



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“PAPEL DEL OXIDO NITRICO EN EL INFARTO DEL  
MIOCARDIO EXPERIMENTAL INDUCIDO CON  
ISOPROTERENOL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
ESPECIALIDAD: BIOLOGÍA CELULAR**

**P R E S E N T A :  
LUCÍA YÁÑEZ MALDONADO**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

ENERO 2009



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y con el financiamiento a los proyectos auspiciado por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del donativo número 5032-M9406, 3944-PM9607 Y 30979-M

Durante la realización del proyecto de tesis, el comité tutorial estuvo integrado por Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. Jorge Suárez Murguía quienes siempre proporcionaron sus valiosas correcciones y sugerencias, así como sus comentarios para el buen desarrollo de trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por crearme y por todo lo que me dá.

Agradezco a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado sus instalaciones y más aún, sus profesores e investigadores del más alto nivel que me transmitieron sus conocimientos y experiencia para mi formación.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca que me otorgó, para el estudio de la Maestría.

A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por su apoyo y dirección en la realización de esta tesis.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz miembro de mi comité tutorial por sus valiosos consejos y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Suárez Munguía por su disposición en el desarrollo de este proyecto y así como su asesoría al ser miembro de mi comité tutorial.

A los miembros del jurado: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dra. Verónica Guarner Lans, Dr. Jorge Suárez Murguía y Dra. Selva Rivas Arancibia, por la corrección de este manuscrito.

A la Mtra. en Ciencias Lidia Martínez Pérez por su asesoría en la realización de los Western blots realizados para este proyecto.

Al Dr. Armando Aranda quien realizó los estudios histológicos de los corazones de rata.

Al Mtro. en Ciencias Juan Carlos Torres Narváez por su ayuda al realizar la determinación de óxido nítrico en perfusados de corazón.

Al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo por su asesoría en el trabajo de cómputo.

A la Srita. Rosario Villaseñor por su auxilio en el trabajo secretarial cuando elaboré este manuscrito.

A todos mis compañeros y amigos del IFC por su consuelo y apoyo moral cuando lo necesité y sobre todo por su amistad.

Dedico esta Tesis:

A la memoria de mi madre, por todo lo que fue en mi vida.

y a mi hermana, por ser mi médico de cabecera, mi amiga, mi confidente, mi camarada y aún más por su cariño y amor de hermana.

## Indice

Abreviaturas	4
Resumen	5
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>6</b>
I.A. GENERALIDADES	6
I.A.1. Sistema cardiovascular	6
a) El corazón	6
b) Los vasos sanguíneos	8
El endotelio	8
El tejido muscular liso	8
Matriz celular	9
I.A.2. El infarto del miocardio	10
I.A.3. El isoproterenol	12
I.A.4. El óxido nítrico	14
Descubrimiento del NO. Historia de los vasodilatadores. EDRF.	14
Óxido nítrico. Molécula reguladora o molécula dañina.	15
I.A.5. Óxido nítrico sintasa (NOS)	19
a) Neural (NOS <sub>n</sub> o NOS <sub>1</sub> )	20
b) Endotelial (NOS <sub>e</sub> o NOS <sub>3</sub> )	22
c) Inducible (NOS <sub>i</sub> o NOS <sub>2</sub> )	22
I.B. ANTECEDENTES	25
I.C. HIPÓTESIS	26
I.D. OBJETIVOS	26
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
II.1. Tratamiento de animales	27
II.A. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS	27
II.A.1. Parámetros hemodinámicos, electrocardiograma (ECG) y temperatura corporal.	27
II.B. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	27
II.C. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	28
II.C.1 Cuantificación de las enzimas de escape en el infarto del miocardio	28
II.C.2. Cuantificación de nitritos y nitratos	28
II.C.3. Óxido nítrico en perfusados de corazón	28
II.C.4. Cuantificación de las enzimas NOS <sub>e</sub> y NOS <sub>i</sub>	28
II.C.5. Actividad enzimática de NOS <sub>e</sub> y NOS <sub>i</sub>	29
II.C.6. Determinación de NADPH	29
II.C.7. Determinación de GMP <sub>c</sub>	30

II.D. Análisis de Datos	30
<b>III. RESULTADOS</b>	31
III.A. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS	31
III.A.1. Efecto de L-NAME sobre los cambios de presión arterial y frecuencia cardiaca inducidos por ISO.	31
III.A.2. Dosis-Respuesta del efecto de L-NAME sobre los cambios de presión Arterial inducidos por ISO.	31
III.A.3. Efecto de L-NAME en la duración de los cambios en la presión sistólica inducidos por ISO .	31
III.B. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	32
III.C. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	32
III.C.1. Cuantificación de las enzimas de escape en el infarto del miocardio	32
III.C.2. Nitritos + nitratos	32
III.C.3. Óxido nítrico generado en corazones perfundidos	33
III.C.4. Óxido nítrico sintasa (NOS)	33
NOS <sub>c</sub> Actividad enzimática	33
Cantidad de enzima	33
NOS <sub>i</sub> Actividad enzimática	34
Cantidad de enzima	34
III.C.5. Determinación de NADPH	34
III.C.6. Cuantificación de los niveles de GMP cíclico	34
<b>IV. DISCUSION</b>	49
<b>V. CONCLUSIONES</b>	52
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	53

## RESUMEN

Actualmente el infarto del miocardio es una de las principales causas de muerte, por ello es importante conocer los mecanismos por los cuales ocurre este fenómeno, y así poder prevenirlo o establecer tratamiento y corregir los daños que se generan; de aquí la necesidad de tener un modelo experimental y realizar investigaciones al respecto. Por otro lado, la cardiotoxicidad producida por la administración del  $\beta$ -agonista isoproterenol (ISO), se ha considerado como un modelo de infarto al miocardio experimental en ratas, sin embargo al no existir ningún acuerdo en las condiciones experimentales Chagoya y cols. (1997) se dieron a la tarea de caracterizar este modelo histológica, fisiológica y bioquímicamente; siendo estas condiciones las usadas en este trabajo. La dosis de ISO administrada a nuestros animales les permite una sobrevivencia de 100 % por lo menos durante las primeras 96 horas, distinguiéndose una etapa de preinfarto que abarca desde el momento de la inyección del ISO hasta las 12 h, un periodo de infarto de las 12 a 24 h y un periodo de postinfarto entre las 24 y las 96 h. Todos los animales presentan una lesión semejante al infarto en la región apical del ventrículo derecho. Uno de los primeros eventos observados después del tratamiento con ISO es un aumento de la frecuencia cardiaca acompañado por una caída en la presión arterial. Conociendo el papel de óxido nítrico (NO) generado en el endotelio vascular regulando el flujo sanguíneo y la presión arterial, se estudió su papel en este modelo de infarto experimental.

**Métodos.-** Se usaron ratas macho de 300 g de peso a los que se inyectó ISO (67 mg /Kg de peso); algunas se utilizaron para registrar continuamente los parámetros hemodinámicos, y ECG y; los otros se sacrificaron a diferentes tiempos desde 30 min hasta 96 h. Se cuantificaron los niveles de nitritos y nitratos, la actividad y expresión de proteína de las enzimas NOS<sub>c</sub> y NOS<sub>i</sub>, en diferentes fracciones subcelulares, además se midió la cantidad de la coenzima NADPH y guanósil monofosfato cíclico a lo largo del tiempo de tratamiento. Usando telemetría se valoró los cambios en la presión inducidos por ISO en presencia de varias dosis de L-NAME (inhibidor de la NOS), también se determinaron las actividades séricas de las enzimas de escape LDH, CK, TGO, TGP y  $\alpha$ -HBDH. Aparte se realizaron estudios histológicos en cortes de los corazones de las ratas tratadas, para observar los efectos de ISO y su modificación por efecto de inhibidor de NOS, L-NAME.

**Resultados.-** Se observaron elevaciones de nitritos y nitratos a 30 min y 12 h de la administración de ISO, y al evaluar la actividad y expresión de la NOS<sub>c</sub> se encontraron aumentos correspondientes al principio del tratamiento, en contraste la NOS<sub>i</sub> presentó un incremento sostenido de actividad y de su expresión en las etapas correspondientes al infarto (12-24 h) y post-infarto. El GMP<sub>c</sub> presentó una elevación importante a las 12 h de la inyección de ISO y con el NADPH no se detectaron cambios importantes. Se registraron elevaciones drásticas en las enzimas de escape que se vieron disminuidas cuando se dio tratamiento con NAME. Igualmente la severidad de la lesión observada en los cortes de corazones fue menor en las ratas que recibieron el NAME.

**Conclusiones.-** Los resultados sugieren que en este modelo experimental de I. M. causado por ISO, el NO generado por el endotelio a través de NOS<sub>c</sub> al inicio del tratamiento, juega un papel importante en la disminución de la presión arterial, no así en la frecuencia cardiaca. Durante el infarto y post-infarto, el NO se genera por la NOS<sub>i</sub> cuya expresión se ve aumentada y probablemente es consecuencia de la reacción inflamatoria que se presenta en esta etapa. Al inhibir la formación de NO por L-NAME, independientemente de su origen, disminuye el daño cardiaco manifestado durante el IM.



# I. INTRODUCCIÓN

## I. A. GENERALIDADES

### I .A. 1. Sistema Cardiovascular

La actividad que lleva a cabo cualquier célula requiere un equilibrio entre la entrada de nutrientes y la salida de productos celulares y desechos; este proceso se hace por simple difusión y varios mecanismos de transporte a través de la membrana celular. Sin embargo en organismos superiores como los vertebrados se requiere un mecanismo de transporte más sofisticado que asegure la llegada de estas sustancias a todo el organismo, y éste lo realiza el sistema cardiovascular.

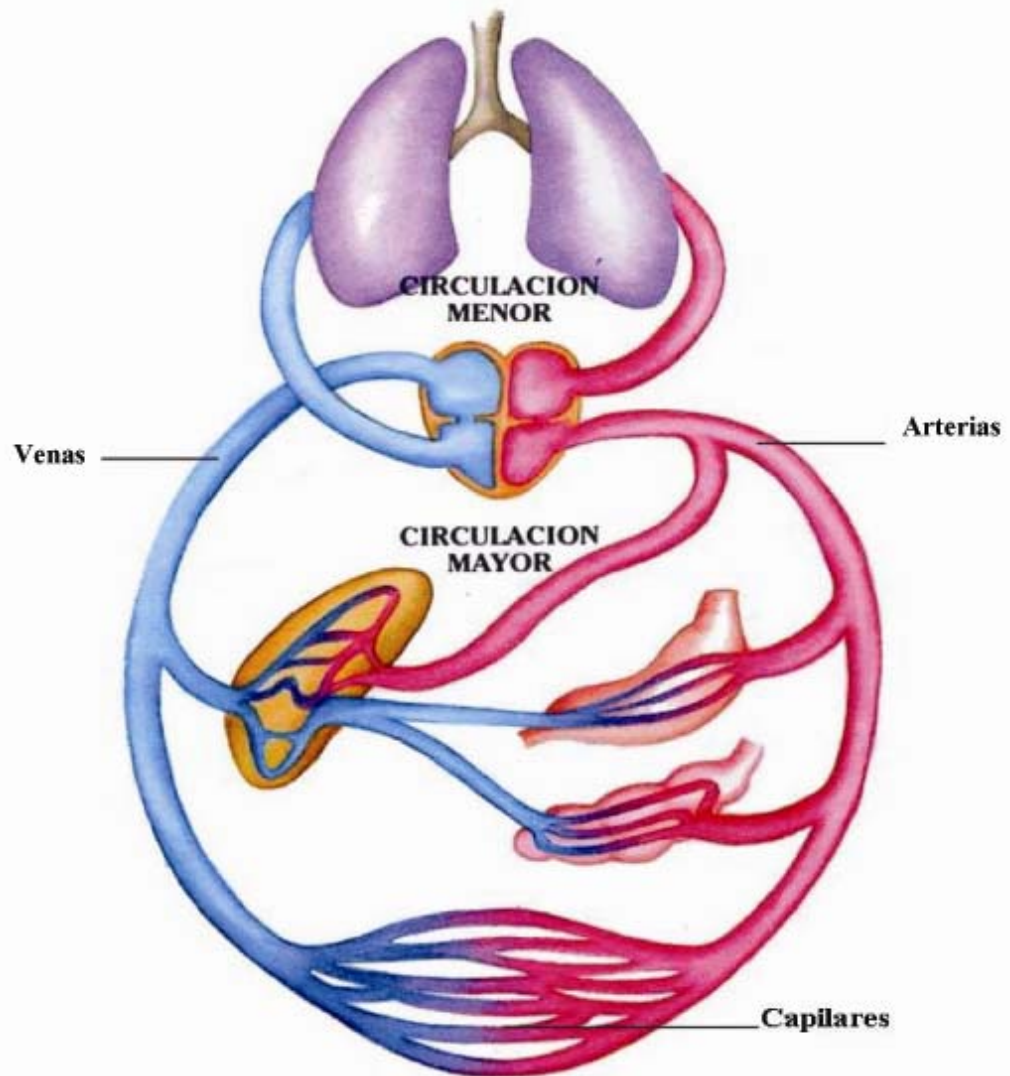
El sistema circulatorio o cardiovascular incluye una bomba muscular, el corazón, y los vasos sanguíneos (1).

**a) El Corazón.-** junto con las arterias, venas y capilares forman el sistema circulatorio; el corazón es el órgano central impulsor de la sangre y el sistema de conductos que parten del él y vuelven al mismo (circulación mayor y menor) toman el nombre de arterias, capilares y venas. Fig. 1.

El corazón es un músculo hueco que desempeña las funciones de una bomba aspirante e impelente, atrayendo a las cavidades la sangre que circula por las venas y lanzándola, por medio de las dos grandes arterias, aorta y pulmonar, a todas las redes capilares. Consta de tres componentes: a) una masa contráctil, o miocardio; b) una serosa que lo rodea, el pericardio, y c) una capa muy delgada de células epiteliales que se encuentra forrando la parte interna, el endotelio cardiaco, también llamado endocardio.

El corazón se compone de dos partes: corazón derecho (sangre venosa) y corazón izquierdo (sangre arterial), que se subdividen en dos cavidades superpuestas, aurícula y ventrículo (2). Durante la **sístole** los ventrículos expulsan la sangre a las grandes arterias con una presión considerable con lo que se aumenta la tensión de la pared en ellas; la tensión es liberada parcialmente durante la relajación cardiaca o **diástole**, manteniéndose la presión hidrostática; así, la sangre es conducida a todo el cuerpo.

El corazón es considerado un vaso sanguíneo modificado, especializado como una doble bomba de propulsión . Su lado derecho recibe la sangre del cuerpo entero y la bombea a los pulmones; su lado izquierdo recibe la sangre de los pulmones y la impulsa a todos los tejidos del cuerpo. Los vasos que llevan sangre a, y de los pulmones, constituyen la circulación pulmonar y aquellos que la colectan y distribuyen al resto del cuerpo forman la circulación sistémica. En las dos circulaciones la sangre es conducida por arterias que se van ramificando, incrementando su número y disminuyendo su calibre, hasta convertirse en arteriolas que terminan en una red de capilares. En éstos tiene lugar el intercambio entre el plasma y el líquido intersticial. La sangre regresa al corazón por vénulas confluyentes y venas (1).



**Figura 1.** El sistema cardiovascular está formado por una bomba propulsora, el corazón, y los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). El corazón está dividido en 2 partes: el corazón derecho que recibe la sangre de todo el cuerpo y la bombea a los pulmones y el corazón izquierdo que recibe la sangre ya oxigenada de los pulmones y la impulsa a todos los tejidos del cuerpo; los vasos que llevan a y de los pulmones constituyen la circulación menor o pulmonar, y los vasos que colectan la sangre y la distribuyen al resto del cuerpo forman la circulación sistémica o mayor.

b) **Los Vasos Sanguíneos.**- la sangre es confinada a un circuito cerrado de vasos forrados en su interior por un epitelio escamoso simple, el **endotelio**. Éste sirve como una división física o una barrera semipermeable interpuesta entre la sangre y el fluido intersticial.

La estructura de los vasos varía de acuerdo a su función y localización . Las arterias que soportan grandes presiones por recibir la sangre que expulsa el corazón tienen paredes más gruesas que su contraparte venosa; así también, conforme se adelgazan los vasos disminuye el grosor de la pared.

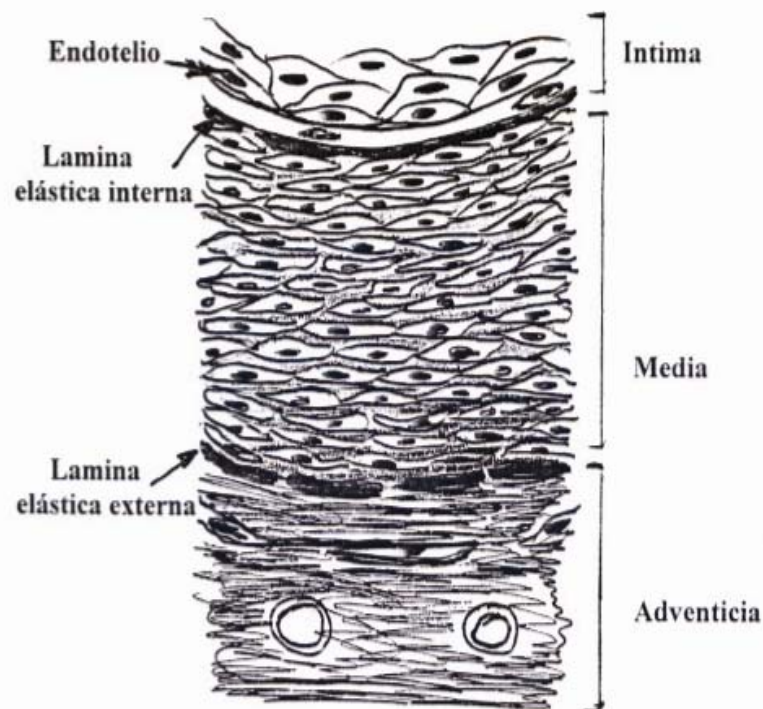
Los vasos sanguíneos tienen tres componentes básicos : el endotelio, tejido muscular liso y la matriz extracelular , que incluye los elementos elásticos , colágena y proteoglicanos. Estos componentes se encuentran arreglados en forma de capas concéntricas : la **íntima** (adyacente al lumen), la **media** y la **adventicia** (más externa) Fig. 2 . En vasos normales la íntima es un recubrimiento de células endoteliales, que está separada de la media por una capa elástica densa, llamada *lamina elástica interna* ; el límite exterior de la media está marcado por una *lamina elástica externa* muy bien definida. En las arterias grandes y medianas, las capas de células de tejido muscular liso de la media cercanas al lumen del vaso dependen de la difusión del oxígeno.

**El endotelio** es un tejido versátil y multifuncional que tiene muchas propiedades sintéticas y metabólicas: 1) sirve como una membrana semipermeable que controla la transferencia de pequeñas y grandes moléculas a través de las paredes de los capilares y vénulas; 2) regula la trombosis, trombolisis y la adherencia plaquetaria; 3) modula el tono y flujo vascular; 4) metaboliza hormonas; 5) regula las reacciones inmunes e inflamatorias por control de las interacciones de los leucocitos y la pared vascular; 6) modifica las lipoproteínas de la pared arterial; 7) regula el crecimiento de algunos tipos celulares, particularmente las células musculares lisas. Sin embargo el endotelio dañado es crítico en la iniciación de la arteroesclerosis, los efectos vasculares de hipertensión y otros desórdenes.

**El tejido muscular liso.**- se encuentra formando la pared de los vasos sanguíneos (excepto capilares y vénulas periciticas), puede estar organizado en capas concéntricas de células arregladas helicoidalmente (arterias y arteriolas) o dispuestas longitudinalmente formando acúmulos de células musculares. Las células del tejido muscular liso son capaces de desempeñar muchas funciones, incluyendo la vasoconstricción y la dilatación en respuesta a algún estímulo normal o farmacológico: síntesis de colágena, elastina y proteoglicanos; elaboración de factores de crecimiento y citocinas; además de su migración a la íntima y proliferación. Como células predominantes de la media, no solo son importantes en la reparación vascular normal, sino también en procesos patológicos como la arteroesclerosis. Su función contráctil es mediada por filamentos citoplásmicos de actina y miosina.

La actividad migratoria y proliferativa de las células del tejido muscular liso es regulada fisiológicamente por promotores de crecimiento e inhibidores. Dentro de los promotores está el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) producido por plaquetas, células endoteliales y macrófagos; el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y la interleucina 1. Los inhibidores son los sulfatos de heparina, óxido nítrico/factor relajante derivado del endotelio (NO/EDRF); interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (3).

**Matriz extracelular.**- constituida como un gel altamente hidratado, por sustancias como proteoglicanos, colágena, fibronectina, y células que pueden estar en una dispersas o fijas a una pared basal. (1)



**Figura 2. Principales componentes de la pared vascular.** Los vasos sanguíneos están compuestos básicamente de 3 elementos: el endotelio, tejido muscular liso y la matriz extracelular. Estos componentes se encuentran arreglados en forma de capas concéntricas: la íntima (adyacente al lumen) y formada por células endoteliales, la media que está constituida por células de tej. muscular liso y son las responsables principalmente de la vasodilatación y de la vasoconstricción, y por último la capa más externa, la adventicia, formada por tejido conectivo y donde se encuentran dispersas fibras nerviosas y los vasos que irrigan a los vasos sanguíneos (*vasa vasorum*). La íntima y la media se encuentran divididas por una capa elástica llamada *lamina elástica interna*, y en parte más externa de la media hay otra capa que la divide de la adventicia, que se llama *lamina elástica externa*.

## I. A. 2. Infarto del Miocardio

El infarto del miocardio es una de las causas más comunes de la mortalidad en pacientes (4); sin embargo, gracias al avance de la tecnología y la disponibilidad de nuevas terapias la tasa de mortalidad por esta causa ha disminuído. (5)

El resultado de la isquemia total y brusca es la muerte tisular o infarto. El término viene de la palabra latina *infartus* que significa “meter dentro” y se refiere al estado de llenura, con aumento de volumen que caracteriza a los infartos hemorrágicos. Sin embargo es usado también para referirse a otras formas de necrosis isquémica

En el infarto de miocardio, la lesión que se produce hace que varias enzimas pasen de las células cardíacas al torrente circulatorio. La medida de la actividad de dos aminotransferasas, alanina aminotransferasa (ALT; también denominada transaminasa glutámico-pirúvica, TGP) y aspartato aminotransferasa (AST; llamada también transaminasa glutámico-oxalacética, TGO) , así como de otra enzima cardíaca , la creatina cinasa (CK) y de la lactato deshidrogenasa (LDH) pueden dar información útil sobre la gravedad de la lesión en el corazón y son determinadas rutinariamente en los casos en que se presume de un infarto de miocardio. La CK es la primera en aparecer en la sangre después de un ataque de corazón, así también desaparece muy rápido; la TGO es la siguiente y la GTP lo hace más tarde. La deshidrogenasa láctica se detecta en la circulación después de las anteriores (6).

Anatomía Patológica.- el infarto comúnmente da lugar a un área de necrosis por coagulación, bien circunscrita, que puede evolucionar hacia la fibrosis cicatrizal. En la zona carente de circulación las células mueren de manera más o menos rápida. La sangre puede continuar circulando por corto tiempo debido a algún grado de reflujo venoso, a la apertura de canales periféricos anastomóticos o bien porque la oclusión del vaso haya sido solamente parcial. En estas condiciones la zona infartada contiene una gran cantidad de sangre, está aumentada de volumen y es de color rojo intenso. Los glóbulos rojos se extravasan de los capilares y hay formación de fibrina derivada de la sangre extravasada; estas son las características del llamado infarto rojo. En estructuras laxas como pulmones y el intestino, la ingurgitación sanguínea es mucho más notable que en los órganos compactos como el hígado, los riñones y el corazón.

Una zona de isquemia tan solo no se considera infarto hasta que aparece la necrosis. La necrosis es seguida de la autólisis y de la hemólisis. La mayor parte de la energía necesaria para la contracción del miocardio es generada por la acción aeróbica del ciclo del ácido cítrico por la oxidación del piruvato . El corazón utiliza como fuente principal a los cuerpos cetónicos, ácidos grasos, la glucosa y los aminoácidos. Sin embargo, en condiciones de anoxia, como es el infarto, la principal fuente de piruvato es la degradación del glucógeno. Por esta razón en las preparaciones histológicas del área de isquemia se aprecia una disminución o desaparición de glucógeno.

Tanto en los animales de experimentación como en los humanos, se ha demostrado una disminución significativa en la actividad de las enzimas

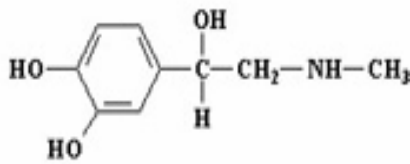
$\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa y glutaminasa I. Con ayuda del microscopio electrónico se ha podido observar la condensación y marginación de la cromatina nuclear así como tumefacción de las mitocondrias y la aparición de gránulos densos mitocondriales.

Como resultado de la degradación anaeróbica de glucógeno, y la producción de piruvato y lactato, el pH local baja, a esto se debe en parte la acidofilia que caracteriza al miocardio anóxico cuando se tiñen con hematoxilina-eosina los cortes de corazones después de seis a doce horas de producida la lesión.

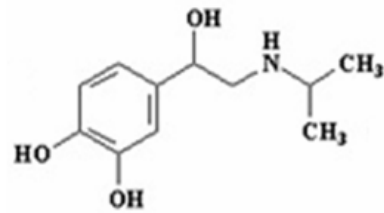
Paralelamente a los cambios anteriores, el tejido periférico a la zona infartada muestra una reacción inflamatoria aguda que es seguida por la infiltración de macrófagos. La degradación de la hemoglobina origina bilirrubina y hemosiderina, da lugar después de aproximadamente seis días a que la zona de infarto se torne amarilla. La reabsorción de los productos de deshecho se hace cada vez más extensa y se observa paulatinamente la retracción de la zona infartada.

Hay un lento y progresivo crecimiento de tejido de granulación procedente de la periferia que va transformando la zona de infarto en área de fibrosis cicatrizal que eventualmente puede hialinizarse. Además no es raro que ocurra una calcificación en la parte central del infarto (7).

### I.A. 3. El Isoproterenol



Adrenalina



Isoproterenol

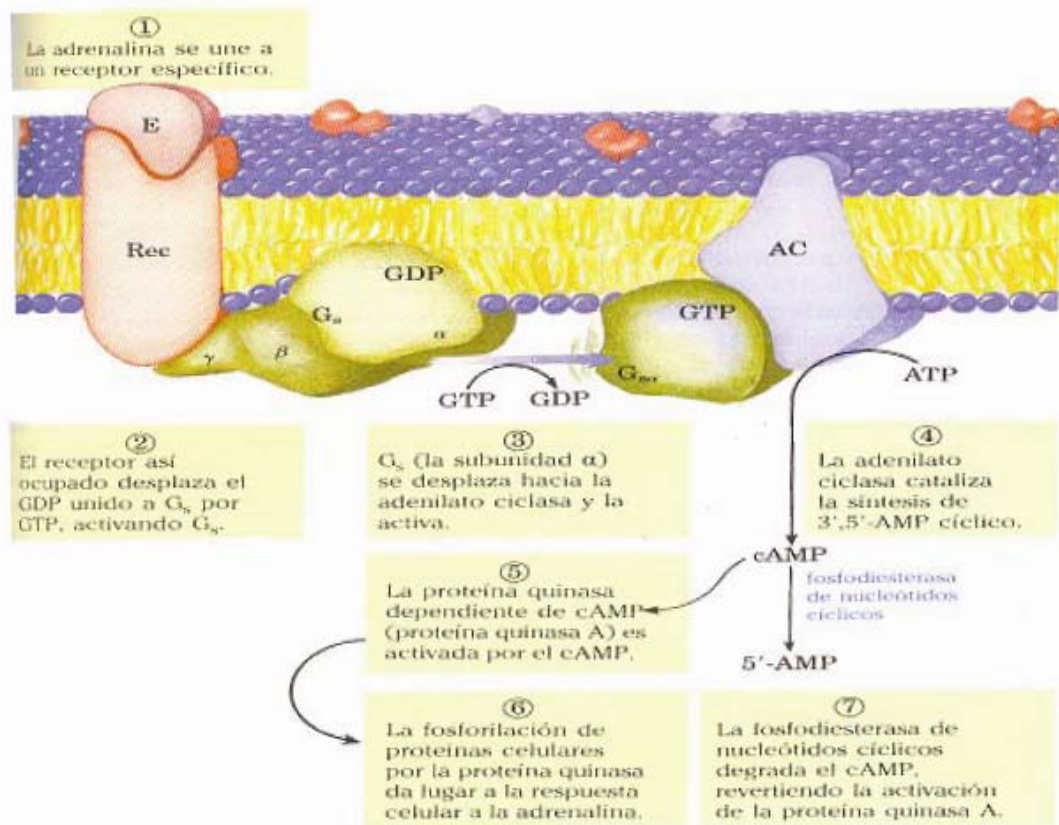
El isoproterenol es una molécula cuyo parecido con la adrenalina (o epinefrina) le da la propiedad de imitar su acción; es un agonista. La adrenalina tiene cuatro diferentes receptores localizados en la membrana de casi todas las células de los mamíferos, éstos han sido diferenciados por el Dr. Alhquist en receptores alfa cuya activación causa contracción y aquellos en que se produce relajación, receptores beta (8).

El isoproterenol es un potente agonista  $\beta$ -adrenérgico no-selectivo, con muy baja afinidad por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Como agonista adrenérgico, mimetiza la acción de la adrenalina, ya que por su semejanza en cuanto a su geometría tridimensional es capaz de ocupar el receptor de la hormona y desencadenar los mismos eventos.

La acción del isoproterenol sobre las células sensibles, se inicia, como ocurre con la epinefrina, con la unión de la molécula a un receptor proteico en la membrana plasmática, el cual la atraviesa, al acoplarse el agonista al receptor provoca cambios conformacionales en su porción intracelular haciendo que una proteína G estimuladora (Gs) se active y así otra proteína, la adenilato ciclasa, catalice la síntesis de AMP cíclico el cual activará a la proteína cinasa A; finalmente se fosforilan proteínas celulares dando lugar a la respuesta celular (6) Fig. 3.

Acciones Farmacológicas.- La administración intravenosa de isoproterenol causa resistencia vascular periférica, principalmente en el músculo esquelético, pero también renal y capa vascular mesentérica. La presión diastólica cae. El flujo sanguíneo renal se disminuye en individuos normotensos, pero aumenta marcadamente en shock. El gasto cardiaco aumenta por el efecto inotrópico y cronotrópico positivo, por la disminución de la resistencia vascular periférica que produce el isoproterenol. Los efectos cardiacos del isoproterenol pueden conducir a palpitaciones, taquicardia sinusal y arritmias más serias; grandes dosis de isoproterenol pueden causar necrosis miocárdica en animales.

El isoproterenol relaja casi todas las variedades de músculo liso cuando el tono es alto, pero esta acción es más pronunciada en los músculos lisos bronquiales y gastrointestinales. Su efecto en el asma puede deberse en parte a una acción adicional de inhibir la liberación de histamina y otros mediadores de la inflamación inducida por antígeno: esta acción es enmascarada por los agonistas selectivos de receptores  $\beta_2$ .



**Figura 3. Mecanismo de Acción de Adrenalina y sus Agonistas** El primer paso en la acción de adrenalina y sus análogos (agonistas) es la unión de la hormona (A) a su receptor (Rec) en la cara externa de la membrana, esto provoca un cambio intracelular que causa la separación de GDP de la proteína G estimulante ( $G_s$ ) y su activación al unirse a GTP, así la subunidad  $\alpha$  de  $G_s$  se desplaza a la adenilato ciclasa (AC) activándola, y por ello la transformación de de ATP en AMPc, el cual activará la proteína cinasa A dependiente de AMPc y en consecuencia la fosforilación de varias proteínas que dará lugar a la respuesta celular a adrenalina. Finalmente una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos degrada al AMPc y de esta manera cesa la acción de la proteína cinasa A.

Tomado de: Principios de Bioquímica. Lehninger A. L.

En el hombre, el isoproterenol causa menos hiperglucemia que la epinefrina, en parte porque la secreción de insulina es estimulada por la fuerte estimulación  $\beta$ -adrenérgica de las células de los islotes del páncreas. El isoproterenol y la epinefrina son igualmente efectivos para estimular la liberación de los ácidos grasos y producción de energía (9).



#### **1.A. 4. El Oxido Nítrico (NO)**

##### **Descubrimiento del NO. Historia de los nitrovasodilatadores. EDRF.**

El tono vascular es regulado por una serie de agentes vasoactivos que pueden alcanzar la pared vascular desde el torrente sanguíneo o que pueden ser liberados en la pared vascular por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, colinérgicas y otras. Todos estos agentes interactúan para mantener la presión sanguínea en los valores adecuados, y cuando se dá una falla en estos mecanismos, se producen situaciones anormales como la hipertensión arterial (10).

Desde la segunda mitad del siglo XIX, compuestos nitrogenados como el nitrito de amilo (11) y la nitroglicerina (NTG) (12) se usaron con éxito en el tratamiento de la angina de pecho e hipertensión arterial, ya que producen una vasodilatación. Por muchos años se pensó que el efecto de estos compuestos se debía a su transformación a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en la circulación. Sin embargo en 1940, Krantz y cols. (13) demostraron que la dosis de la NTG usada, no podría producir suficiente  $\text{NO}_2^-$  para causar tal vasodilatación.

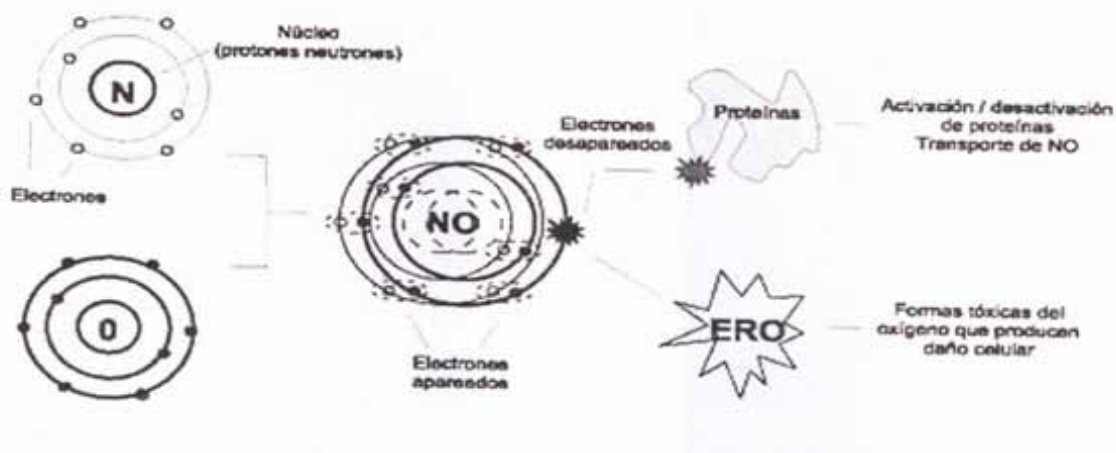
En 1977 dos grupos independientes demostraron que los nitratos orgánicos inducen un incremento en los niveles de GMPc en el músculo liso (14,15). Posteriormente, algunos experimentos bioquímicos demostraron que los nitrovasodilatadores y el NO activan la guanilato ciclasa soluble (16,17). Más tarde, se describió la generación de NO por estos vasodilatadores mediante una reacción no enzimática con cisteína y que la misma concentración de vasodilatadores usada para activar a la guanilato ciclasa induce la liberación uniforme de NO (18).

En los años 80 se sugirió que sustancias producidas por las propias células vasculares (concretamente en el endotelio) participan en la regulación del tono del músculo liso. Furchgott y Zawadzki (19) encontraron que las células endoteliales liberan un poderoso factor vasodilatador, que denominaron factor de relajación derivado del endotelio (endotelium derived relaxing factor, EDRF). En 1987 en grupo de Moncada (20) demostró que el EDRF es el óxido nítrico (NO) que se biosintetiza del aminoácido L-arginina (21). Posteriormente se observó que esta vía L-arginina NO no se limita al tejido vascular, sino que se encuentra en una amplia gama de células, con lo que se piensa que se trata de un mecanismo general de comunicación intercelular para la activación de la guanilato ciclasa (10).

Así más tarde, se descubrió que el efecto que tienen la acetilcolina y otros agentes relajantes sobre el tejido muscular liso y los vasos sanguíneos requiere de un tejido endotelial íntegro, el cual libera un factor difusible (22, 23) el EDRF u NO. Este EDRF parece tener una vida media muy corta de apenas entre 2-30 segundos.

La identificación del NO como el EDRF condujo a experimentos que demostraron su generación en el cerebro (24).

## Óxido Nítrico. Molécula reguladora o molécula dañina.



**Figura 4.** El óxido nítrico (NO) es una molécula formada por un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno, que contiene electrones desapareados los cuales interactúan con proteínas provocándoles su activación o desactivación, además se combina con el ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y forma especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan diversos daños celulares.

El óxido nítrico es un radical libre gaseoso, es capaz de difundir a los tejidos vecinos de donde se produce, actualmente se le considera como la principal molécula mensajera que regula la función inmune y que además funciona como neurotransmisor en el cerebro y sistema nervioso central (25).

El óxido nítrico por un lado actúa como un mensajero fisiológico intracelular, y por otro, tiene actividad citotóxica *in vivo* (26). La molécula señalizadora de NO se sintetiza por la activación de la óxido nítrico sintasa expresada constitutivamente (NOS<sub>c</sub> o 3) por periodos de tiempo cortos (segundos o minutos); en cambio, el citotóxico NO es sintetizado por la NOS inducible, la cual produce NO por largos periodos de tiempo (horas o días) (27).

Así el NO como citotóxico, está implicado en las acciones de los macrófagos (28), ya que ellos producen nitratos que derivan en NO, cuyo precursor es el aminoácido arginina; tanto la ausencia de arginina al medio de incubación como la presencia de derivados de arginina, bloquean la tumoricidad y las acciones bactericidas de los macrófagos, por lo que se ha establecido que el NO es un mediador crucial en la función del macrófago.

El NO actúa como molécula reguladora sobre los vasos sanguíneos, activando a la enzima guanilato ciclasa soluble. Éste se une al hierro del grupo hemo en el sitio activo de la enzima, generando así GMPc el cual estimula una proteína cinasa dependiente de GMPc, y da como resultado la relajación del músculo liso y la vasodilatación. En el corazón, el GMPc suaviza las contracciones estimulando las bombas iónicas que mantienen una concentración reducida de Ca<sup>2+</sup> citosólico (22) (Fig. 5).

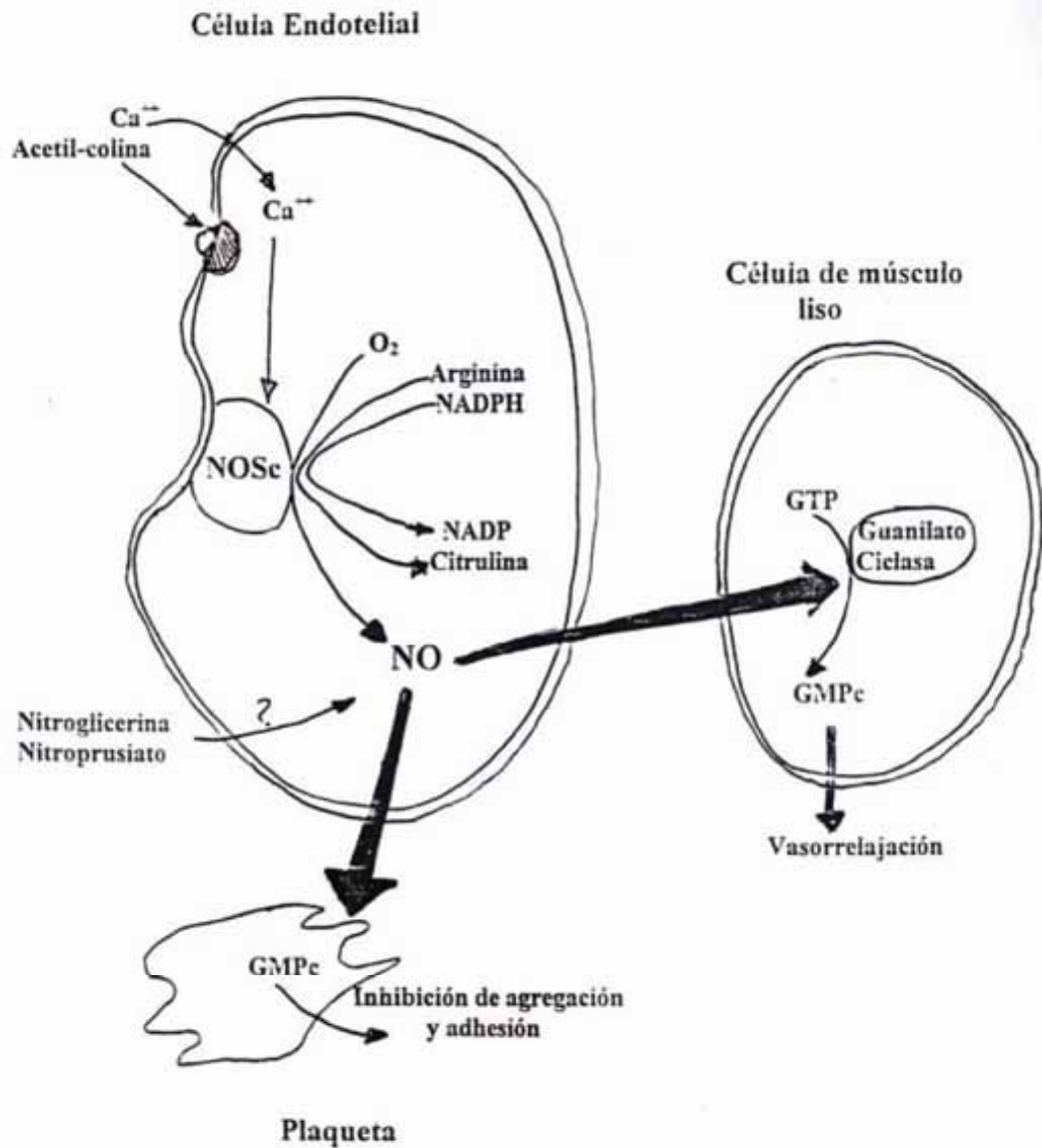
El NO en el medio extracelular reacciona con el oxígeno y el agua para formar  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ . La cardiotoxicidad del NO es debida a su capacidad de combinarse con aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y formar peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ), un radical libre oxidante que puede causar fragmentación del DNA y oxidación de los lípidos. En la mitocondria  $\text{ONOO}^-$  actúa sobre la cadena respiratoria (I-IV) y la SOD-Mn generando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y aniones superóxido (28)

Fig 6.

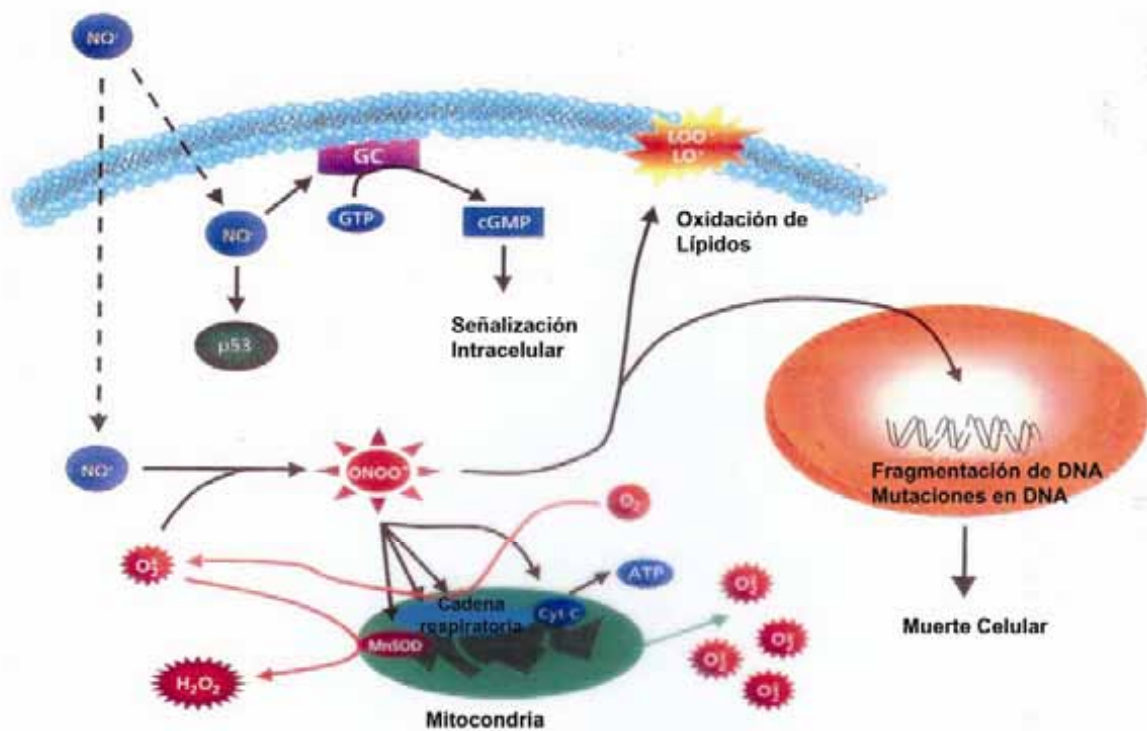
El NO se sintetiza por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual utiliza como sustrato al aminoácido arginina. La adición de análogos no activos de arginina tales como N-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-ciclopropil-L-arginina o N-nitro-arginina metil éster (L-NAME) causan un bloqueo de la actividad de NOS y la consecuente disminución de los niveles de GMPc (29, 30).

El NO es diferente a otros mediadores biológicos, sus propiedades biológicas están determinadas por las reacciones químicas que sufre, y sus efectos se han clasificado en dos categorías directos e indirectos (31, 32). Los efectos directos son aquellos en los que el NO interactúa directamente con los blancos biológicos como la reacción con el grupo hemo de algunas proteínas y generalmente son reacciones rápidas. Contrariamente los efectos indirectos se deben a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS) que se forman por reacción de NO y oxígeno o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), son reacciones de nitrosación que afectan grupos amino y tioles, y de oxidación con macromoléculas como DNA, proteínas y lípidos.

El NO producido a bajas concentraciones y por periodos cortos media efectos directos; y los efectos indirectos se producen con concentraciones de NO más altas y durante periodos de tiempo más largos. La formación de NO cuando se produce en cantidades discretas se le atribuye a las isoformas de NOS constitutivas (NOS<sub>n</sub> y e) y la generación de NO en concentraciones mayores que llegan a ser micromolares que se mantienen por tiempos prolongados se deben a la acción de la isoforma inducible (NOS<sub>i</sub>) (33, 34, 35).



**Figura 5. El óxido nítrico (NO) y la vasodilatación.** El óxido nítrico producido en las células endoteliales por la acción catalítica de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOS<sub>e</sub>) y usando como sustratos al aminoácido arginina y oxígeno, el NO es capaz de difundir a las células de tej. muscular liso, y ahí al activar a la enzima guanilato ciclasa (GC) desencadena una serie de reacciones que finalmente llevan a la vasorrelajación del tej. muscular liso. El NO en las plaquetas causa inhibición de la agregación y de la adhesión plaquetaria. Cuando se dá tratamiento con nitroglicerina o nitroprusiato a pacientes con padecimientos como la angina de pecho, el NO que se genera a partir de estos compuestos es el responsable de la vasorrelajación producida.

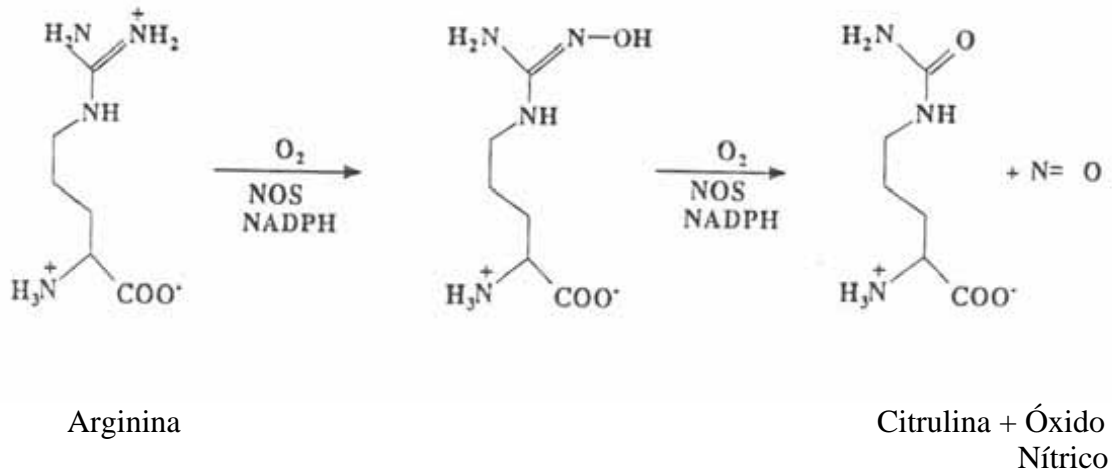


**Figura 6. Acción del óxido nítrico.** El NO generado a partir del amino ácido arginina por acción de la enzima NOS tiene una vida media de unos cuantos segundos, difunde a través de la membrana plasmática y citoplasma, en el tejido vascular reacciona con el hierro del sitio activo de la guanilato ciclasa (GC) y estimula la producción de GMPC relacionado con la liberación de neurotransmisores que darán como resultado la relajación del músculo liso y la vasodilatación. La toxicidad de NO se debe a su capacidad de combinarse con iones superóxido ( $O_2^-$ ) y formar peroxinitritos ( $ONOO^-$ ), un radical oxidante que puede causar fragmentación del DNA y oxidación de lípidos. En la mitocondria actúa sobre la cadena respiratoria (I-IV) y la superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD-Mn) generando  $H_2O_2$  y aniones superóxido.

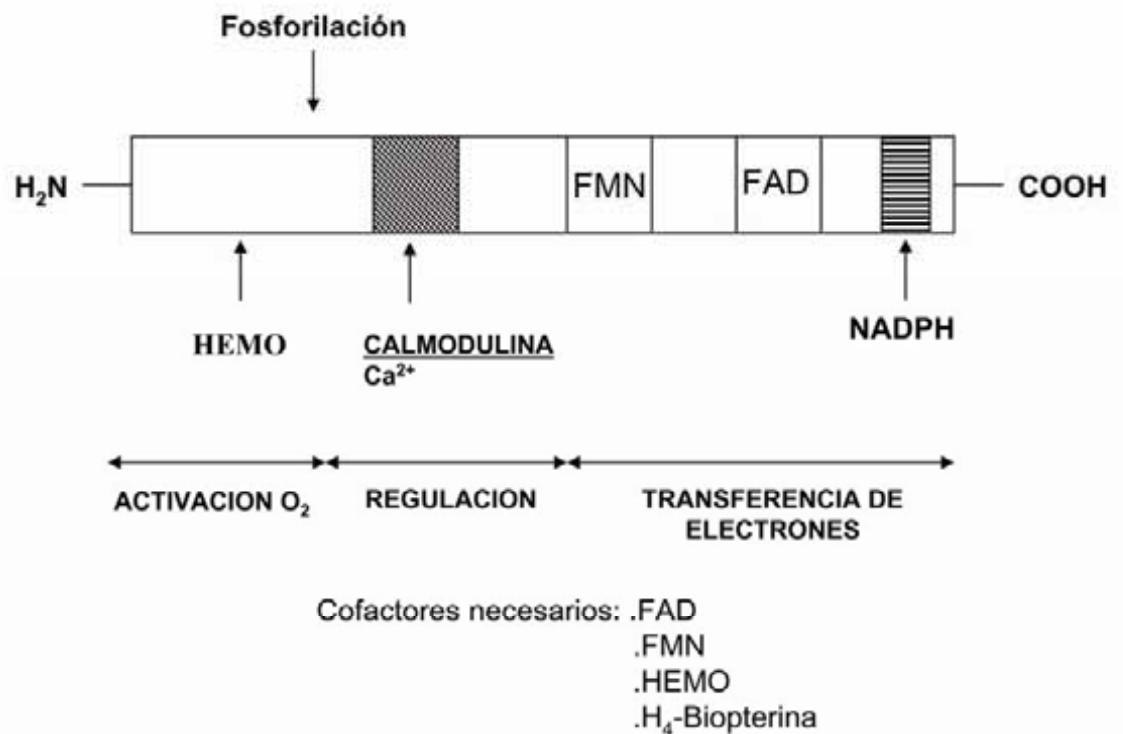
Tomado de: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

### I. A. 5. Óxido Nítrico Sintasa (NOS)

Como ya se señaló anteriormente, el NO tiene una vida media de apenas unos cuantos segundos, por lo cual se ha buscado estudiar la enzima que le da origen, la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta sintetiza NO a partir del aminoácido L-arginina y requiriendo de NADPH y O<sub>2</sub> como co-sustratos en la reacción que cataliza:



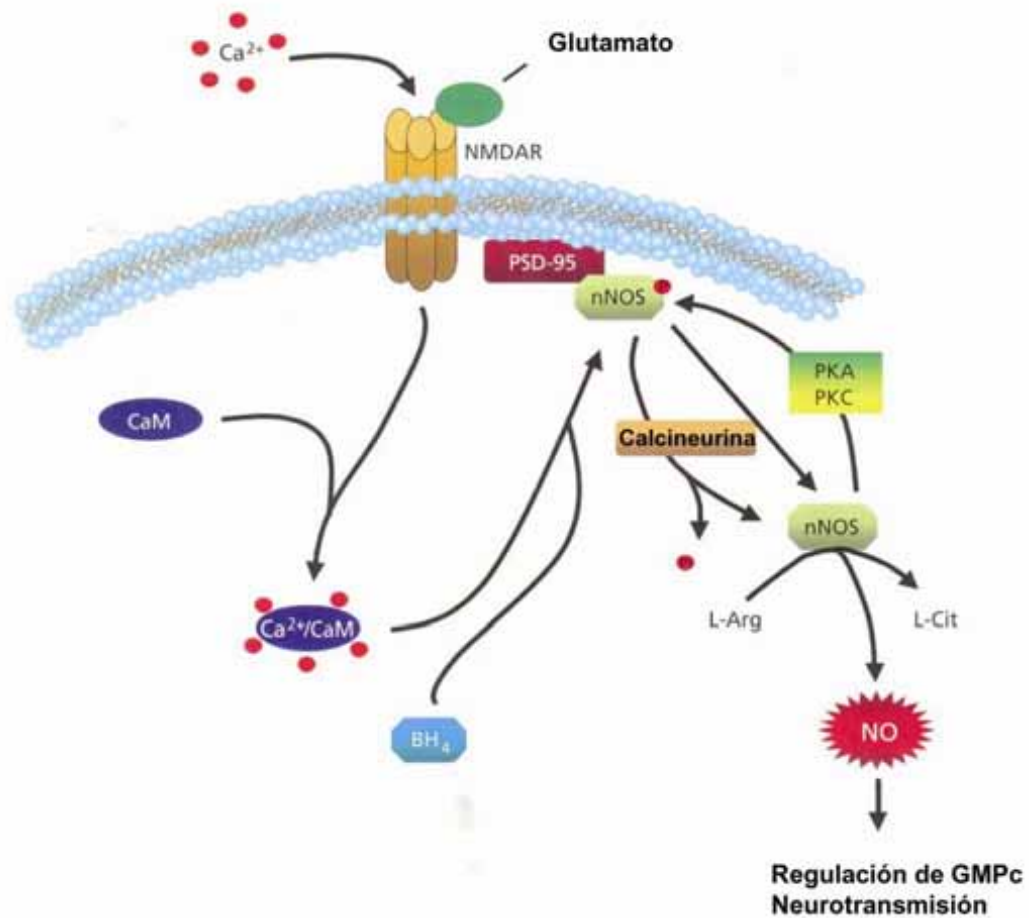
De la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) se conocen tres isoformas que fueron identificadas originalmente en el cerebro (neuronal o NOS<sub>n</sub>) (38), en los macrófagos (inducible o NOS<sub>i</sub>) (39, 40) y en las células endoteliales (endotelial o NOS<sub>e</sub>) (41, 42), muestran entre ellas 50 y 60% de homología en su secuencia de aminoácidos y son codificadas por tres diferentes genes (NOS1, NOS2 y NOS3, respectivamente) (36): las tres son homodímeros con subunidades de 130 – 160 KDa. Todas tienen sitios de enlace para NADPH, FAD y FMN cercano al extremo carboxilo (dominio de reductasa), además contienen sitios de enlace para tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), hemo y L-arginina, próximo al amino terminal (dominio de oxigenasa). Los dominios de reductasa y oxigenasa están ligados por un sitio de enlace a calmodulina (CaM). La ocupación de este sitio facilita el transporte de electrones desde los cofactores hasta el dominio de reductasa y al grupo hemo durante la reducción del NO (37). Además, respecto a la activación, las tres isoformas funcionan como homodímeros. En cada monómero el NADPH proporciona los electrones que se transfieren desde las flavinas (FAD o FMN) al hierro del grupo hemo, el cual es activado para enlazar O<sub>2</sub> y en presencia del sustrato L-arginina, catalizar la síntesis de NO y L-citrulina (43). En el caso de NOS<sub>n</sub> y NOS<sub>e</sub>, el calcio en concentraciones fisiológicas regula la unión a calmodulina y el flujo de electrones al grupo hemo (43, 44). Existe evidencia que el NO puede tener efecto de “feedback” sobre la síntesis de NO al formar complejos fierro-nitrosilos con hemo, lo cual inactiva parcialmente a la enzima (45, 46). En los macrófagos activados, NO puede inhibir la actividad de NOS<sub>i</sub> insertándose en el monómero y reduciendo la disponibilidad del grupo hemo, de esta manera bloquea la formación del dímero y así inactiva a la enzima (47) Fig. 7.



**Figura 7. SECUENCIA DE LA PROTEINA NO-SINTASA** En todas las isoformas de NOS se encuentran los mismos dominios de interacción con: NADH, cercanos al carboxilo terminal (COO-) y el cual proporciona los electrones que se transfieren desde las flavinas (FAD y FMN) al hierro del grupo hemo en el extremo terminal amino (NH-); tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), Ca/Calmodulina, con acción reguladora para las NOS constitutivas.

Las tres isoformas de NOS que se han identificado son:

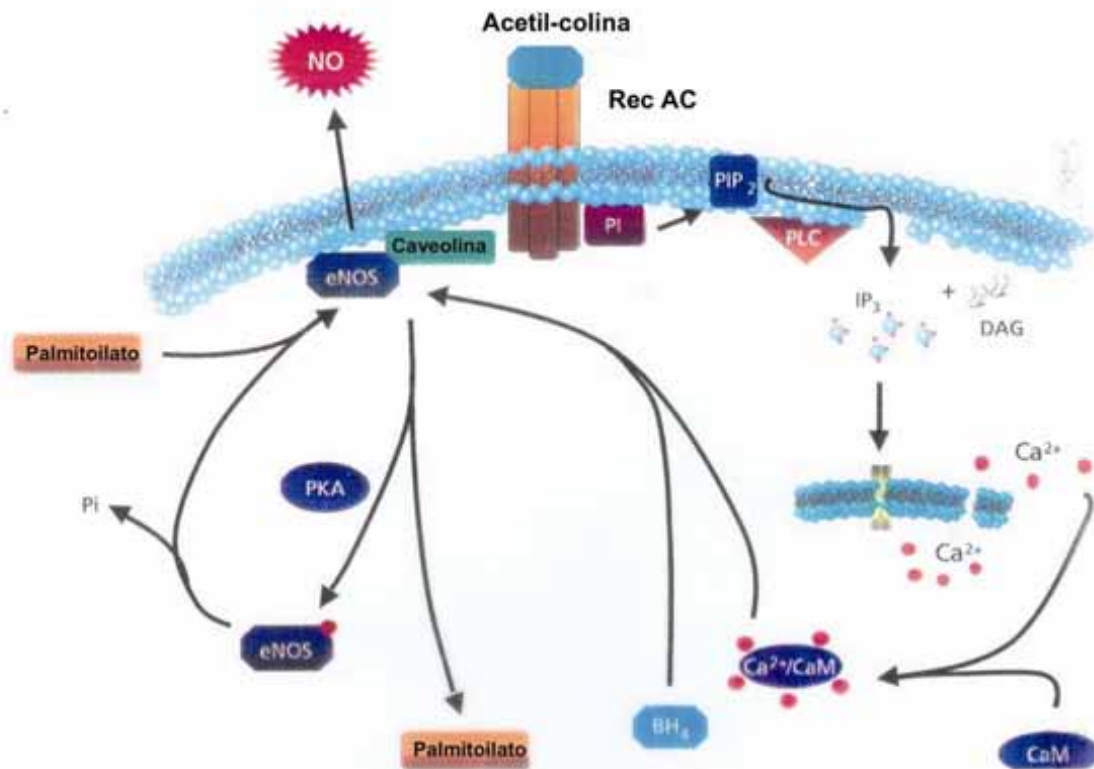
- a) **Neuronal (NOS<sub>n</sub> o NOS<sub>1</sub>)** .- Es una proteína de 160 KDa cuya secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las especies, (similitud de 93 % entre la rata y el humano); en el humano, el gene codificante se encuentra localizado en el cromosoma 12 (38, 48), y se expresa constitutivamente en las terminales nerviosas ortosimpáticas regulando la liberación de catecolaminas en el corazón. La enzima tiene muchos sitios de regulación, incluyendo el sitio de unión a NADPH, FAD, FMN, además requiere para su actividad de tetrahydrobiopterina (36, 37). NOS<sub>n</sub> se ha asociado con la proteína neuronal “post-synaptic density protein” (PSD-95) en la membrana neuronal. En respuesta a un incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, esta isoforma interactúa con CaM y este complejo en combinación con BH<sub>4</sub> origina la translocación de NOS<sub>n</sub> de la membrana plasmática al citoplasma. NOS<sub>n</sub> es fosforilada por varias proteínas cinasas (Ca/calmodulina dependiente, AMPc dependientes y GMPc dependientes y proteína cinasa C) con lo cual disminuye su actividad (49, 50). La defosforilación de NOS<sub>n</sub> inicia la producción de NO. NO activa la guanilato ciclasa (GC) y con ella varias rutas de señalización (37). Fig. 6.



**Figura 8. Oxido Nítrico Sintasa Neuronal (NOSn)** Se expresa constitutivamente las membranas de celulares de las neuronas, cuando el neurotransmisor glutamato y  $Ca^{2+}$  se asocian con el receptor en la membrana plasmática se producen cambios conformacionales. A la NOS n se le asocia con la proteína neuronal "post-synaptic density protein" (PSD-95) en la membrana neuronal. Cuando se presenta un aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico, la NOSn interactúa con el complejo calmodulina-  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}/CaM$ ) y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) provocando una traslocación de la enzima de la membrana al citosol y su defosforilación por calcineurina, lo cual activa a NOSn produciendo NO que activará a la guanilato ciclasa (GC) produciéndose GMPc que tendrá acción reguladora en varias proteínas que están asociadas con la neurotransmisión. La NOSn vuelve a su estado inactivo al ser fosforilada en sus aminoácidos.

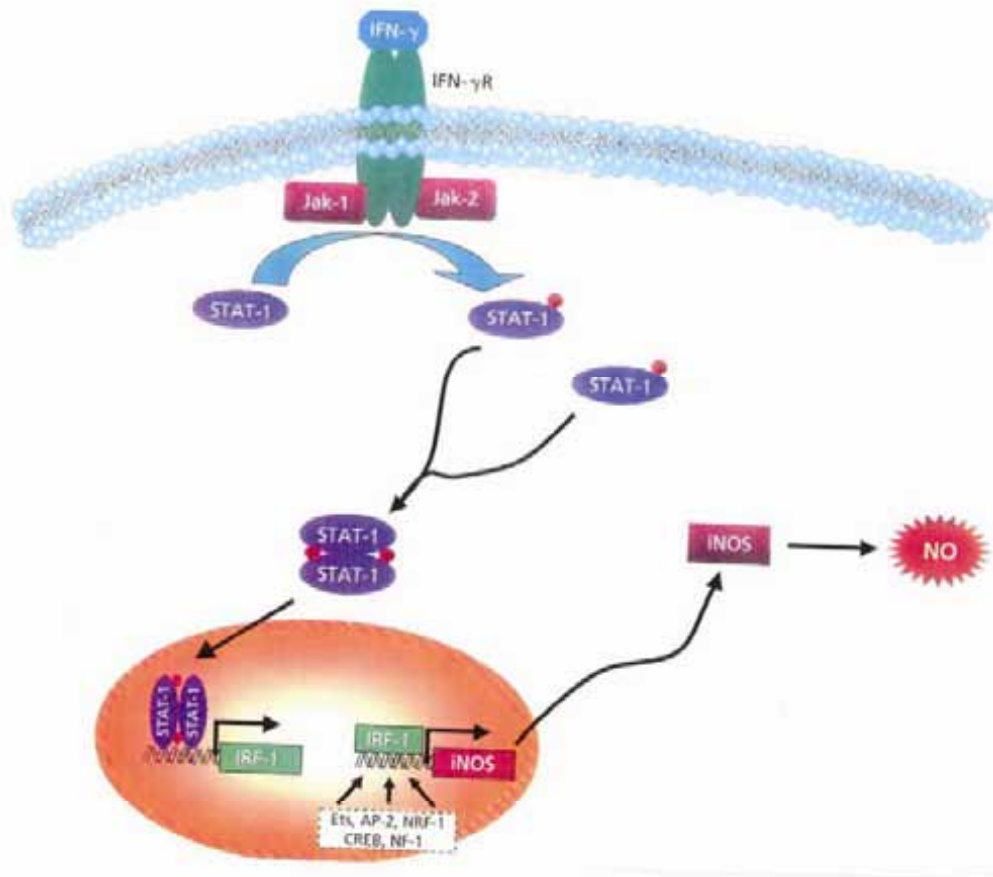


- b) **Endotelial (NOSe o NOS<sub>3</sub>).**- Es una proteína de 135 KDa, y en el humano está codificada por el gene NOS<sub>3</sub>, localizado en el cromosoma 7 (51, 52), y se caracteriza por primera vez en las células endoteliales de aorta bovina (41, 42), es activada por incrementos intracelulares de calcio. Se ha demostrado que NOSe se expresa constitutivamente en células endocárdicas; células endoteliales de los grandes vasos y en poca cantidad en pequeñas arteriolas y capilares; células del epitelio renal, neuronas del hipocampo piramidal, cardiomiocitos y miocitos de músculo esquelético (53-59). Existen evidencias fisiológicas de que NOSe regula el flujo sanguíneo en grandes vasos más que en los pequeños (37) y al igual que NOS<sub>n</sub> presenta los mismos sitios de regulación y es activada por Ca-calmodulina. Tanto en células endoteliales como en miocitos cardiacos la enzima está asociada principalmente a fracciones de membranas donde es miristoilada y palmitoilada lo que la mantiene unida a la caveola y en un estado inactivo (60, 61). Las caveolinas, las principales proteínas estructurales de la caveola, mantienen un ciclo movilizándose entre la membrana plasmática y el aparato de Golgi, donde se localiza también la NOSe (62-64), la que se ha detectado co-precipitando con la caveolina-1 (65). La activación de los receptores de acetil colina disparan la síntesis de IP<sub>3</sub> el cual induce el aumento de calcio al citoplasma, ahí activa a la calmodulina que se unirá a NOSe desprendiéndola de la caveola y translocándola al citoplasma donde permanecerá activa hasta que sea fosforilada por una proteína cinasa A (PKA) lo que provocará su inactivación y regreso a la membrana (37) Fig.7.
- c) **Inducible (NOS<sub>i</sub> o NOS<sub>2</sub>).**- Se trata de una proteína de 130 KDa. El gene codificante de esta isoenzima se encuentra localizado en el cromosoma 17; fue caracterizada y clonada por primera vez en macrófagos (66-68), pero la actividad de NOS<sub>i</sub> se ha detectado en una gran variedad de células, incluyendo células endocárdicas y endoteliales, células del tejido vascular liso, fibroblastos y cardiomiocitos (34, 69, 70). La NOS<sub>i</sub> está situada en el citosol y se encuentra en cantidades insignificantes en las células como macrófagos, pero la transcripción del gene que codifica a esta enzima y la expresión de la proteína son inducidas por una amplia variedad de agentes como son endotoxinas (lipopolisacáridos [LPS]), interleucina (IL-1) beta, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, interferón (IFN)-gamma e IL-6, reflejando la complejidad de la regulación del promotor NOS<sub>2</sub> en las especies estudiadas (68, 71). Los receptores de los factores inductores de NOS<sub>i</sub> (por ejemplo INF- $\gamma$ ) señalizan a través de la familia de cinasas Janus (Jak); y transductores de señales y activadores de transcripción (Stats), la ocupación de los receptores y su dimerización induce la fosforilación de las Stats y dimerización, y ya así activadas translocan al núcleo donde disparan la expresión del factor de transcripción IRF-1 el cual se une a elementos específicos del DNA en la región promotora del gene NOS<sub>2</sub> incrementando su expresión y como consecuencia la síntesis de NOS<sub>i</sub> que originará mayor cantidad de NO (37). La actividad de NOS<sub>i</sub> es independiente de Ca-calmodulina aunque en la estructura de la sintasa se hallan los sitios de reconocimiento a ésta (25) Fig. 8.



**Figura 9. Oxido Nítrico Sintasa Endotelial (NOSe o c).** El NO producido en el endotelio está involucrado en la vasorrelajación, agregación plaquetaria y mecanismos de homeostasis cardiovascular. La NOSe se expresa constitutivamente, su palmitoilación y miristoilación la mantiene unida a la caveola en la membrana celular y en estado inactivo. La activación de los receptores endoteliales de acetilcolina activan la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). El IP<sub>3</sub> induce el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, activa a calmodulina que se une a NOSe, ésta se disocia de la proteína caveolina y transloca al citoplasma. NOSe es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA) inactivando la enzima, la cual vuelve a asociarse con la caveolina en la membrana.

Tomado de: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)



**Figura 10. Óxido Nítrico Sintasa Inducible (NOSi).** Los macrófagos son muy importantes en la respuesta inmune temprana que presenta un organismo ante la invasión de microorganismos, y la producción de NO es central en esta función. El NO es generado en este caso por la NOSi después de la exposición a ciertas citocinas como el IFN- $\gamma$ . Los receptores de IFN- $\gamma$  señalizan a través de la familia de cinasas janus (JAK), y transductores de señales y de activadores de transcripción (Stats). La ocupación del receptor y su dimerización induce la fosforilación de las Stats y ya activadas se dimerizan y translocan al núcleo donde aumentan la expresión del factor de transcripción IRF-1 que se une a elementos específicos del DNA en la región promotora del gene de NOSi y así incrementa la expresión del gene NOSi. La NOSi es soluble a diferencia de NOS<sub>e</sub> y NOS<sub>n</sub>, y no requiere Ca<sup>2+</sup> para su activación.

Tomado de: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

## I. B. ANTECEDENTES

Actualmente el infarto del miocardio es una de las principales causas de muerte humana, es importante conocer los mecanismos por los cuales ocurre este fenómeno para poder prevenirlo o establecer tratamiento y así corregir los daños generados; de aquí la necesidad de tener un modelo experimental y realizar investigaciones al respecto (72). Con este fin se han usado diferentes métodos entre los cuales está la administración de isoproterenol a animales de experimentación; este agonista  $\beta$ -adrenérgico tiene la capacidad de disminuir la presión diastólica, elevar la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón, así como relajar casi todas las variedades de músculo liso.

La cardiotoxicidad producida por la administración del  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO), se ha usado como un modelo experimental de infarto al miocardio en ratas (73); sin embargo no existía un acuerdo en cuanto a las condiciones experimentales hasta que el grupo de la Dra Chagoya (72) se dió a la tarea de caracterizar este modelo histológica, fisiológica y bioquímicamente, estas condiciones se usaron para la realización de este trabajo.

La dosis de ISO administrada a los animales les permite una sobrevivencia de por lo menos 96 horas, periodo en el que se puede distinguir una etapa de pre-infarto, que abarca desde el momento en que se inyecta el ISO al animal hasta las 12 horas que siguen, un periodo de infarto propiamente dicho comprendido entre las 12 y 24 horas y un periodo de post-infarto de las 24 a las 96 horas.

Las etapas mencionadas se caracterizaron a través de pruebas histológicas, bioquímicas (cuantificando las enzimas de escape del infarto al miocardio) y manteniendo un registro continuo de ECG y de los cambios hemodinámicos en la frecuencia cardíaca y en la presión arterial (72)

Uno de los primeros eventos que se presentaron después de administrar el ISO fué el incremento de 60 % en la frecuencia cardíaca y la baja en la presión arterial que trae como consecuencia la disminución del flujo sanguíneo y una hipoxia funcional en el tejido cardíaco.

Sabiendo que el óxido nítrico (NO) producido en el endotelio vascular, desempeña un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial por su acción sobre la enzima guanilato ciclasa, se pensó que el efecto del ISO pudiera estar relacionado con la formación de este gas. Así que una de las primeras tareas en este trabajo fue averiguar cómo se modificaban los niveles de NO a lo largo del tratamiento con este

$\beta$ -adrenérgico, también se midió la enzima que cataliza la reacción de formación de NO, la óxido nítrico sintasa; la coenzima que interviene en esta reacción, el NADPH; GMPc como el compuesto que produce la vasodilatación en el tejido liso y se probó el efecto del análogo de arginina L-NAME (N-nitro- $\Omega$ -L-arginina metil éster) el cual, usado como sustrato de la enzima NO sintasa, la inhibe y evita la producción de NO.

## **I. C. HIPÓTESIS**

El infarto al miocardio experimental inducido con isoproterenol en ratas ocurre 12h después de su administración, observándose en la etapa de preinfarto una disminución inmediata (3 minutos después de su administración) importante (50 y 85% de las presiones sistólica y diastólica respectivamente) y prolongada (6 a 8 horas) de la presión sanguínea, nuestra hipótesis es que este efecto es determinante en el desarrollo del infarto y que está mediado por NO.

## **I. D. OBJETIVOS**

1. Investigar si el NO participa en el infarto al miocardio inducido con isoproterenol. Las estrategias a seguir fueron:
  - a) Usando un inhibidor en la formación de NO (L-NAME) correlacionar el efecto del inhibidor con la magnitud del infarto en preparaciones histológicas, en parámetros bioquímicos (enzimas de escape) y alteraciones de los parámetros hemodinámicos.
  - b) Cuantificar el óxido nítrico formado mediante determinación de sus productos de oxidación (nitritos y nitratos) en homogenado total y fracciones subcelulares de los animales experimentales.
  - c) Liberación y cuantificación de NO en corazones de los animales experimentales perfundidos con un sistema de Langendorff.
  
2. Identificar el sistema de formación del NO, si es el constitutivo o el inducible.
  - a) Se midió la actividad de la sintasa del NO de las dos isoformas constitutiva e inducible
  - b) Se cuantificó la cantidad de las dos sintasas con anticuerpos específicos y por la técnica de Western blot.
  - c) Se cuantificaron los niveles del cofactor de la sintasa del NO, el NADPH.
  - d) Se midieron los niveles de GMPc como un indicador del efecto relajante del isoproterenol mediado por NO.

## I. MATERIAL Y MÉTODOS

**II.1. Tratamiento de los animales.**- En este trabajo se utilizaron ratas macho con un peso de 250 –300 g, mantenidas con agua y alimento *ad libitum*, y que se inyectaron vía sub-cutánea con una dosis de ISO de 67 mg/Kg de peso corporal, sacrificándose a los 30 min, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 hrs. después de la administración del compuesto. Cuando se usó el análogo de arginina NAME, éste se inyectó vía intraperitoneal a dosis de 10 mg/Kg 1, 6 y 10 horas antes del ISO. Los animales fueron destinados a tres tipos de estudios: fisiológicos, histológicos y bioquímicos.

### II. A. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

**II. A. 1 Parámetros hemodinámicos, electrocardiograma (ECG) y temperatura corporal .-** Para determinar estos parámetros se usó el método de telemetría en animales que se mantuvieron concientes y con libre movimiento en su jaula, usando un equipo Data Sciences International con un implante T1 11 M2-C50-PXT el cual se colocó previamente dentro del cuerpo del animal en forma quirúrgica para así monitorear presión sanguínea, sistólica y diastólica; ECG y temperatura. La presión sanguínea se midió gracias a un catéter transmisor situado a nivel de la bifurcación de la aorta y el ECG por medio de dos electrodos, uno colocado subcutáneamente en el hombro derecho y el otro en la pierna izquierda. A estos animales se les registró los parámetros a estudiar durante las 24 horas.

Como en todos los experimentos, se hicieron nuestras determinaciones en animales que recibieron una dosis de ISO de 67 mg/Kg, y se manejaron controles a los que se inyectó solución salina isotónica subcutáneamente . Además se integró un grupo de animales en los cuales se probó el efecto de L-NAME, que se administró vía I. P. en dosis de 10 mg/Kg una hora antes de iniciar el tratamiento con ISO, A todos los animales se les monitoreó continuamente por las 96 horas que duró el tratamiento, haciendo posible detectar todos los cambios que se pudieran presentar.

Por otro lado se hizo una curva dosis–respuesta para evidenciar el efecto del L-NAME sobre el cuadro producido con ISO.

### II. B. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Estos estudios se realizó por una colaboración del Dr. Aranda en el Instituto Nacional de Cardiología.

Los corazones de las ratas usadas para la obtención de suero fueron destinados para estudios histológicos. De cada corazón se hicieron cortes transversales para obtener rebanadas de cada una de las 3 secciones de interés: ápex, región media y base. Cada rebanada se fijó con amortiguador de formalina al 10 %, se embebió en parafina y se hicieron cortes de 4 µm de grosor los que se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricromo de Masson.

La cuantificación del daño se hizo usando microscopio de luz, considerando los tipos de daño: elongación, ondulación de las fibras y formación de lesiones de bandas contráctiles como características de estado de pre-infarto; necrosis coagulativa y fragmentación de fibras como representativa de daño por infarto y presencia de macrófagos , fibroblastos y fibras de colágena para relacionar el estado de post-infarto.

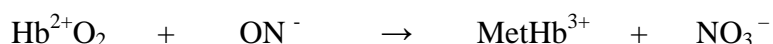
## II. C. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

### II. C. 1. Cuantificación de las enzimas de escape en el infarto del miocardio.-

Otro grupo de animales con el tratamiento NAME-ISO se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron de ellos muestras de suero en las que se midieron las enzimas deshidrogenasa láctica (LDH), transaminasa glutámico oxaloacética (TGO o AST), transaminasa glutámico pirúvica (TGP o ALT), creatina cinasa (CK), creatina cinasa en su fracción de cerebro y miocardio (CKMB) y OH-Butirato deshidrogenasa, usando reactivos comerciales. Las técnicas se fundamentan en la detección del aumento o la disminución en la absorbancia a 340 nm de longitud de onda, debido a la reducción u oxidación de los nicotín adenín dinucleótidos que se están produciendo o que se consumen, y que en estas reacciones actúan como co-enzimas.

**II. C. 2. Cuantificación de nitritos y nitratos.-** Se hizo usando el método de Griess (sulfanilamida 1% + N-N-Naftiletiléndiamina 1% en ácido fosfórico 5%) y se midió la absorbancia del producto a 550 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman (74). Para incluir a los nitratos en la determinación, se redujeron a nitritos con cadmio (75). Las muestras de suero primero se desproteinizaron con una solución de ZnSO<sub>4</sub> 30% y con los tejidos se obtuvo un extracto con ácido perclórico 6% el cual se neutralizó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> antes de realizar la determinación.

**II. C. 3. Oxido nítrico en perfusados de corazón.-** Los corazones fueron extraídos de ratas anestesiadas, las cuales habían sido tratadas con ISO durante los tiempos que se establecieron en el modelo, se les perfundió en un sistema de Lagendorf con una solución Krebs Ringer por 20 min. y un flujo 20 ml/min hasta la estabilización de la frecuencia cardíaca. Después se cambió el flujo a 10 ml/min para medir la producción de NO por la transformación de oxihemoglobina a metahemoglobina y su posterior determinación usando un espectrofotómetro de doble rayo. Se midió la absorbancia de la muestra en las longitudes de onda de 401 y 411 nm (76).



**II. C. 4. Cuantificación de las enzimas NOS<sub>c</sub> y NOS<sub>i</sub> :** se hizo usando el método de Western Blot. Se tomaron 50 µg de proteína de las diferentes fracciones subcelulares y se desnaturalizaron por calentamiento a 65 °C durante 15 min en buffer de corrida que contenía Tris/HCl 0.625 µM a pH 6.8, SDS 1%, glicerol 10% azul de bromofenol 0.001% y mercaptoetanol 1%, después se sometieron a un proceso de separación por electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida 10% de acuerdo al método de Laemmli (77). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un buffer compuesto por Tris 0.58%, glicina 0.019%, SDS 0.037% y 20% de metanol. A continuación se bloquearon los sitios de unión no específicos de las proteínas por espacio de una hora con PBS conteniendo 5% de leche descremada, tween 20 al 0.2%. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS por 10 min. Agitando suavemente, posteriormente se incubaron durante 12 horas a 4 grados centígrados en contacto con el

respectivo anticuerpo (anti NOSi o anti NOSc obtenido en conejo) a dilución 1: 1 000. Al terminar esta incubación se lavó 3 veces como se indicó anteriormente y se volvió a incubar ahora con un anticuerpo secundario (anti conejo obtenido en cabra) acoplado a fosfatasa alcalina a dilución 1: 10 000, nuevamente se dieron 3 lavados a la membrana. Las bandas del complejo proteína a cuantificar + anticuerpos, se visualizó al revelar con solución de azul de tetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (78).

**II. C. 5. Actividad enzimática de NOSc y NOSi.**- tanto en los homogenados como en las fracciones subcelulares obtenidas, se cuantificó la actividad de dos isoformas de la enzima NOS que se encuentran en el corazón. La actividad de la NOS se midió por la transformación del sustrato arginina-[H<sup>3</sup>] en citrulina-[H<sup>3</sup>] usando una mezcla de incubación que contenía HEPES 50 mM, DTT 1mM, L-arginina-HCl 10 μM, y L-arginina-HCl-[H<sup>3</sup>] 0.2 μCi, cuando se determinó la actividad de la NOSi; y se agregó CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, calmodulina 0.1 μM y BH<sub>4</sub> 30 μM para el caso de NOSc. La reacción se disparó por adición de 50 μg de proteína y se paró agregando un buffer HEPES 20 mM, EDTA 2mM y EGTA 2mM. La cantidad de arginina transformada en citrulina se mide por la cantidad de radiactividad (H<sup>3</sup>) en el líquido obtenido al eluir una columna empacada con la resina Dowex 50; la arginina que no se transforma queda retenida en la resina.

La actividad enzimática de las NOS corresponde al cociente del producto marcado entre el total de radiactividad en la muestra, multiplicado por la cantidad de sustrato (arginina) y relacionado a la cantidad de proteína usada en el ensayo y al tiempo de incubación (79, 80).

$$\text{Actividad } (\eta\text{moles}/\text{min}/\text{mg}) = \frac{(\text{cpm en citrulina} - \text{cpm en bco}) \times 1 \eta\text{mol}}{\text{Total de cpm} \times 30 \text{ min} \times 50\mu\text{g de P}}$$

**II. C. 6. Determinación de NADPH.**- primeramente se prepararon extractos de corazón en una solución alcohólica de KOH 0.5 N, después de neutralizarlos se cuantificó la coenzima en una mezcla de reacción que contenía dihidroxiacetona fosfato 20 mM, 2-oxoglutarato 0.1 M, cloruro de amonio 0.2 M, TEA 0.5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M con pH de 7.4 y las enzimas glicerofosfato deshidrogenada 0.1 U/ml y glutamato deshidrogenada 1U/ml. Se registró la disminución de absorbancia a 340 nm correspondiente a la desaparición de NADPH.

**II. C. 7. Cuantificación de los niveles de GMP cíclico.**- se realizó aplicando un método de radio inmuno ensayo, usando con un equipo comercial que produce la marca Amersham.

La determinación está basada en la competencia de GMPc no marcado (en la muestra) y una cantidad fija de GMPc -H<sup>3</sup>, por el anticuerpo anti-GMPc contenido en un suero en cual tiene una alta afinidad y especificidad por GMPc. La cantidad de GMPc-H<sup>3</sup> unido al anticuerpo es inversamente proporcional al GMPc contenido en la muestra problema.



Midiendo el anticuerpo unido se puede calcular el GMPc no marcado de la muestra. El GMPc que se unió al anticuerpo se separa del no unido precipitándolo con una solución sulfato de amonio y centrifugando enseguida. El precipitado, (que contiene el complejo de unión) se disuelve en agua y su actividad se determina en un contador de centelleo (82).

## **II. D. ANÁLISIS DE DATOS.**

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado, excepto en aquellos experimentos en que se graficó un experimento representativo como fué el caso de la cuantificación de proteína por Western Blot para las enzimas NOSc y NOSi. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. La significancia se evaluó usando la prueba ANOVA y se consideró un resultado como significativo cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## . RESULTADOS

### III. A. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

**III. A. 1. Efecto de ISO y L-NAME sobre los cambios de frecuencia cardiaca presión arterial inducidos por ISO.** - En el primer panel de la gráfica 1 (con cuadros vacíos) se puede apreciar el efecto de ISO incrementando la frecuencia cardiaca hasta 450 latidos/min partiendo de un valor de 270, y este efecto no se modifica por la administración de L-NAME. En los otros paneles se observa claramente el efecto hipotensor que causa el ISO sobre los animales sometidos al tratamiento con este  $\beta$ -agonista, la mayor disminución en la presión se presenta después de una hora de tratamiento, también se aprecia el efecto de L-NAME aumentando la P. sistólica (de 100 a 160 mm de Hg) manteniéndose este efecto por 6 horas (cuadros llenos). En el panel correspondiente a las gráficas de P. diastólica, esta baja de 105 a 67 mm de Hg en los animales tratados con ISO (símbolos vacíos), mientras que L-NAME evita esta disminución (símbolos llenos)..

**III. A. 2. Dosis-Respuesta del efecto de L-NAME sobre los cambios de presión arterial inducidos por ISO.** – El efecto de L-NAME en los animales tratados con ISO se exploró usando diferentes dosis de inhibidor de la NOS (1/10, 1/2, 1 y 10 veces la dosis de 10 mg/Kg de peso). En la gráfica 2 se muestran los valores de frec. cardiaca y presión sistólica detectados después de una hora de comenzado el tratamiento con ISO; en el eje de las abscisas de la gráfica se representó en una escala logarítmica las dosis de L-NAME, y se ve que hay una reversión gradual del efecto de ISO sobre la presión arterial causada por el incremento de dosis de L-NAME administrada. Se partió desde el valor mínimo de 65 mm de Hg, que se presenta en el animal tratado con el ISO, después con 1/10 de la dosis de L-NAME se tiene un aumento a 90 y cuando se dio 1/2 dosis, la presión sube hasta 117 y al final de esta subida llega hasta 130 mm de Hg al aplicar 10 mg /Kg. A los animales a los que se administró 10 veces la dosis, tan solo presentaron un aumento a 83, pero su estado general fue malo y murieron a las 6 h. La inhibición de la NOS por NAME evitando la formación de NO revirtió el efecto hipotensor de ISO en la etapa de pre-infarto e infarto y desapareció en el post-infarto.

**III. A. 3. Efecto de L-NAME en la duración de los cambios en la presión sistólica y frecuencia cardiaca inducida por ISO.**- La duración del efecto de ISO en los animales que recibieron las diferentes dosis de NAME se ilustra en la graf. 3; usando escala logarítmica en el eje de las abscisas para indicar las dosis usadas de L-NAME, se puede ver que cuando el animal se trató con ISO el efecto se mantuvo por 96 h en el caso de la presión y por 48 h en la frecuencia cardiaca, usando una dosis de 1 mg/Kg (1/10 de la original) el efecto se manifestó tan solo por 24 h en ambos casos y cuando la dosis administrada fue de 5 mg/Kg (1/2,) la acción de ISO solamente duró 12 h para la presión sistólica. Para la frec. cardiaca, se mantuvo la alteración durante 24 h y ya no se presentó cambio al aumentar la dosis a 10 mg/Kg (1) y se marca una bajada en la duración del efecto en las ratas inyectadas con 10 veces la dosis original, pero su sobrevivencia fue apenas de 7 h.

Atendiendo a los resultados obtenidos, el L-NAME disminuye en magnitud y duración la acción hipertensora del ISO.

### **III. B. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS**

Estos estudios se realizaron por una colaboración de personal del Instituto de Cardiología .

Las evaluaciones de las preparaciones histológicas de los corazones de animales tratados con ISO evidencian que existe una lesión semejante al infarto localizada en la región apical del ventrículo (tabla 1). Cuando la evaluación se hizo a los corazones de rata sometidas al tratamiento con el agonista  $\beta$ -adrenérgico, pero habiendo administrado L-NAME previamente, se vió que aunque la lesión se mantuvo localizada apicalmente, se extendió al subepicardio disminuyendo su intensidad. Las lesiones de pre-infarto se prolongaron, las de infarto se conservaron y las de postinfarto bajaron . Hubo además fenómenos isquémicos prolongados y las fibras dañadas aún cuando fueron iguales no se presentó la necrosis, por lo tanto se pudo comprobar la existencia de un factor de protección (tabla 1).

### **III. C. ESTUDIOS BIOQUIMICOS**

#### **III. C. 1. Cuantificación de la enzimas de escape en el infarto del miocardio.**

Cuando se determinó la actividad de las enzimas que se ven incrementadas en el infarto, como la LDH, TGO, TGP, CK, CKMB y la  $\alpha$ -OH BDH se encontró que al administrar L-NAME a los animales que posteriormente serían inyectados con ISO, estas actividades no alcanzan los niveles tan elevados como en los cuadros de infarto. La LDH no llega a tener el aumento espectacular de casi 10 veces, las CK, CKMB y  $\alpha$ -OH BDH no suben a los niveles obtenidos en el modelo de ISO o sea de un aumento de 110 a 220 U/l y de 22 a 50U/l respectivamente, por lo que se comprueba nuevamente que existe un factor de protección el tener el efecto inhibitorio de L-NAME sobre la NOS (tabla 2).

#### **III. C. 2. Nitritos + nitratos**

Los nitritos y nitratos son productos de oxidación del óxido nítrico y se consideran como un índice de su producción. Como primer intento de averiguar si el óxido nítrico se está produciendo en los organismos de nuestros animales tratados con ISO se midieron con el método de Griess los niveles de nitritos y nitratos en el homogenado y tres fracciones subcelulares, los valores se concentraron en un solo esquema (graf. 4) para hacer más fácil su apreciación. Se encontró que existe una primera elevación entre la  $\frac{1}{2}$  y 1 hr de tratamiento en casi todas las fracciones (etapa de pre-infarto), donde se hace más notoria es en las membranas; más tarde, alrededor de las 12 y 24 hrs se presenta otro aumento que se destaca en el homogenado total, plasmalema y sarcolema; y corresponde al periodo de

infarto. En las horas posteriores, o sea en el periodo de post-infarto, se distingue una etapa de estabilización con niveles bajos de nitritos y nitratos.

### **III. C. 3. Oxido nítrico generado por corazones perfundidos**

Se perfundieron cada uno de los corazones de las ratas tratadas con ISO a los tiempos ya convenidos en un sistema Lagendorff, y se determinó la cantidad de NO generado, midiendo la transformación de la metahemoglobina a oxihemoglobina. Se encontró una tendencia muy semejante entre el sistema de determinación usado en animal íntegro, y evaluando el NO mediante la cuantificación de nitritos y nitratos con el Met. de Griess, aunque por supuesto los niveles son diferentes y al cuantificar los nitritos y nitratos se mide el NO presente y que se oxidó a estos productos.

Los corazones generaron mayor cantidad de NO desde la ½ h de inyectado el ISO y se apreció un máximo de NO producido a las 6 y 12 horas de tratamiento; ya a las 24 y hasta las 96 horas hubo una caída de los niveles del mismo (graf.5).

### **III. C. 4. Oxido nítrico sintasa (NOS)**

La NOS fue medida en dos de sus isoformas, la forma constitutiva (No. 3), y la forma inducible o número 2. Estas enzimas se midieron tanto en cantidad de proteína por el método de Western Blot, como por su actividad, cuantificando la marca de  $H^3$  en la citrulina producida y que no se retiene en la resina Dowex. Ambas enzimas se midieron en las diferentes fracciones subcelulares de los corazones extraídos de los animales tratados con ISO.

Tanto la actividad de las enzimas como la cantidad de proteína de las enzimas NOS<sub>c</sub> y NOS<sub>i</sub> se determinaron en el homogenado total, en el citosol y en la fracción membranal (plasmalema) ya que el homogenado nos da una idea global del comportamiento de las enzimas y el citosol y membranas son los sitios donde se encuentran la NOS<sub>i</sub> y la NOS<sub>c</sub> respectivamente; aunque pudieran presentarse movimientos de ellas o bien contaminaciones en otras fracciones.

#### **NOS<sub>c</sub>**

Actividad enzimática.- En el primer panel de la gráfica 6 se muestra la actividad de la NOS<sub>c</sub> medida en el homogenado de corazón, existe una elevación gradual durante el periodo de preinfarto ( ½ - 6 h) después se mantiene constantemente elevada y al final del tratamiento de nuevo presenta una elevación. En el citosol la enzima presenta cambios dirigidos a la disminución de actividad y en el plasmalema se mantiene casi constante presentando un pico en la etapa en que comienza el infarto.

Cantidad de enzima.- Al cuantificar la proteína NOS<sub>c</sub> encontramos en el homogenado poca variación aunque se puede ver aumentos a las 6 h de la inyección de ISO; el citosol muestra una insignificante cantidad de proteína, por lo que no se graficó, y la fracción del plasmalema presenta aumentos a las 3, 12, 24 y 72 h (graf. 7).

## NOSi

Actividad enzimática.- En la gráfica 8 se muestra la actividad de la enzima en las fracciones subcelulares obtenidas del corazón de los animales tratados con ISO, aquí se aprecia un aumento sostenido en el homogenado a partir de la ½ hora de tratamiento y se mantiene a lo largo de la evolución del infarto, hasta las 96 hrs.; en el citosol, el incremento fue más notable a partir de 1 h de tratamiento, al igual que en las membranas donde se observa aumento marcado en la actividad después de ½ h de la administración del fármaco.

Cantidad de enzima.- La graf. 9 muestra la cantidad de proteína de NOSi expresada como unidades relativas de densidad, ya que se midió la intensidad de las bandas de la proteína correspondientes al peso molecular de la Enzima en la membrana de nitrocelulosa. En forma similar a lo que ocurre con la actividad, se observa en el homogenado un aumento sostenido en la proteína desde la primera hora de la administración de ISO. En el citosol no fue tan evidente, pero se puede ver muy claro que en esta fracción existe un máximo de actividad a las 48 h; sin embargo en la fracción correspondiente a las membranas no es posible ver la presencia de la proteína NOSi .

Adicionalmente se cuantificó la cantidad de proteína NOSi en aorta y corazón a tiempos cortos (graf.10). Se encontró que la enzima presenta un aumento en la aorta a de 1 h de comenzado el tratamiento con ISO; contrariamente, en el corazón se apreció una elevación rápida de la cantidad de proteína (desde los 10 min), aunque no parece sostenerse pues, disminuye y luego parece volver a incrementarse a la hora, sin que alcance el nivel que tuvo a los 10 min.

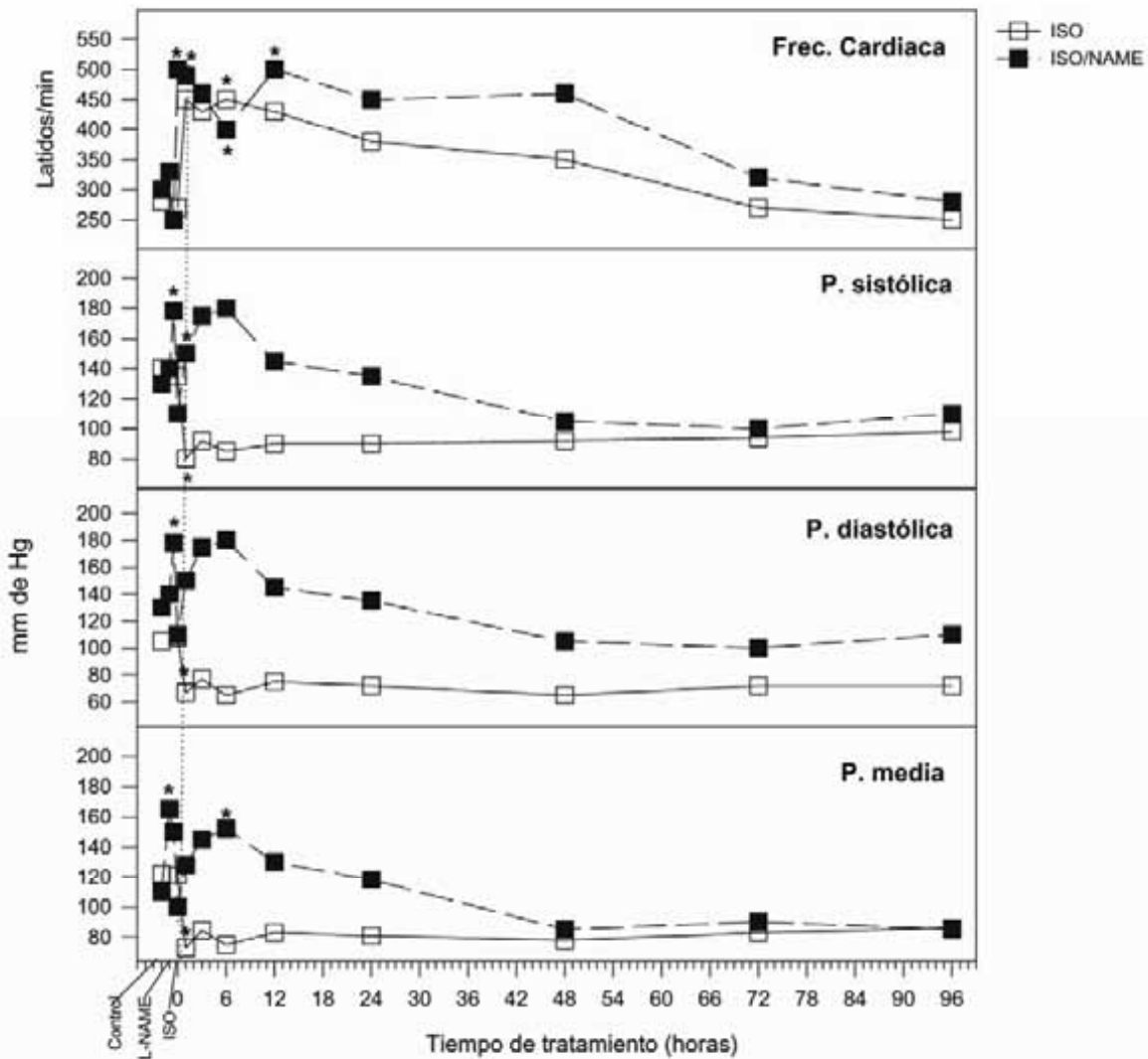
### **III. C. 5. Determinación de NADPH**

Esta co-enzima se determinó en homogenados de tejido y no se detectó cambios significativos en los niveles, excepto que se encontró elevada a las 3 h posteriores al inicio del tratamiento con ISO y a las 96 horas del mismo (graf. 11). Posiblemente no se encuentren cambios en la cantidad de NADPH ya que al utilizarla en la reacción enzimática que genera el NO, esta coenzima se oxida.

### **III. C. 6. Cuantificación de los niveles de GMP cíclico**

Se buscó evaluar la cantidad de GMPc tanto en plasma como en homogenados de corazón, ya que la mayoría de los vasodilatadores lo incrementan y se le ha implicado como efector .

En la gráfica 12 se aprecia que el GMPc en el tejido cardiaco, aumenta después de una hora de tratamiento con ISO llegando a alcanzar el valor mas elevado cuando han pasado 6 horas de la inyección. Más tarde baja y llega a mantener un nivel constante a partir de las 48 horas. Cuando se cuantificó GMPc en plasma, se observó un incremento a partir de la hora posterior a la administración del fármaco, y a las 24 h este aumento se hizo muy notorio y al igual que en el tejido hay una estabilización de las 48 h en adelante.

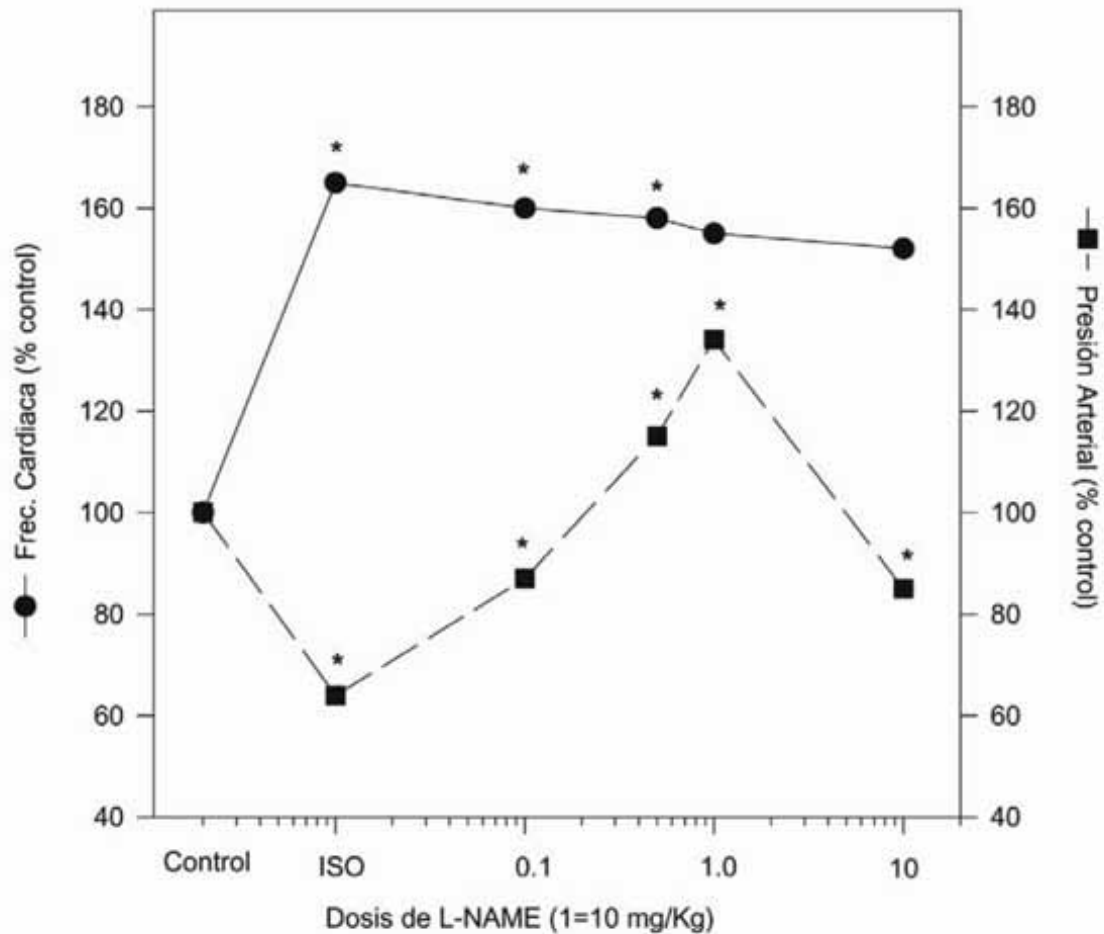


**Gráfica 1. Efecto de L-NAME sobre ratas tratadas con ISO.** El primer p nel muestra la drástica elevación de la FC desde el momento en que se administró ISO a los animales, este efecto no se vió modificado por el inhibidor de NOS, L-NAME .

Los p neles restantes muestran el efecto hipotensor de ISO y como L-NAME evitó la caida de la presión a lo largo del tratamiento.

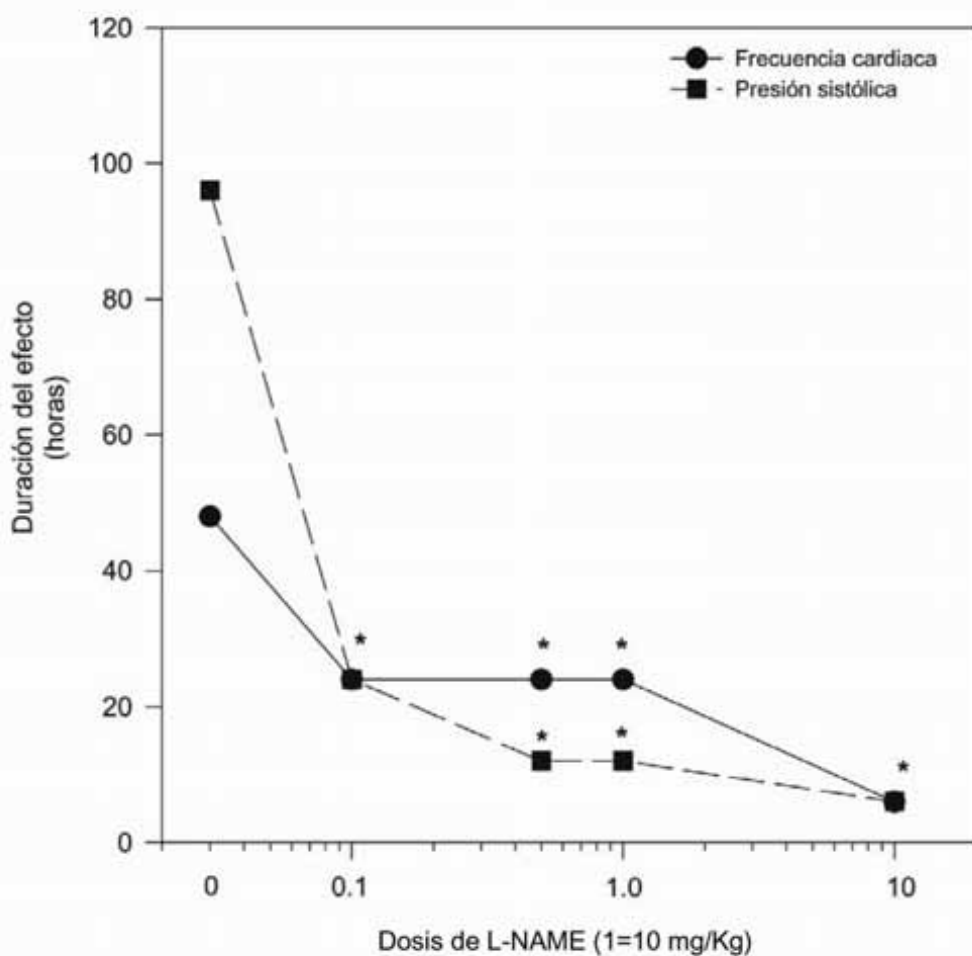
\*  $p < 0.005$  control v.s. grupo ISO  $n=5$

\*  $p < 0.002$  grupo ISO v.s. grupo L-NAME  $n=5$



**Grafica 2. Dosis-Respuesta del efecto de L-NAME sobre los cambios de presión inducidos por ISO.** El aumento en la FC que causó ISO no se ve modificado por L-NAME ninguna de las dosis probadas, a diferencia del efecto que se apreció en la disminución de la P. sistólica, L-NAME evitó la acción hipotensora de ISO en todas las dosis probadas. Los puntos Control e ISO se fijaron arbitrariamente y no corresponden a los valores de la escala.

\*  $p < 0.002$  Control v.s. grupo ISO  
 \*  $p < 0.002$  grupo ISO v.s. L-NAME  
 n=5



**Grafica 3. Efecto de L-NAME en la duración de los cambios de presión sistólica y frecuencia cardiaca inducidos por ISO.** L-NAME produjo una franca disminución en la permanencia del efecto de ISO sobre la P. sist. y la F. C. desde la dosis más baja de 1/10. El eje de las abscisas indica en escala logarítmica la dosis de L-NAME, colocando arbitrariamente el valor de cero en el punto correspondiente al efecto de ISO sin el inhibidor. La significancia estadística se calculó comparando el valor del control (efecto de ISO) con los grupos de animales que recibieron L-NAME

\* $p < 0.005$  con  $n=5$



**Tiempo de tratamiento con ISO  
(horas)**

**Tiempo de tratamiento con ISO-L-NAME  
(horas)**

Tipo de daño	3	6	12	24	48	72	96		3	6	12	24	48	72	96
<b>Elongación y ondulación de la fibra</b>	+++	++	+	-	-	+	+		++	++	+++	++	+	-	-
<b>Necrosis por bandas</b>	+	+++	++	+	-	-	-		++	+	++	+++	+	+	++
<b>Necrosis coagulativa</b>	-	-	+	++	-	-	-		-	+/-	+	++	+	-	-
<b>Fragmentación de Miofibrillas</b>	-	-	-	+	++	-	-		-	-	+/-	+	++	++	-
<b>Polimorfonucleares</b>	-	+	++	+++	+	-	-		-	-	+	++	+	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	+	+++	++	+		-	-	-	+	++	++	+
<b>Fibroblastos y colágena</b>	-	-	-	-	+	++	+++		-	-	-	+	++	+++	++
<b>Edema</b>	-	+	++	+++	++	+	-		+	+	+++	++	+	-	+/-

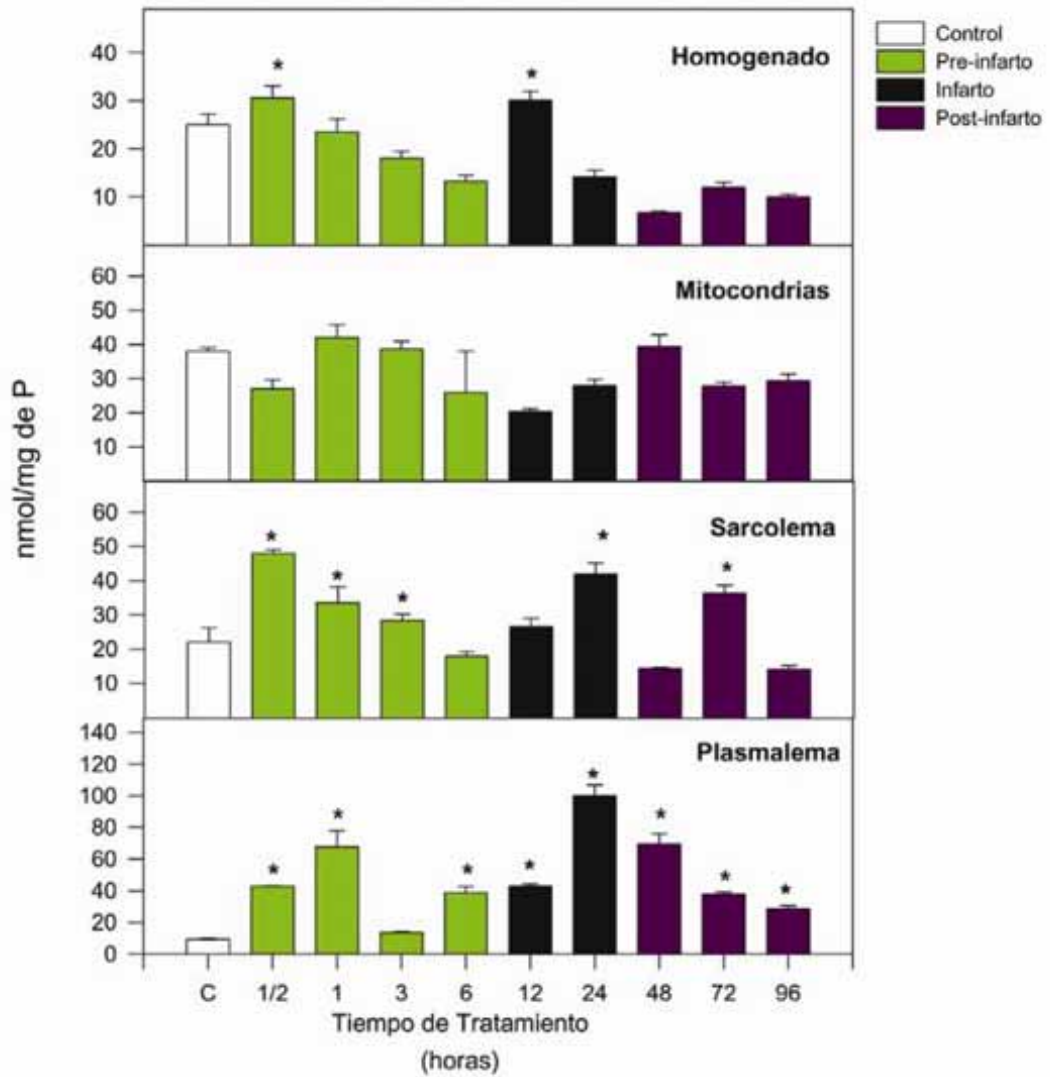
Observaciones realizadas por el Dr. Aranda INC.

**Tabla 1. Efecto de L-NAME en la lesión cardiaca producida por ISO.** En esta tabla se muestra (en la sección de la izquierda) la evaluación del daño en la sección apical del ventrículo izquierdo en los corazones de ratas que se sometieron al tratamiento con ISO . en la parte derecha de la tabla se registró la valoración de los 8 parámetros a los cortes de corazones de rata sometidas a tratamiento con ISO que además recibieron la inyección del inhibidor de NOS, el L-NAME 1 h antes de ISO . Aunque la lesión siguió localizada en la zona apical y se extendió a la región subepicárdica disminuyó su intensidad. Las lesiones de pre-infarto se prolongaron, las de infarto se conservaron y las de post-infarto bajaron.

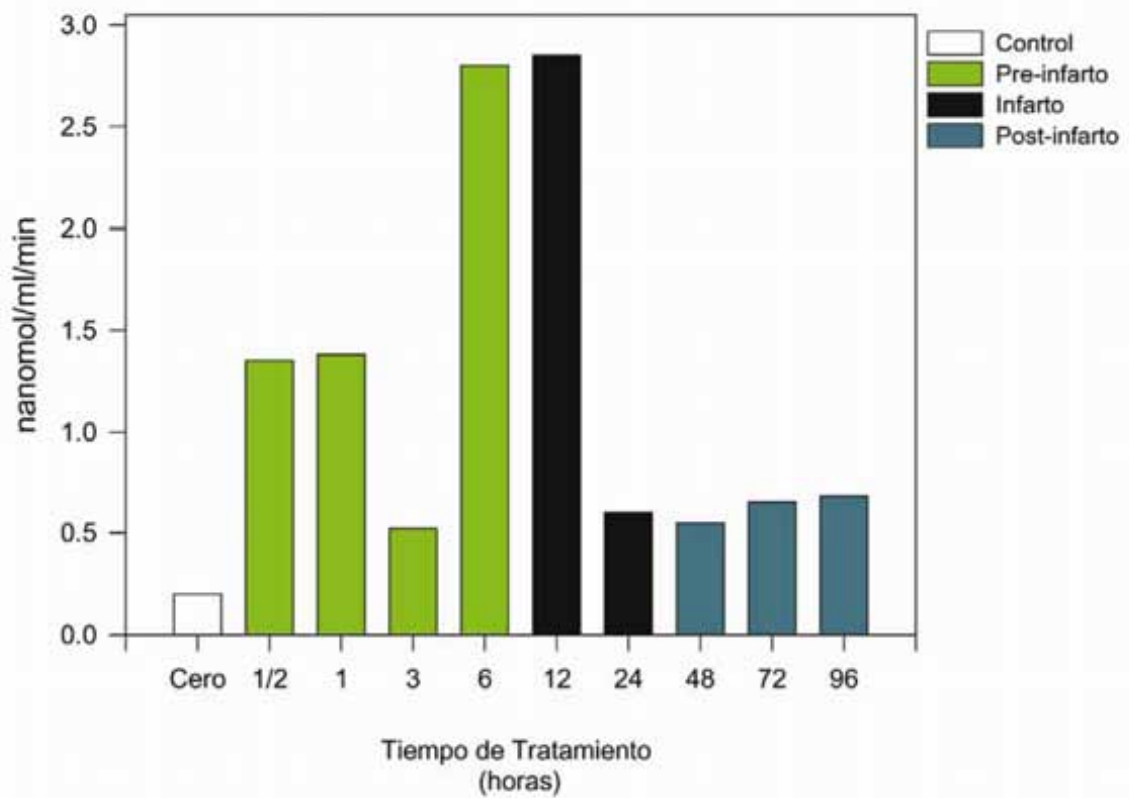
<b>Enzimas</b>	<b>Sin tratamiento μmol/min/l o U/l</b>	<b>Isoproterenol μmol/min/l o U/l</b>	<b>ISO-NAME μmol/min/l o U/l</b>
<b>C K</b>	110 ± 9.2	220 ± 23 p<.0.005	80 ± 2.4 p< 0.001
<b>CK MB</b>	104 ± 6.5	389 ± 50.0 p< 0.001	160.0 ± 3.5 p< 0.005
<b>α- HBDH</b>	22 ± 1.9	50 ± 8.0 p<0.01	44.0 ± 3.9 p<0.5
<b>AST</b>	110 ± 7.0	260 ± 16.8 p<0.001	220.0 ± 10.0 p< 0.1
<b>LDH</b>	120. ± 5.6	1 180.0 ± 13.0 p< 0.001	102.0 ± 2.0 p< 0.001

**Tabla 2. Efecto de Isoproterenol y L-NAME sobre las enzimas marcadoras en la lesión cardíaca.** En esta tabla se muestra la actividad promedio de cada enzima en suero de 5 ratas (n=5) y corresponde al máximo observado a las 12 horas de tratamiento (periodo de infarto).

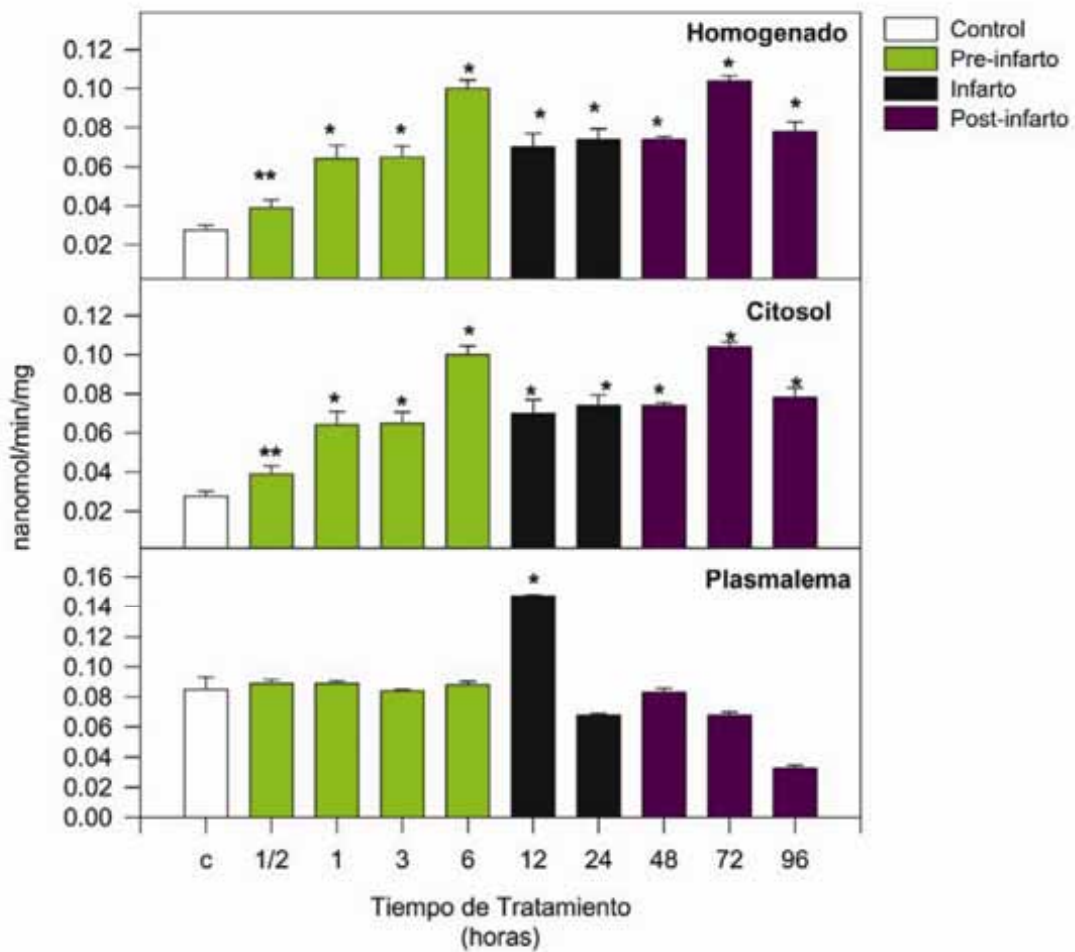
La significancia **p** en cada celda de la columna marcada con Isoproterenol corresponde a la comparación del grupo control (sin tratamiento) v.s. ISO; y **p** en la columna ISO-NAME compara el tratamiento de ISO v.s. ISO-L-NAME



**Grafica 4. NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> en fracciones subcelulares.** Los nitritos y nitratos se exploraron como índice de producción de NO y se encontró que homogenado existían aumentos significativos a 1/2h del tratamiento con ISO y en el periodo de infarto, a las 6 h. En el sarcolema se presentaron elevaciones significativas a 1/2, 1, 3, 24 y 72 h y en el plasmalema se registraron aumentos durante toda la sobrevivencia de los animales. Se comparó el valor control v.s. con los tiempos marcados con asteriscos de tal forma que: \*p < 0.002, n=5



Grafica 5. NO Generado en el perfusado de corazones de rata. En esta gráfica se muestran los resultados obtenidos al cuantificar NO en el líquido de perfusión de corazones de animales tratados con ISO. En esta gráfica cada tiempo muestra el resultado de un experimento representativo (flujo 10 ml /min).

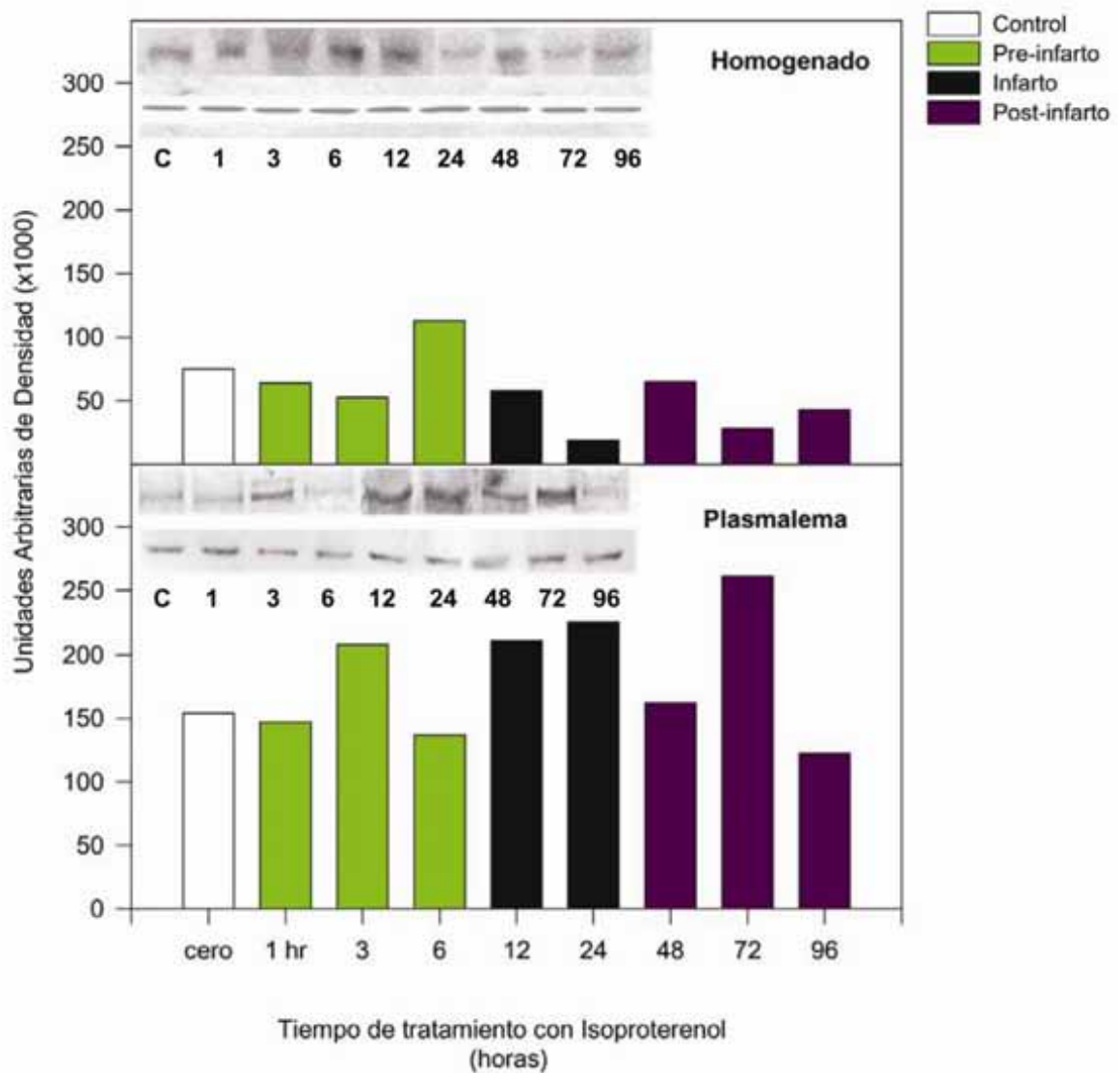


**Grafica 6. Actividad de la enzima NOSc en corazones de ratas tratadas con ISO.** El primer p nel muestra una elevaci3n gradual en el homogenado a lo largo del tratamiento con ISO, esto mismo se present3 en la fracci3n citos3lica y en el plasmalema

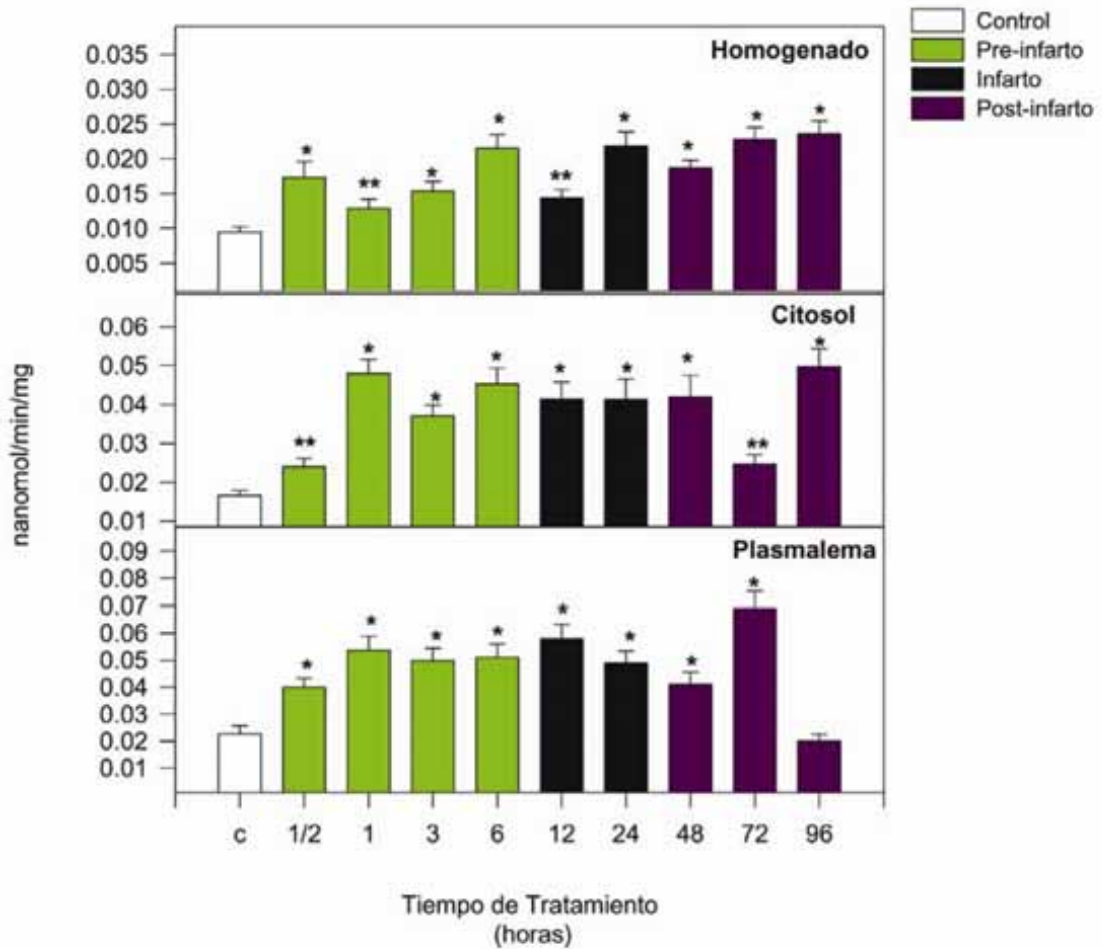
\*  $p < 0.001$  control v.s. tratadas

\*\*  $p < 0.002$  control v.s. tratadas

n=5

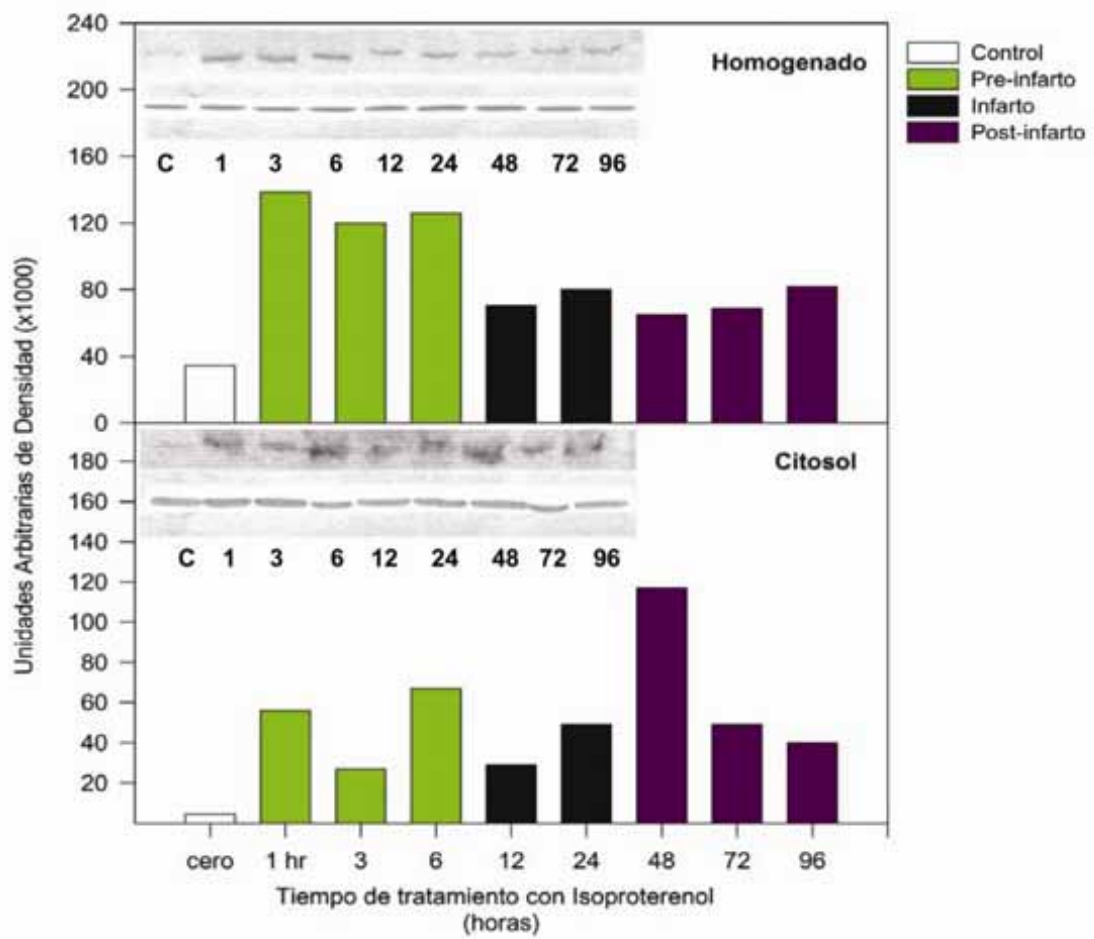


**Gráfica 7. Cantidad de proteína NOSc en corazón de ratas tratadas con ISO.** En el p nel correspondiente al homogenado se halló poca variación en la NOSc presentándose un aumento a las 6 h del tratamiento, a diferencia de los que se presentaron en el plasmalema a las 3, 12, 24 y 72 h. El citosol no se graficó por que las cantidades de proteína fueron demasiado pequeñas. Esta gráfica corresponde a un experimento representativo por lo cual no se d  valor de p



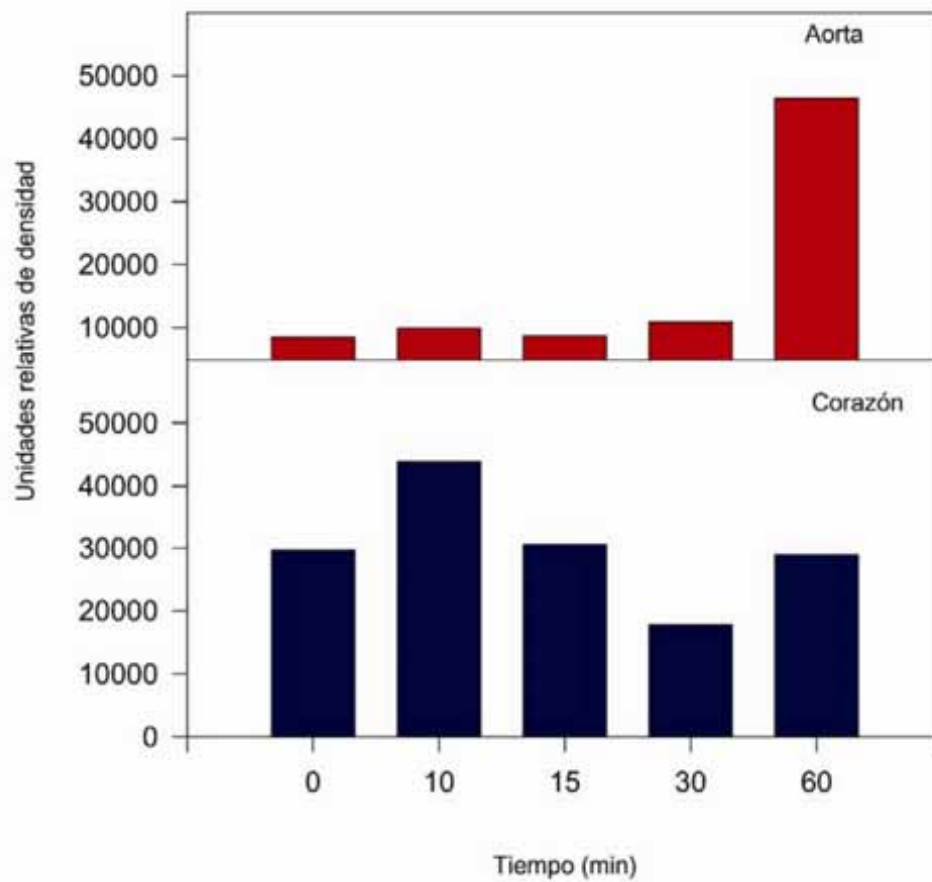
Gráfica 8. **Actividad de la enzima NOSi en corazón de ratas tratadas con ISO.** Tanto en el homogenado como en las fracciones subcelulares citosol y plasmalema se encontró la actividad de NOSi aumentada desde 1/2 h de tratamiento y hasta el último tiempo explorado (96h).

\*  $p < 0.001$  control v.s. tratadas  
 \*\*  $p < 0.002$  control v.s. tratadas  
 n=5

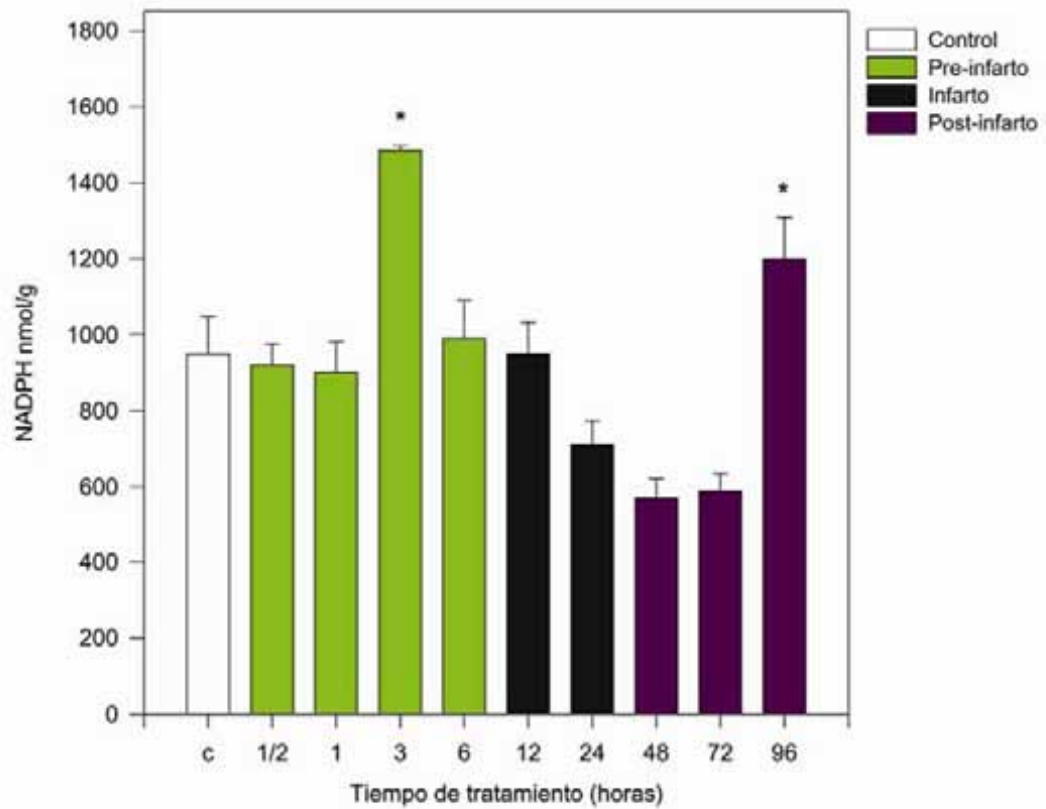


**Grafica 9. Cantidad de la enzima NOS1 en corazón de rata tratada con ISO.** La cantidad de proteína correspondiente a la enzima NOS1 se halló muy incrementada en el homogenado del corazón desde el inicio del tratamiento con ISO.



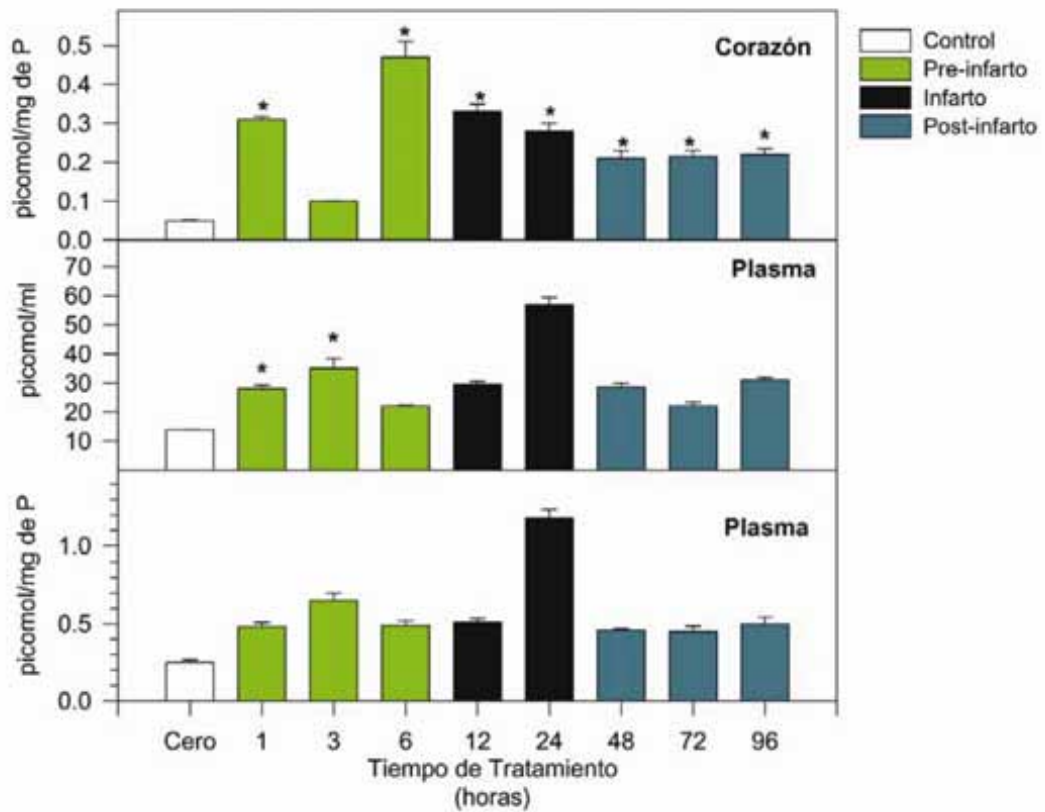


**Gráfica 10. Cuantificación de proteína NOSi en aorta y corazón a tiempos cortos.** Se cuantificó NOSi explorando tiempos muy cortos y se encontró un aumento muy marcado en la aorta a la hora de comenzado en tratamiento con ISO, en el corazón se vió unaumento temprano a los 10 min de comoenzado el tratamiento, pero que no se sostuvo.



**Grafica 11. NADPH en homogenado de corazón.** La cuantificación de la coenzima utilizada en la reacción de síntesis de NO solamente presenta 2 elevaciones a lo largo de todo el tratamiento a las 3 h (preinfarto) y a las 96 h (post-infarto).

\*  $p < .001$  control v.s. tratadas  
 n=5



**Grafica 12. GMPc en rata tratadas con Isoproterenol en corazón y plasma.** GMPc aumentó significativamente después de 1 h del tratamiento con ISO llegando a un máximo a las 6 h (preinfarto) en el corazón y de 24 h en plasma.

\*  $p < 0.001$  control v.s. tratados

\*\*  $p < 0.002$  control v.s. tratados

n=5

## IV. DISCUSIÓN

El infarto al miocardio es una de las causas más comunes de mortalidad que ha disminuído por los avances de la tecnología y la disponibilidad de nuevas terapias (4,5) sin embargo no se conocen a fondo los eventos celulares y moleculares que lo desencadenan.

En humanos es difícil investigarlo, pero los modelos experimentales son de gran utilidad para este tipo de interrogantes. El infarto se define como un área de necrosis tisular causada por una disminución en el aporte de sangre por oclusión de la arteria responsable de su irrigación produciendo una isquemia parcial o total. Uno de los modelos experimentales más usados es el inducido por la oclusión de la arteria coronaria generándose una isquemia inmediata, entre el proceso quirúrgico para ligar la arteria y la recuperación del animal, ocurren eventos que son difíciles de monitorear. El modelo experimental de infarto del miocardio inducido por isoproterenol presenta importantes ventajas, como es el hecho de que no hay intervención quirúrgica, sino que una simple administración subcutánea del isoproterenol induce un infarto al miocardio a las 12 horas de haberlo administrado facilitando así el estudio de eventos que ocurren en esas primeras 12 horas que llamamos preinfarto, el infarto propiamente ocurre entre 12 y 24 h y nos permite ajustar la dosis de tal manera que el infarto no sea de consecuencia mortales y nos permita estudiar la etapa de postinfarto hasta las 96 h.

Estudios previos del laboratorio (72) nos han permitido caracterizar este modelo en las tres etapas de preinfarto, infarto y postinfarto desde el punto de vista histológico; bioquímico, cuantificando las enzimas marcadoras de infarto al miocardio y fisiológicas midiendo, parámetros hemodinámicos frecuencia cardiaca, presión arterial electrocardiograma y conducción auriculoventricular, de tal manera que a través de estos estudios se definió la presencia del infarto al miocardio en la parte apical del corazón a las 12 h de la administración de isoproterenol originado probablemente por el efecto hipotensor del compuesto que induce una hipoxia funcional y lleva a un IM a este tiempo.

Un antecedente muy importante de este trabajo sobre el papel del NO en el IM inducido con isoproterenol, fue el hecho del claro efecto del agonista  $\beta$  disminuyendo de forma casi inmediata, (3 minutos después de su administración) la presión arterial y aumentando en forma importante la frecuencia cardiaca. Conociendo el papel regulador del NO sobre el tono vascular descrito por Moncada (20), usamos un análogo de arginina L-NAME, el cual inhibe la formación de NO; al medir el efecto hipotensor del ISO se observó que duraba tan solo 1 h, mientras que en ausencia de NAME se mantiene por 6h; aparte, no se registró disminución en la presión dentro de las 12h posteriores a la administración del ISO, aunque se detectaron discretas bajas después de las 24h. Llamó la atención que la administración del L-NAME no afectó el aumento de la frecuencia cardiaca inducida por ISO. Estos resultados de disminución del efecto hipotensor de la droga, sugerían que la hipoxia funcional era de menor magnitud existiendo la posibilidad de que el IM fuera de menor tamaño.

Lo anterior se comprobó histológicamente, ya que se vió que el IM era de menor magnitud (Tabla 1), que las enzimas de escape marcadoras de daño al miocardio CK, CK MB, LDH disminuían de manera importante (Tabla 2), en el grupo tratado con L-NAME; datos que en conjunto nos demostraban que el NO, participaba de manera

importante en la inducción del IM en presencia del isoproterenol ya que al inhibir su formación se reducía la magnitud del IM.

### **Preinfarto**

Durante esta etapa se observa una disminución importante de la síntesis de ATP y de la función mitocondrial, modificaciones importantes en la dinámica de  $\text{Ca}^{+2}$  aumentando los niveles de calcio en las mitocondrias y en los microsomas y un aumento de ión superóxido generado por oxidación del adrenocromo producto de oxidación del ISO y/o la xantina oxidasa (72, 83).

Comentaré sobre los cambios observados en la cantidad de NO, su formación y acción en la etapa previa al infarto. Al medir los niveles de NO liberado de los corazones perfundidos con y sin tratamiento con ISO (Fig 5), podemos ver el incremento de 6 veces en la liberación de NO desde los 30 minutos de su administración, incrementando hasta 13 veces antes del IM. Al medirlo en las distintas fracciones subcelulares y homogenado total; en el plasmalema y el sarcolema (Fig 4) se detectaron incrementos en los productos de oxidación del NO, (Fig 4) de menor magnitud, explicable si consideramos que el NO es una molécula pequeña que difunde fácilmente, esto lo comprobamos al medir los niveles de nitritos y nitratos en plasma de los animales experimentales, encontrando un aumento importante de 7 y 4 veces en los niveles de nitritos y nitratos circulantes a los 10 y 15 minutos de la administración del ISO. Al medir la actividad de la NOSc en las distintas fracciones, solo en homogenado total pudimos encontrar un aumento de tres veces en la actividad de la NOSc (medida en presencia de calcio) (Fig 6) a las 3 h de tratamiento y un pequeño incremento de 50% en la cantidad de la enzima; es posible que estos incrementos estén relacionados con la activación de la NO sintasa constitutiva por el ISO (44, 72). Cuando se evaluó la actividad de NOSi, observamos incrementos en la actividad de la enzima desde los 30 minutos hasta antes del infarto en todas las fracciones (Fig 8) y como podríamos esperar, estos aumentos en actividad van acompañados de un aumento en la expresión de la NOSi. Los niveles de coenzima NADPH de la NOS no fue factor limitante, se mantuvo constante y un incremento del 50% se detectó a las 3h del tratamiento. La vasodilatación y consecuente relajación de las células del músculo liso, está mediada por la formación del GMPc que inicia la vía de señalización la cual estimulan las bombas iónicas, favoreciendo la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la desensibilización de las miofibrillas promoviendo así una distensión de las fibras cardiacas (84). Un hallazgo inesperado fue el incremento de los niveles de GMPc en plasma a lo largo de la etapa de preinfarto, pudiendo considerarse como un posible marcador de esta etapa. En conjunto los resultados obtenidos durante la etapa de preinfarto nos comprueban el papel tan importante que desempeña el NO formado principalmente por la forma inducible de NOS, cuya expresión se ve aumentada, y una pequeña parte, por activación de la NOSc; que estos cambios son los principales responsables del marcado efecto hipotensor del ISO y también responsable en gran parte del IM inducido por el ISO. Por otra parte, el aumento de NO en esta etapa, coincide con un incremento en la formación del anión superóxido pudiendo formarse peroxinitritos que son especies oxidantes muy poderosas que pueden dañar las proteínas (83) participantes en la dinámica de calcio.

## **Infarto**

Como se comentó previamente el infarto ocurre 12 horas después de la administración del ISO independientemente de la comprobación histológica, bioquímica y fisiológica. En esta etapa la función mitocondrial está muy dañada y se observa la máxima disminución de ATP, el  $\text{Ca}^{2+}$  continúa elevado, se observa incremento de la respuesta inflamatoria (Tabla 1) y el máximo estrés oxidativo (83). El NO generado en corazón perfundido a las 12 h de tratamiento con ISO continúa elevado hasta 9 veces el control, pero a las 24h disminuye marcadamente; al cuantificarlo en las fracciones subcelulares se encuentra disminuído a las 12h y aumentado a las 24h. La actividad de la NOS<sub>c</sub> se eleva a las 12h, posiblemente está activada por las condiciones metabólicas existente como puede ser el estrés oxidativo, ya que la cantidad de la enzima no cambia. La NOS<sub>i</sub> mantiene su actividad elevada como se observó en el preinfarto, pero con disminución de la cantidad de enzima. Los niveles de GMPc disminuyeron en relación a los encontrados en el preinfarto, pero están elevados en relación al control; el aumento consecuente de la vía de señalización afecta la función del miocito a través de fosforilación del fosfolamban, que a su vez regula la actividad de SERCA. (38, 83). De manera importante el nivel de GMPc en plasma se eleva marcadamente a las 24h. En esta etapa crucial de daño al miocardio, el NO puede participar a través de aumentar los niveles de GMPc y regular la actividad del miocito o en el daño a las proteínas del plasmalema, que es máximo en esta etapa (82).

## **Postinfarto**

Este periodo comprende entre las 48h y el fin del seguimiento del tratamiento (96h) y representa el esfuerzo del sistema para recuperarse de los retos fisiológicos y bioquímicos asociados con la iniciación y desarrollo del IM. En esta etapa, se observa una disminución de la inflamación, y se inicia el proceso de cicatrización, observándose una recuperación parcial de la carga energética, del potencial de membrana (72), no se recupera la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ , y persiste la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (83). La liberación de NO en corazón perfundido disminuye notablemente, aunque se observa un incremento 2 a 3 veces el control en las fracciones subcelulares, también se observa una menor formación de nitritos y nitratos. La actividad de la NOS<sub>i</sub> y NOS<sub>c</sub> va disminuyendo muy lentamente, lo mismo los niveles de GMPc. Tal parece que los efectos mediados por NO también disminuyen aunque no desaparecen, y posiblemente interfieran en la etapa de remodelación postinfarto, favoreciendo la hipertrofia cardiaca observada un mes después del infarto.

## V. CONCLUSIONES

1. El NO participa de manera importante en la instalación y progresión del IM inducido por ISO. Ésto se demostró claramente con los experimentos realizados en presencia de NAME como inhibidor de la síntesis de NO; en los que se observa menor daño en el infarto, disminución del proceso inflamatorio y disminución del efecto hipotensor del agonista beta.
2. El NO juega un papel determinante en el efecto hipotensor del ISO, el cual resulta en una hipoperfusión, que en función del tiempo desencadena el infarto.
3. El aumento de la frecuencia cardiaca también es importante en el desarrollo del IM aumentando el desbalance energético y talvez esté mediado por la sobrecarga de calcio y no directamente por el NO, ya que este proceso no disminuye en presencia de NAME.
4. Se hizo patente el efecto regulador de la NOSc por ISO.
5. El incremento de GMPc mediado por el NO, también fue importante en la relajación de las fibras cardiacas y en la posibilidad de usarlo como marcador de daño cardiaco mediado por NO en plasma.
6. Este estudio aporta información importante de la participación del NO en los eventos moleculares que inducen y tienen lugar en el IM, y permite añadir más información en el proceso de caracterización de este modelo experimental, ya que puede orientar al diseño de posibles terapias para disminuir, y prevenir el daño del infarto

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. León Weiss with 35 contributors. Cell and Tissue Biology. A textbook of Histology Sixth Edition. Urban and Schwarzenberg. Baltimore and Munich. Pags.355-363.
2. Testut L. y Latarjet A. Compendio de Anatomía Descriptiva. Salvat Editores. Pags. 240 –255. 1970.
3. Robbins Pathologic Basis of Disease. Six Edition W. B. Saunders Company pags.: 494- 498).
4. Tunstall-Pedoe, H. K., Kuulasmaa, K., Amouyel, P., Aerveiler, D., Rajakangas, A. M., and Pajak, A., Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Circulation. 90: 583-612. 1994.
5. Wittels, E. H., Hay, J. W., and Gotto, A. M. Medical cost of coronary disease in the United States. Am. J. Cardiol. 65: 432-440. 1990.
6. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. Principios de Bioquímica. Segunda Edición. Ediciones Omega. Pag. 514 . 1995
7. Correa Pelayo, Arias-Stella Javier, Pérez Tamayo Ruy y Carbonell Luis M. Texto de Patología . La Prensa Médica Mexicana. Pags. 335-336. 1970
8. García-Sáinz J. A. Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. La Ciencia desde México. Fondo de cultura económica.
9. Goodman Gilman Alfred, Rall Theodore W., Nies Alan S. y Taylor Palmer. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Octava edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 198-200 y 209-210. 1991.
10. Berrazueta, J. R., López Jaramillo P. y Moncada S. “El óxido nítrico: de vasodilatador endógeno a mediador endógeno” Revista Española de Cardiología 43: 421-431. 1990.
11. Brunton T. L., Use of nitrite of amyl in angina pectoris. Lancet. 2: 97-98. 1867.
12. Murrel W. Nitroglicerine as a remedy for angina pectoris. Lancet. 1: 97-98. 1879.
13. Krantz J. C. Jr., Forman S. E., Cone N. Mechanism and action of organic nitrates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 70: 523-527.1940.
14. Schultz K. D., Schultz K., Schultz G. Sodium nitroprussiate and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferents. Nature 265:750-751. 1977.



15. Katsuki S., Arnold W, Mittal C., Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprussiate , nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison of the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleo. Res.* 3: 23-25. 1977.
16. Murrad F., Mittal C. K., Arnold W. P. Katsuki S., Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radicals and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucleo Res.* 9: 145-158. 1978.
17. Kukovetz W. K., Holzmann S., Poch B. Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary a smooth muscle. *Naunyn Schm. Arch. Pharmacol.* 310: 129-138. 1979.
18. Feelisch M., Noack E. A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J.Pharmacol.* 139: 19-30. 1987.
19. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetyl choline. *Nature* 288:373-376. 1980.
20. Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-526. 1987.
21. Palmer R. M. J., Ashton D. S. , Moncada S. Vascular endotelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333: 664-666. 1988.
22. Ignarro L. J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30. 535-560. 1990. Kröncke Klaus-D, Fehsel Karin and Kolb-Bachofen Victoria. Nitric Oxide: Citotoxicity versus Cytoprotection . How, Why, and Where?. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* Vo. 1, No. 2 , April, pp 107-120. 1997.
23. Moncada S., Palmer, R. M. J., and Hibbs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43. 109-142. 1991.
24. Garthwaite John. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends in Neurosciences.* Vol. 14.Issue 2: 60-67. Feb. 1991.
25. Lowestein Charles J. and Snyder Solomon. Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell.* Vol 70. 705-707. September 4, 1992.
26. Kröncke Klaus-D, Fehsel Karin and Kolb-Bachofen Victoria. Nitric Oxide: Citotoxicity versus Cytoprotection . How, Why, and Where?. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* Vo. 1, No. 2 , April, pp 107-120. 1997
27. Laurent, M., Lepoivre, M., and Tenu, J. P. Kinetic modeling of the nitric oxide gradient generate in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J.* 314: 109-13. 1996.

28. Brown G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 351-369. 1999.
29. Nathan, C. F. and Hibbs, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65-70. 1991.
30. Snyder S. H. and Bredt D. S.. Biological roles of nitric oxide. *Am. Sci.* 266: 28-35. 1992
31. Espey M G., Miranda, K. M., Feelisch, Fukuto, J., Grisham, M. B. Vitek, M. P. and Wink, D. A.. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidation stress. *Ann. NY Acad. Sci.*; 899: 209-221. 2000.
32. Wink D. A. and Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med* 25: 434-456. 1998.
33. Griffith O. W. and Stuehr, D. J. Nitric oxide Synthases; Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 707-736. 1995.
34. Nathan, C., and Xie, Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269: 137725-13728. 1994
35. Lewis, R. S., Tamir, S., Tannenbaum, S. R. And Deen, W. H. Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J. Biol. Chem.* 270: 29350-29355. 1995.
36. Balligan, J. L. and Cannon P. J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle: autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17. Pags. 1846-1858. 1997
37. Dawson M. T., Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog. Brain Res.* 118 3-11. 1998.
38. Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R., Snyder S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature (London).* 351: 714-718. 1991.
39. Xie Q. W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A. Swiderek K. M., Lee T. D., Ding A., Troso T., Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228. 1992.
40. Lyons C. R., Orloff G.J., Cunningham J. M., Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267: 6370-6374. 1992.
41. Lamas S., Marsden P. A., Li G. K., Tempst P., Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6348-6352. 1992.

42. Sessa W. C., Harrison J. K., Barber C. M., Zeng D., Durieux M. E., D'Angelo D. D., Lynch K. R., Peach M. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 15274-15276. 1992.
43. Abu-Soud H. M., Loftus M., Stuehr D. J. Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding, and catalytic function. *Biochemistry.* 34: 11167-11175. 1995.
44. Su Z., Blazing M. A., Fan D., George S. E. The calmodulin-nitric oxide synthase interaction: critical role of calmodulin latch domain in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 270: 29112-29117. 1995.
45. Buga G. M., Griscavage J. M., Rogers N. E., Ignarro L. K. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.* 73: 808-812. 1993.
46. Hurshman A. R., Marletta M. A. Nitric oxide complex of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry.* 34: 5627-5634. 1995.
47. Albakri Q. A., Stuehr D. J. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability. *J. Biol. Chem.* 271: 5414-5421. 1996.
48. Mayer B., John M., Bohme E. Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS* 277:215-219. 1990.
49. Bredt D. S., Ferris C. D., Snyder S. h. Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem.* 267: 10976-10981. 1992.
50. Dinerman J. L., Steiner J. P., Dawson T. M., Dawsom V. L., Snyder S. H. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neural nitric synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 33: 1245-1251. 1994.
51. Robinson L. J., Weremowicz S., Morton C. C., Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics* 19:350-357. 1994.
52. Marsden P. A., Heng H. H., Scherer S. W., Hall A. V., Shi X. M., Tsui L. C., Schappert K. T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268: 17478-17488. 1993.
53. Moncada S., Higgs A. The L-arginine: nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012. 1993.

54. Balligan J. L., Kobzik L., Han X., Kaye D. M., Velasen L., O'Hara D. S., Kelly R. A., Smith T. W., Michel. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 14582-14586. 1995.
55. Tracey W. R., Pollock J. S., Murad F., Nakane M., Forstermann U. Identification of a type III (endothelial like) particulate nitric oxide synthase in LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 266: C322326. 1994.
56. Dinerman J. L., Dawson T. M., Schell M. J., Snowman A., Snyder S. H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications of synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4214-4218. 1994.
57. Kobzik L., Reid M. B., Bredt D. S., Stamier J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 372: 546-548. 1994.
58. Han X., Kobzik L., Balligand J. L., Kelly R. A., Smith T. W. Nitric oxide synthase (NOS<sub>3</sub>)-mediated cholinergic modulation of Ca<sup>sup</sup> 2+ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ. Res.* 78: 998-1008. 1996.
59. Seki T., Hagiwara H., Naruse K., Kadowaki M., Kashiwagi M., Demura H., Hirose S., Naruse M. In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys Res Commun* 218: 601-605. 1996.
60. Shaul P. W., Smart E. J., Robinson L. J., German Z., Yuhanna I. S., Ying Y., Anderson R. G. W. Michel T. Acylation targets endothelial nitric oxide synthase to plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 271: 6518-6522. 1996.
61. García-Cadena G., Oh P., Liu J., Sessa W. C. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Sci. USA* 93: 6448-6453. 1996.
62. Lisanti M. P. Tang Z. L., Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J. Cell Biol.* 123: 595-604. 1993.
63. Conrad P. A., Smart E. J., Ying Y. S., Anderson R. G. W., Bloom G. S. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule dependent steps. *J. Cell Biol.* 131(pt 1): 1421-1433. 1995.
64. Sessa W. C., García-Cadena G., Liu J., Keh A., Pollock J. S., Bradley Thien S., Braverman I. M., Desai K. M. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270: 17641-17644. 1995.
65. Feron O., Velasen L., Kobzik L., Smith T. W., Kelly R. A., Michel T., Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interaction with

- caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 22810-22814 1996.
66. Marsden P. A., Heng H. H. Q., Duff C. L., Shi X. M., Tsui L. C., Hall A. V. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11-q12. *Genomics* 19: 183-185 1994.
  67. Geller D. A., Lowenstein C. J., Shapiro R. A., Nussler A. K., Di S. M., Wang S. C., Nakayama D. K., Simmons R. L., Snyder S. H., Billiar J. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. USA* 90:3491-3495. 1993.
  68. Chartrain N. A., Geller D. A., Koty p. P., Sitrin N. F., Nussler A. K., Hoffman E. P., Billiar T. R., Hutchinson N. I., Mudgett J. S. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 269: 6765-6772. 1994.
  69. Roberts A. B., Roche N. S., Winokur T. S., Burmester J. K., Sporn M. B., Nathan C. F. Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor beta and interleukin-1beta on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *J. Clin Invest.* 89: 2045-2062. 1992.
  70. Shindo T., Ikeda U., Ohkawa F., Kawahara Y., Yokoyama M., Shimada K. Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc. Res.* 29: 813-819. 1995.
  71. De Vera M. E., Shapiro R. A., Nussler A. K., Mudgett J. S., Simmons R. L., Morris S. M., Jr. Billiar T. R., Geller D. A. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 1054-1059. 1996.
  72. Chagoya de Sánchez V., Hernández-Muñoz R., López-Barrera F., Yáñez Maldonado L., Vidrio Gómez S., Suárez J., Cota-Garza. D., Aranda Fraustro A y Cruz D. Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can. J. Pharmacol.* 75: 1300-1311. 1997.
  73. Rona G. C. I. Chappel, T. Balazs and Gacidry. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch. Pathol.* 67: 443-445. 1959.
  74. Schultz P. J., and Raij, L. J. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J. Clin. Invest.* 90. 1718-1725, 1992.
  75. Green L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L., Skipper, J. S., Wishnok and S. R. Tannenbaum.. Analysis of nitrate, nitrite and N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126: 131-138. 1982.
  76. Kelm, Man Schrader J. Nitric oxide release from the isolated guinea heart. *Eur. J. Pharmacol.* 155, 317-321. 1988.

77. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227 (259): 680-685. 1970
78. Towbin H., Stachelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Sep; 76 (9): 4350-4. 1979
79. Bredt D. S. and Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 9030-9033. 1989.
80. Bredt D. S. and Snyder S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin – requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Jan; 87 (2): 682-85. 1990.
81. Klingenberg M. Nicotinamide-adenine-dinucleotides and dinucleotides phosphates (NAD, NADP, NADH, NADPH). In: *Methods of enzymatic analysis*. Vol. VII Bergmeyer H. Ed. Pp. 261-267. VCH, Weinheim, Germany. 1965
82. Albano J. D. Barness G. D., Maudsley D. V., Brown B. L., Etkins R. P. Factors affecting the saturation assay of cyclic AMP in biological systems. *Anal. Biochem.* Jul; 60 (1): 130-141. 1974.
83. Díaz-Muñoz, M., Álvarez-Pérez M. A., Yáñez M.L., Vidrio G. S., Martínez P. L., Rosas G., Yáñez M., Ramírez S., and Chagoya de Sánchez V. Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 289: 125-136, 2006.
84. Massion P. B., Feron O. Dessy C, Ballgan J. L. Nitric oxide and cardiac funtion. Ten years after and continuing. *Cic. Res.* 93: 388-398. 2003.