

Efecto del tratamiento con Ramipril en la reactividad de la aorta de ratas con diabetes mellitus: participación del óxido nítrico y prostanoïdes

Mayor M.C. Juan Pablo **García-Hurtado**,* Mayor M.C.M. en C. Carlos Armando **Sosa-Luna**,**
Dr. en C. Maximiliano **Ibarra- Barajas*****

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos.
Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala, Unidad de Biomedicina, UNAM.

RESUMEN

Introducción. La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento metabólico, que en México ocupa el cuarto lugar en causas de mortalidad desde 1989, ocasionado por la insuficiencia endocrina de liberación de insulina, por las células β del páncreas. A largo plazo la hiperglicemia resulta en daño de los nervios (neuropatía), de los vasos pequeños (microangiopatía) y de los vasos de gran calibre (macroangiopatía).

Material y método. Se empleó la metodología de aorta en cámara de órgano aislada y equipo Biopac MP100, para realizar las curvas concentración-respuesta a fenilefrina, y en presencia de L-NAME inhibidor de las NOS-1, NOS-2 y NOS-3 o con indometacina como inhibidor de las COX1 y COX2.

Resultados. En la DM se observó hiperreactividad tanto en anillos con y sin endotelio respecto al grupo control ($p < 0.001$). En la DM disminuye la función endotelial, sugiriendo disminución en la producción de óxido nítrico (NO) e incremento en la producción de agentes contráctiles que provienen del músculo liso vascular. Estas alteraciones se normalizaron en los grupos diabéticos tratados con ambos iECAS (ramipril y captopril).

Conclusiones. Estos efectos benéficos de los iECAS podrían indicar un aumento en la producción y/o liberación de NO, aunque este efecto es mayor con el captopril y sugiere la disminución en la producción de prostanoïdes contráctiles y aumentó en la actividad del NO.

Palabras clave: Endotelio, óxido nítrico, prostaglandinas, DM, aorta, prostaciclina, tromboxano, receptores α_1 adrenérgicos, reactividad vascular.

Effect of the treatment with ramipril in aortic reactivity of rats with diabetes mellitus: participation of nitric oxide and prostanoïds

SUMMARY

Introduction. Diabetes mellitus (DM) is a metabolic suffering, in Mexico occupies the fourth place in mortality causes from 1989, caused by the endocrine insufficiency of insulin liberation, by pancreas cells β . In long term hyperglycemia is in damage of the nerves (neuropathy), small vessels (microangiopathy) and heavy caliber vessels (macroangiopathy).

Material and method. Aortic methodology in organ isolated camera and Biopac MP100 equipment was used, to make concentration-answer to fenilefrine curves, and in the presence of the NOS-1, NOS-2 and NOS-3 inhibitor L-NAME or with indometacine like COX1 and COX2 inhibitor.

Results. Hyperreactivity in rings with and without endothely with respect to control group was observed In DM. Endotelial function diminishes in DM, suggesting diminution in the production of NO and increase in the production of contractil agents who come from vascular smooth muscle. These alterations were standardized in diabetic groups treated with both iECAS (Ramipril and Captopril).

Conclusions. These beneficial effects of iECAS could indicate an increase in the production and/or liberation of NO, although this effect is greater with captopril and suggests diminution in the productivity of contractil prostanoïds and increase in the NO activity.

Key words: Endothely, nitric oxide, prostaglandines, DM, aortic, prostaciclina, tromboxane, andrenergic α_1 receptors, vascular reactivity.

* Graduado de la Maestría en Ciencias Biomédicas con especialización en Farmacología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.
** M. en C. en Farmacología, Coordinador del Área Médica de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y asesor interno de Tesis de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Profesor titular. Doctor en Ciencias en Farmacología y Toxicología. Tutor y Asesor principal de la Tesis de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia:

Dr. Maximiliano Ibarra-Barajas

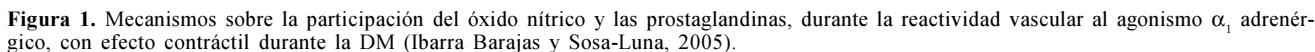
Cerrada de Palomas s/n, Esq. Periférico, Escuela Médico Militar, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la EMGS. Torre de Laboratorio 2o. piso. Col. Lomas de San Isidro. Del. Miguel Hidalgo. C.P. 11200. Tel.: 5623-1290. Correo electrónico: maxibarrab@correo.unam.mx

Recibido: Marzo 23, 2006

Aceptado: Junio 19, 2006

Sin embargo, los mecanismos responsables del incremento de la respuesta contráctil de las arterias diabéticas a ago-

Por otro lado las prostaglandinas (PGS), pertenecen al grupo de los eicosanoides que constituyen un grupo de compuestos que se forman a partir de algunos ácidos grasos polinsaturados, provenientes de la dieta, en particular del metabolismo del ácido araquidónico (AA). El metabolismo del AA a través de las vías de la lipooxigenasa y ciclooxige-



nasa resulta en la formación de leucotrienos y prostanoïdes, respectivamente.

La familia de las ciclooxigenasas está constituida por tres isoformas, sin embargo, son dos las que han sido ampliamente estudiadas; la ciclooxigenasa -1 (COX-1), que se expresa de manera constitutiva en casi todas las células y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que se induce por algunos factores séricos, citosinas y factores de crecimiento.¹³

Las prostaglandinas principales, PGI₂ (prostaciclina), PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α} son metabolizadas rápidamente y ejercen la mayor parte de sus efectos fisiológicos en forma local. La prostaciclina causa vasodilatación, broncodilatación e inhibe la agregación plaquetaria. Los efectos de las prostaglandinas vasodilatadoras son balanceados por el TXA₂, el cual es un potente vasoconstrictor, broncoconstrictor y agregante plaquetario producido principalmente por las plaquetas.¹⁴ La COX es inhibida en forma selectiva por los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), tales como el ácido acetilsalicílico y la indometacina.

El sistema renina-angiotensina (SRA), está involucrado en la regulación de la presión sanguínea, el balance de fluidos y otras funciones cardiovasculares y renales. La renina es la enzima limitante de la producción de angiotensina II, que es el componente biológicamente activo del SRA. En la circulación y en diversos tejidos la renina rompe el angiotensinógeno para liberar el decapeptido angiotensina I, que es convertido a AII, por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La renina, al igual que los demás elementos del SRA, se expresa en tejidos extrarrenales, lo cual ha conducido a postular la existencia de SRA locales, con funciones específicas del tejido y que pueden estar involucrados en diferentes patologías.¹⁵

Recientes estudios indican que el incremento de los niveles de angiotensina II durante la diabetes incrementan la expresión del RNAm de NAD(P)H oxidasa que es considerada la fuente más importante de especies reactivas de oxígeno.¹⁶

Los principales efectos de angiotensina II incluyen vasoconstricción, producción de especies reactivas de oxígeno, hipertrofia celular y apoptosis.¹⁶

Sin embargo, aún no se han definido los mecanismos que actúan en la vasculatura de aorta de rata.¹⁶

El efecto de los inhibidores de la ECA en la reactividad vascular podría retrasar la progresión, tanto de la insuficiencia cardíaca como de la aterosclerosis y pueden prevenir complicaciones de la diabetes. Un metaanálisis de tres estudios importantes, que incluyó más de 9000 pacientes con fracción de eyección del V.I. baja, mostró que el tratamiento con iECAs (ramipril 10 mg/día), reducía un 23% el infarto del miocardio y de otros eventos isquémicos (HOPE 2000).¹⁷ El ramipril es usado para el tratamiento de la falla cardíaca congestiva y para la hipertensión; y disminuye la progresión de la falla renal en pacientes con diabetes. El captopril está indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial, y en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, la administración de captopril está indicada después del infarto al

miocardio, en pacientes clínicamente estables con alteración asintomática y sintomática del ventrículo izquierdo, para mejorar la supervivencia, demorar el inicio de la insuficiencia cardíaca sintomática, reducir las hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca y reducir los procedimientos de revascularización coronaria e infarto al miocardio recurrente.¹⁸ Aunque los iECAs, parecen mostrar un incremento en la función endotelial arterial de animales de experimentación y en pacientes con aterosclerosis coronaria establecida, su efecto preciso en DM, no ha sido bien establecido y su eficacia es todavía controversial.¹⁹

Metodología

Animales de experimentación:

Se utilizaron ratas Wistar machos (9-10 semanas de edad), de 250 a 300 gr de peso. Se alimentaron con alimento Harman Teklad para roedores de Laboratorio LM-485 con 4.05 Kcal/gr, así como agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas a temperatura ambiente entre 18 y 22 grados centígrados, en el Bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Fármacos y químicos:

Clorhidrato de L-fenilefrina (PE), cloruro de carbamilcolina (carbacol), estreptozotocina (STZ), clorhidrato de N-nitro-L-arginina-metil-ester- (L-NAME), indometacina, clorhidrato de rauwolscina y captopril (CAP), fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, USA). El -DL- clorhidrato de propanolol 99% fue comprado a Acros Organics (New Jersey, USA). El ramipril (RAM) fue proporcionado por Usiphar (L'Aigle France). El Pentobarbital Sódico para uso veterinario fue adquirido de Salud & Bienestar Animal, S.A. de C.V. (México). Todos los demás químicos fueron adquiridos de laboratorios Merck (Germany). Todos los fármacos excepto la STZ, RAM y CAP fueron disueltos en la solución de Krebs. La STZ fue disuelta en amortiguador frío de citratos a un pH de 4.5. Ramipril (1 mg/kg/día) y captopril (30 mg/kg/día) fueron disueltos y ajustados a un volumen de agua para beber por día.

Soluciones:

Agua destilada y solución de perfusión (Krebs) cuya composición (en mM) es la siguiente: NaCl: 6.9g (118 mM), NaHCO₃: 2.1g (25 mM), KCl: 0.35g (4.7 mM), MgSO₄·7H₂O: 0.29g (1.17 mM), CaCl₂·2H₂O: 0.37g (2.5 mM), KH₂PO₄: 0.16g (1.17 mM), Glucosa: 2.1g (11.6 mM), EDTA: 0.01g (0.026 mM), los compuestos mencionados, se disolvieron en un litro de agua ultra pura, la solución de Krebs permaneció con burbujeo constante de una mezcla de 95/5% de O₂/CO₂, a un pH de 7.4 y a una temperatura de 37°.

Material y Equipo:

Tiras reactivas para glucómetro digital Accutrend GCT de Roche Diagnóstico GmbH (Mannheim Germany) (Glucosa y Triglicéridos), Equipo de micro cirugía. Equipo Biopac. -100-A-CE. (Santa Barbara, CA USA). Transductores de presión (Grass FT03 RI, USA), Sistema de órgano aislado (cámaras o baño). Equipo para medir presión en la arteria

caudal: Que consta de esfigmomanómetro, sensor IITC con un haz de luz dirigido a una celda fotosensible montada en un manguillo de hule látex inflable, que son captadas simultáneamente en un polígrafo Grass modelo 7D, Sistema de burbujeo de carbógeno (95% O₂/5% CO₂).

Protocolos

Inducción de diabetes mellitus. Se indujo la diabetes por una inyección intraperitoneal de STZ a dosis de 50 mg/kg de peso, se confirmó el desarrollo de DM por determinación de glucosa mayor a 200 mg/dL, con un glucómetro digital, a las 72 horas.

Determinación del peso corporal, glucosa y triglicéridos. Los pesos corporales y los niveles sanguíneos de glucosa fueron monitorizados una vez a la semana. Además, se monitorearon los triglicéridos en sangre, en los siguientes tiempos: inicial, dos semanas y cuatro semanas.

Diseño experimental. De un total de 54 ratas, los animales fueron divididos al azar en dos grupos experimentales; controles y diabéticos: los controles y diabéticos se dividieron en tres subgrupos (N = 9); tratados con vehículo, con ramipril o con captopril.

Protocolo de administración de los fármacos. El ramipril y captopril fueron administrados, a partir del día 15, de inducción de la diabetes, en el agua de beber, a una dosis de 1 mg/kg/día para el ramipril (se utilizaron tabletas de 10 mg) y 30 mg/kg/día para el captopril (se utilizó la sal activa).

Registro de la presión arterial sistólica, media y diastólica en animales conscientes. El registro de la presión arterial sistólica se realizó de manera indirecta, registrando el pulso sistólico, diastólico y medio de la presión en la arteria caudal. El sistema de registro consta de un sensor IITC con un haz de luz dirigido a una celda fotosensible, montada en un manguillo de hule látex inflable, en donde se introduce la cola de la rata. Un esfigmomanómetro conectado al manguillo suministra la presión necesaria para que se infle rápidamente, obstruya la arteria caudal y posteriormente se desinfe de manera gradual y constante. Las señales provenientes de la fotocelda y del esfigmomanómetro captadas simultáneamente en un polígrafo Grass modelo 7D y una computadora, permitió medir los cambios en la tensión arterial. Las mediciones se llevaron a cabo en los siguientes tiempos: inicial, dos semanas y cuatro semanas.

Registro de la contracción isométrica en aortas aisladas de ratas. Al final de cuatro semanas de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas y una vez que se obtuvo la aorta torácica descendente, la cual fue cuidadosamente disecada y removida a una caja de petri con solución de Krebs y oxigenación, se terminó por limpiar de todo el tejido conectivo adyacente hasta dejarla lo más limpia posible sin dañarla, se cortó en cuatro anillos de aproximadamente 4 mm de largo, de los cuales a dos se les removió el endotelio por frotación de la superficie luminal con la punta de una pinza Kelly. Los anillos de aorta fueron colocados entre dos ganchos de alambre de nikrom, se fijó en la base de las cámaras y el otro alambre (opuesto), se fijó al transductor de tensión

(GRASS FT03, RI, USA) conectado a un equipo MP-100-A-CE Physiograph Biopac Systems Inc., (Santa Bárbara, CA, USA) y a una computadora. Se midieron los cambios en la tensión isométrica en las preparaciones arteriales provocados por los agonistas. Cada una de las cámaras para órgano aislado contenían 10 mL de solución Krebs con un (pH 7.4), una temperatura de 37°C, y continuamente oxigenada con una mezcla de 5% CO₂ y 95% O₂. A todas las soluciones de Krebs se les adicionó Rauwalscina (1 x 10⁻⁷M) y Propanolol (1 x 10⁻⁷ M) para antagonizar los receptores α_2 , β_1 , β_2 adrenérgicos. Una vez colocados todos los anillos en el interior de las cámaras, se sometieron a una tensión inicial en reposo óptima de 3.0 g y posteriormente se estimuló tres veces con fenilefrina (1 x 10⁻⁵ M), cada 30 minutos y con lavados intermedios cada 15 minutos. En el tercer estímulo con fenilefrina (1 x 10⁻⁵ M), cuando la respuesta contráctil llega a la meseta, se le agregó carbacol (1 x 10⁻⁵ M) para evaluar la integridad del endotelio, una relajación igual o mayor a 80% es considerada suficiente para demostrar la integridad funcional del endotelio. Después de 30 minutos, se realizó la curva concentración respuesta acumulativa con PE (1 x 10⁻⁹ a 1 x 10⁻⁵ M) para cada anillo. Por otro lado, las respuestas relajantes menores a 20% de la concentración previa fueron consideradas como indicativo de la remoción del endotelio.²⁰

En anillos con y sin endotelio se realizaron las curvas con PE de manera acumulativa, permitiendo llegar a la meseta con cada concentración para agregar la dosis subsiguiente, hasta alcanzar el efecto máximo (Emax).

Los inhibidores no selectivos de la sintasa de óxido nítrico L-NAME (1 x 10⁻⁴ M) y de la ciclooxigenasa, Indometacina (1 x 10⁻⁵ M), fueron adicionados en las cámaras que contenían anillos de aorta durante 30 minutos antes de la segunda curva a PE. Las curvas con PE se realizaron de manera acumulativa, permitiendo llegar a la meseta entre cada concentración de PE (1 x 10⁻⁹ a 1 x 10⁻⁵ M) para agregar la concentración subsiguiente, hasta alcanzar el efecto máximo (Emax).

La sensibilidad a los agonistas fue evaluada con los parámetros de Emax, área bajo la curva (AUC) y dosis efectiva 50 (pD₂), la cual es el logaritmo negativo de la concentración del fármaco requerido para producir 50% de la respuesta máxima.

Estadística

Los resultados fueron analizados usando las pruebas estadísticas t de Student, t pareada y análisis de varianza (ANOVAs). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de p < 0.05.

La prueba t de Student se utilizó para las variables como el peso, glicemia, triglicéridos y presión arterial sistólica. En todos los casos se tomó como nivel de diferencia estadísticamente significativa una p < 0.05. Además se utilizó el programa Sigma Plot para la construcción de las curvas concentración-respuesta (empleando la función Fit Curve).

Todos los valores fueron expresados como la media $\pm$ SEM de todas las variables medidas, por ejemplo: peso, gli-

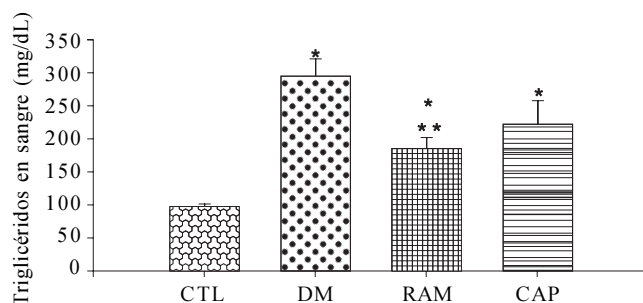
cemia, respuesta contráctil, etc. La AUC fue calculada de cada curva concentración-respuesta de manera individual en anillos sin endotelio y con endotelio y las relaciones AUC sin endotelio/AUC con endotelio y AUC con inhibidor/AUC control o sin inhibidor, son expresadas como un porcentaje del incremento o decremento ($\Delta\%$). En donde la tensión inicial fue considerada como 100% en anillos de aorta con endotelio o controles (sin inhibidor L-NAME 1×10^{-4} M o Indometacina 1×10^{-5} M). El porcentaje del incremento o decremento se considera como un índice de la función endotelial del NO y de las prostaglandinas.

Para cada curva concentración-respuesta, el efecto máximo ($E_{\max}$) y la concentración de agonista que produce la mitad del efecto máximo $E_{\max}$ ($\log EC_{50}$), fueron calculados usando un análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). La sensibilidad de los agonistas fue expresada como pD_2 ($-\log EC_{50}$) y se consideran como un índice de la reactividad vascular.

Resultados

Las ratas con STZ, presentaron severa hiperglicemia a las 48 horas y después de cuatro semanas, incrementaron su presión sanguínea tanto sistólica, diastólica y media respecto al grupo CTL (t de Student $p = 0.002$). El grupo de ratas diabéticas tratadas con (CAP) y el grupo de ratas diabéticas tratadas con (RAM) redujeron a niveles normales la presión sanguínea. A partir de la segunda semana el peso de las ratas diabéticas y la hiperglicemia observada en DM tratadas con vehículo (RAM) o (CAP), mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el grupo control (ANOVA una vía, $p < 0.005$), por tanto, el tratamiento en la DM no modificó la hiperglicemia ni la pérdida de peso en los animales de experimentación (Cuadro 1).

Los niveles sanguíneos de triglicéridos fueron incrementados en la hiperglicemia en todos los grupos (DM, DM+RAM y DM+CAP) vs. el grupo (CTL) (t de Student $p < 0.001$). El efecto para reducir los niveles sanguíneos de triglicéridos en el grupo de ratas diabéticas tratadas con (RAM) fue signifi-



*Diferencias con t de Student, $p < 0.001$ entre el CTL vs. DM, CAP y RAM. ** Diferencias con t de Student, $p < 0.05$ entre DM vs. RAM.

Figura 2. Efectos en la reducción de niveles de triglicéridos en sangre en los tratamientos con ramipril y captopril en ratas diabéticas. Las barras muestran la media y SEM en los niveles de triglicéridos en sangre, después de cuatro semanas de inducida la diabetes con STZ.

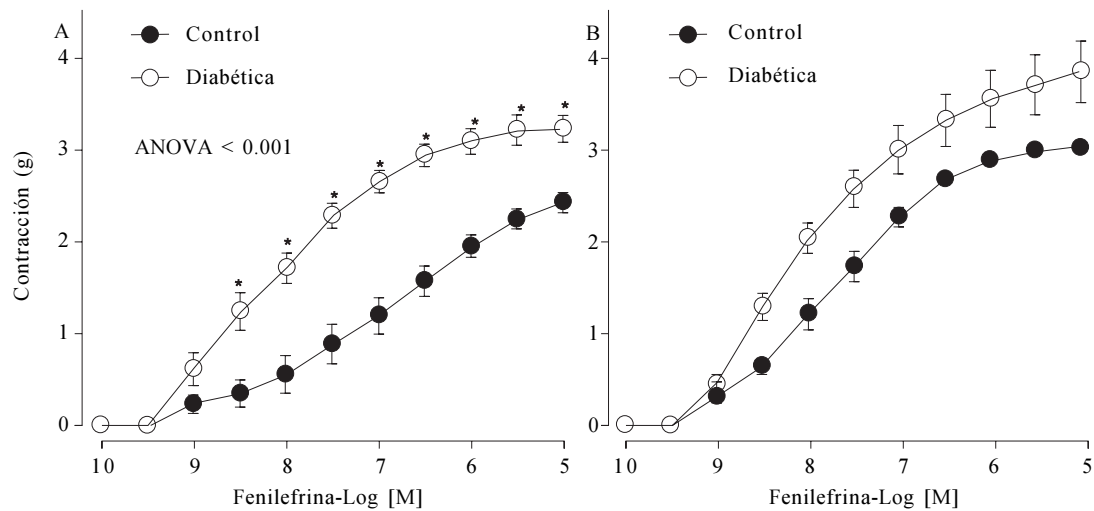
cativo (t de Student $p = 0.004$) y no se modificó en el grupo de ratas diabéticas tratadas con captopril (CAP) ($p = 0.123$). Cuando comparamos los grupos de ratas diabéticas tratadas con (RAM) con los grupos control (CTL y DM) se encontraron diferencias con la prueba t de Student $p < 0.001$ y $p = 0.004$, respectivamente. El tratamiento de ratas diabéticas con (RAM) cuando se compara con el grupo control (CTL) no normaliza los niveles sanguíneos de triglicéridos, solamente los reduce. Este efecto del ramipril, que resulta ser benéfico en situaciones de hipertrigliceridemia, como podría ser en procesos patológicos como la DM, explica el efecto en la reducción de riesgos de IAM u otras complicaciones cardiovasculares (Figura 2).

En las condiciones experimentales utilizadas se observó que la hiperglicemia a las cuatro semanas después de la inducción de la diabetes con STZ, indujo hiperreactividad a la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos, al compararlo con el grupo (CTL), tanto en anillos con endotelio como sin endotelio (Figura 3). Las áreas de las curvas de concentración-respuesta a PE, de aortas con endotelio, del grupo de ratas diabéticas tratadas con (RAM) fue estadísticamente diferente con respecto al grupo DM (prueba de Wilcoxon

Cuadro 1. Peso corporal, nivel de glucosa sanguínea, y presión arterial en las ratas control, diabéticas y tratadas con ramipril y captopril.

	Peso corporal (g)			Glucosa sérica (mg/dL)			Presión sanguínea Media (mmHg)		
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 0	Semana 2	Semana 4
Control									
CTL	240.64 $\pm$ 10.34	260.82 $\pm$ 10.19	312 $\pm$ 8.69	99.27 $\pm$ 3.72	98.55 $\pm$ 2.86	93 $\pm$ 3.08	102.5 $\pm$ 6.07	102.88 $\pm$ 3.50	104.75 $\pm$ 4.24
RAM	252.3 $\pm$ 6.2	269.6 $\pm$ 4.4	298.6 $\pm$ 6.2	100.3 $\pm$ 3.35	99.13 $\pm$ 3.8	89.8 $\pm$ 5.3	104.8 $\pm$ 2.9	107.16 $\pm$ 2.34	111.16 $\pm$ 4.19
CAP	257.8 $\pm$ 4.3	280.4 $\pm$ 4.8	305.8 $\pm$ 4.7	102.6 $\pm$ 2.7	101.61 $\pm$ 3.6	88.9 $\pm$ 6.6	101.9 $\pm$ 3.48	101.29 $\pm$ 2.4	103.5 $\pm$ 4.072
Diabética									
DM	272.88 $\pm$ 3.70	252.75 $\pm$ 15.30*	233.5 $\pm$ 12.43*	84.88 $\pm$ 2.20	409.13 $\pm$ 33.14***	457.75 $\pm$ 25.18***	104.57 $\pm$ 4.97	123.71 $\pm$ 2.80**	137.71 $\pm$ 3.53***
RAM	269.17 $\pm$ 4.68	226.67 $\pm$ 7.63	204.6 $\pm$ 2.94*	86.33 $\pm$ 2.14	408.33 $\pm$ 36.49***	489.17 $\pm$ 17.94***	101.0 $\pm$ 3.94	124.67 $\pm$ 4.95*	110.83 $\pm$ 4.28
CAP	283.71 $\pm$ 6.82	259 $\pm$ 10.63	240.43 $\pm$ 14.84*	86.86 $\pm$ 2.42	391.2 $\pm$ 18.67***	485.43 $\pm$ 24.25***	96.86 $\pm$ 3.25	117.14 $\pm$ 2.15*	111.71 $\pm$ 1.13

Los datos son representados como la media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ (comparado con el control). ** $p < 0.005$ (comparado con el control). *** $p < 0.001$ (comparado con el control).



*Diferencias con ANOVA de dos vías $P < 0.001$ entre CTL vs. DM. En (A) se muestran los anillos de aorta con endotelio: $pD_2 = 6.99 \pm 0.21$ y $E_{max} = 2.43 \pm 0.11$ g en el grupo CTL vs. $pD_2 = 7.71 \pm 0.18$ y $E_{max} = 3.25 \pm 0.15$ g en DM y en (B) anillos de aorta sin endotelio: $pD_2 = 7.70 \pm 0.12$ y $E_{max} = 3.04 \pm 0.06$ g en el grupo CTL vs. $pD_2 = 8.10 \pm 0.15$ y $E_{max} = 3.86 \pm 0.33$ g en DM

Figura 3. La hiperreactividad a la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos en anillos de aorta de rata diabética es similar con y sin endotelio. Los círculos muestran la media y la SEM de los datos de la curva concentración-respuesta a PE.

Cuadro 2. Contracción y parámetros de las curvas Concentración-Respuestas

	Endotelio intacto	AUC Sin endotelio	$\Delta\%$ relación E-/E+	Endotelio intacto	E_{max} (g) Sin endotelio	$\Delta\%$ (relación E- /E+)	Endotelio intacto	pD_2 Sin endotelio	$\Delta\%$ relación E-/E+
No- Diabético CTL	6.14 $\pm$ 0.66	8.07 $\pm$ 0.30* (p = 0.028)	31.43	2.43 $\pm$ 0.11	3.04 $\pm$ 0.06*** (p = < 0.001)	25.10	6.99 $\pm$ 0.21	7.70 $\pm$ 0.12** (p = < 0.016)	10.15
RAM CTL	4.13 $\pm$ 0.46	10.65 $\pm$ 0.80*** (p = < 0.001)	57.86	2.30 $\pm$ 0.20	3.66 $\pm$ 0.21*** (p = < 0.001)	59.13	6.56 $\pm$ 0.99	8.06 $\pm$ 0.15*** (p = < 0.001)	22.86
CAP CTL	5.65 $\pm$ 0.81	7.62 $\pm$ 0.23** (p = 0.017)	34.86	2.54 $\pm$ 0.23	3.04 $\pm$ 0.07 (p = 0.318)	19.68	6.98 $\pm$ 0.48	7.47 $\pm$ 0.15** (p = < 0.005)	7.02
Diabético DM	9.43 $\pm$ 0.63	10.85 $\pm$ 0.82 (p = 0.166)	15.05	3.25 $\pm$ 0.15	3.86 $\pm$ 0.33 (p = 0.438)	18.76	7.71 $\pm$ 0.18	8.10 $\pm$ 0.15 (p = 0.076)	5.05
RAM	7.41 $\pm$ 0.61	9.59 $\pm$ 0.68* (p = 0.020)	29.41	2.69 $\pm$ 0.07	3.86 $\pm$ 0.19*** (p = < 0.001)	59.42	7.37 $\pm$ 0.19	7.29 $\pm$ 0.09 (p = 0.103)	-1
CAP	6.44 $\pm$ 0.49	8.74 $\pm$ 0.24*** (p = < 0.001)	35.71	2.55 $\pm$ 0.06	3.28 $\pm$ 0.17*** (p = < 0.001)	28.62	7.20 $\pm$ 0.13	7.79 $\pm$ 0.10*** (p = < 0.001)	8.19

En $\Delta\%$ en la relación E-/E+ de: AUC, E_{max} y pD_2 . en anillos con y sin endotelio de los diferentes grupos. (E+ = con endotelio, E- = sin endotelio).

* p < 0.05, Endotelio vs. sin endotelio ** p < 0.005, Endotelio vs. sin endotelio *** p < 0.001, Endotelio vs. sin endotelio ***p < 0.001 (comparado con el control).

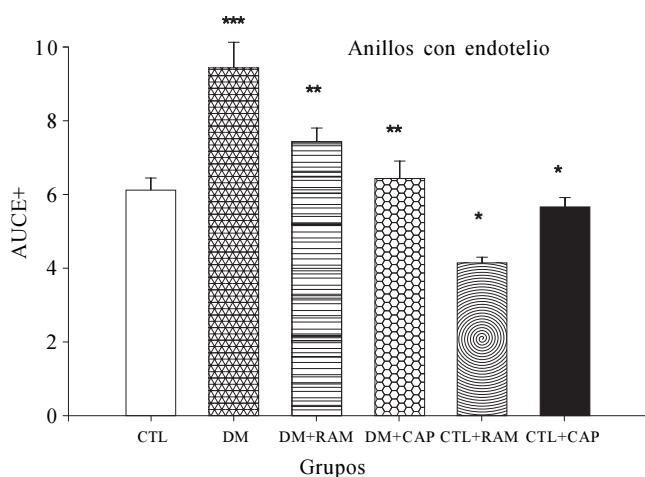
Signed Rank p = 0.027), y no presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo de ratas (CTL) (Wilcoxon Signed Rank p = 0.181); mientras que los anillos de aorta sin endotelio no se observaron diferencias con el grupo (CTL) (t-pareada, p = 0.096). Lo que indica que el fármaco ramipril normaliza la reactividad vascular en los anillos con y sin endotelio de ratas diabéticas (Cuadro 2).

Las áreas bajo las curvas de concentración-respuesta a PE de aortas con endotelio del grupo de ratas diabéticas tratadas con (CAP) fue muy diferente estadísticamente con respecto al grupo DM (t-pareada p = < 0.001), y no presentó diferencias al compararlo con el grupo de ratas CTL (t-pareada p = 0.758); en tanto que los anillos de aorta sin endotelio

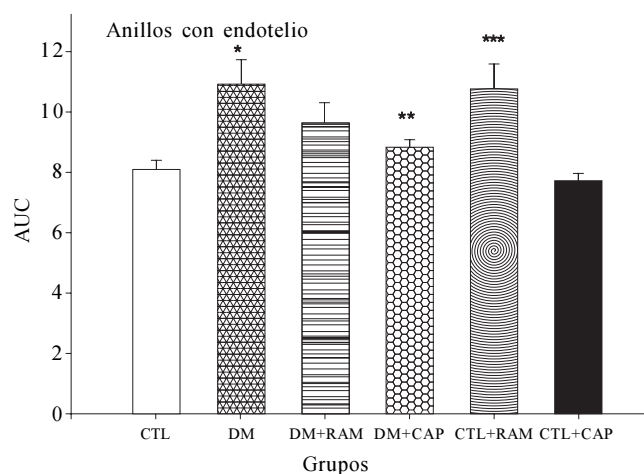
mostraron una reducción de la respuesta contráctil comparado con el grupo DM (prueba de Wilcoxon Signed Rank p = 0.030) sin presentar cambios significativos al compararlo con el grupo CTL (prueba de Wilcoxon Signed Rank p = 0.265). Lo que indica que el fármaco captopril tiene la capacidad de normalizar la reactividad vascular en los anillos de aorta de rata diabética, tanto con endotelio como sin endotelio.

Este grupo no presenta diferencias al compararlo con las ratas diabéticas tratadas con (RAM) (t de Student p = 0.351) (Figuras 4 y 5).

Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en los anillos sin endotelio de estos dos grupos de ratas diabéticas tratadas (prueba de Wilcoxon Signed Rank



*** $p < 0.001$ entre CTL vs. DM. ** $p < 0.05$ entre DM vs. DM+RAM y DM+CAP. * $p < 0.05$ entre CTL vs. CTL+CAP, y CTL+RAM.



* $p < 0.05$ entre CTL vs. DM. ** $p < 0.05$ entre DM vs. DM+CAP. *** $p < 0.005$ entre CTL+CAP vs. CTL+RAM.

Figura 4. Diferencias de las áreas bajo la curva a PE de los distintos grupos de anillos con endotelio.

Figura 5. Diferencias de las áreas bajo las curvas a PE, de los distintos grupos de anillos sin endotelio.

Cuadro 3. Efecto del NO, en la contracción y parámetros de las curvas concentración respuesta a PE

	AUC Endotelio intacto	Sin endotelio	Emax (g) Endotelio intacto	Sin endotelio	pD2 Endotelio intacto	Sin endotelio
Antes L-NAME						
CTL	5.67 ± 0.90	7.76 ± 0.42	2.43 ± 0.13	3.04 ± 0.07	6.78 ± 0.32	7.55 ± 0.42
DM	10.12 ± 0.85	11.86 ± 1.24	3.23 ± 0.22	3.87 ± 0.57	7.79 ± 0.25	8.47 ± 0.16
RAM	6.49 ± 0.85	9.89 ± 1.11	2.54 ± 0.13	4.06 ± 0.26	6.98 ± 0.28	7.31 ± 0.17
CAP	5.69 ± 0.54	8.83 ± 0.32	2.57 ± 0.08	3.33 ± 0.26	7.17 ± 0.19	7.77 ± 0.15
Después L-NAME						
CTL	7.74 ± 0.88** ($p = 0.004$) $\Delta\% + 35.50$	5.28 ± 0.94 ($p = <0.042$) $\Delta\% - 31.93$	2.92 ± 0.18 ($p = <0.022$) $\Delta\% + 20.16$	1.93 ± 0.23*** ($p = <0.001$) $\Delta\% - 36.51$	7.67 ± 0.2 ($p = 0.050$) $\Delta\% + 13.12$	7.30 ± 0.36 ($p = 0.414$) $\Delta\% - 3.31$
DM	7.96 ± 0.61* ($p = <0.021$) $\Delta\% - 21.39$	7.26 ± 1.17* ($p = 0.015$) $\Delta\% - 38.81$	3.17 ± 0.28 ($p = 0.858$) $\Delta\% - 1.85$	3.10 ± 0.61 ($p = 0.132$) $\Delta\% - 23.64$	7.59 ± 0.22 ($p = 0.547$) $\Delta\% - 2.5$	7.41 ± 0.33 ($p = 0.180$) $\Delta\% - 12.51$
RAM	6.84 ± 0.51 ($p = 0.732$) $\Delta\% + 5.32$	5.68 ± 0.73* ($p = 0.006$) $\Delta\% - 42.61$	2.82 ± 0.19 ($p = 0.253$) $\Delta\% + 11.02$	2.46 ± 0.34** ($p = 0.002$) $\Delta\% - 19.89$	7.53 ± 0.18 ($p = 0.124$) $\Delta\% + 7.08$	7.33 ± 0.14 ($p = 0.926$) $\Delta\% - 0.2$
CAP	8.20 ± 0.55** ($p = <0.005$) $\Delta\% \pm 44.19$	6.69 ± 0.43*** ($p = <0.001$) $\Delta\% 24.28$	3.10 ± 0.11** ($p = <0.002$) $\Delta\% + 20.62$	2.34 ± 0.18** ($p = 0.004$) $\Delta\% - 29.72$	7.59 ± 0.24 ($p = 0.185$) $\Delta\% + 5.08$	8.06 ± 0.20 ($p = 0.275$) $\Delta\% - 3.7$

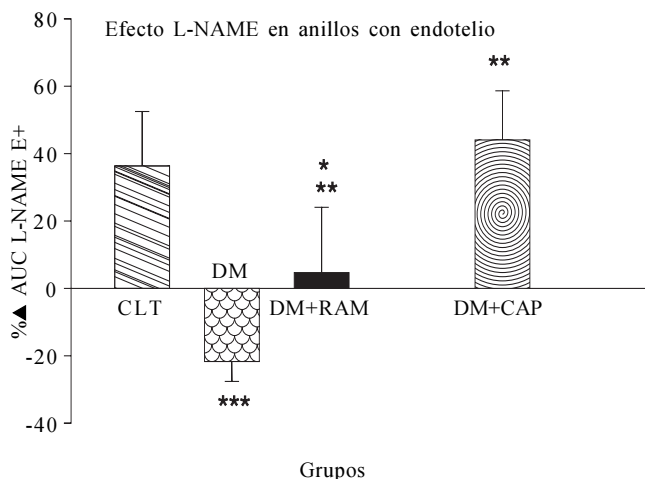
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$

Muestra el efecto del óxido nítrico en anillos con y sin endotelio de animales de todos los grupos (CTL, DM, RAM y CAP) en condiciones previas y en presencia de L-NAME y sus parámetros de medición de la reactividad vascular a la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos con las curvas concentración-respuesta a PE, en $\Delta\%$ después/antes de: AUC, Emax y pD_2 .

$p = 0.764$). Por lo tanto, no hay diferencias entre ambos tratamientos para reducir la reactividad vascular en la hiperglicemia.

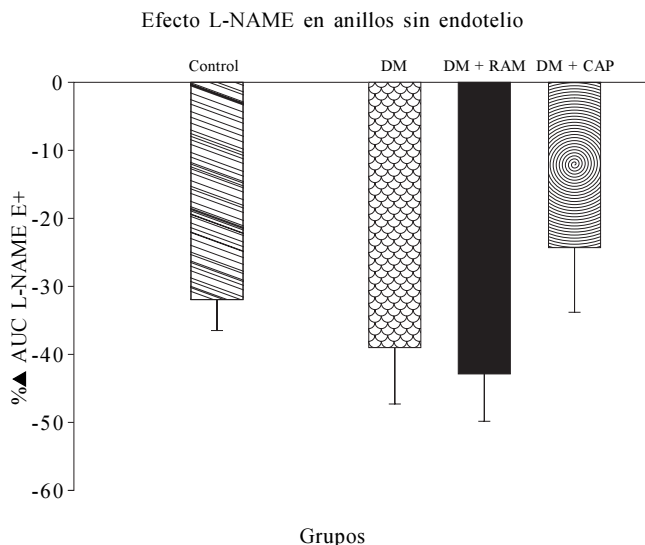
Al realizar la discusión del efecto del **óxido nítrico** en la concentración vascular a la estimulación de los receptores

α_1 -adrenérgicos, en los diferentes grupos de ratas de experimentación con endotelio, observamos lo siguiente: Respecto a su $\Delta\%$ AUC en las condiciones control y en el grupo de ratas diabéticas tratadas con CAP con endotelio, existe una gran biodisponibilidad de NO, ya sea que se incremente su



*** $p < 0.001$ entre CTL vs. DM y ** $p < 0.001$ entre DM vs. DM+CAP. ** $p < 0.05$ entre DM vs. DM+RAM y * $p < 0.05$ entre CTL y DM+CAP vs. DM+RAM.

Figura 6. Efectos del NO en la reactividad contráctil a la estimulación α_1 -adrenérgica en anillos de aorta con endotelio a las cuatro semanas, de los distintos grupos (CTL, DM, DM+RAM y DM+CAP), se ilustra el %Δ (incremento o decremento) de la relación AUC con L-NAME/AUC sin inhibidor, las medias $\pm$ S.E.M. de la contracción para las curvas concentración-respuesta a PE.



"Entre los grupos no hubo diferencia estadísticamente significativa"

Figura 7. Efectos del NO en la reactividad contráctil a la estimulación α_1 -adrenérgica en anillos de aorta sin endotelio a las cuatro semanas, para los distintos grupos (CTL, DM, DM+RAM y DM+CAP), se ilustra el %Δ (incremento o decremento) de la relación AUC con L-NAME/AUC sin inhibidor o en condiciones previas a L-NAME. Las medias $\pm$ SEM de la contracción de las curvas concentración-respuesta a PE.

síntesis o disminuyan los ROS, éste fenómeno no es tan evidente en las ratas tratadas con RAM (Cuadro 3).

Por otro lado, en los anillos sin endotelio para el parámetro $\Delta\%$ AUC no muestra diferencias significativas entre los diversos grupos y no parece influir en las diferencias de regulación/difunción en la reactividad vascular observada

en la diabetes mellitus *versus* condiciones control (Figuras 6 y 7).

Al analizar los **prostanoides** en la contracción vascular a la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos en los diferentes grupos de ratas de experimentación con endotelio, observamos lo siguiente: respecto a su $\Delta\%$ AUC al comparar los anillos de aorta con endotelio del grupo DM vs. RAM, se observó una mayor atenuación de la respuesta contráctil, dicho cambio resultó ser significativo (t pareada $p = 0.013$) y al comparar el grupo DM vs. CAP no se observaron cambios estadísticamente significativos (t-pareada, $p = 0.226$), por lo que parece ser que el ramipril tiene mayor efecto en inhibir la respuesta contráctil en ratas diabéticas con endotelio, que el fármaco captopril (Cuadro 4). Aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (t-pareada, $p = 0.470$), respecto al grupo de anillo sin endotelio, observamos que no existe una diferencia significativa entre los distintos grupos, excepto entre el grupo DM vs. CAP (t pareada, $p = 0.038$), lo que indica que en el grupo de ratas diabéticas sin endotelio el captopril parece tener un efecto menor para disminuir la respuesta contráctil, al parecer por existir menor cantidad de agentes contráctiles; aunque el cambio que se aprecia entre los tratamientos CAP vs. RAM con un ligero decremento en la contracción en el grupo de CAP sin endotelio, tampoco es estadísticamente significativo (t Student $p = 0.368$); esto podría ser por presentar una menor cantidad de endoperóxidos cíclicos (PGH₂, PGG₂ y TXA₂) en el músculo liso, o bien por existir mayor cantidad de agentes relajantes (prostaciclina o biodisponibilidad de NO) (Figuras 8 y 9).

Discusión

En nuestro estudio ambos iECAS, normalizaron la reactividad vascular. El captopril normaliza la reactividad vascular al parecer gracias a la capacidad antioxidante, incrementando la biodisponibilidad de NO, efecto más marcado en anillos con endotelio y al parecer debido al grupo funcional sulfidrido (SH) dentro de su estructura química, que inactiva a los aniones superóxido (ROS). También se ha observado una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa, esta acción captadora del captopril se ha observado al inhibir la peroxidación lipídica.²¹

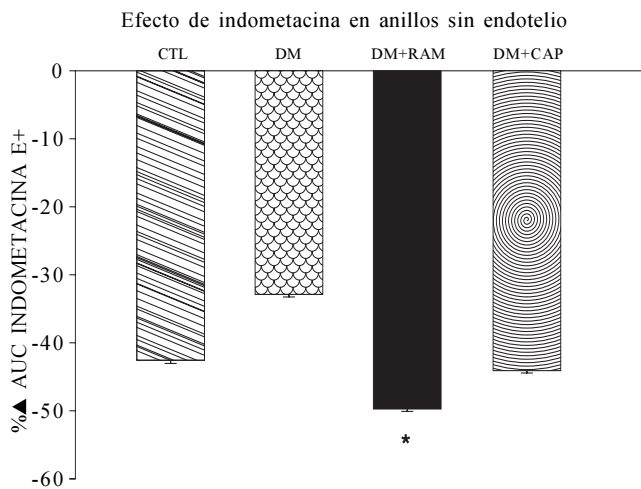
Por el contrario otros iECAS, entre ellos el ramipril, carecen de dicho grupo funcional, sin embargo, su efecto en reducir los radicales libres parece deberse principalmente a la estimulación de la síntesis y/o liberación de prostaciclina,²² este efecto también se ha observado en otros iECAS.

En el caso del grupo de animales diabéticos con vehículo en presencia de L-NAME, se observó una respuesta menor a la contracción, lo que evidencia una menor producción o efecto del NO en donde la función endotelial está dañada y el estrés oxidativo presente condiciona incremento de ROS, que reacciona con el escaso NO generado por las NOS formando los N = O-O⁻ (peroxinitritos) que no tienen efecto vasodilatador, y no tienen la capacidad para inhibir la activi-

Cuadro 4. Efecto de los prostanoideos, en la contracción y parámetros de las curvas concentración respuesta a PE

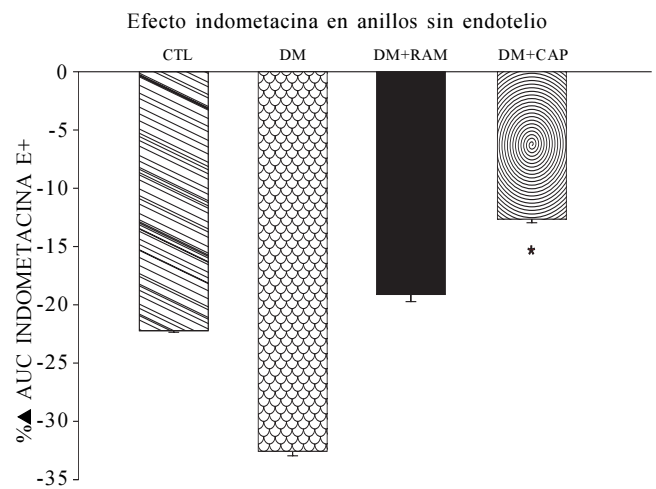
Antes de Indometacina	AUC Endotelio intacto	Sin endotelio	E _{max} (g) Endotelio intacto	Sin endotelio	pD ₂ Endotelio intacto	Sin endotelio
CTL	6.60 ± 0.97	8.26 ± 0.46	2.43 ± 0.17	3.08 ± 0.09	7.20 ± 0.27	7.77 ± 0.18
DM	8.71 ± 1.02	10.22 ± 1.30	3.24 ± 0.18	3.44 ± 0.49	7.58 ± 0.24	8.18 ± 0.13
RAM	8.34 ± 0.69	9.28 ± 0.84	2.84 ± 0.02	3.66 ± 0.29	7.75 ± 0.16	7.27 ± 0.10
CAP	7.15 ± 0.71	8.66 ± 0.36	2.57 ± 0.09	3.24 ± 0.25	7.15 ± 0.18	7.80 ± 0.13
Después de Indometacina						
CTL	3.94 ± 0.72* (p = 0.043) Δ% -42.33	6.57 ± 0.65* (p = 0.049) Δ% -21.83	2.09 ± 0.25 (p = 0.377) Δ% -13.99	2.80 ± 0.29* (p = 0.006) Δ% -9	6.90 ± 0.16 (p = 0.357) Δ% -4.16	7.12 ± 0.46 (p = 0.185) Δ% -8.36
DM	5.70 ± 0.65* (p = 0.013) Δ% -32.54	6.57 ± 0.64 (p = 0.077) Δ% -32.32	2.62 ± 0.18* (p = 0.013) Δ% -19.13	2.78 ± 0.47 (p = 0.133) Δ% -19.18	7.21 ± 0.23 (p = 0.216) Δ% -4.8	7.37 ± 0.16*** (p = <0.001) Δ% -9.90
RAM	4.29 ± 0.58*** (p = <0.001) Δ% -49.14	7.54 ± 0.86 (p = 0.169) Δ% -19.05	2.10 ± 0.24 (p = 0.006) Δ% -26.05	3.07 ± 0.34 (p = 0.216) Δ% -16.12	6.56 ± 0.09** (p = 0.003) Δ% -15.35	7.11 ± 0.15 (p = 0.381) Δ% -2.20
CAP	4.14 ± 0.71** (p = 0.005) Δ% -43.33	7.61 ± 0.55 (p = 0.052) Δ% -12.36	2.36 ± 0.13 (p = 0.090) Δ% -8.17	3.03 ± 0.24 (p = 0.536) Δ% -6.48	6.61 ± 0.20 (p = 0.064) Δ% -7.5	7.45 ± 0.16 (p = 0.093) Δ% -4.48

*** p < 0.001, ** p < 0.05, * p < 0.05. Efecto de los prostanoideos en anillos con y sin endotelio de animales de todos los grupos (CTL, DM, RAM y CAP), en condiciones previas y en presencia de Indometacina y sus parámetros de medición de la reactividad vascular a la estimulación de los receptores α₁ adrenérgicos, con las dosis concentración-respuesta a PE en Δ% después/antes de indometacina en: AUC, E_{max} y pD₂, utilizando prueba estadística t de Student.



* p < 0.05 entre DM vs. DM+RAM

Figura 8. Efectos de los prostanoideos en la reactividad contráctil a la estimulación α₁-adrenérgica en anillos de aorta con endotelio a las cuatro semanas, para los distintos grupos (CTL, DM, DM+RAM y DM+CAP). Se muestra el %Δ (incremento o decremento) de la relación AUC con Indometacina/AUC sin inhibidor. Las medias ± SEM de la contracción de las curvas de respuesta-concentración a PE.



p < 0.05 entre DM vs. DM+CAP

Figura 9. Efectos de los prostanoideos, en la reactividad contráctil a la estimulación α₁-adrenérgica en anillos de aorta sin endotelio a las cuatro semanas, para los distintos grupos (CTL, DM, DM+RAM y DM+CAP), se muestra el %Δ (incremento o decremento) de la relación AUC con Indometacina/AUC sin inhibidor. Las medias ± SEM de la contracción de las curvas respuesta-concentración a PE.

dad de la tromboxano sintasa. Este hecho es revertido con ambos fármacos aunque se observa mayor efecto con el captopril.

En el grupo de animales diabéticos tratados con RAM presentan una mayor inhibición de los eicosanoides contráctiles derivados de AA por vía COX a nivel endotelial; al parecer al inhibir la producción de angiotensina II, también se disminuye la expresión de las COX, sobretodo de la COX₂, esto a su vez disminuye la producción de eicosanoides, que producen vasoconstricción entre los que se encuentran los endoperóxidos cíclicos (PGH₂, PGG₂ y TXA₂ e incremento de la PGI₂).

Referencias

1. Maureen I. Diabetes in America: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Care* 1998; 21: C11-C14.
2. Fortes ZB, García JL, Scivoletto R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 771-81.
3. American Diabetes Association. Prevalence of diabetes mellitus in the USA. *Diabetes Care* 2000; 23(S1): 20-3.
4. García MJ, Mc Namara PM, Gordon T, Kannell WB. Morbidity and mortality in diabetes in the Framingham population. *Diabetes* 1974; 23: 105-11.
5. Abebe WH, MacLeod KM. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to α_1 adrenoreceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J Cardiovasc. Pharmacol* 1990; 16: 239-48.
6. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium-derived PGH₂/Tx₂. *Am J Physiol* 1989; 257: H1327-H1333.
7. Pieper GM, Gross GJP. Oxygen-derived free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1988; 255: H825-H833.
8. Chang KSK, Stevens WC. Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 983-90.
9. White RE, Carrier GO. Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin diabetes. *J. Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 1057-62.
10. Ohara T, Sussman KE, Draznin B. Effects of diabetic on cytosolic free Ca²⁺ and Na⁺/K⁺ ATPase in the aorta. *Diabetes* 1991; 40: 1560-3.
11. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
12. Hobbs AJ, Higgs, Moncada S. Inhibition of Nitric Oxide Synthase as a potential therapeutic Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 191-220.
13. Zoja C, et al. The renoprotective properties of angiotensin converting enzyme inhibitors in chronic model of membranous nephropathy are solely due to inhibition of angiotensin II. Evidence based on comparative studies with receptor antagonist. *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 254-64.
14. Romanosky AA, Blaties CM. Elevation of body temperature per se induces the late phase syndrome. In: *Temperature regulation recent physiological and pharmacological advances*. A.S. Milton Basel Birkhauser; 1994, p. 41-6.
15. Ibarra M, Pedraza J. Renina: estructura y regulación de la expresión del gen, biosíntesis y vías celulares de secreción. *Rev Inv Clin* 1993; 45: 255-66.
16. Lusaka I, Lusaka G, Changman. Role of AT₁ receptors and NAD(P)H Oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H2442-H2451.
17. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. *Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 2000; 355: 205-12. Issue 9199.
18. Ramipril, Rx-list. Monographs. Altace® Online. Description, Chemistry, Ingredients, 2004.
19. Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, Thomson H, Thorne SA, Powe AJ, Furuno T, Bull T, Deanfield JE. Effect of enalapril on endothelial function in young insulin-dependent diabetic patients: a randomized, double-blind study. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1330-5.
20. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
21. Mitra S, Singh M. Possible mechanism of captopril induced endothelium-dependent relaxation in isolated rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 1990; 47: 265-7.
22. Pi XJ, Chen X. Captopril and ramiprilat protect against free radical injury in isolated working rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21(12): 126-71.