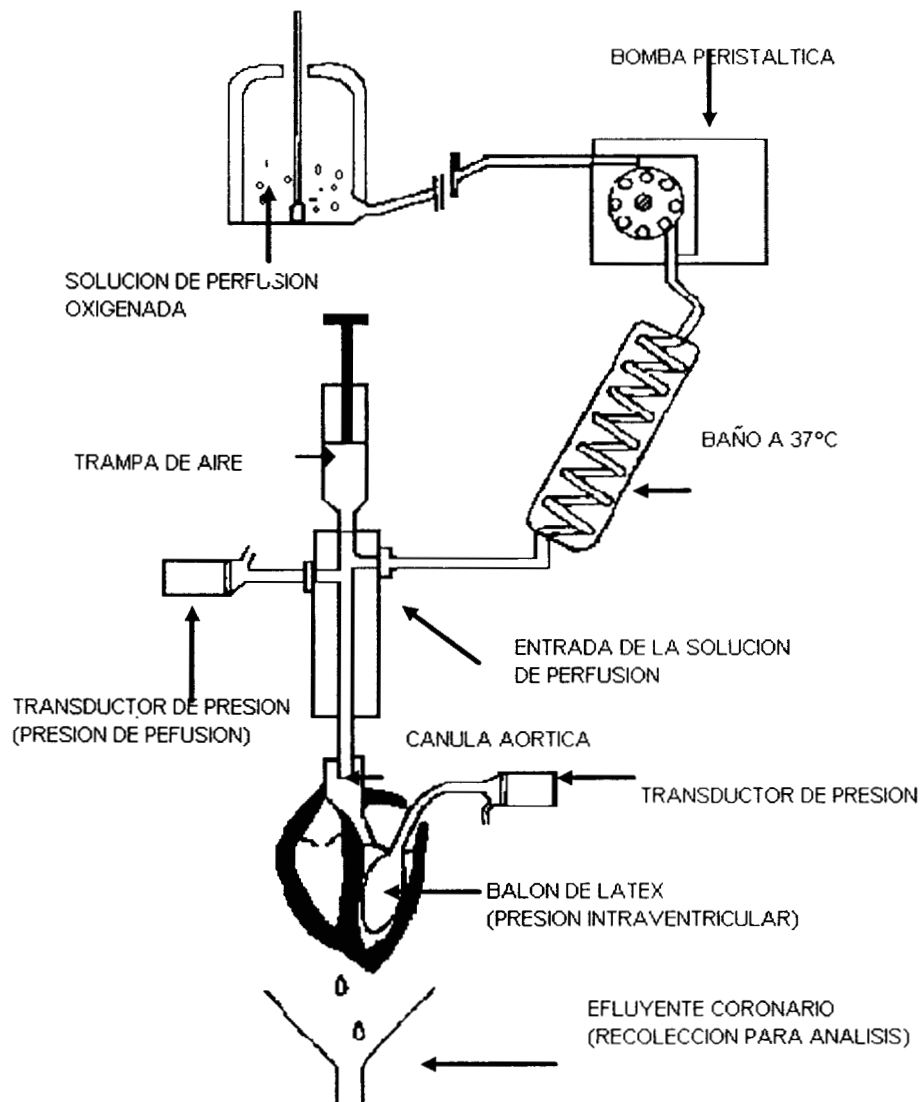


Figura. 6. Diagrama del sistema de corazón aislado. El corazón es perfundido retrógradamente vía la aorta. La presión ventricular se monitorea mediante la inserción de un balón de látex en el ventrículo izquierdo.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS.-

En los experimentos de isquemia-reperfusión *in vivo* e *in vitro*, se determinaron las actividades enzimáticas de lactato deshidrogenasa (LDH) y creatín cinasa (CK). Para ambas, los métodos se basan en la formación de NADH, el cual se produce en forma proporcional a la actividad de las enzimas y se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. El ensayo se realiza en suero o en el líquido de perfusión colectados en los experimentos previos. En los experimentos de isquemia y perfusión *in vivo*, el uso del PBN causó una significativa hemólisis de los sueros obtenidos causando interferencia en la determinación del NADH, por lo tanto, las determinaciones enzimáticas se realizaron directamente en la fracción soluble del tejido isquémico que fue tratado de la siguiente manera: al final del experimento, se separó el corazón del cuerpo del animal y se separó el ventrículo izquierdo, el cual se homogeneizó en 20 ml de solución salina, el homogenado se centrifugó a 15 000 rpm a 4°C, se separó el sobrenadante para cuantificar en él las actividades enzimáticas. Una alícuota del homogenado total fue reservada para la determinación de proteínas totales.

CUANTIFICACION DE LIPOPEROXIDACION.-

En los experimentos de isquemia y perfusión utilizando PBN se cuantificó la lipoperoxidación producida en el tejido isquémico mediante el análisis del malondialdehído (MDA), producto estable que resulta de la

lipoperoxidación en las membranas celulares. Esta molécula se cuantifica mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico con el cual forma un complejo estable fluorescente (método de TBARS) (Giroti, 1989). El tejido isquémico se trató de la siguiente manera: después del periodo de perfusión se separó el corazón del cuerpo del animal y se lavó con solución salina-BHT (butil-hidroxi-tolueno) al 0.05% para evitar oxidación adicional durante la manipulación y eliminar residuos de sangre. Se separó el ventrículo izquierdo del resto del miocardio y se homogeneizó con ayuda de un politrón en 20 ml de solución salina-BHT. A 200 μ l del homogenado se le añadió un ml de amortiguador de fosfatos 0.15M, pH 7 y se incubó durante 30 min a 37 °C, después de la incubación se añadió 1ml de ácido acético glacial al 20%, pH 4 y 1.5ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8% y se calentó en agua hirviendo durante 45 min. Después se extrajo el complejo formado en 5ml de n-butanol y 1ml de KCl al 2%. La fase orgánica y acuosa fueron separadas por centrifugación y la fluorescencia desarrollada por la primera se midió en un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS-50B) a una longitud de emisión de 553nm y una de excitación de 515nm. El contenido de MDA se calculó de acuerdo a una curva estándar preparada con 1,1,3,3-tetraetoxipropano y es expresada en nmol por mg de proteína.

DETERMINACION DE PROTEINAS.-

La cuantificación de proteínas totales en los homogenados de tejido fue realizada espectofotométricamente mediante el método de Lowry (Lowry OH et al, 1951).

ANALISIS MORFOLOGICO .-

Se tomaron muestras del segmento superior de la aorta de ratas HTG y controles para realizar un análisis histológico. Las muestras se fijaron en una solución de fosfato-formaldehído al 10%. Se incluyeron en parafina para realizar cortes transversales que fueron examinados al microscopio de luz. Las preparaciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina de acuerdo al procedimiento estándar (Sheehan DC, 1980)

ANALISIS ESTADISTICO. ,

La significancia de las diferencias en los parámetros generales intergrupales se determinó mediante un análisis de la *t* de Student. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre la respuesta mecánica del corazón de RHTG y controles, de un solo sentido, teniendo como variable independiente la frecuencia de estimulación y como variables de respuesta, la contracción o presión ventricular desarrollada y el intervalo auriculoventricular respectivamente. Un análisis semejante se llevó a cabo para evaluar las diferencias entre las ratas HTG y controles en los ensayos de isquemia y perfusión, en donde se tomó el tiempo como variable dependiente y los latidos como respuesta, en ambos casos se hicieron comparaciones múltiples una vez encontrada una *F* significativa. En los experimentos de isquemia-reperfusión, se

evaluaron también la incidencia de los diferentes tipos de arritmias: taquicardias, fibrilación y latidos ventriculares prematuros, mediante un análisis no paramétrico, la χ cuadrada. La clasificación de las arritmias se reportó de acuerdo a la convención de Lambeth (Walker MJA et al, 1980). En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando se obtuvo una p menor o igual a 0.05.

IX. RESULTADOS

Las características generales de los dos grupos se muestran en el cuadro 2. A excepción de los niveles de triglicéridos y de la presión sanguínea, ninguno de los otros parámetros cambió entre los grupos. De acuerdo a estudios reportados anteriormente (Baños G et al, 1997) , el grupo de animales que recibió azúcar comercial (ratas HTG), tuvo los niveles de triglicéridos más elevados que el grupo de animales control al final del periodo de tratamiento. De igual forma, la presión arterial resultó significativamente mayor en el grupo HTG comparado con el control y los valores de este parámetro resultaron por arriba de 140 mm de Hg. No se identificaron cambios en el peso corporal o en el peso del corazón entre los dos grupos de animales.

Cuadro 2. Características generales de los animales.

	CONTRO L	HTG	p
Peso Corporal (g)	428±38.4	478±11.14	ns
Peso del corazón (g)	1.9±0.13	1.9±0.14	ns
Peso corporal/peso corazón (g/mg)	2.25±0.5	2.56±.05	ns
Presión sanguínea (mmHg)	119.25±2.3	143±4.5	0.001
Triglicéridos (mg/dl)	53.8±8.4	264.5±27.17	0.001

Los valores están expresados como la media ± ES de 8-10 animales. Todos los parámetros se midieron al final del periodo de tratamiento.

ACTIVIDAD MECANICA Y ELECTRICA DEL MIOCARDIO.-.

La figura 7 representa el desarrollo de la presión ventricular a diferentes frecuencias de estimulación. Puede observarse que a frecuencias extremas, los corazones de ratas HTG machos desarrollaron

una PV menor que los correspondientes controles (Fig. 7A), sin embargo las ratas hembras HTG desarrollaron una presión más elevada que los controles (Fig. 7B). En los puntos intermedios de las curvas, la presión desarrollada por los corazones de ratas macho es similar (panel A), sin embargo, el análisis estadístico de la tendencia global evaluada de acuerdo a las pendientes que siguen las curvas revela que las ratas machos tienen un comportamiento significativamente diferente ($p < 0.05$). La tendencia en las ratas hembras revela que se comportan de manera similar a los controles, presentando pendientes paralelas.

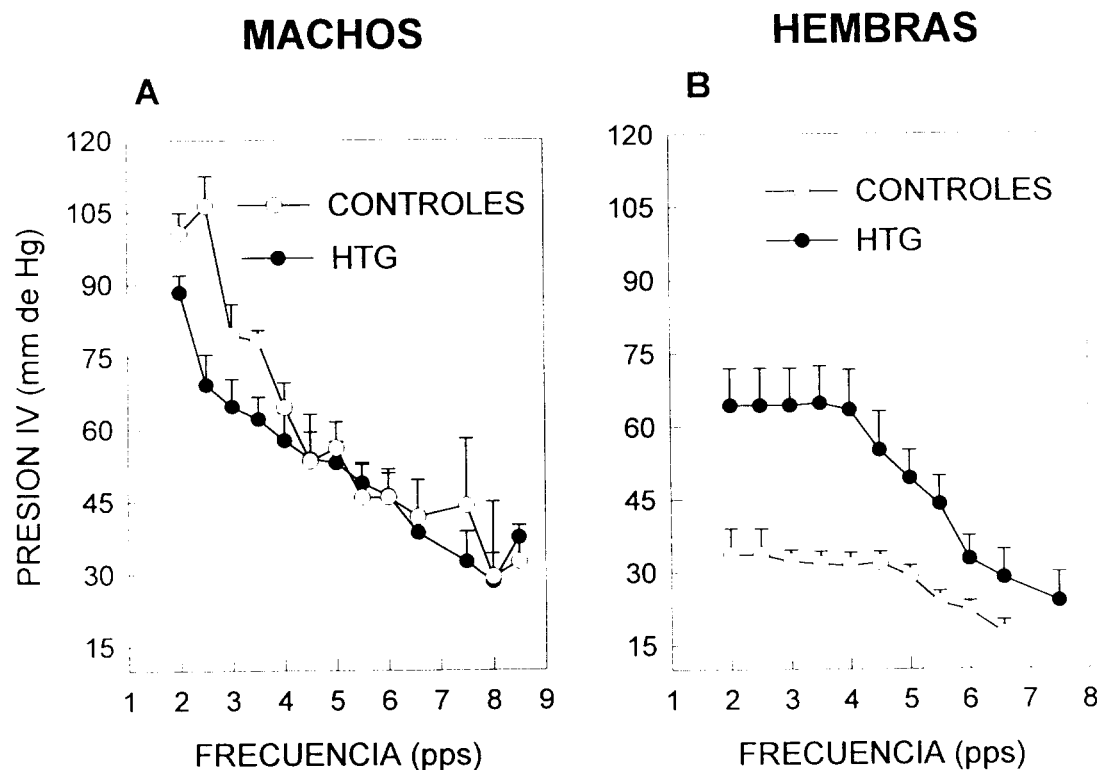


Figura 7. Actividad mecánica de corazones perfundidos de ratas HTG y Controles. Se representa la presión ventricular desarrollada a diferentes frecuencias de estimulación de ratas machos (panel A) y hembras (panel B). La pendiente de la curva desarrollada por los corazones de las ratas HTG machos (círculos cerrados) fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) de la pendiente de la curva desarrollada por los controles (círculos abiertos). Los valores representan la media y el ES de 8-10 experimentos diferentes. Pps pulsos por segundo.

De manera similar, la actividad eléctrica, identificada por el intervalo atrio-ventricular (figura 8A y 8B) muestra que los corazones de ratas HTG, tanto hembras como machos, presentan una conducción eléctrica con intervalos menores que los controles, esta diferencia es constante en las diferentes frecuencias a las que se realizó el experimento. El flujo coronario se mantuvo sin cambios en ambos grupos.

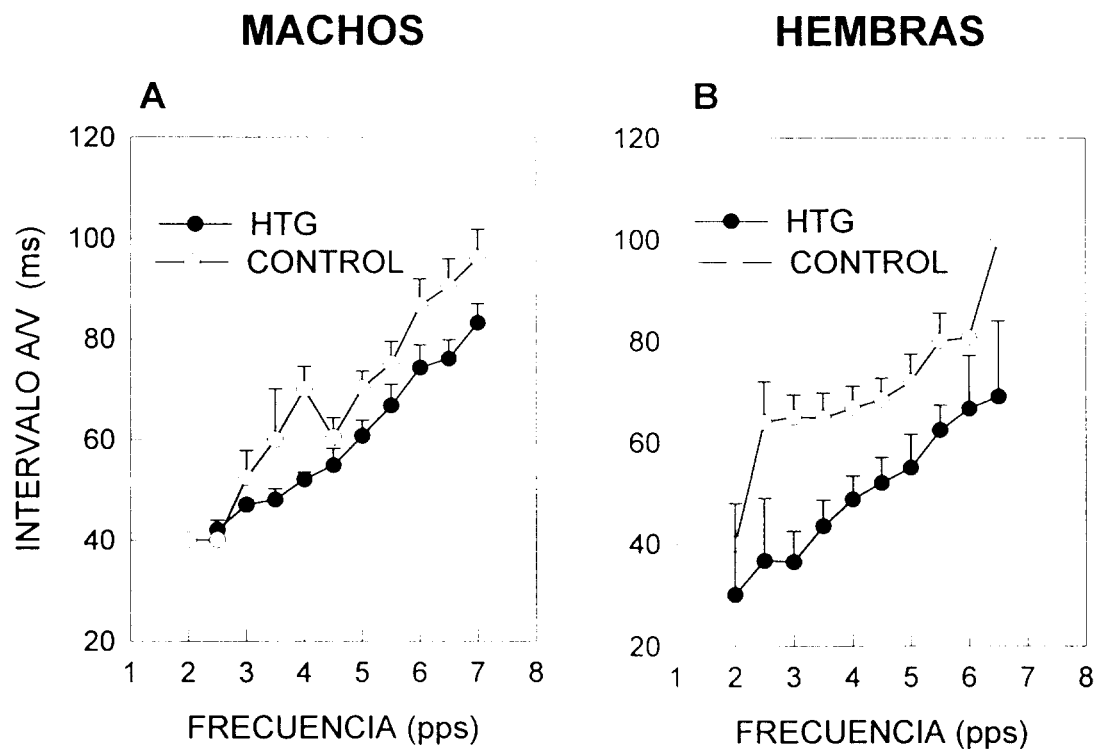


Figura 8. Actividad eléctrica del corazón de ratas HTG y controles. Se representan los cambios en el intervalo de conducción atrio-ventricular de ratas macho (panel A) y hembras (B) a diferentes frecuencias de estimulación. Los puntos de la curva desarrollada por los corazones HTG (círculos cerrados) fue estadísticamente diferente de los controles (círculos abiertos) con una $p < 0.05$. Los puntos están expresados como la media y el ES de 8-10 experimentos diferentes. Pps, pulsos por segundo.

ISQUEMIA Y REPERFUSION *IN VITRO*.

La figura 9 representa el porcentaje de recuperación de la presión ventricular desarrollada durante la reperfusión por los corazones de ratas machos (panel A) y hembras (Panel B) HTG y controles. No se encontraron diferencias en los valores preisquémicos entre los dos grupos, sin embargo, durante los minutos 35, 40 y 45 de reperfusión los corazones de ratas HTG desarrollaron PV menores que los controles y la PV desarrollada al final del periodo de reperfusión fue menor en los corazones de ratas HTG sin alcanzar el 100% de recuperación. Por el contrario, los corazones del grupo de ratas controles desarrollaron una actividad mecánica por arriba del 50% durante los primeros minutos de reperfusión y al final del periodo alcanzaron valores muy cercanos al 100% de su valor inicial antes de la isquemia. Los corazones de ratas hembras HTG desarrollaron una PV ligeramente menor que los controles pero no alcanzó diferencia estadística.

La figura 10 muestra en curso temporal la incidencia de los diferentes tipos de arritmias durante la reperfusión. El principal tipo de arritmia presente en ambos grupos fue extrasístoles ventriculares, sin embargo, en el grupo HTG la duración de este tipo de arritmia fue mayor que en el grupo control ($p < 0.05$). La fibrilación ventricular fue más frecuente en los corazones de ratas HTG que en los controles, con una incidencia máxima durante los primeros 5 minutos de reperfusión. La taquicardia ventricular tuvo una incidencia muy baja en el grupo control, mientras que en el HTG tuvo una incidencia significativamente mayor

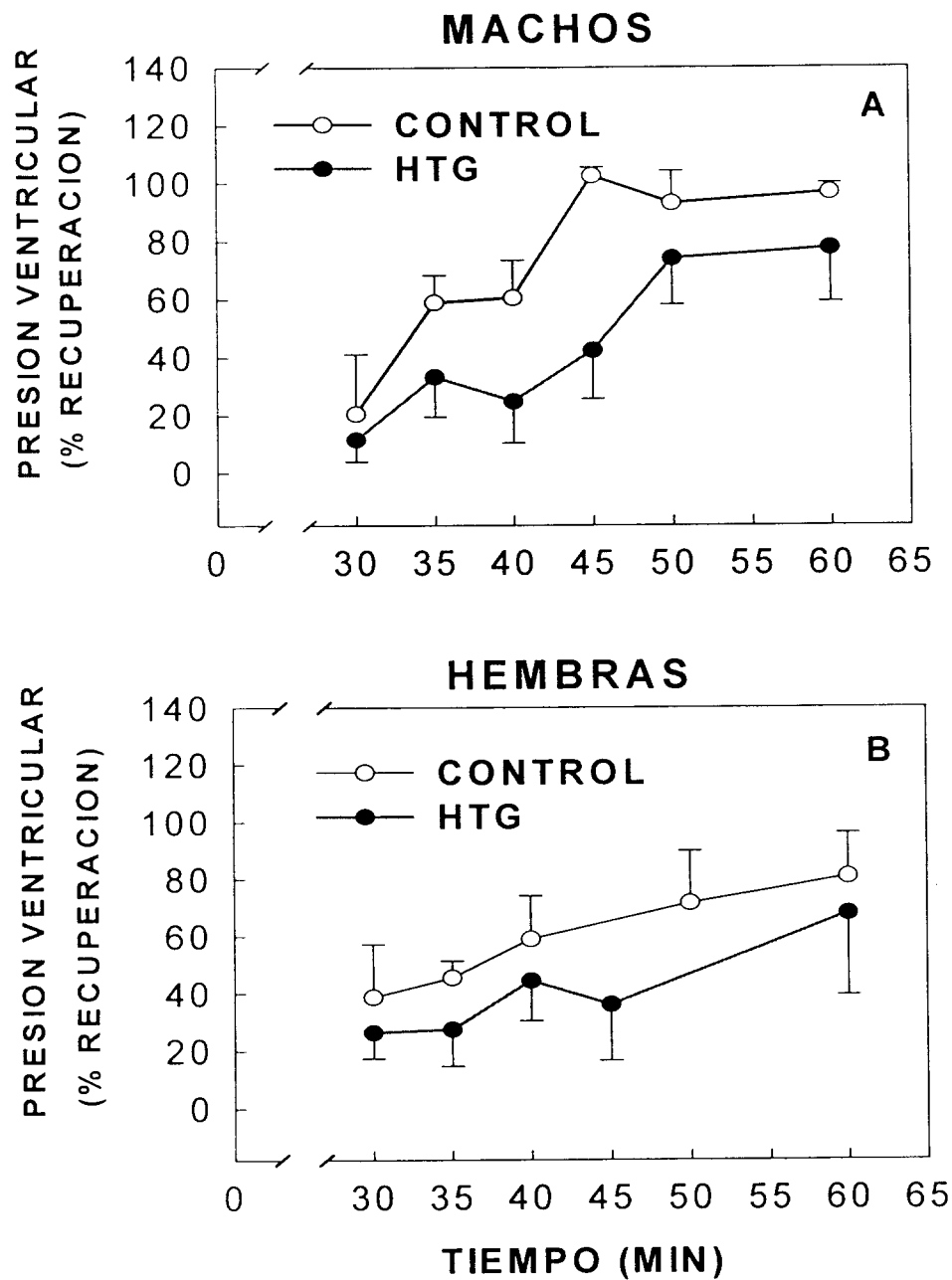


Figura 9. Gráfica que representa el curso temporal de los cambios en la presión ventricular desarrollada durante los 30 minutos de reperusión en corazones de ratas macho (panel A) y hembras (panel B). Los valores indican el porcentaje de recuperación alcanzada en el tiempo indicado con respecto a la presión basal desarrollada antes de los 30 minutos de isquemia. La recuperación en el grupo HTG de machos (símbolos cerrados) resultó significativamente menor que la alcanzada por los corazones del grupo control (símbolos abiertos) con una $p < 0.05$. Los valores representan la media y el ES de 10 experimentos diferentes.

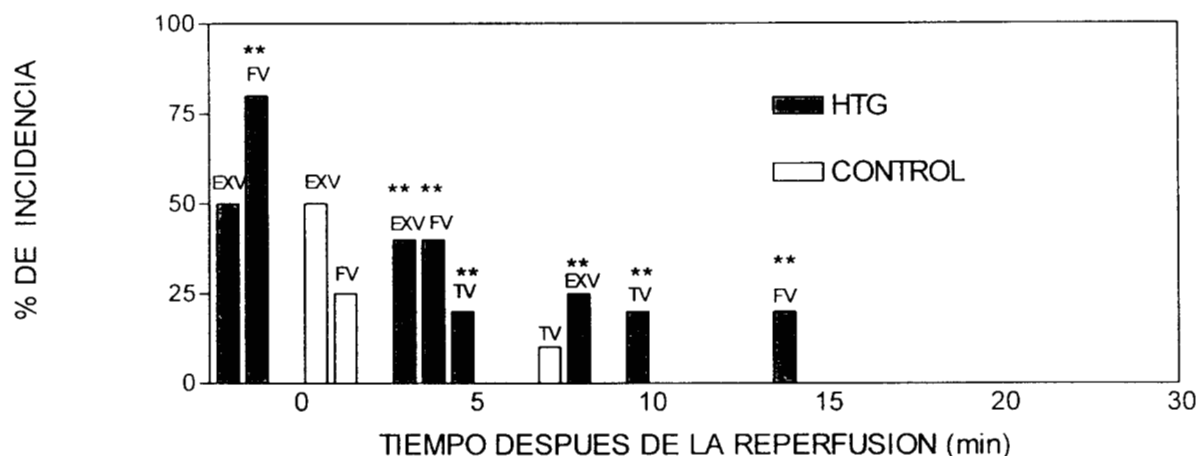
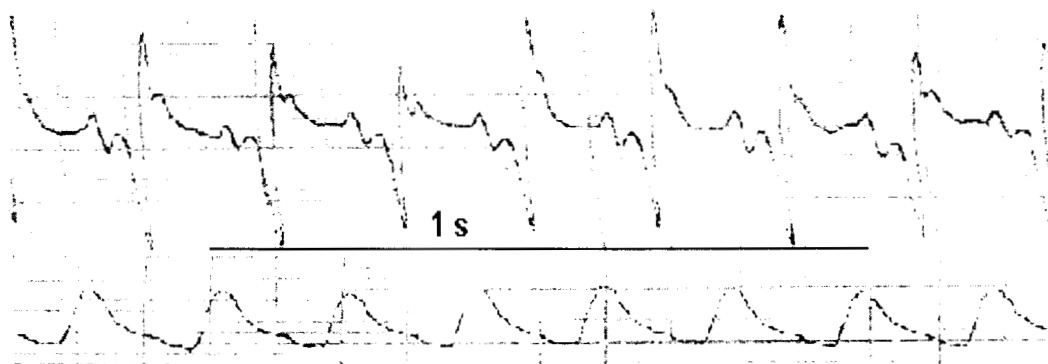


Figura 10. Gráfica de barras que muestra la diferencia en la incidencia de los diferentes tipos de arritmias, extrasístoles ventriculares (EXV), taquicardia ventricular (TV) y fibrilación ventricular (FV) entre el grupo control (barras abiertas) y HTG (barras sombreadas). El eje X representa el periodo de reperfusión iniciado 30 minutos después de la isquemia. ** indica diferencia significativa entre el grupo HTG y el grupo control ($p < 0.005$). $n = 6-8$.

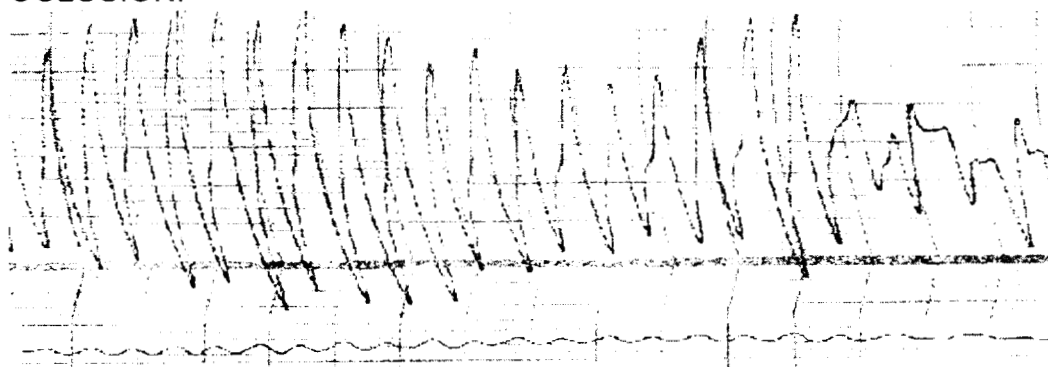
($p < 0.01$). No se encontraron cambios significativos en la frecuencia cardíaca antes o después de la isquemia entre los dos grupos.

ISQUEMIA Y REPERFUSION *IN VIVO*

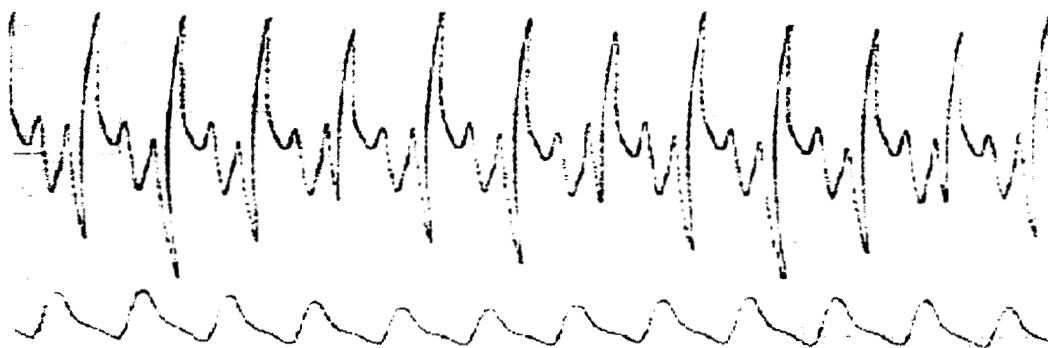
Durante los experimentos de isquemia y reperfusión se utilizó un fármaco que previene la sobrecarga intracelular de calcio, el Ketorolac, para explorar el manejo de este ion en los corazones de las ratas HTG. En este caso se observó que las ratas machos HTG no recuperaron el ritmo sinusal (Fig. 11A y 11B) durante la reperfusión, contrario a lo que se observó en las ratas controles, donde el Ketorolac fue capaz de revertir las arritmias producidas durante la reperfusión, así como inducir la recuperación de la



OCLUSION.

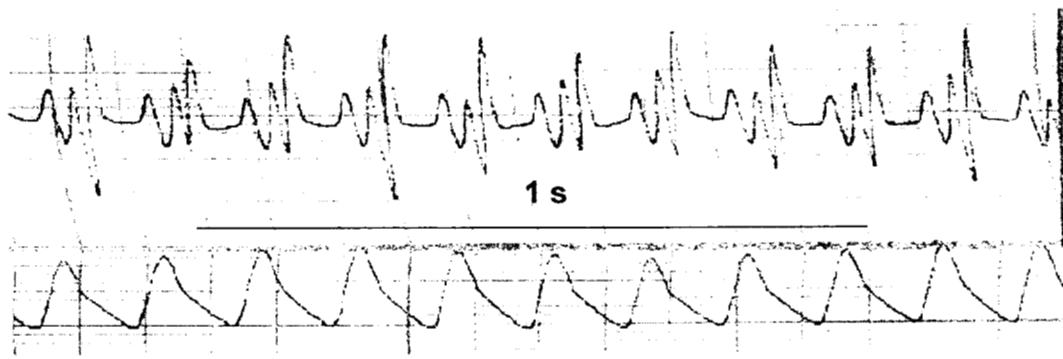


REPERFUSION (MIN 5-7)

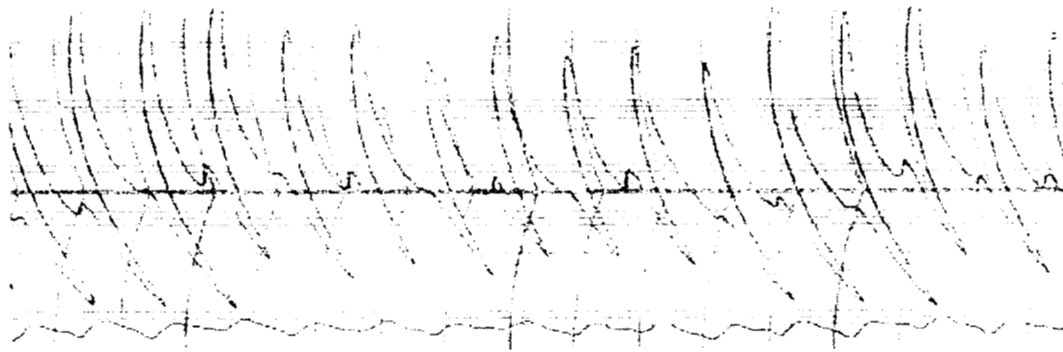


REPERFUSION (MIN 8-10)

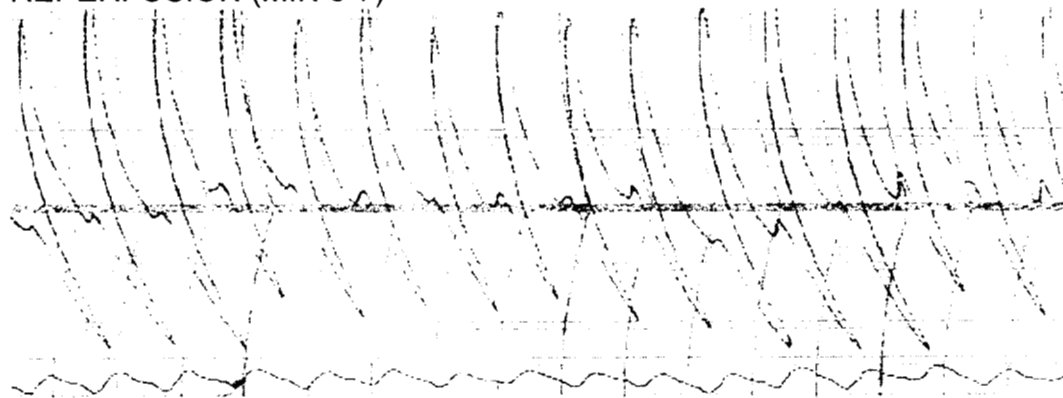
Figura 11A. Trazos representativos de electrocardiograma y señal de presión en la arteria femoral de ratas controles tratadas con Ketorolac. Puede observarse cómo el Ketorolac es capaz de revertir a ritmo sinusal las arritmias producidas durante la reperfusión en las ratas control.



OCLUSIÓN.



REPERFUSION (MIN 5-7)



REPERFUSION (MIN 8-10)

Figura 11B. Trazos representativos de electrocardiogramas y señal de presión en la arterial femoral de ratas HTG machos que recibieron Ketorolac. Se puede observar que a pesar de haber administrado el fármaco, las ratas macho HTG no recuperan el ritmo sinusal durante el tiempo de reperusión.

presión registrada en la arteria femoral . La figura 12 representa el curso temporal de la frecuencia cardíaca cuando se utilizó Ketorolac, en el panel A puede observarse que los machos mantienen una frecuencia de latidos anormales durante todo el tiempo de reperfusión, semejante a lo observado cuando no se utiliza el fármaco . En el panel B, se presenta el curso temporal de la frecuencia cardíaca en ratas hembras utilizando Ketorolac; puede observarse que tanto las ratas controles como las HTG recuperan el ritmo sinusal durante los últimos minutos, sólo que las hembras HTG lo hacen en un tiempo más largo que las controles. La determinación de enzimas marcadoras de daño celular CK y LDH (figura 13A y 13B) muestra que, a diferencia de lo que ocurre en los animales que no recibieron la sacarosa, el Ketorolac no protege del daño en los animales HTG y los niveles de enzima liberada son semejantes a los obtenidos en animales controles que tuvieron isquemia-reperfusión sin administración previa de Ketorolac.

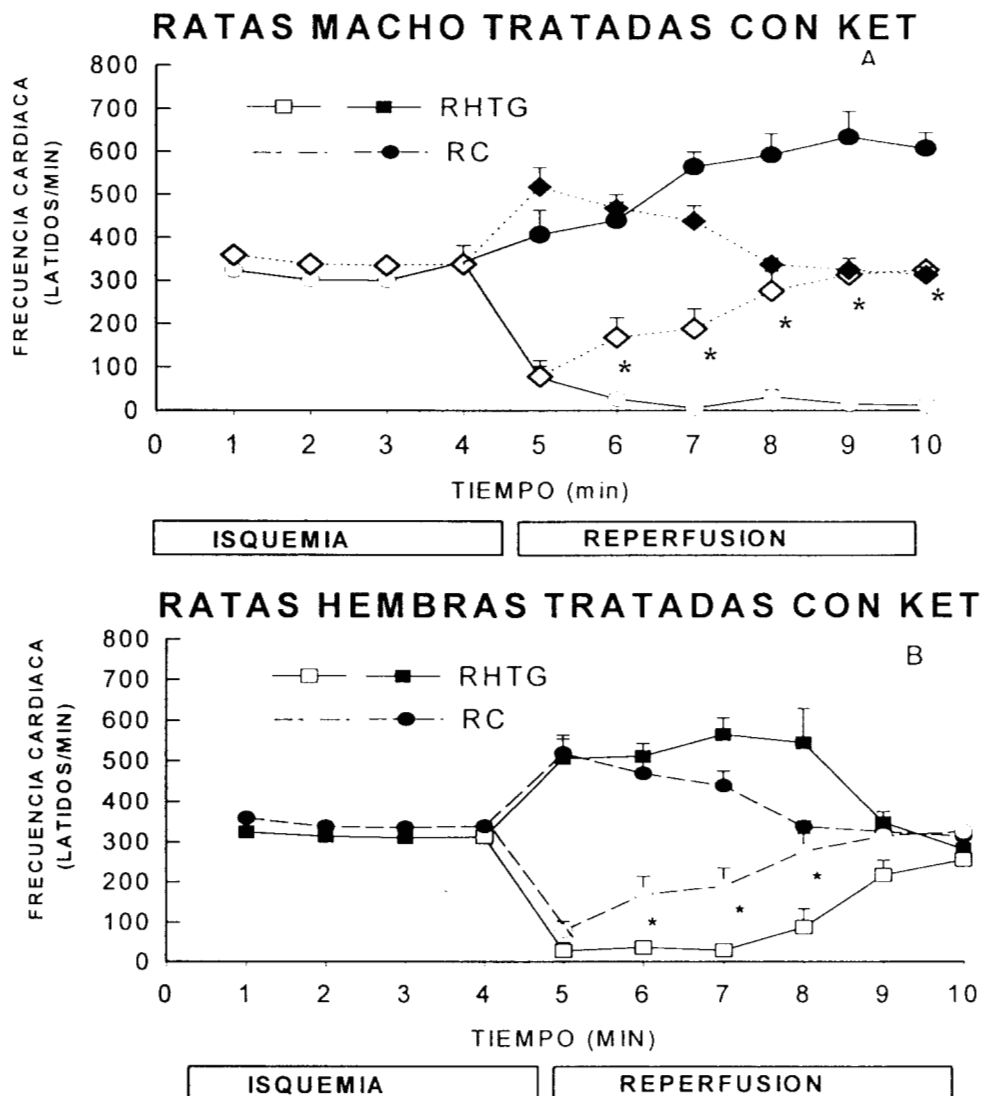


Figura 12. Curso temporal de la frecuencia cardíaca en ratas controles y HTG machos (A) y hembras (B). Al tiempo indicado, se ligó la arteria coronaria izquierda, La perfusión se inició como se indica. Los latidos normales están representados por los símbolos cerrados, mientras que los latidos arrítmicos están representados por símbolos abiertos. Los valores representan la media y el ES de 10 experimentos. * denota diferencia estadísticamente significativa entre los latidos arrítmicos desarrollados por las ratas HTG y las controles en los minutos de perfusión indicados ($p < 0.01$).

222866

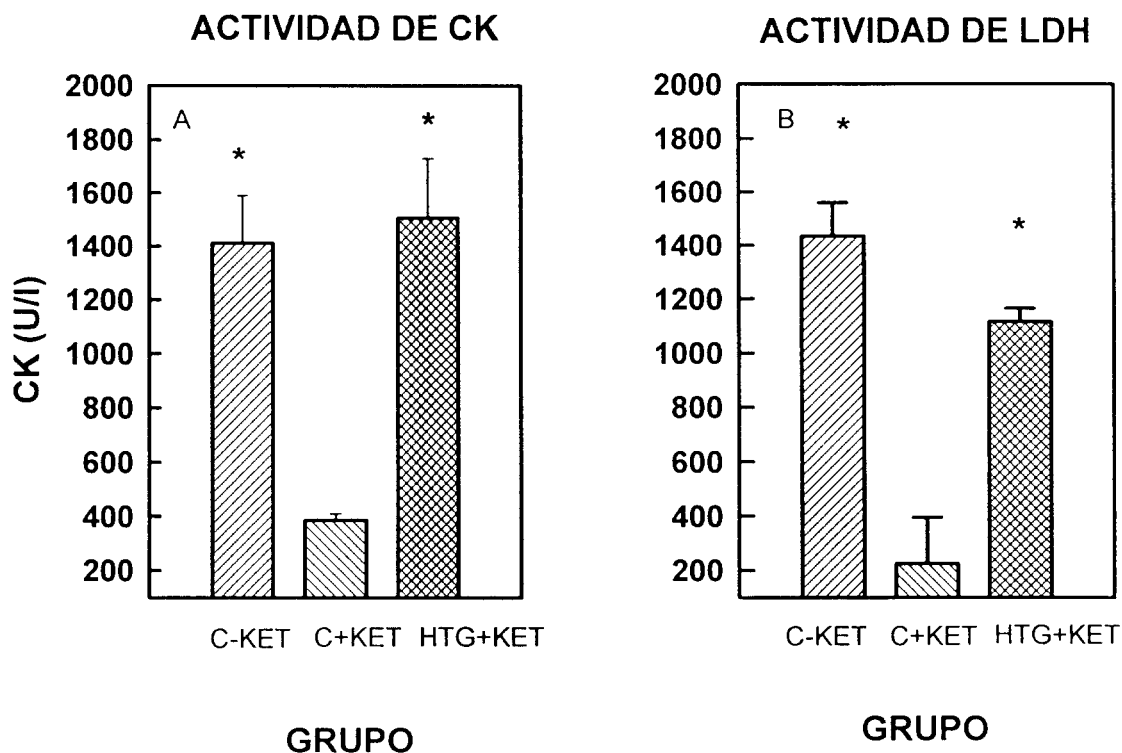


Figura 13. Concentraciones plasmáticas de creatín cinasa (CK) (panel A) y lactato deshidrogenasa (LDH) (panel B) en ratas macho controles, y HTG tratadas con Ketorolac (C+KET y HTG+KET); se indica también la liberación de estas enzimas en ratas controles que no fueron tratadas con el fármaco (C-KET). * Denota diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.005$). Los valores representan la media y el ES de 10 animales.

Con el fin de explorar el manejo de radicales libres durante el daño producido por isquemia y reperfusión se utilizó el agente atrapador de radicales libres n-fenil-butilnitrona (PBN), 5 minutos antes de la isquemia. Se ha descrito que este fármaco es capaz de proteger de la formación de radicales libres durante procesos de reperfusión de una manera casi inmediata a su aplicación (Hearse DJ y Tosaki A, 1987). En estos experimentos se observó que en los animales HTG machos el PBN fue

capaz de revertir las arritmias evocadas por la reperfusión postisquémica.

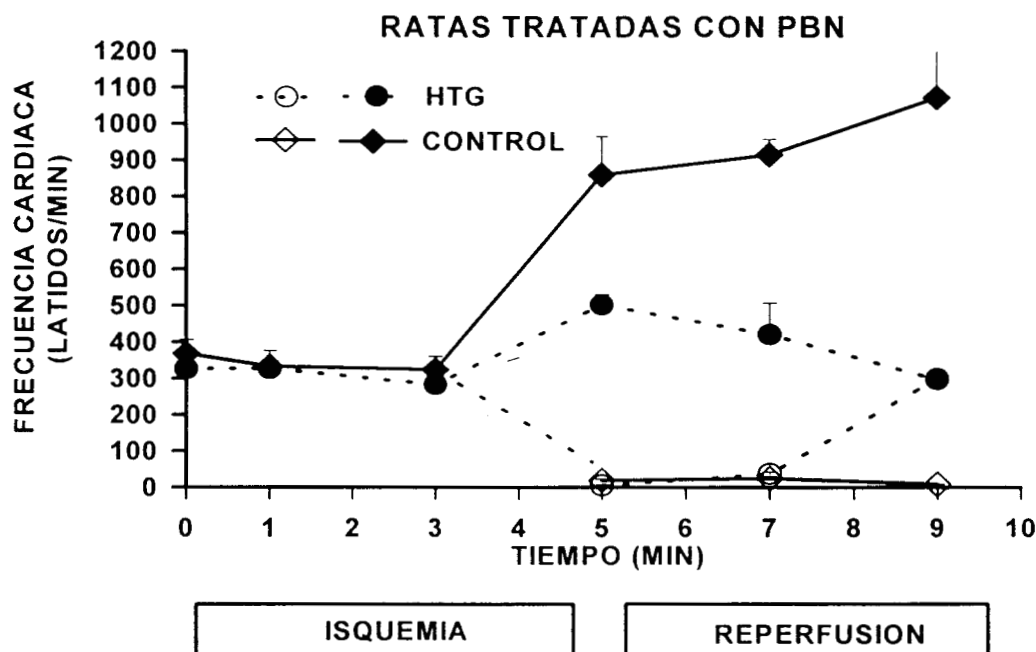


Figura 14. Curso temporal de la frecuencia cardiaca en ratas macho controles sin tratamiento de PBN y HTG que fueron tratadas con PBN 5 minutos antes de la ligadura. Los símbolos abiertos indican los latidos arrítmicos, y los símbolos cerrados los latidos normales. En el tiempo indicado, se retiró la ligadura de la arteria coronaria izquierda para iniciar la reperfusión. Los latidos arrítmicos desarrollados por las ratas no tratadas fueron estadísticamente diferentes de los de las ratas HTG que recibieron PBN ($p < 0.05$). Los valores representan la media y el ES de 8-10 experimentos diferentes.

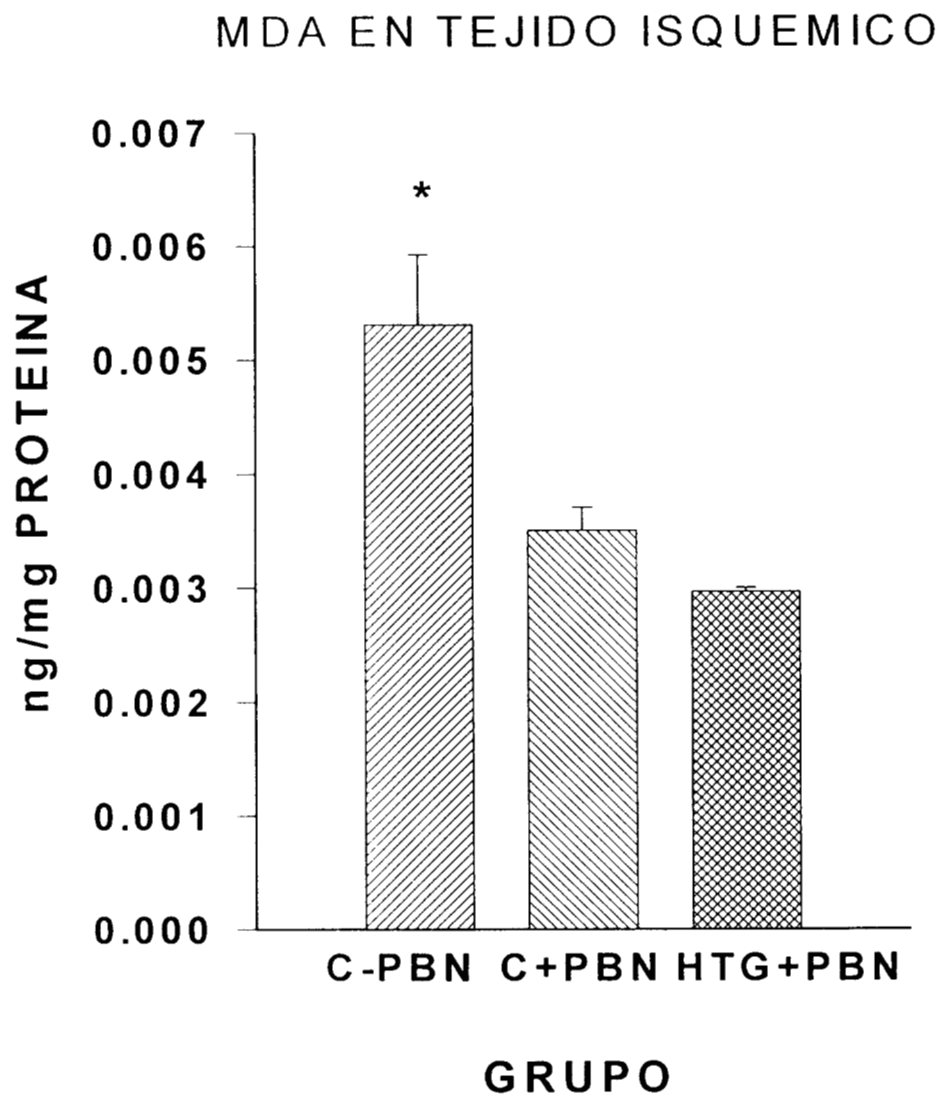


Figura 15. Contenido de malondialdehído (MDA) en tejido isquémico de ratas macho control y HTG tratadas con PBN y ratas control sin PBN. El contenido de MDA en el tejido de ratas que no fueron tratadas con el fármaco es estadísticamente mayor ($p < 0.05$) que en las ratas a las que se les administró PBN antes de la isquemia. Los valores representan la media y el ES de 10 animales.

La figura 14 muestra el curso temporal de la frecuencia cardíaca durante la isquemia y la reperfusión donde puede observarse que tanto los animales controles como los HTG que se sometieron a este procedimiento recuperan el ritmo sinusal durante los primeros minutos . El análisis del MDA en el tejido isquémico reveló que el PBN fue capaz de prevenir la lipoperoxidación en los corazones de ambos grupos de animales, sin embargo puede observarse que en los corazones de ratas HTG los niveles de MDA son un poco más altos sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa entre ratas controles y HTG tratadas con PBN (figura 15), sin embargo, el tejido isquémico de ratas controles que no fueron tratadas con el atrapador de radicales, tuvo un nivel de lipoperoxidación significativamente mayor que el de los grupos tratados con el fármaco.

La cuantificación de MDA llevada a cabo en tejido no isquémico de los animales revela que el tejido cardíaco de ratas HTG que no tuvo privación de flujo sanguíneo tiene mayor cantidad de MDA que el de ratas controles, (Fig.16) sin embargo los datos obtenidos no fueron suficientes para determinar diferencias significativas. Las determinaciones de enzimas marcadoras de daño celular CK y LDH, que se llevaron a cabo directamente en el tejido y se evaluaron de acuerdo a la pérdida de enzima producida durante la isquemia (Heuer HJ y Bernauer W, 1986), no revelaron diferencia entre el tejido ventricular isquémico de rata HTG y de ratas controles tratadas con PBN, mientras que las ratas controles que no

fueron tratadas con el fármaco tuvieron un contenido menor de las enzimas (Fig. 17 A y 17 B).

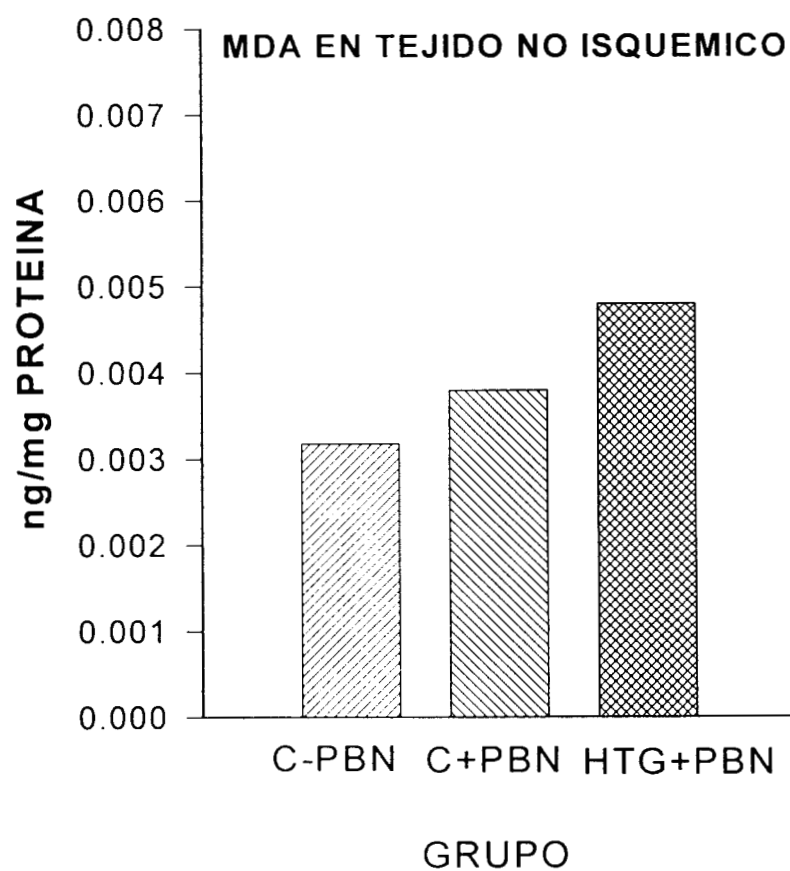


Figura 16. Contenido de malondialdehído en el tejido no isquémico (ventrículo derecho) de ratas macho controles tratadas con PBN (C+PBN), HTG tratadas con PBN (HTG+PBN) y ratas controles que no recibieron PBN (C-PBN). Puede observarse que en el tejido de ratas HTG existe mayor cantidad de MDA, sin embargo, la diferencia no alcanza significancia estadística.

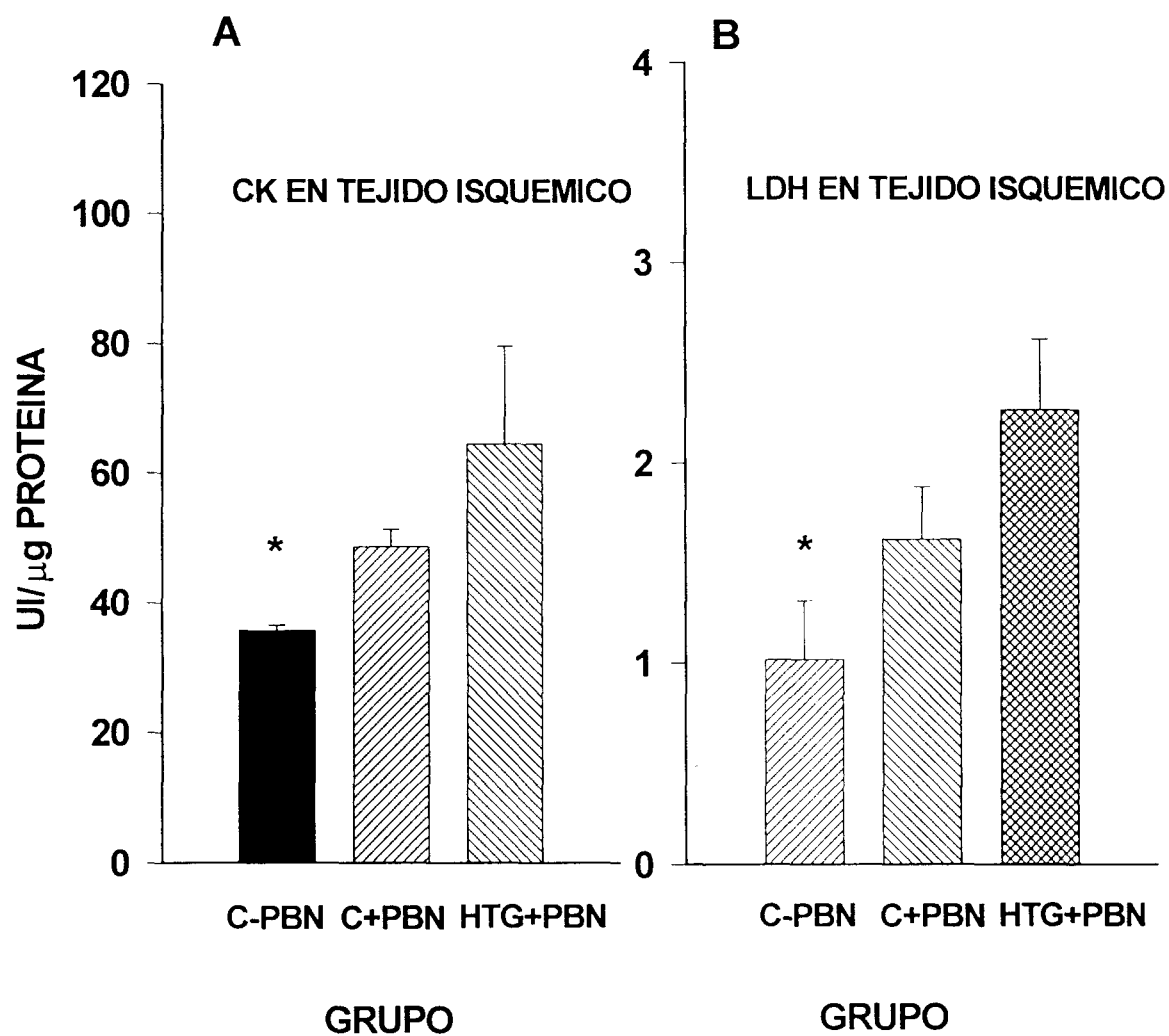


Figura 17. Concentración de CK (panel A) y LDH (panel B) retenidas en el tejido isquémico de corazones de ratas controles sin ningún tratamiento (C-PBN), controles que recibieron PBN (C+PBN) y ratas HTG que fueron tratadas con PBN (HTG+PBN). * indica diferencia significativa entre los grupos que recibieron PBN y el grupo control que no recibió tratamiento. Los valores representan la media y el ES de 10 animales.

ANALISIS MORFOLOGICO.-

La observación microscópica de anillos de aorta, reveló que las ratas HTG presentaron una disminución en la luz vascular, debida principalmente a una disminución de radio externo de la arteria, y no del grosor de las capas del vaso. Estos resultados se expresan en el cuadro 3.

Cuadro 3. DIAMETRO DE ANILLOS DE AORTA DE RATAS HTG MACHOS CORREGIDOS POR PESO (mm).

	DIAM. EXT	DIAM. INT	GROSOR
HTG n = 7	1.13 ± 0.054	0.76 ± 0.09	0.33 ± 0.06
CONTROLES n = 6	1.7 ± 0.24	1.3 ± 0.28	0.32 ± 0.06
p	0.047 *	0.049 *	0.88

Los diámetros están expresados en mm por 100 g de peso corporal. El grosor de la pared vascular está expresado como la diferencia entre el diámetro externo y el diámetro interno del vaso. *Denota diferencia estadísticamente significativa entre las ratas HTG y las controles.

X. DISCUSION

Existen varios modelos experimentales que permiten el estudio profundo de los factores celulares que conducen a alteraciones en el metabolismo. Se han descrito varios modelos experimentales los cuales manifiestan alteraciones en los niveles de la glucosa sanguínea, lípidos circulantes, resistencia a la insulina, presión sanguínea y complicaciones cardiovasculares, sin embargo, el número de síntomas que presenta cada modelo difiere y hace difícil discernir entre la contribución e implicación de cada uno de ellos. Muchas especies utilizadas para este fin presentan alteraciones de carácter genético, siendo los desórdenes que manifiestan un rasgo propio de la especie o bien, un producto de manipulaciones genéticas por las cuales se han desarrollado mutantes para ciertos caracteres (Shafir E, 1993; Klimes I et al, 1995).

Por otro lado, el uso de animales de laboratorio para estudiar desórdenes de este tipo mediante la inducción por cambios nutricionales ha sido ya descrito. Varias especies de roedores como la rata de arena (*Psammomys obesus*), la rata y ratón de laboratorio desarrollan elementos característicos del síndrome plurimetabólico cuando son alimentados con dietas que contienen grandes proporciones de grasa y sacarosa. Este hecho proporciona una fuerte justificación para utilizar estos modelos en el estudio de los desórdenes metabólicos evocados por el consumo excesivo de azúcares, ya que se ha reportado que en humanos, este tipo de patologías ocurren con una alta incidencia en poblaciones con dietas abundantes en estos elementos.

Las alteraciones que la alimentación con fructosa puede producir en el hígado incluyen por ejemplo 1) la conversión de los carbonos de la fructosa en triglicéridos mediante las vías lipogénicas, lo que resulta en un aumento de las VLDLs plasmáticas; 2) la activación de ciclos fútiles para deshacerse de la energía excedente mediante la elevación de T_3 y 3) hyperuricemia. Algunas vías metabólicas se ven también afectadas: en las mitocondria de ratas alimentadas con fructosa, la piruvato deshidrogenasa (PDH) de hígado, enzima que regula la dirección de sustratos hacia el ciclo de Krebs o hacia lipogénesis, presenta una actividad aumentada, facilitando el flujo de la fructosa hacia lipogénesis, mientras que en corazón se ve reducida, requiriendo entonces de un aumento en la oxidación de ácidos grasos como una fuente alterna de energía. El aumento que resulta en la proporción de acetil coenzima A (Aco) acomplejada /Aco libre, y la concentración de citrato inhibe la utilización de glucosa. De esta forma, la actividad de la PDH en corazón por ejemplo, donde juega un importantísimo papel en la aportación de energía, puede verse afectada en animales que reciben dietas ricas en azúcares simples (Shafir E, 1993) contribuyendo de manera importante a una disminución en las respuestas ante situaciones demandantes de estas vías energéticas, como lo son la isquemia y reperfusión.

Las características del modelo usado en este trabajo, principalmente aquéllas asociadas al daño cardiovascular, representan una alternativa para el estudio de los mecanismos y procesos involucrados en la patogénesis de esta clase de enfermedad. El objetivo de este estudio fue

evaluar el efecto sobre la función cardíaca de la hipertrigliceridemia y la hipertensión inducida por una dieta alta en carbohidratos.

Frecuentemente, las anomalías en la función cardíaca se encuentran asociadas al desarrollo de hipertrofia. Este fenómeno se ha reportado en algunos modelos animales de hipertensión que presentan alteraciones en la fuerza contráctil del corazón (Kirshenbaum LA et al, 1993 y Kioshi RF et al, 1994), y es un claro ejemplo en pacientes con hipertensión asociada a desórdenes lipídicos. Sin embargo, en la rata HTG, parece ser que la disfunción observada no se debe a un desarrollo hipertrófico, ya que no se observaron alteraciones en la masa ventricular o en la relación peso del corazón/peso corporal a pesar de que observaciones histológicas de miocardio han revelado un aumento de volumen en las células miocárdicas, así como un incremento en el número de núcleos presentes, sugiriendo un posible desarrollo hipertrófico. Esto puede explicarse por el hecho de que la hipertensión presente en este modelo es una hipertensión moderada, más que una hipertensión severa, de tal manera que la sobrecarga ventricular no es suficiente para producir un aumento importante en la masa del miocardio. La duración del tratamiento, así como el tiempo requerido para que aparezca la hipertensión podrían tener alguna implicación en este hallazgo. De igual manera, la ausencia de alteraciones promotoras del crecimiento y desarrollo celular en el miocardio, como son una marcada hiperinsulinemia y el tiempo requerido para que ésta se presente podrían estar influyendo en el desarrollo de hipertrofia. Este tipo de complicaciones, ha sido asociado en otros modelos a la hiperinsulinemia presente; por ejemplo, en la cepa SHHF/Mcc-cp, una variedad de rata corpulenta que manifiesta

hipertensión severa, alta resistencia a la insulina, hiperlipidemia y una moderada hiperglucemia, desarrolla enfermedad cardíaca congestiva con una marcada hipertrofia de miocitos y fibrosis intersticial (Shafrir E, 1993). Del mismo modo, se ha demostrado que en la rata espontáneamente hipertensa (SHR) la administración crónica de insulina produce un aumento en la pared vascular de arteriolas, así como un incremento en la proporción de peso corporal/peso del corazón (Zimlichman R et al, 1997). En un modelo de hipertensión en perro, donde se induce este padecimiento por la administración de una dieta hipercalórica durante 20 semanas, no se logra producir hipertrofia ventricular (Verwaerde P et al, 1996), sin embargo, otras alteraciones metabólicas como obesidad abdominal fueron reportadas en este modelo, indicando una estrecha relación entre los desórdenes cardiovasculares y endocrino-metabólicos, los cuales están fuertemente asociados a los modelos de hipertensión inducida por un régimen hipercalórico tales como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina((Weidmann P et al, 1993 ; Hulman S y Falkner B; Reaven GM et al, 1989).

Por otro lado, es posible que el daño vascular observado anteriormente en este modelo de hipertrigliceridemia e hipertensión (Baños G et al, 1997) pudiese extenderse hasta el endotelio vascular del miocardio, contribuyendo de esta manera a su disfunción. En este sentido, varias investigaciones han demostrado que el daño causado por los desórdenes lipídicos en la función cardíaca están ligados a una función endotelial. Una marcada reducción de la relajación dependiente de endotelio ha sido reportada en corazones de conejos que recibieron una

dieta rica en colesterol (Woditsch I y Schror K , 1994). En este estudio, la disminución de la respuesta endotelial se potenció cuando se estimuló con agentes adrenérgicos o con otros de tipo simpaticomiméticos. Otros estudios han demostrado el papel del endotelio endocárdico y su implicación en la modulación de la contracción mecánica del miocardio (Fort S et al, 1993), indicando que el daño producido por la remoción del endotelio de corazones perfundidos de hurones se refleja en una reducción significativa de la presión ventricular desarrollada por los mismos.

La contribución del daño endotelial en enfermedades vasculares tiene múltiples implicaciones; varios estudios en pacientes con enfermedad coronaria congestiva han demostrado que la vasorreactividad dependiente del endotelio se encuentra alterada y está caracterizada principalmente por disminución de síntesis de NO, un posible aumento en la producción de endotelina-1 y cambios en el metabolismo de prostaglandinas (Katz SS, 1995). En este sentido, la función cardíaca de las ratas HTG se ve disminuída cuando se enfrenta a situaciones tales como son la estimulación a frecuencias extremas o a estrés oxidativo como la isquemia y reperfusión, lo que sugiere que la hipertrigliceridemia e hipertensión alteran la capacidad del miocardio para responder a condiciones extremas.

Estudios clínicos han demostrado una alteración en la respuesta endotelial luego de un periodo de isquemia en el antebrazo de pacientes con hipercolesterolemia (Hayoz D et al, 1995). En este estudio, se propone que existe una asociación entre la dislipidemia y el daño causado en la actividad mecánica del músculo arterial estudiado. La hipertrigliceridemia

producida por la administración de sacarosa tiene un efecto similar en los corazones de las ratas HTG, donde el daño producido por la isquemia y la reperfusión es mayor que en los animales normotrigliceridémicos. El papel que los niveles altos de lípidos circulantes puede desempeñar en la producción del daño generado durante los procesos isquémicos ha sido evaluado en la rata espontáneamente hipertensa (SHR) (McLennan P et al, 1996). Aquí, se ha visto que la administración de ácidos grasos n-3 polinsaturados para modular la calidad de los lípidos séricos logra también reducir la incidencia de arritmias post-isquémicas y la actividad vasoconstrictora en la rata adulta SHR, en la cual se ha demostrado una elevación en la producción de metabolitos relacionados con tromboxanos.

Los niveles altos de triglicéridos circulantes en la rata HTG, pueden actuar como sustratos para la lipoperoxidación que se lleva a cabo durante la reperfusión post-isquemia. Esto resulta en una incidencia mayor de arritmias y una extensión del daño. El hecho de que el PBN, un atrapador de radicales libres, fuera capaz de proteger del daño producido durante la isquemia y reperfusión, sugiere que la contribución de esta vía al daño está potenciada en las ratas HTG de tal manera que la prevención de la sobrecarga de calcio con Ketorolac no es suficiente para revertir las arritmias como en las ratas controles. Además, la producción de agentes vasoconstrictores, producidos también durante los fenómenos de isquemia y reperfusión, probablemente esté aumentada, ya que los productos derivados del ácido araquidónico están elevados en este modelo (Baños G et al, 1997 y El Hafidi et al, 1997).

Aunados a los efectos antes descritos, los cambios en el perfil lipídico inducidos por la dieta de sacarosa podrían producir cambios en la composición de estructuras celulares tales como la membrana plasmática, los organelos intracelulares y complejos enzimáticos, alterando así el metabolismo de la célula. Se ha demostrado que el exceso de ácidos grasos es capaz de exacerbar el daño en corazones isquémicos, principalmente inhibiendo las vías metabólicas que mantienen al tejido miocárdico durante la isquemia (Liedtke AJ et al, 1988). En el corazón isquémico de la rata HTG, la incapacidad de recobrar la fuerza contráctil podría deberse a una provisión incompleta de la energía necesaria para desarrollar esta tarea, involucrando una alteración en los recursos metabólicos de la célula cardiaca. Por otro lado, se han reportado cambios en la composición lipídica de varios tipos de membranas en la rata HTG (El Hafidi M y Baños G, 1997). En el tejido cardiaco, estos cambios pueden alterar la permeabilidad iónica de la célula, donde un desequilibrio de las fuerzas eléctricas a través de la membrana del miocito puede interferir con la transmisión del impulso eléctrico. Nuestros resultados muestran un aumento en la conducción eléctrica del corazón perfundido HTG, lo que da lugar a la posibilidad de promover la incidencia y duración de las arritmias. Más aún, otros mecanismos involucrados en la recuperación del corazón durante la isquemia y perfusión, tales como la transducción de señales (Van den Ende R et al, 1994 y Yabe K et al, 1995), el manejo del calcio intracelular y la actividad enzimática antioxidante (Bolli R et al, 1989) pudiesen estar alterados en este modelo. En la rata HTG hereditaria, se han reportado anormalidades en el manejo del calcio intracelular en plaquetas, células cuya función depende importantemente de las concentraciones de este catión. En ese trabajo, los niveles

intracelulares de Ca^{+2} en plaquetas de ratas HTG fueron semejantes a los niveles de los respectivos controles, sin embargo bajo la estimulación de trombina, el incremento de Ca^{+2} en el interior de la célula fue menor en las ratas HTG. De igual manera, la respuesta con otros elementos como $[\text{Mn}^{+2}]$, fue menor en las ratas HTG (Zicha J et al, 1996).

XI. CONCLUSIONES

1). Los resultados obtenidos sugieren que la HTG podría causar alteraciones en la actividad mecánica y eléctrica del miocardio, situación que puede contribuir al desarrollo posterior de desórdenes cardiovasculares y potenciar el daño producido por estrés agudo como la isquemia y reperfusión. Los mecanismos y funciones celulares directamente afectados quedan aún por discernir.

2). Las diferencias encontradas en las ratas hembras pueden atribuirse a un efecto protector ejercido por los estrógenos, indicando una vez más que los padecimientos cardiovasculares están estrechamente relacionados con la interacción de los factores de riesgo que se presenta en un solo individuo. En este caso, puede observarse que el sexo juega un papel determinante en la ocurrencia de los eventos cardiovasculares que se presentan con la hipertrigliceridemia e hipertensión producidas en las ratas.

3). Este hecho abre un amplio campo en donde las interrogantes acerca del papel de las hormonas sexuales en otras funciones distintas a las reproductivas quedan aún por ser exploradas.

XII. BIBLIOGRAFIA

Ahumada MA (1991). Revisión de temas cardiológicos. Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas. I. Fisiopatología. *Arch Inst Cardiol Mex* 61:79-91

Alcocer-Díaz L (1993). Posibilidades potagénicas del daño hipertensivo. En: Sánchez-Torres G. Hipertensión arterial sistémica, de su impacto poblacional a las vicisitudes terapéuticas. Preludios del XVIII Congreso Nacional de Cardiología, Veracruz, Ver. Sociedad Mexicana de Cardiología. México. pp 81-105.

Arteaga D, Odor A, López RM, Contreras G, Pichardo J, García E, Aranda A y Chávez E (1992). Impairment by cyclosporin-a of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sciences* 51:1127-1134.

Ashraf M, Suleiman J y Ahmad M (1994). Ca^{+2} preconditioning elicits a unique protection against the Ca^{+2} paradox injury in rat heart. *Circ Res* 74:360-367.

Austin MA (1989). Plasma triglycerides as a risk factor for coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 129:249-259.

Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J y Franco M (1997). Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 10:379-388.

Bohr DF y Webb RC (1984). Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *Am J Med* 5:3-16.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R y MacCay PB (1989). Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to post-ischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci.* 86:4695-4

Castelli WP (1992). Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol.* 70:3H-9H.

Chávez E, Téllez F, Pichardo J, Milán R, Cuéllar A, Carvajal K and Cruz D (1996). On the protection by ketorolac of reperfusion-induced heart damage. *Com Biochem Physiol.* 115C:95-100.

Ciriaco E, Abbate F, Ferrante F, Laura R y Amenta F (1993). Structural changes in the endothelium of the femoral artery of spontaneously hypertensive rats: sensitivity to isradipine treatment. *J Hypertension* 11:515-522.

Cox Rh (1983). Comparison of arterial wall mechanisms using ring and cylindrical segments. *Am J Physiol* 244:H298-H303.

Descovich GC, Benassi B, Cancelli V, D'addato S. De Simone y Dormi A (1993). An epidemiologic view of the plurimetabolic syndrome: the Brisighella study. En : Crepaldi G, Tiengo A y Manzato E. Diabetes, obesity and hyperlipidemias: V The plurimetabolic syndrome. Ed, Excerpta Medica, Amsterdam. p 31-39

Dohi Y, Thiel MA, Bühler FR y Lüscher TF (1990) . Activation of endothelial L-Arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension* 15:170-179.

Döring HJ y Dehnert H (1988). The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. En: Methods in experimental physiology and pharmacology. Biological measurement techniques V. Biomesstechnik-Verlang March. West Germany. 219 p.

El Hafidi M, Carvajal K, Baños de MacCarthy G. Analysis of fatty acids and lipoperoxidation products in hypertriglyceridemic and hypertensive rat (1996). Abstract. 5th National Congress of Hypertension. Mexico.

Engler RL, Dahlgren MD y Morris DD (1986). Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251:H314-H322.

Fort S. Lewis MJ y Shah AM (1993). The role of endocardial endothelium in the modulation of myocardial contraction in the isolated whole heart. *Cardioscience*. 4:214-223.

Furchgott RF (1983). Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 53:557-573.

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

Gettes LS, Cascio WE, Jonhson T y Fleet WF (1991). Local myocardial biochemical and ionic alterations during myocardial ischaemia and reperfusion. *Drugs* 47(suppl 1):7-13.

Gianturco SH y Bradley WA (1988). Lipoprotein-mediated cellular mechanisms for atherogenesis in hypertriglyceridemia. *Seminars Thrombosis and Hemostasis*. 14(2):165-169.

Girotti AW (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radicals Biol Med* 1:87-95.

Guadalajara JF (1991). Cardiología. 4ta. Ed. Méndez Cervantes , México. p.1322.

Hayoz D, Weber R, Sutschmann B, Darioli R, Burnier M, Waeber B y Brunner HR (1995). Postischemic blood flow response in Hypercholesterolemic Patients . *Hypertension* 26:497-502.

Hearse DJ y Tosaki A (1987). Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin-trap agent PBN in the rat heart. *Circulation research* 60:375-383.

Heuer HJ y Bernauer W (1986). Myocardial damage by ventricular fibrillation in isolated perfused rat hearts, and its underlying mechanism. *Basic Res Cardiol* 81:188-198.

Hulman S y Falkner B (1994) . The effect of excess dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res* 36:95-101.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB y Reaven GM (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10:512-516.

Ibarra M, Meneses A, Ransanz V, Castillo C, Hong E (1995). Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats. *Arch Med Res* 26:S177-S183.

Johnston DL and Lewandowski ED (1991). Fatty acid metabolism and contractile function in the reperfused myocardium. *Circ Res* 68:714-725.

Kaplan NM (1994). Manejo de la hipertensión. 5ta ed. Mercadotecnia de innovación y desarrollo. México, D. F: pp 14-20.

Katz S D (1995). The role of endothelium-derived vasoactive substances in the pathophysiology of exercise intolerance in patients with congestive heart failure. *Progress Cardiovasc Diseases* 1:23-50

Kioshi RF, Stefanon I, Mill JG and Vassallo DV (1994). Time-dependent changes of left ventricular contractility in Langendorff perfused hearts from renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 27:783-793.

Kirshenbaum LA y Singal PK. Increase in endogenous antioxidant enzymes protects hearts against reperfusion injury (1993). *Am J Physiol* 265:H484-H493.

Klimes I, Vrána A, Kunes J, Sebökova E, Dobesová Z, Stolba P y Zicha J (1995). Hereditary hypertriglyceridemic rat:a new model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Pressure* 4:137-142.

Kunes J, Dobesová Z y Zicha J (1995). High blood pressure of hypertriglyceridaemic rats is related to metabolic disturbances. *Physiol Res* 44:421-424.

Larason B, Welin L y Erikson H (1993). The plurimetabolic syndrome and the study of men born in 1913, Göteborg, Sweden. En : Crepaldi G, Tiengo A y Manzato E. Diabetes, obesity and hyperlipidemias:V The plurimetabolic syndrome. Ed,. Excerpta Medica, Amsterdam. p 17-30.

Lawn RM (1992). Lipoproteína (a) en la enfermedad cardíaca. *Investigación y Ciencia* (agosto):14-21

Lehninger. AL (1993). Principios básicos de bioquímica. 2da. ed. Ed. Omega. Madrid, España. P. 674-677.

Lieberthal W, Yang Z y Lüscher TF (1989). Renal ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation. *The American Physiological Society*. 256:F894-F900.

Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM and Nelis SH (1988). Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res*.62:535-542.

Lüscher FT, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM y Bühler FR (1987). Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 11:573-578.

Marshall JJ, Kontos Ha (1990). Endothelium-derived relaxing factors. A perspective from *in vivo* data. *Circ Res* 16.371-386.

Martínez FJ, Rizza RA y Romero JC (1995). High fructose feeding, insulin resistance, hyperinsulinism and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension* 23:281-287.

Maxwell SRJ (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361.

McLennan P, Howe O, Abeywardena M, Muggli R, Raederstorff D, Mano M, Rayner T and Head R (1996). The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol* 300;83-89.

Mills GL, Lane PA y Weech PK (1984). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. A guidebook to lipoprotein technique. Elsevier. New York, E. U, 512 p.

222866

Minhaz U, Koide S, Shohtse A, Fujishima M Nakazawa H (1995). Perfusion delays causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic Res Cardiol*;90:418-423.

Nägele U, Hägele EO, Sauer G, et al (1984). Reagent for the enzymatic determination of serum triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 22, 165-174.

Nathan C (1992). Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fed Am Soc Exp Biol J* 6:3051-3064.

Nayler WG (1991). Basic mechanisms involved in the protection of the ischemic myocardium. The role of the calcium antagonist . *Drugs* 42:21-27.

Opie LH (1989). Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 80:1049-1062.

Palmer RMJ, Ashton DS y Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginine. *Nature* 33:664-666.

Pichardo J, Chávez R, Bravo C, Zazueta C y Chávez E (1994). Protección por ketorolac en el daño producido por isquemia y perfusión miocárdica. *Arch Inst Cardiol Mex* 64.325-330.

Reaven GM (1990). El papel de los trastornos del metabolismo de los carbohidratos y las lipoproteínas en la patogenia y en el curso clínico de la hipertensión arterial. *J Cardiovasc Pharmacol* 15:S1-S4.

Reaven GM (1991). Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes Care* 14:195-203.

Reaven GM y Ho H (1991). Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 4:610-614.

Reaven GM, Ho H, Hoffmann BB (1989). Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 14: 117-120

Reaven P (1996). The role of dietary fat in LDL oxidation and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 6:57-64.

Richard V, Hogie M y Thuillez C (1995). Role of endogenous endothelin in myocardial ischemia and nitric oxide-deficient hypertension. En: Lüscher TG. The endothelium in cardiovascular disease. Springer. Berlín, Germany. Pp 74-83.

Schwandt P (1990). The triglyceride controversy: a review of the data. *Eur Heart J* (suppl H):38-43.

Shafrir E.(1993). The plurimetabolic syndrome in animals: Models for experimentation, their implications and relation to NIDDM. En: Crepaldi G, Tiengo A y Manzato E.Diabetes, obesity and hyperlipidemias:V The plurimetabolic syndrome. Ed,. Excerpta Medica, Amsterdam. p 45-55.

Shah AM (1996). Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 31:847-867

Sirtori CR, Mancini M y Paoletti R (1990). Consensus: Hypertriglyceridaemia as a vascular risk factor, *Europ Heart J* 11:44-48.

Stamler J, Stamler R y Lui K (1985). High blood pressure: role in coronary heart disease and implications of prevention and control. En : Connor W y Bristow D. Coronary Heart Disease. JB Lippincott. Philadelphia, USA. Pp 85-109.

Suárez J and Rubio R.(1991) Regulation of glycolytic flux by coronary flow in guinea pig heart . Role of vascular endothelial cell glycocalyx. *[GBdM1]Am J Physiol* 261:H1994-H2000.

Takeda K, Nakata T, Kuwabara T, Itoh H, Yamahara Y, Takesako T, Tanabe S, Sasaki S, Asayama J y Nakagawa M (1992). Effect of manidipine on cardiac hypertrophy and coronary circulation in DOCA/salt hypertensive rats. *Blood Press* (suppl) 3:48-52.

Téllez F, Carvajal K, García C, Vásquez C, Chávez E y Moreno-Sánchez R (1996) . Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y reperfusión en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex* 66:162-181.

Tokahashi M, Yui Y, Yasumoto H, Apyama T, Morishita H, Hattori R y Kawai C (1990). Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Am J Physiol* 258:H1-H8.

Treasure C, Klein LJ, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC y Alexander RW (1995). Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 332(23):481-487.

Van de Voorde J y Leusen I (1986). Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *The American Physiological Society* 250:H711-H717.

Van den Ende R, Batink HD, Michel MC and Van Zwieten PA (1994). Influence of ischaemia and reperfusion on cardiac signal transduction, G protein content, adenyl cyclase activity, cyclic AMP content, and forskolin and isobutyl cyclic AMP-induced inotropy in the rat Langendorff heart. *Fundam Clin Pharmacol*. 8:408-416.

Verwaerde P, Galinier M, Rougé P, Massabuau P, Galitzky J, Sénard JM, Berlan M and Monstastruc JL. Hypertension artérielle expérimentale induite par un régime hypercalorique (1996). *Arch Mal Coeur Vaiss* 89:1019-1023.

Viallard JF, Dos-Santos P, Raffard G, Taiosse L, Gouverneur G, Besse P, Canioni p y Bonoron-Adele S (1993). Metabolic aspects of hemodynamic behavior in left ventricular hypertrophy by ^{13}C NMR. *Arch Mal Coeur Vaiss* 86:1123-1127.

Vraná A y Kazdová L (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 22:2579

Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DWG, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B (1980). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 47:1-9.

Weidmann P, de Courten M, Böhlen L (1993). Insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertension. *J Hypertens.* 11 :S27-S38.

Woditsch I y Schror K (1994). Reduced endothelium-dependent relaxation at enhanced NO release in hearts of hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Pharmacol* 111:1025-1040.

Yabe K, Nasa Y and Takeo S (1995). Hypoxic preconditioning in isolated rat hearts: non-involvement of activation of adenosine A₁ receptor, G protein, and ATP-sensitive K⁺ channel. *Heart Vessels* 10:294-303.

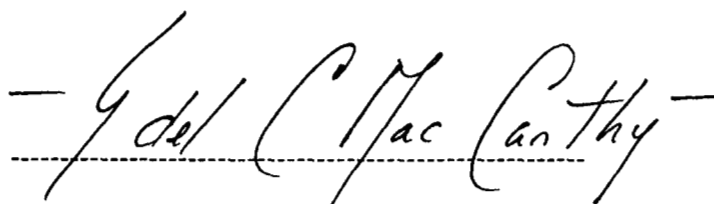
Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K y Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:311-415.

Yu PB (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Review* 74:139-162.

Zicha J, Kunes J, David-Dufilho M, Pernollet MG y Devynck MA (1996). Cell, calcium handling and intracellular pH regulation: reduced platelet response to thrombin stimulation. *Life Science* 59:803-813.

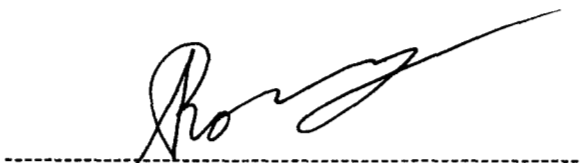
Zimlichman R, Zaidel L, Nofech-Mozes S, Shkedy A, Matas Z, Shahar C y Eliahou HE (1997). Hyperinsulinemia induces myocardial infarctions and arteriolar medial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 10:646-653.

Los integrantes del Comité Tutorial designados por la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la presente tesis el mes de septiembre de 1997.

A handwritten signature in cursive script, reading "G del C Mac Carthy", written over a horizontal dashed line.

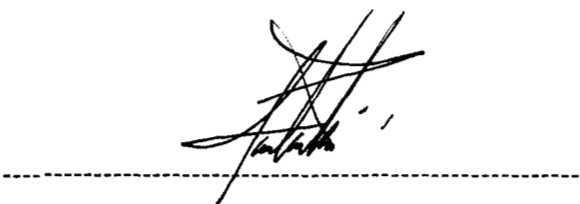
Dra. Guadalupe Baños de Mac Carthy.

Director de tesis

A handwritten signature in cursive script, reading "Rubén", written over a horizontal dashed line.

Dr. Rubén Román Ramos.

Asesor Interno.

A handwritten signature in cursive script, reading "Jorge", written over a horizontal dashed line.

Dr. Jorge Suárez Mungía.

Asesor Externo.