



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"*

*EFEECTO DE LA NITROGLICERINA SOBRE
EL CONSUMO DE OXIGENO EN EL
MIOCARDIO AISLADO DE RATA*

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

presentan

Ma. del Carmen Esteban Valencia

Estherlinda Lozano Hernández

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA:

A Mitze: a su sonrisa.

A mis padres que siempre me han brindado su apoyo y ayuda.
Lo mejor.

A mis hermanos: Eve, Lucio, Martín, Alma, Jesús, Laura,-
Ma. Luisa y Eirén. Por sus cosas bonitas, cada uno tan
especial.

Porque seamos una familia unida por el Amor.

A Gloria, Maru, Ma. Luisa, a la Maestra Evangelina y a to-
dos mis demás amigos y amigas. Por haber compartido algo
de su vida conmigo.

A Carmen por no desistir.

A la Vida.....GRACIAS.

Estherlinda.

DEDICATORIA:

Esta Tesís la dedico a mi Madre:

Ma. Asunción Valencia M.

por su apoyo, consejos y sacrificios.

A mi nena:

Liliana Angelica

A mis hermanos:

Guadalupe

Emilia

Charly

Luis y

Mary

Con cariño:

A mis Maestros, Amigos y Compañeros.

Carmen.

A G R A D E C I M I E N T O S

Damos gracias a las siguientes personas que nos ayudaron y apoyaron en el desarrollo de la presente tesis: a la Q.F.B. Guadalupe Marín O. por su constante apoyo y colaboración, a la Q.F.B Camila Torres G. por las facilidades otorgadas en el Laboratorio, a los M. en C. Emma Gloria Ramos R., Beatríz Vázquez y Sergio González M. así como al I.B.Q. Abel Fuentes T. por las sugerencias hechas a este trabajo.

Finalmente hacemos un reconocimiento al Dr. Alberto-Rangel A. por su dirección y facilidades otorgadas - en el servicio de Hemodinamia en el Hospital de Especialidades de la Raza del I.M.S.S., donde se realizó este trabajo.

" I N D I C E "

INTRODUCCION	1
METABOLISMO DEL MIOCARDIO	1
FARMACOLOGIA DE LA NITROGLICERINA	4
ANTECEDENTES DEL EFECTO DE LA NITROGLICERINA SOBRE EL METABOLISMO CARDIACO	6
OBJETIVO	11
METODOLOGIA	12
CALIBRACION DEL RESPIROMETRO DE BARCROFT-WARBURG	12
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL TEJIDO	14
CUANTIFICACION DEL CONSUMO DE OXIGENO	17
ESTANDARIZACION DEL PROCEDIMIENTO	21
EL EFECTO DE LA NITROGLICERINA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO	23
RESULTADOS	27
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

EFEECTO DE LA NITROGLICERINA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO EN EL MIOCARDIO
AISLADO DE RATA

INTRODUCCION:

Murrell en 1879 dió a conocer sus estudios con nitroglicerina (NTG) sublingual y estableció que debido a su acción fisiológica probablemente serviría en el tratamiento de la angina de pecho. En la actualidad existen amplias aplicaciones clínicas de la NTG, entre las más importantes, ésta es utilizada para aliviar el dolor en el enfermo con angina de pecho, en estudios de cateterismo cardíaco y de la circulación coronaria por su efecto vasodilatador coronario. La NTG también relaja la musculatura lisa bronquial y traqueal y la vasculatura pulmonar. En general es relajante del músculo liso.

Debido a que el material biológico para este trabajo es el miocardio, es importante tener una visión general de las funciones metabólicas oxidativas del corazón.

A continuación se mencionan los principales sustratos utilizados por el corazón y su participación en el metabolismo cardíaco.

El corazón intacto extrae y utiliza una variedad de sustratos de la sangre de las coronarias como son: lactato, piruvato, glucosa, ácidos grasos y sus productos de oxidación parcial como el ácido B-hidroxiacético y el ácido acetoacético que le sirven como fuente de energía. Los ácidos grasos y sus subproductos pueden contribuir aproximadamente con el 80% de la energía requerida bajo condiciones de ayuno, en estas condiciones el corazón cambia su utilización "preferencial" de carbohidratos a casi exclusivamente

ácidos grasos. Los ácidos grasos presentes en el corazón son los no esterificados ligados a la albúmina y son transportados por el retículo sarcoplásmico al sarcoplasma, aquí se lleva a cabo el metabolismo de la glucosa donde la glucosa-6-fosfato es una llave metabólica que puede: 1.- Ser convertida a glucógeno que se almacena en forma de gránulos en condiciones normales y sus niveles son muy estables en estas condiciones. 2.- Experimentar oxidación directa por la vía de las hexosas monofosfato de Warburg y Dikens. 3.- Ser oxidada por la vía de Embden-Meyerhof, en la que la reacción terminal de la glucólisis no ocurre en condiciones normales ya que el miocardio es altamente aeróbico y no genera deuda de oxígeno.

El lactato y la glucosa son extraídos simultáneamente de la sangre de las coronarias y metabolizados, lo cual sugiere que la capacidad de las mitocondrias para el transporte electrónico excede a la proporción glucolítica.

Existe en el miocardio y otros tejidos un sistema para la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato que es el ciclo de Utter y Ochoa por medio del cual es posible que las reacciones de la glucólisis sean reversibles.

La fibra muscular cardíaca se caracteriza por presentar abundancia de sarcosomas debido a la gran cantidad de trabajo mecánico que desarrolla durante los procesos contráctiles. En los sarcosomas se lleva a cabo la oxidación del piruvato el cual en su mayoría proviene de la sangre de las coronarias y es convertido a acetil-CoA por medio del complejo multienzimático de la deshidrogenasa pirúvica para incorporarse al ciclo de Krebs.

También sucede aquí la oxidación del Acetil-CoA proveniente de los ácidos grasos (Olsson, 1962).

La oxidación de los ácidos grasos en el corazón bajo condiciones normales está controlada por cambios en el cociente acetil-CoA / CoA en la mitocondria y en el citosol, así, un aumento en el nivel de acetil-CoA en la matriz mitocondrial reduce el nivel de CoA disponible para la B-oxidación.

El incremento en la proporción de la fosforilación oxidativa - tiende a aumentar la actividad de la piruvato-deshidrogenasa por disminución de los cocientes NADH / NAD y acetil-CoA / CoA (Vary y col., 1981).

En lo que se refiere al oxígeno como sustrato, en el tejido normal la relación de la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno está estrictamente acoplada con la utilización del ATP. Se ha encontrado una estrecha relación lineal entre el desarrollo de la presión ventricular y el consumo de oxígeno miocárdico, el incremento en éste último está acompañado de un aumento en el flujo de la cadena transportadora de electrones, lo que provoca una disminución del cociente NADH / NAD mitocondrial, así, cuando el consumo de oxígeno se incrementa y la proporción de la oxidación del acetil-CoA por la vía del ciclo de Krebs, el flujo de la piruvato deshidrogenasa - tiende a aumentar para compensar el bajo cociente NADH / NAD (Vary y col., 1981).

La difusión de sustratos y gases está determinada por el sarcolema, una membrana delgada y bien definida que envuelve a la fibra muscular y provee una baja resistencia a la difusión de éstos.

El corazón muestra una amplia flexibilidad en la utilización - de sustratos sin cambios en su funcionamiento o capacidad de trabajo en condiciones normales (Olsson, 1962).

Por otro lado, los aspectos cualitativos o cuantitativos del

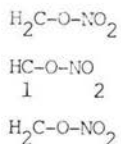
consumo de oxígeno en los organismos superiores varía entre las especies y está determinado en cada organismo principalmente por la edad, tamaño sexo, estado hormonal, dieta, temperatura, estación del año y actividad. La utilización del oxígeno para la oxidación de los nutrientes con su consecuente producción de energía, CO_2 y H_2O se lleva a cabo en los diversos procesos de la respiración celular, así, el metabolismo celular se expresa en términos de consumo de oxígeno y se denota como O_2 .

A continuación se mencionan los aspectos generales de la farmacología de la NTG por ser este el fármaco utilizado en el presente trabajo y posteriormente los antecedentes sobre su efecto en el metabolismo cardíaco.

La nitroglicerina ó trinitrato de glicerilo pertenece al grupo de los nitratos orgánicos que son ésteres poliólicos del ácido nítrico y presentan una secuencia de átomos $(-\text{C}-\text{O}-\text{NO}_2)$ y actúan en el organismo como relajantes del músculo liso.

Es importante tener en cuenta que la NTG es denominada erróneamente nitrocompuesto ya que éstos tienen una secuencia de átomos $(\text{C}-\text{NO}_2)$ y no tienen efecto relajante.

La estructura química de la NTG es la siguiente:



La eficacia de la acción de los nitratos orgánicos sobre el músculo liso (bronquial, del tracto biliar, del tracto gastro-intestinal , -

ureteral y uterino) se reproduce igualmente en las estructuras denervadas periféricamente y en órganos extirpados, estos nitratos reducen el tono de la musculatura lisa pero no alteran la capacidad de la fibra muscular para que ésta pueda contraerse al máximo en respuesta a estímulos adecuados (Goodman y Gilman, 1981, Shlevin, 1982).

El patrón cualitativo y cuantitativo de la biotransformación de la NTG es similar en humanos, conejos, ratas y perros. Se ha demostrado que biopsias frescas de hígado tienen la misma velocidad enzimática de denitración (Shlevin, 1982).

Estudios en diferentes sistemas indican que la hidrólisis reductora de la NTG requiere del glutathion y es catalizada rápidamente por la glutathion-nitrato orgánico reductasa. Una molécula de NTG reacciona con dos de glutathion reducido liberándose un ión nitrito inorgánico de la posición 2 ó 3 quedando 1, 3 ó 1, 2 gliceril dinitrato y glutathion oxidado. Posteriormente las moléculas de dinitrato son degradadas por el mismo sistema enzimático a 1 y 2 gliceril mononitrato, este último paso es en una proporción de 2 a 5%, de la primer degradación.

La acción relajante de los nitratos se manifiesta independientemente de su reducción a nitritos.

Se sabe desde hace muchos años que la NTG y otros nitratos de bajo peso molecular se absorben a través de la piel y membranas mucosas (Goodman y Gilman, 1981; Shlevin, 1982).

Como se mencionó anteriormente la NTG sublingual alivia el dolor cardíaco en el enfermo con angina de pecho, sin embargo, SE DESCONOCE el mecanismo exacto por el cual lo alivia.

La información bibliográfica acerca del efecto de la NTG en el

##...

organismo es muy amplia, aquí se hará incapié de su efecto en el metabolismo cardíaco.

Con los antecedentes que se mencionan a continuación se tiene un panorama general del efecto de la NTG sobre el metabolismo del corazón

Raab y Lepeschkin, 1950. En sus experimentos con gatos anestesiados encontraron que la NTG contrarresta el efecto cardio acelerador producido por la inyección de adrenalina, además, comprobaron su efecto relajante sobre la vasculatura coronaria y encontraron disminución significativa en el consumo de oxígeno.

Eckstein y col., 1951. En sus estudios acerca del efecto de la NTG en el corazón perfundido de perros anestesiados observaron que la NTG aún en grandes dosis no modifica el consumo de oxígeno miocárdico bajo estimulación adrenérgica (inyección de adrenalina), lo que contrapone el punto de vista de Raab.

Los autores concluyen que la NTG puede mejorar la oxigenación miocárdica por vasodilatación coronaria y que puede reducir los requerimientos de oxígeno miocárdico por una disminución en la resistencia vascular periférica (sin haber previa estimulación adrenérgica).

Krantz y col., 1951. En sus trabajos sobre metabolismo de aorta de rata, demostraron que la NTG disminuye el consumo de oxígeno del tejido arterial; proponen que los vasodilatadores de acción rápida del tipo de los nitratos y nitritos orgánicos disminuyen la acción de la adenin trifosfata

sa (ATPasa) en el tejido arterial y concluyen que la NTG interfiere rápidamente con la actividad de la ATPasa sobre el tejido arterial, sugieren que a través de la acción de este vasodilatador el ATP no es hidrolizado debido a la inhibición de la ATPasa. Consideraron que se a través de la - descomposición del ATP por esta enzima, el tono arterial se mantiene; una - droga que actúe relajando agudamente la arteria podría hacerlo interfiriendo con la actividad de la ATPasa.

West y Guzmán, 1959. En sus estudios acerca de la influencia de varios tipos de drogas sobre el tono arterial coronario por medio de técnicas selectivas de cateterismo cardíaco, observaron que la NTG tiene - efecto vasodilatador; encontraron que inmediatamente después de la administración de la NTG el grado de dilatación de los vasos coronarios era visible, sugirieron que la NTG tiene un efecto vasodilatador en las arterias que poseen una desarrollada capa muscular, e " indirectamente " disminuye el consumo - de oxígeno cardíaco.

Winbury y col., 1969. Examinaron los efectos de los nitratos orgánicos y otros vasodilatadores coronarios en arterias coronarias grandes y pequeñas en perros, mostraron que los nitratos como la NTG producen - vasodilatación prolongada sólo en arterias grandes y tienen un efecto vasodilatador transitorio pero significativo en arterias pequeñas.

Ganz y Marcus, 1972. En sus investigaciones en el uso de la NTG para aliviar la angina de pecho inducida en pacientes con enfermedad arterial coronaria, el efecto positivo de aliviar el dolor se atribuyó a dos posibles mecanismos: (1) a un aumento en el suministro sanguíneo miocárdico - por acción vasodilatadora directa de la droga sobre las arterias coronarias.

(2) a una reducción en la demanda de oxígeno miocárdico por acción de la droga sobre la circulación sistémica. Concluyeron que la reducción en la demanda de oxígeno miocárdico es el mecanismo básico por el cual la NTG alivia el dolor y no por un incremento en el suministro de oxígeno miocárdico.

Schaar y Sparks, 1972. Examinaron los efectos de la NTG sobre pequeñas y grandes arterias coronarias "in vitro" y confirmaron los trabajos de Winbury y col. Observaron que la NTG causó una mayor relajación en las arterias grandes que en las más pequeñas.

Andersson, 1973. En sus experimentos en músculo de colon de conejo encontró una correlación entre el grado de relajación y el incremento en el contenido de AMP cíclico por efecto de la NTG; al mismo tiempo disminuyó el contenido de ATP, esto no se observó en preparaciones pobres en calcio. Sugirió que el AMP cíclico y las drogas que aumenten su nivel pueden producir un efecto relajante estimulando un proceso de restricción del calcio y de este modo se reduce el calcio libre mioplásmico, aclara que éste mecanismo podría ser el responsable de la relajación del músculo liso.

Greenberg y col., 1975. En sus estudios sobre los efectos de la NTG en pacientes con enfermedad coronaria, sugirieron que la NTG altera favorablemente la relación entre las necesidades de oxígeno miocárdico y su demanda y que mejora la distribución de oxígeno en el tejido isquémico por aumento del flujo sanguíneo miocárdico total o por una redistribución del mismo.

Oei y col., 1978. En sus investigaciones sobre el efecto -

de la NTG sobre la circulación coronaria y el metabolismo cardíaco, aclaran las controversias acerca del efecto de esta droga y concluyen que la NTG - " in vivo " tiene un efecto bifásico; durante la primera fase incrementa el consumo de oxígeno cardíaco por aumento en el flujo sanguíneo coronario y durante la segunda fase el consumo de oxígeno decae al igual que el flujo sanguíneo coronario por abajo de los niveles control; de este modo en el organismo normal influye favorablemente en el balance entre la demanda de oxígeno del corazón y el flujo sanguíneo coronario.

Vatner y col., 1980. En sus experimentos acerca del efecto de la NTG sobre el diámetro de las grandes y pequeñas arterias coronarias - en perros concientes, observaron que la NTG provoca una respuesta bifásica; en la primera fase hay un aumento en el flujo sanguíneo coronario por reducción de la resistencia vascular coronaria, produciendo vasodilatación coronaria de las arterias menores, la que es transitoria y rápidamente reemplazada por un período sostenido de dilatación de los grandes vasos coronarios, este período corresponde a la segunda fase. Concluyeron que la NTG tiene una acción directa sobre las arterias coronarias relajando su musculatura.

Watkins y Davidson, 1980. En sus investigaciones sobre los procesos contráctiles en aorta aislada de conejo, concluyen que la NTG actúa disminuyendo la disponibilidad de los depósitos de calcio, principalmente cuando éste se libera de los sitios intracelulares, así como de los depósitos extracelulares.

Ignarro y col., 1981. Mencionan en estudios recientes que el GMP cíclico puede estar involucrado en la respuesta relajante del músculo -vascular liso a las drogas vasodilatadoras del tipo de la NTG, los autores reportan que la NTG reacciona con el grupo -SH de la cisteína para formar S-nitrocisteína (nitrosotiol) la cual es un compuesto inestable y a su vez un activador potente de la guanilato-ciclasa, esto provoca un incremento en los niveles de GMP cíclico en la arteria coronaria de bovino precontracta provocando su relajación.

Feldman y col., 1982. Mencionan que la vasodilatación no es igual en todo el árbol coronario por efecto de la NTG, es decir, que sucede principalmente en la circulación colateral provocada por isquemia en el miocardio.

Por los efectos de la NTG mencionados anteriormente se tiene -en claro que ésta actúa directamente sobre la musculatura de las arterias -coronarias grandes y pequeñas provocando su relajación o reducción de su tono muscular. La disminución de las resistencias vasculares produce vasodilatación periférica lo cual disminuye la post-carga y la tensión ventricular. La vasodilatación coronaria a su vez incrementa el riego sanguíneo y redistribuye el flujo; a partir de este efecto directo tiene lugar una -acción indirecta que es la disminución del trabajo cardíaco y por lo tanto del consumo de oxígeno en el corazón.

El mecanismo de acción de la NTG sobre el músculo liso se ha -atribuido principalmente a un incremento del AMP cíclico, del GMP cíclico,

a una disminución de la disponibilidad del calcio y a la inhibición de la - ATPasa.

La NTG actúa indirectamente disminuyendo el consumo de oxígeno del corazón.

En la revisión bibliográfica no se encontró evidencia de la acción directa de la NTG en el metabolismo del músculo cardíaco y por lo tanto en el consumo de oxígeno como expresión de éste.

O B J E T I V O

Evaluar experimentalmente el efecto de la NTG sobre el consumo de oxígeno ventricular "in vitro".

H I P O T E S I S

La NTG disminuye directamente el consumo de oxígeno en el músculo cardíaco.

Ayudada en los mecanismos de acción de la NTG sobre el músculo liso.

M E T O D O L O G I A

Para medir el consumo de oxígeno se utilizó la técnica manomé-

trica de Warburg descrita por él en 1920, por medio de ésta es posible medir la producción o consumo de un gas in vitro pudiéndose utilizar como material de estudio finos cortes de tejido u homogenizados, fracciones subcelulares o componentes aislados de sistemas enzimáticos en animales o vegetales. Si las preparaciones biológicas se mantienen en condiciones adecuadas es posible seguir en forma cuantitativa los procesos metabólicos durante varias horas (Hawk, Oser y Summerson, 1940). En este caso se utilizaron finos cortes de ventrículo.

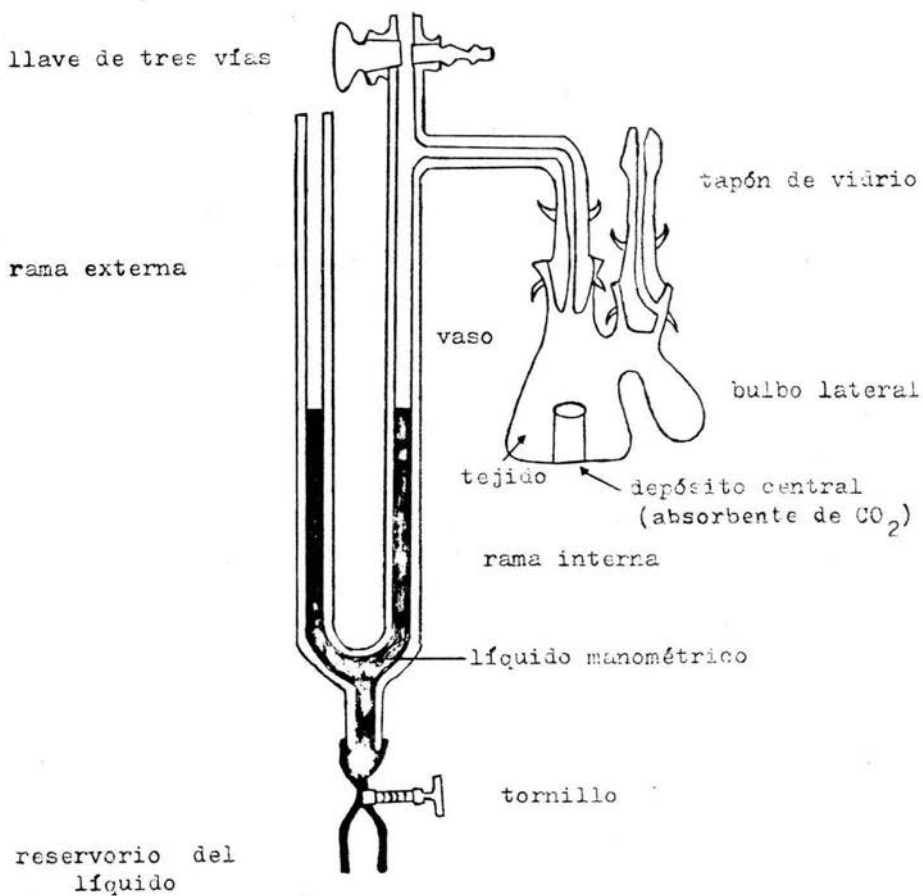
El instrumento base de esta técnica es el aparato - conocido como respirómetro de Barcroft-Warburg. El principio físico en el que se fundamenta es que "a temperatura y volúmen constante de un gas, los cambios en el volúmen de este gas pueden ser medidos por cambios en su presión" (ley de Boyle).

Existen varios tipos de respirómetros, el utilizado en este trabajo se muestra en la figura 1.

CALIBRACION DEL RESPIROMETRO DE BARCROFT-WARBURG.

Para utilizar esta técnica fué necesario calibrar - los respirómetros. La calibración puede realizarse por varios métodos; en este caso se hizo por los métodos del mercurio y del bicarbonato (Umbreit, Burris y Stauffer, 1945). El objetivo de la calibración es obtener el valor de la constante - de calibración K por medio de la cual es posible calcular el volúmen en microlitros (μ l.) de los cambios medidos en mm. en la columna manométrica, que son el resultado de la - utilización o liberación de un gas. Las unidades de la K - son: $l./mm.$

Fig. 1



RESPIROMETRO DE WARBURG

Los valores de la K obtenida por los métodos indicados para diferentes volúmenes, para oxígeno y a 37° C se muestran en la -
Tabla I.

El líquido manométrico utilizado fué el de Krebs (Krebs, 1951) su composición es la siguiente:

NaBr (anhidro)	44.0 gr.
tritón X-100	0.3 gr.
fucsina ácida	0.3 gr.(indicador)
agua destilada	1000 ml.

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL TEJIDO.-

Se utilizaron como especímenes biológicos ratas Long Evans - hembras adultas jóvenes con un peso de 220 20 gr., las que fueron sacrificadas por descerebración, el corazón fue extraído inmediatamente y colocado en solución Drebs - ringer - fosfato modificada - - (Webb y col., 1949) a una temperatura aproximada a 0° C con el - fin de evitar daño tisular por inadecuado suministro de oxígeno (La- ser, 1942; Fuhrman y Fiel, 1944) con un pH de 7.4 como en las condiciones fisiológicas, se separaron las aurículas y se trabajó - exclusivamente con ventrículo, éstos mediante un corte logitudinal - quedaban separados en dos fragmentos, cada uno se cortó por separado en forma de finos cortes transversales, al tiempo en que se hacían - los cortes en una fracción la otra se mantenía en la solución indica - da a 0° C. El tejido se cortó sobre una caja de Petri invertida - sumergida en hielo sobre la que se colocó un papel filtro humedecido con la

solución, esto con el fin de evitar que el tejido se moviera en el momento de estar realizando los cortes los que se hicieron con una navaja de afeitar a manos libres (Hawk, Oser y Summerson, 1949) en forma homogénea; el grosor de los cortes fué el permisible para trabajar en presencia de aire ambiente, Webb y col. demostraron que el grosor máximo debe ser 0.42 mm. de acuerdo con la ecuación de Warburg y que no hay diferencias significativas en el consumo de oxígeno en cortes de tejido con variación de 0.3 a 0.4 mm. de grosor, el cual es limitante para la velocidad de difusión de oxígeno. Conforme se hacían los cortes estos se colocaban en la solución, una vez cortado todo el tejido los cortes se secaron uno a uno con papel filtro Watman # 42 (Hawk, Oser y Summerson, 1949) para pesarse rápidamente en la balanza analítica -- con un vidrio de reloj tarado, los cortes se manipularon con pinzas entomológicas o pinzas de Adsson tratando de dañarlos lo menos posible. El tiempo de anoxia calculado desde que se secó y pesó el tejido no fue mayor de 2 min. los periodos de anoxia disminuyen de manera importante el CO_2 (Webb y col.- 1949). Se tomó como referencia un peso de 100 ± 10 mg. de tejido por cada vaso (Kratz y col., 1951 ; Webb y col., 1949 y Bernheim y Bernheim, 1944). Una vez cortado y secado todo el tejido se colocó en los vasos de Warburg - previamente preparados, la preparación consistió en :

a) .- Colocar cada vaso con su respectivo tapón de vidrio sellado con grasa, verificar que no hayan fugas de aire y fijarlos con bandas de hule.

b) .- Añadir en el compartimiento principal del vaso 2.5 ml. de la solución Krebs-ringer-fosfato modificada previamente oxigenada durante 10 min. burbujéandola con oxígeno al 98 % (Bernheim y Bernheim, 1944)

c) .- Colocar en el depósito central tubular del vaso un papel filtro doblado en forma de acordeón (para aumentar su superficie) quedando aproximadamente de 2 a 3 mm. fuera del depósito.

d) .- Una vez hecho lo anterior colocar los vasos en un recipiente con hielo para mantener la solución a baja temperatura.

e) .- Verificar que los manómetros estén listos para usarse es decir, que la llave de tres vías esté engrasada sin obstruir su comunicación - con la presión atmosférica, asegurándose que el líquido manométrico contenido en los capilares del manómetro llegue al punto de referencia (150 mm.)

Una vez colocado el tejido en el vaso y verificado lo anterior-se adicionaron 0.2 ml de KOH al 20 % impregnando bien el papel filtro con - el propósito de absorber el CO_2 producto de la respiración del tejido y poder registrar únicamente los cambios debidos al consumo de oxígeno (Webb y col.,1949). Es importante no colocar antes el KOH para que no se absorba el CO_2 del ambiente.

Se colocaron los vasos con sus respectivos manómetros con la - llave de tres vías abierta a la presión atmosférica, se sellaron con grasa y se sujetaron los vasos a los manómetros con bandas de hule.

Finalmente los respirómetros se introdujeron en el tanque con agua a una temperatura constante de 37°C regulada por un termostato. El tanque funciona como un baño maría en el que queda sumergido el vaso. Existe un sistema de agitación en el tanque que actúa sobre el vaso en forma horizontal a un ritmo ordinario de 110 oscilaciones por minuto y con un recorrido de 3 a 4 cm. para asegurar el equilibrio entre la fase líquida y gaseosa

Se utilizó aire ambiente como fase gaseosa en el respirómetro con el fin de tener un valor constante de la presión de oxígeno ya que existen va-

riaciones en la respiración a diferentes tensiones de oxígeno (Laser, 1942).

En tiempo de equilibrio fué de 15 min. en todos los casos (este es el tiempo necesario para que la solución contenida en los vasos alcance la temperatura del baño a la que se ha re realizar el experimento) durante este intervalo de tiempo estuvo funcionando el sistema de agitación.

CUANTIFICACION DEL CONSUMO DE OXIGENO.

Para hacer las mediciones concernientes al QO_2 después del tiempo de equilibrio se anotó la lectura inicial del menisco en la rama externa del manómetro y se cerró la llave de tres vías con lo que quedó constituido un sistema hermético en cada respirómetro.

En cada experimento se instaló un respirómetro que llevó a cabo la función de termobarómetro mediante el cual es posible corregir los cambios en la presión interna debidos a modificaciones en la temperatura del baño o a cambios en la presión en el laboratorio (Umbreit, Burris y Stauffer, 1945). El vaso del termobarómetro puede contener diferente volúmen de agua el cual no es crítico, sin embargo, para no introducir cambios se trabajó con el mismo volúmen que en los demás vasos. Debido a la gran sensibilidad del método a los cambios mencionados es necesario hacer las correcciones correspondientes indicadas por el termobarómetro.

Las lecturas en los manómetros se hicieron por intervalos de 10 min., durante 2 horas.

Por otro lado debido a que el QO_2 en muestras pequeñas se expresa en microlitros por miligramo de peso seco por unidad de tiempo fué necesario en cada experimento separar una muestra de tejido del mismo órgano que se utilizó para calcular el % de sólidos y obtener el peso seco, la cantidad de tejido que se utilizó para esto fué también de 100 ± 10 mg. Para secar el te-

jido se mantuvo durante 24 horas a 100°C.

El método que se siguió para cuantificar el CO_2 es el descrito por Umbreit denominado método total de consumo.

Para llevar a cabo este método es necesario construir una tabla para hacer las anotaciones correspondientes en cada muestra de tejido en donde se registran los siguientes datos:

- a).- Interválo de tiempo
- b).- Cambio en la lectura del termobarómetro (TB)
- c).- Lectura de los cambios observados en el respirómetro.
- d).- Cambio en mm. en el respirómetro
- e).- Corrección por el TB.
- f).- Cambio real en mm. (h).
- g).- consumo de oxígeno por intervalo de tiempo en μ l. (XO_2)
- h).- Valor acumulativo del XO_2
- i).- Valor de la K del respirómetro.

El consumo de oxígeno (XO_2) es igual al cambio real (h) multiplicado por la K , es decir: $XO_2 = h.K$

En el cuadro 1, se ejemplifica el método total de consumo con los datos de un experimento particular

A partir de los datos obtenidos en el cuadro I se calculó el consumo de oxígeno para esa muestra de tejido, a los 60 min., el XO_2 , fué de 10.12 μ l. Para estandarizar los resultados se tomó como valor fijo 100 mg. de peso seco, así, el CO_2 siempre se reportó en las siguientes unidades:

##...

μ l. de O_2 / 100 mg. de peso seco/ hora

La ecuación que se utilizó fué la siguiente:

$$QO_2 = X_{O_2} \times 60/t \times 100/\text{peso seco} \quad (1)$$

Donde:

X_{O_2} = microlitros de O_2 consumidos por el tejido

$60/t$ = relación entre unidad de tiempo y tiempo de experimentación.

$100/\text{peso seco}$ = relación para obtener 100 mg. de peso seco

Sustituyendo los valores correspondientes a este experimento:

$$QO_2 = 10.12 \mu\text{l.} \times 60/60 \text{ min.} \times 100/19.26$$

$$QO_2 = \underline{52.54 \mu\text{l./hora/100 mg. peso seco}}$$

C U A D R O I

METODO PARA CALCULAR EL CONSUMO DE OXIGENO							
tiempo	lectura del TB	lectura del replegómetro	cambio en mm. (resp)	corrección por el IB	cambio real en mm.	consumo de O ₂ (ML)	suma
0	150.0	149.5	0	0	0	0	0
10'	151.0	149.0	-0.5	1	1.5	2.76	2.76
20'	151.0	149.0	0	0	0	0	2.76
30'	152.0	149.0	0	1	1	1.84	4.60
40'	153.0	149.0	0	1	1	1.84	6.44
50'	135.5	148.5	-0.5	0.5	1	1.84	8.28
60'	154.5	148.5	0	1	1	1.84	10.12
70'	155.0	148.0	-0.5	0.5	1	1.84	11.96
80'	156.0	147.5	-0.5	1	1.5	2.76	14.72
90'	156.5	147.0	-0.5	0.5	1	1.84	16.56
100'	156.5	147.0	0	0	0	0	16.56
110'	157.0	146.5	-0.5	0.5	1	1.84	18.40
120'	158.0	145.5	-1	1	2	3.68	22.08
constante del sistema para oxígeno = 1.84 (volumen final 2,700 microlitros)							

ESTANDARIZACION DEL PROCEDIMIENTO.-

Para estandarizar el procedimiento se hicieron 20 experimentos con el objeto de familiarizarnos con el manejo de la técnica, eliminar al máximo errores en las mediciones y de controlar adecuadamente las variables que afectan el consumo de oxígeno. Los resultados no se incluyen por no tener una aplicación práctica posterior.

También se efectuaron otros experimentos en donde se demuestra la acción de la adrenalina sobre el QO_2 del corazón.

Para esto se hicieron 4 experimentos sin modificación en el método descrito. La adrenalina se adicionó durante la segunda hora en cada experimento, los valores obtenidos durante la primera hora sirvieron como control.

En la tabla II, se muestran los resultados, se observa un marcado incremento en el consumo de oxígeno provocado por la administración de adrenalina. En el experimento No. 4, se utilizó como fase gaseosa oxígeno al 98%, y en los primeros aire ambiente.

Como ya se sabe, el aumento en el consumo de oxígeno celular producido por la administración de catecolaminas es debido al incremento en la glucogenolisis cuyos niveles en condiciones de reposo son bajos normalmente. En la rata como en el hombre las catecolaminas aumentan la glucogenolisis en los músculos cardíaco y esquelético.

Una vez estandarizado el procedimiento se hicieron 15 experimentos en los que se midió el consumo de oxígeno durante 2 horas, con el fin de evaluar el comportamiento de el QO_2 en este tiempo. Se cuantificó

el $\dot{Q}O_2$ a los 60 min. y a los 120 min.

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla III.

Con estos valores se realizó una prueba de "t", por medio de la cual se comprobó que la variación en el $\dot{Q}O_2$ durante la primera y segunda hora no son significativas, lo que reafirma que el $\dot{Q}O_2$ puede permanecer constante por lo menos durante las dos primeras horas bajo condiciones adecuadas.

EL EFECTO DE LA NITROGLICERINA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO.-

Como se comprobó estadísticamente no existen diferencias significativas en el $\dot{Q}O_2$ durante la primera y segunda hora sin tratamiento, estos resultados apoyan el punto de vista de varios investigadores en cuanto a que el $\dot{Q}O_2$, puede permanecer constante durante varias horas en condiciones adecuadas. Esto sirvió como apoyo para considerar el $\dot{Q}O_2$ durante la primera hora como valor control, tomando en cuenta además, que el $\dot{Q}O_2$ varía de un organismo a otro e incluso puede variar de una muestra de tejido a otra.

Para determinar el efecto de la NTG sobre el $\dot{Q}O_2$, se añadió ésta inmediatamente después de transcurrida la primera hora.

Las concentraciones de NTG fueron:

1.47×10^{-3} M. 2.35×10^{-4} M. y 3.77×10^{-5} M. la primera y la última tomadas como referencia de la biliografía (Krants, y col. 1951), que estudiaron el efecto de la NTG sobre el $\dot{Q}O_2$ en aorta de rata.

##...

La segunda concentración fué un valor intermedio.

Se hicieron 19 determinaciones con 1.47×10^{-3} M, 16 con 2.35×10^{-4} M, y 18 con 3.77×10^{-5} M. Estas son las concentraciones finales de la NTG en el vaso.

No se hizo ninguna modificación el el método. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.

El análisis estadístico consistió en una prueba de comparaciones pareadas para cada una de las concentraciones de NTG.

Los resultados se muestran en la Tabla V.

Análisis estadístico de los valores obtenidos para el efecto de la NTG, sobre el consumo de oxígeno.

Comparaciones Pareadas:

Se realizaron tres series de experimentos en los que se midió el consumo de oxígeno durante la primera hora ; inmediatamente se adicionó a cada serie de experimentos NTG a diferentes concentraciones y se midió el consumo de oxígeno durante la segunda hora, los valores obtenidos durante la primera hora se tomaron como control.

El objetivo de este análisis es determinar si las diferencias observadas (disminución del $\dot{Q}O_2$) de los grupos experimental respecto a los grupos control son significativas.

a).- DATOS.- Los datos consisten en los valores de $\dot{Q}O_2$ en miocardio en muestras de tejido antes y después de la adi

ción de NTG: 19 muestras con 1.47×10^{-3} M, 16 con 2.35×10^{-4} M. y 18 con 3.77×10^{-5} M. (Ver Tabla IV).

b).- SUPOSICIONES.- Las diferencias observadas antes y después del tratamiento constituyen una muestra aleatoria de una población normalmente distribuida de diferencias que pudieron generarse bajo las mismas circunstancias.

c).- HIPOTESIS.- La hipótesis nula a probarse es que $\mu_2 - \mu_1 = 0$. Sí $\mu_d = \mu_2 - \mu_1$ entonces:

$$H_0: \mu_d = 0$$

$$H_a: \mu_d < 0$$

d).- ESTADISTICA DE PRUEBA.- Dadas las suposiciones la estadística de prueba apropiada es:

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_{\bar{d}}}$$

e).- DISTRIBUCION DE LA ESTADISTICA DE PRUEBA.- Si la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba se distribuye con $n - 1$ grados de libertad.

f).- REGLA DE DECISION.- Sea $\alpha = 0.01$ el valor crítico de t^* es:

Para 1.47×10^{-3} M.

$$\alpha = 0.01 \quad -2.552$$

Para 2.35×10^{-4} M.

$$\alpha = 0.01 \quad -2.602$$

Para 3.77×10^{-5} M.

$$\alpha = 0.01 \quad - 2.567$$

Se rechaza H_0 si el valor calculada de t es menor que el -
valor crítico (consultado en Tablas).

g).- ESTADISTICA DE PRUEBA CALCULADA:

Para 1.47×10^{-3} M.

$$t = \frac{-20.57 - 0}{\sqrt{96.82/19}} = \frac{-20.57}{2.257} = \underline{\underline{-9.11}}$$

Para 2.35×10^{-4} M.

$$t = \frac{-18.47 - 0}{\sqrt{108.38/16}} = \frac{-18.47}{2.60} = \underline{\underline{-7.10}}$$

Para 3.77×10^{-5} M.

$$t = \frac{-21.45 - 0}{\sqrt{114.96/18}} = \frac{-21.45}{2.52} = \underline{\underline{-8.51}}$$

h).- DECISION ESTADISTICA.- Se rechaza H_0 ya que -9.11 , -7.10 y -8.51 están en la región de rechazo, es decir, son menores que los valores críticos de " t ".

g).- DECISION EXPERIMENTAL.- Puede concluirse que la disminución en el CO_2 al adicionar NTG es debida al efecto de ésta.

Se puede construir un intervalo de confianza del 99 por ciento utilizando la siguiente ecuación:

$$\bar{d} \pm t (1 - \alpha/2) s\bar{d}$$

###...

Los resultados se presentan en la Tabla V.

R E S U L T A D O S . -

A continuación se mencionan los resultados obtenidos en este -
trabajo:

-La densidad del líquido manométrico se determinó con un densitómetro -
obteniéndose un valor de 1.027 gr./ml. a 22°C.

-Los valores de las constantes de calibración para oxígeno en 17 respiró-
metros calculadas por los métodos del mercurio y del bicarbonato para 6 di-
ferentes volúmenes finales se muestran en la Tabla I.

-Los resultados del efecto de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno se
muestran en la Tabla II.

- Se hicieron 15 experimentos en donde se cuantificó el consumo de oxígeno
durante dos horas con el propósito de conocer su comportamiento durante es-
te tiempo. Los valores se presentan en la Tabla III.

- Los valores del consumo de oxígeno antes y después de la adición de NTG,
se muestran en la Tabla IV.

- Los resultados del efecto de la NTG sobre el consumo de oxígeno en el mio-
cardio se muestran en la Tabla V y en la gráfica I.

###...

T A B L A I

CONSTANTES DE CALIBRACION PARA OXIGENO ($K_{O_2} = \mu\text{l/cm.}$)						
VF (μl) RESP.	2,000	2,200	2,500	2,700	2,800	3,000
I	1.81	1.79	1.77	1.75	1.74	1.73
I'	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	1.91
II	1.83	1.81	1.58	1.57	1.56	1.55
III	1.86	1.34	1.82	1.80	1.79	1.78
IV	1.79	1.77	1.75	1.73	1.72	1.71
V	1.58	1.56	1.54	1.53	1.52	1.51
VI	1.67	1.65	1.63	1.61	1.60	1.60
VII	1.91	1.88	1.86	1.84	1.83	1.82
VIII	1.77	1.75	1.72	1.71	1.70	1.69
IX	1.66	1.64	1.61	1.60	1.59	1.58
X	1.71	1.69	1.67	1.65	1.64	1.63
XI	1.77	1.75	1.72	1.70	1.69	1.68
XII	1.64	1.62	1.59	1.58	1.57	1.56
XIII	1.52	1.50	1.48	1.47	1.46	1.45
XIV	1.38	1.36	1.34	1.33	1.32	1.31
XV	1.24	1.23	1.21	1.20	1.19	1.18
XVI	1.39	1.37	1.35	1.34	1.33	1.33

Se calculó la K a una temperatura de 37°C .

VF = volúmen final.

T A B L A 11

EFECTO DE LA ADRINALINA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO (μ l./100mg. peso seco/hr.)		
muestra #	1a. hora (control)	2a. hora con adrenalina
1	64.53	414.40
2	46.69	300.39
3	83.17	250.40
4 [*]	422.81	686.20

cada muestra de tejido correspondió a un organismo diferente.

* ver texto.

T A B L A # III

CO ₂ (μl./100 mg. peso seco/hr.)		
EN VENTRICULO DE CORAZON DE -		
RATA A LA 1a. y 2a. HORA		
muestra #	1a. hora	2a. hora
1	55.40	55.40
2	62.07	45.05
3	51.62	51.62
4	29.70	29.70
5	75.21	75.21
6	52.54	62.09
7	67.42	61.25
8	45.05	45.05
9	56.16	56.16
10	40.92	35.86
11	55.30	62.81
12	43.04	46.62
13	94.52	85.92
14	131.20	124.99
15	45.47	45.47
\bar{X}	60.24	58.88
S	24.97	23.25

T A B L A IV

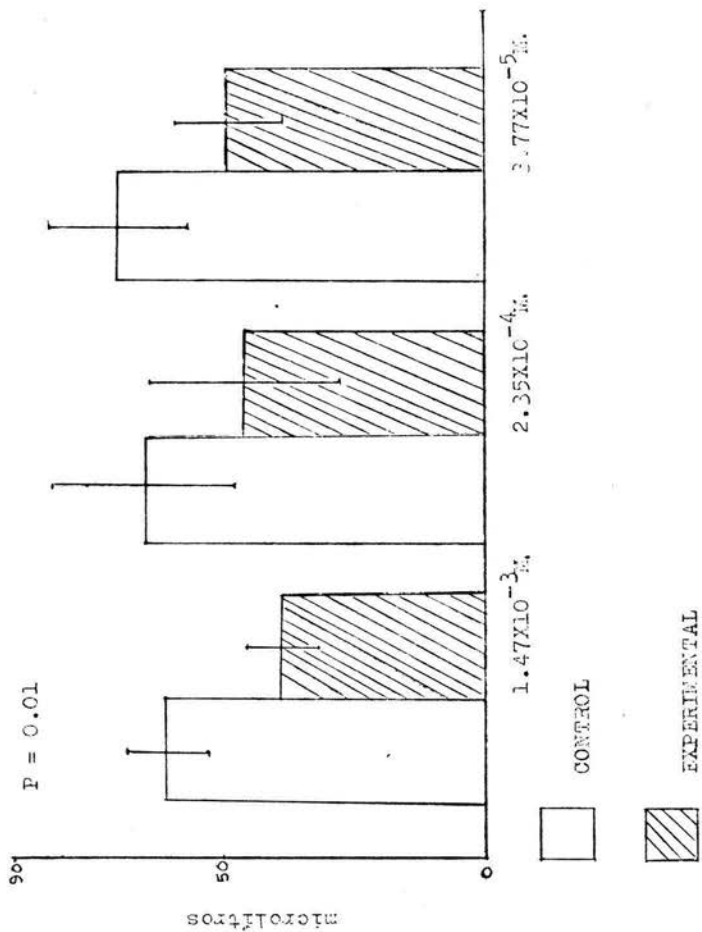
VALORES DE $\dot{Q}O_2$ IN VITRO EN MIOCARDIO DE RATA ANTES Y DESPUES DE ADICION DE NTG						
CONSUMO DE OXIGENO ($Ml./100 \text{ mg./peso seco}$)						
Muestra #	Control	Con NTG $3 \cdot 10^{-4} M.$	Control	Con NTG $4 \cdot 10^{-4} M.$	Control	Con NTG $5 \cdot 10^{-4} M.$
	antes (M_1)	despues (M_2)	antes (M_1)	despues (M_2)	antes (M_1)	despues (M_2)
1	70.10	60.61	101.94	101.94	58.52	43.89
2	56.73	51.43	90.07	77.20	49.84	42.72
3	51.51	35.27	95.63	60.80	54.43	30.22
4	52.95	36.20	97.52	81.27	49.68	37.26
5	63.46	46.04	90.55	62.68	75.02	46.84
6	79.46	48.41	74.71	45.98	71.11	44.44
7	71.27	48.80	69.38	46.28	67.30	44.89
8	68.55	33.81	58.59	36.62	59.53	29.76
9	72.46	38.16	43.98	25.20	72.83	63.67
10	81.23	50.15	42.93	24.55	60.64	51.97
11	74.66	53.76	37.61	25.07	65.85	29.29
12	52.81	45.70	44.06	36.68	53.59	40.19
13	57.04	39.38	42.79	28.52	47.33	40.57
14	68.91	34.02	46.00	17.21	108.74	81.55
15	62.72	33.81	47.62	17.82	104.09	72.81
16	43.53	21.50	50.07	50.07	89.41	59.61
17	49.42	27.93			92.29	50.37
18	36.56	24.06			88.52	72.47
19	36.58	30.08				

T A B L A V

RESULTADOS DE QO_2 IN VITRO (μ I/100 mg. peso seco/hr.) EN MIOCARDIO DE RATA ANTES Y DESPUES DE LA ADICION DE NITROGLICERINA		
	CONTROL	EXPERIMENTAL
Dosis de NTG	- - -	1.47×10^{-3} M.
No. de Exp.	19	19
\bar{X}	60.52 ± 8.89	39.90 ± 7.05
Diferencia (\bar{d})		20.57 ± 6.49
P	0.01	0.01
Dosis de NTG	- - -	2.35×10^{-4} M.
No. de Exp.	16	16
\bar{X}	64.59 ± 17.29	46.11 ± 18.35
Diferencia (\bar{d})		18.47 ± 7.66
P	0.01	0.01
Dosis de NTG	- - -	3.77×10^{-5} M.
No. de Exp.	18	18
\bar{X}	70.48 ± 12.92	49.02 ± 10.49
Diferencia (\bar{d})		21.45 ± 7.30
P	0.01	0.01

G R A F I C A 1

CONSUMO DE OXIGENO IN VITRO ($\mu\text{l.}/100 \text{ mg. peso seco/hr.}$) EN EL MIOCARDIO DE RATA ANTES Y DESPUES DE LA ADICION DE NITROGLICERINA.



D I S C U S I O N . -

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de hemodinamia del Hospital de la Raza, donde se hacen estudios a pacientes con afecciones cardiopulmonares, en algunos casos se utiliza la nitroglicerina como vasodilatador coronario, de ahí surgió la necesidad de realizar esta investigación.

Para determinar el consumo de oxígeno in vitro sólo se contaba con el respirómetro que se mencionó, consideramos que con este aparato se podría alcanzar el objetivo de nuestro trabajo. La técnica manométrica de Warburg ha sido de gran aplicación en el estudio de diferentes rutas metabólicas.

El miocardio en el tipo de preparaciones que se utilizaron está libre de carga y tensión que son factores propios del metabolismo cardíaco que provocan cambios en el consumo de oxígeno y que no pueden controlarse en el organismo in vivo.

Incluimos en el trabajo la calibración de los respirómetros ya que estos no se encontraban calibrados y esto ocupó gran parte de nuestro trabajo y es parte de la metodología.

Por otra parte, se seleccionó el líquido manométrico de Krebs, entre varios, se utilizó previamente el de Brodie sin resultados satisfactorios. El líquido de Krebs por contener triton X-100 abate la tensión superficial del agua por lo que tiene mayor fluidez, además, no provoca precipitados, turbidez, viscosidad, no es volátil ni corrosivo y es más económico.

Para realizar los cortes de tejido se probó primera-

mente el cortador de Sketch descrito por Thomas y De Eds, sin embargo, no fué posible obtener cortes homogéneos, también se hicieron cortes por microtomo congelando previamente el tejido pero el grosor de éstos fué siempre menor al indicado en la bibliografía.

Las determinaciones del efecto de la adrenalina sobre el consumo de oxígeno en el corazón se hicieron como parte de la estandarización del procedimiento y para aumentar la seguridad en el método, sus resultados e interpretación ya han sido estudiados y discutidos con amplitud en la literatura médica. Esto se comprobó experimentalmente.

Se sugiere que utilizando el mismo método se investigue más acerca de la acción de la NTG, como podría ser el efecto antiadrenérgico en el miocardio, en cuanto a su efecto sobre el consumo de oxígeno se investigue la relación dosis/respuesta.

El método ofrece un campo muy amplio en la investigación en su aplicación en las ciencias biomédicas, ya que éste sigue vigente con adaptaciones nuevas como en el caso del sistema automatizado mediante la adaptación de una microcomputadora que mide el QO_2 in vitro a través de un sistema fotodetector infrarrojo sensitivo a los cambios manométricos en la reacción del vaso, además calcula la velocidad de respiración (Johnson y col., 1982). Otra de las aplicaciones es en los estudios actuales acerca de los factores que provocan el crecimiento de tumores cancerígenos mediante la reconstrucción de rutas meta-

bólicas para una futura reconstitución del efecto Warburg para aclarar como el RNA o DNA tumoral induce cambios bioquímicos - que toman lugar en la célula normal transformándola (Racker, - 1983).

Edmiston y col. en 1985 usan el respirómetro de - Warburg para evaluar la toxicidad de tres pesticidas del car - bamato en Paramecium multimicronucleatum que inhiben en dife - rentes grados al consumo de oxígeno.

También mediante la técnica manométrica de Warburg se ha estudiado la actividad antimicótica de varios fármacos con el fin de obtener resultados terapéuticos óptimos en el trata - miento de micosis en humano (Raab y Holg, 1980 y 1981).

C O N C L U S I O N E S . -

Se comprobó el efecto directo de la nitroglicerina sobre el consumo de oxígeno en el músculo cardíaco in vitro.

Al adicionar diferentes concentraciones de nitroglicerina a las preparaciones de músculo cardíaco (ventrículo) se observó una disminución en el consumo de oxígeno y mediante el análisis estadístico de comparaciones pareadas se comprobó que la disminución en el QO_2 de los grupos experimentales con respecto a su control es significativa; por lo que los cambios medidos en el consumo de oxígeno al aplicar las diferentes con centraciones de nitroglicerina no son debidos al azar como pue den ser las variaciones en el consumo de oxígeno "per se", la pureza del fármaco y los errores estocásticos.

Por otro lado, también se puede considerar a los grupos control como uno solo, ya que los tres grupos son muy - homogéneos (esto se observó al construir los interválos de con fianza en cada grupo control) y se puede decir que las tres con centraciones de NTG producen una disminución cuantitativamente igual (esta información se obtuvo a partir de los interválos - de confianza para cada grupo experimental) con respecto al gru po control único.

Se concluye que:

La nitroglicerina actúa sobre el miocardio produ-

ciendo un efecto depresor directo sobre el consumo de oxígeno; los resultados de esta investigación demuestran que la NTG a nivel tisular actúa así. Esto puede contribuir a reducir las necesidades de oxígeno del corazón.

B I B L I O G R A F I A

ANDERSSON, R. Cyclic AMP as a mediator of the relaxing action of papaverina, nitroglycerine, diazoxide and hydralazine in intestinal and vascular smooth muscle. Acta Pharmacol. et Toxicol. 32(5): 321-336, 1973.

BERNHEIM, F. BERNHEIM. M.L.C. The effect of various conditions on the respiration of rat muscle in vitro. Am. J. Physiol. 142: 195-199, 1944.

ECKSTEIN, R.W., NEWBERRY, W.B. Mc EACHEN, J.A. and SMITH, G. Studies of the antidrenergic effects of nitroglycerin on the dog heart. Circulation . 4: 534-540, 1951.

EDMISTON, C.E. Jr. GOHEEN, M. MALANEY, G.W. MILLS, W.L.- Evaluation of carbamate toxicity: acute toxicity in a culture of Paramecium multimicronucleatum upon exposure to aldicarb, carbaryl, and mexacarbate as measured by Warburg respirometry and acute plate assay. Environ.Res. 36(2) : 338-350, 1985.

FELDMAN, R. L. MARX, J.D. PEPINE, C.J. and CONTI, C.R. Analysis of coronary responses to various doses of intracoronary nitroglycerin. Circulation. 66 : 321-326, 1982.

FUHRMAN, F. A. and FIELD, J. 2nd. The use low environmental temperature during the preparation of tissue slices for respiration studies in vitro. Biol. Chem. 153 : 515-520, 1944.

GANZ, W. and MARCUS, U. S. Failure of intracoronary nitroglycerin to alleviate pacing-induced angina. Circulation 46 : 880-889, 1972.

GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. The pharmacological basis of Therapeutics (6a. ed) New York, N.Y. E.U.A. The Macmillan Co., 1980. p.p. 819-831.

GREENBERG, H. DWYER, M.E. JAMESON, G. A. and PINKERNELL, H. B. Effects of nitroglycerin on the major determinants of myocardial oxygen consumption. Am. J. Cardiol. 36(4) : 426-432, 1975.

HAWK, P. B. OSER, B.L. and SUMMERSON, W.H. Practical physiological chemistry (12 a. ed.) Philadelphia and Toronto: Blakiston Co., 1949. p.p. 271-284.

IGNARRO, L. J. LIPPTON, H. EDWARDS, J. C. BARICOS, W. H. HYMAN, A. L. KADOWITZ, P.J. and GROETER, C. A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, ni-

##...

trites, nitropruside and nitric oxide: evidence for invol -
vement of nitrosothiols as active intermediates. J. Pharm. -
Exp. Ther. 218 (3) : 739-749, 1981.

JOHNSON, T. A. MERCER, R. R. TAYLOR, P.C. -
GRAHAM, J. A. and O' NEIL, J.J. Oxygen consumption measu -
red with microcomputer assisted Warburg manometry. J.Appl .
Physiol . 53 (3) : 1634-1637, 1982.

KRANTZ, J. C. Jr. CARR, J.C. and KNAPP, M.J.
Alkil nitrites. XV. The effect of nitrites and nitrates on
oxygen uptake of arterial tissue. J.Pahrmacol. Exp. Ther. 102;
250-260,1951.

KREBS, H. A. Improved manometric fluid. Biochem
J. 48: 240;241 1951.

LASER, H.A. A critical analysis of the tissue -
slice method inmanometric experiments. Effect of variations -
in O_2 and CO_2 tension. Biochem. J. 36 : 319-335, 1942.
2 2

DEI, H. H. HALE, T. H. KOPJAS, T. C. and WEGRIA,
R. Effect of nitroglycerin on coronary circulation and cardiac
metabolism. Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 235 (2) : 317-327,
1978.

OLSSON, R. E. Physiology of cardiac muscle. In:

##...

Handbook of Physiology, section 2 circulation, Washington D.C. edited by W. F. Hamilton, & P. Dow, 1962, pp. 199-235, vol. 1.

RAAB, W. and LEPESCHKIN, E. Antiadrenergic - effects of nitroglycerin on the heart. Circulation 1 : part. II (4) ; 733-740, 1950.

RAAB, W. and HOLG, F. The activity of imidazole derivatives in the presence of human plasma. (autor's transl.) Z. Hautkr. 56 (13) : 843-846, 1981.

RAAB, W. and HOLG, F. Interactions between - amphotericin B and hydroxytetracycline. (Autor's transl.) Z.Hautkr. 55 (17); 162-171. 1980.

RACKER, E. Resolution and reconstitution of biological pathways from 1919 to 1984. Fed. Proc. 42 (12) : 2899-2909, 1983.

SCHAAR, R. L. and SPARKS, H. V. Response of - large and small coronary arteries to nitroglycerin, NaNO_2 and adenosine. Am. J. Physiol. 223 (1) : 223-228, 1972.

SHLEVIN, H. H. Animal pharmacology of nitroglycerin. Life Sci. 12,30 (15) : 1233-1246, 1982.

THOMAS, O. J. and DE EDS, F. S. Cientific apparatus and laboratory methods: uniform tissue sections for Warburg technique. Sci. 86 : 2221-2222, 1937.

UMBREIT, W.W. BURRIS, R. and STAUFFER, F. J. - Manometric Techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Mineapolis, Burges Publishing Co., 1945.

VARY, C. T. REIBEL, K. D. and NEELY, R. J. Control of metabolism of heart muscle. Ann. Rev. Physiol. 43: 419-430, 1981.

VATNER, S. F. PAGANI, M. MANDERS, V. T. and PASIPOULARIDES, A. D. Alpha adrenergic vasoconstriction and nitroglycerin vasodilation of large coronary arteries in the conscious dog. J. Clin. Invest. 65 : 5-14, 1980.

WATKINS, R. W. and DAVIDSON, I. W. F. Comparative effects of nitroprusside and nitroglycerin; actions on phasic and tonic components of arterial smooth muscle contraction. - Europ. J. Pharmacol. 62 : 191-200, 1980.

WAYNE, W. D. Bioestadística: Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. (1a. ed.) México: limusa, - 1977.

WEEB, L. J. SAUNDERS, R. P. and THIENES, H. C.

The metabolism of the heart in relation to drug action. 1.
The endogenous aerobic metabolism of rat heart slices. Arch.
Biochem. 22 : 444-450, 1949.

WEST, J. W. and GUZMAN, S. V. Coronary dila -

tation and contraction visualized by selective arteriography.
Circulation Res. 7 : 527-536, 1959.

WIMBURY, M. M. HOWE, B. B. and HEFNER, M.A. -

Effect of nitrates and other coronary dilators on large and -
small coronary vasseles: an hypotesis for the mechanism of
action of nitrates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 168 : 70-95,
1969.