



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“PARTICIPACIÓN DE LA VÍA CICLOOXIGENASA-
SINTASA DE PROSTACICLINA Y TROMBOXANO
EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y MUSCULAR DE
LA AORTA DE RATAS CON DIABETES
EXPERIMENTAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OMAR IVÁN FACIO MARTÍNEZ



**DIRECTOR DE TESIS: DR. MAXIMILIANO
IBARRA BARAJAS**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE
MÉXICO, 2020**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular (Lab-3) de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Maximiliano Ibarra Barajas y el apoyo de la Dra. Patricia Castro Moreno. Dicho proyecto de investigación estuvo financiado por el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, DGAPA UNAM (IN221615).

A mi tutor

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

A mis sinodales

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dra. Patricia Castro Moreno

M en C. Carmen Guadalupe Mondragón Huerta

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Diabetes mellitus	3
1.1.1 Diabetes tipo 1	5
1.1.2 Diabetes tipo 2	6
1.1.3 Diabetes gestacional	7
1.1.4 Otros tipos de diabetes	7
1.2 Complicaciones de la diabetes	8
1.3 Vasos sanguíneos	8
1.4 Tono vascular	10
1.5 Endotelio y función vascular	11
1.6 Regulación del tono vascular por las ciclooxigenasas y sus prostanoides	12
1.7 Ciclooxigenasas	14
1.7.1 Ciclooxigenasa 1	15
1.7.2 Ciclooxigenasa 2	15
1.8 Efecto de la diabetes en la vasculatura	16
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL	20
4.1 Objetivos particulares	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Inducción de diabetes	21
5.2 Obtención de la aorta torácica	22
5.3 Registro de la contracción isométrica	22
6. RESULTADOS	25
6.1 Peso y concentración de glucosa en sangre	25
6.2 Reproducibilidad de las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina de la aorta 27	
6.3 Efecto de la diabetes en la contracción de la aórtica	30
6.4 Efecto de la Indometacina sobre la contracción aórtica	32

6.5 Efecto de SC560 sobre la contracción de la aortica	35
6.6 Efecto de NS-398 sobre la contracción de la aorta	38
6.7 Influencia del NO en el efecto de los inhibidores selectivos de las COX.....	41
6.8 Participación de la Tromboxano sintasa en la respuesta contráctil de la aorta 44	
6.9 Participación de la prostaciclina sintasa en la respuesta contráctil de la aorta 47	
7. DISCUSIÓN.....	50
7.1 Respuesta contráctil a la fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	50
7.2 El papel de la vía de las ciclooxigenasas en la reactividad vascular	53
7.3 El papel de las isoformas de COX en la reactividad vascular.....	53
7.4 Papel de la PGIS y TXAS.....	55
8. CONCLUSIONES.....	56
9. LITERATURA CITADA.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diabetes por edad a nivel mundial.	3
Figura 2. Adultos con diabétes y gastos sanitarios en distintos países... ..	4
Figura 3. Principales síntomas de la diabetes tipo 1	5
Figura 4. Principales síntomas de la diabetes tipo 2.	6
Figura 5. Causas de muerte en el “Mundo Occidental”	8
Figura 6. Estructura de un vaso sanguíneo.. ..	10
Figura 7. Equilibrio vasodilatador y vasoconstrictor del endotelio.	11
Figura 8. Múltiples funciones del endotelio.	12
Figura 9. Biosíntesis de prostanoïdes.. ..	13
Figura 10. Estructura de la ciclooxigenasa.. ..	15
Figura 11. Mecanismos que alteran la función de la vasculatura.. ..	17
Figura 12. Aorta colocada entre dos ganchos de acero en una cámara del equipo de órgano aislado	22
Figura 13. Periodo de estabilización con 3 estimulaciones con fenilefrina, y la estimulación con carbacol.	23
Figura 14. Primera y segunda curva concentración-respuesta a fenilefrina. .24	
Figura 15. Protocolo completo realizado para el registro de la tensión isométrica de los anillos aórticos.	24
Figura 16. A. Peso corporal de ratas diabéticas y normoglucémicas.	26
Figura 17. Efecto del tiempo sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos aorticos con endotelio	28
Figura 18. Efecto del tiempo sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos aorticos sin endotelio	29
Figura 19. . Influencia de la diabetes sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina	31
Figura 20. Efecto de la inhibición de COX con indometacina, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	33

Figura 21. Efecto de la inhibición de COX con indometacina, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio normoglucémicas y diabéticas	34
Figura 22. Efecto de la inhibición de COX-1 con SC560, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	36
Figura 23. Efecto de la inhibición de COX-1 con SC560, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	37
Figura 24. Efecto de la inhibición de COX-2 con NS-398, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	39
Figura 25. Efecto de la inhibición de COX-2 con NS-398, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	40
Figura 26. Efecto de la inhibición de NOS (L-NAME), COX-1 (SC560) y COX-2 (NS-398), sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	42
Figura 27. Efecto de la inhibición de NOS (L-NAME), COX-1 (SC560) y COX-2 (NS-398), sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	43
Figura 28. Efecto de la inhibición de TXAS (Ozagrel) sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	45
Figura 29. Efecto de la inhibición de TXAS (Ozagrel) sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas	46
Figura 30. Efecto de la inhibición de PGIS con tranilcipromina sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas con endotelio de ratas	48

Figura 31. Efecto de la inhibición de PGIS con tranilcipromina sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas sin endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas49

ABREVIATURAS

COX Ciclooxygenasa

COX-1 Ciclooxygenasa 1

COX-2 Ciclooxygenasa 2

PGD₂ Prostaglandina D₂

PGE₂ Prostaglandina E₂

PGF_{2α} Prostaglandina F_{2α}

PGG₂ Prostaglandina G₂

PGH₂ Prostaglandina H₂

TXA₂ Troboxano A₂

TXAS Tromboxano sintasa

PGIS Prostaciclina sintasa

PLA₂ Fosfolipasa A₂

NO Óxido nítrico

STZ Streptozotocina

ECV Enfermedades cardiovasculares

FCDE Factor constrictor derivado de endotelio

FRDE Factor relajante derivado de endotelio

FHDE Factor hiperpolarizante derivado de endotelio

SHR Ratas espontáneamente hipertensas

WKY Ratas Wistar Kyoto

ROS Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

La diabetes mellitus es un padecimiento crónico que se caracteriza principalmente por un aumento de glucosa en la sangre y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, debido a la deficiencia de insulina o a la incapacidad del organismo en responder a esta hormona. Las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) son enzimas que a través de la oxidación del ácido araquidónico producen prostanoïdes vasoconstrictores como el TXA₂ (tromboxanoA₂) y vasodilatadores como la PGI₂ (prostaciclina), los cuales son sintetizados por las enzimas sintasa de tromboxano (TXAS) y prostaciclina (PGIS) respectivamente. Las alteraciones funcionales de los vasos sanguíneos durante la diabetes se han asociado con el desequilibrio en la producción de prostanoïdes derivados de las COX's, provocando alteraciones en el tono vascular. Por lo que resulta importante estudiar en un modelo de diabetes experimental tipo 1, la participación de las enzimas COX's, TXAS y PGIS en la regulación de la actividad contráctil de la arteria aorta. Para ello, se utilizó un modelo experimental de diabetes con streptozotocina (STZ) en ratas Wistar macho (1 y 4 semanas de evolución). De cada rata se aisló la aorta, se cortó en anillos con y sin endotelio y se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina y en presencia de los inhibidores de COX, TXAS y PGIS. En las aortas con y sin endotelio de ratas diabéticas (de 1 y 4 semanas), la estimulación con fenilefrina provocó menor respuesta con respecto a los grupos control. La indometacina (inhibidor de las COX's) y SC560 (inhibidor de COX-1) no provocaron cambios en la respuesta a fenilefrina en aortas con y sin endotelio de ningún grupo de ratas. Sin embargo, en presencia de, NS-398 (1x10⁻⁵ M) (inhibidor de COX-2) la respuesta a fenilefrina disminuyó en los anillos con endotelio de animales normoglucémicos y diabéticos. La inhibición de TXAS con Ozagrel no tuvo efecto sobre la contracción inducida por fenilefrina en ningún grupo estudiado. La inhibición de PGIS con tranilcipromina mostró una significativa reducción en la contracción a fenilefrina, principalmente en los anillos sin endotelio. Los resultados sugieren que la contracción de la arteria aorta en ratas diabéticas inducidas con STZ está disminuida, por un posible daño, tanto a nivel

endotelial como muscular. La COX-2 endotelial regula el tono vascular liberando posiblemente prostanoïdes vasocontractiles. La COX-1 y TXAS no participan en la contracci3n por la estimulaci3n de los receptores α 1-adren3rgicos en las condiciones de estudio. La Tranilcipromina reduce de la sensibilidad a fenilefrina por una vïa independiente de la PGSI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

Es un padecimiento crónico, que tiene como característica principal un aumento de glucosa en la sangre (hiperglicemia), debido a la deficiencia de insulina o a la incapacidad del organismo en responder a esta hormona. Lo que a largo plazo provoca diversas complicaciones como disfunción y falla de diferentes órganos (ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos) que trae como resultado diversas enfermedades cardiovasculares, renales, etc. (FID, 2017).

Se estima que para el año 2045 el número de adultos (20-64 años) con diabetes a nivel mundial pasará de 327 millones, en el 2017, a 438 millones y los adultos mayores (65-79 años) de 98 millones a 191 millones (fig.1). México se encuentra entre los 10 primeros con mayor número de adultos con diabetes (20-79 años), con una cifra de 24 millones de personas y con un gasto sanitario de 19 mil millones en el año 2017 (fig.2).

Diabetes por edad

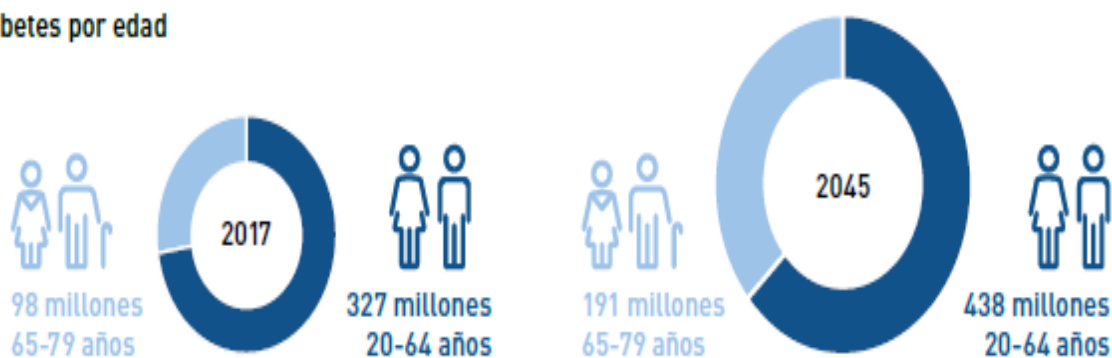


Figura 1. Incidencia de diabetes por edad a nivel mundial y estimación de la enfermedad al año 2045. FID, 2017.

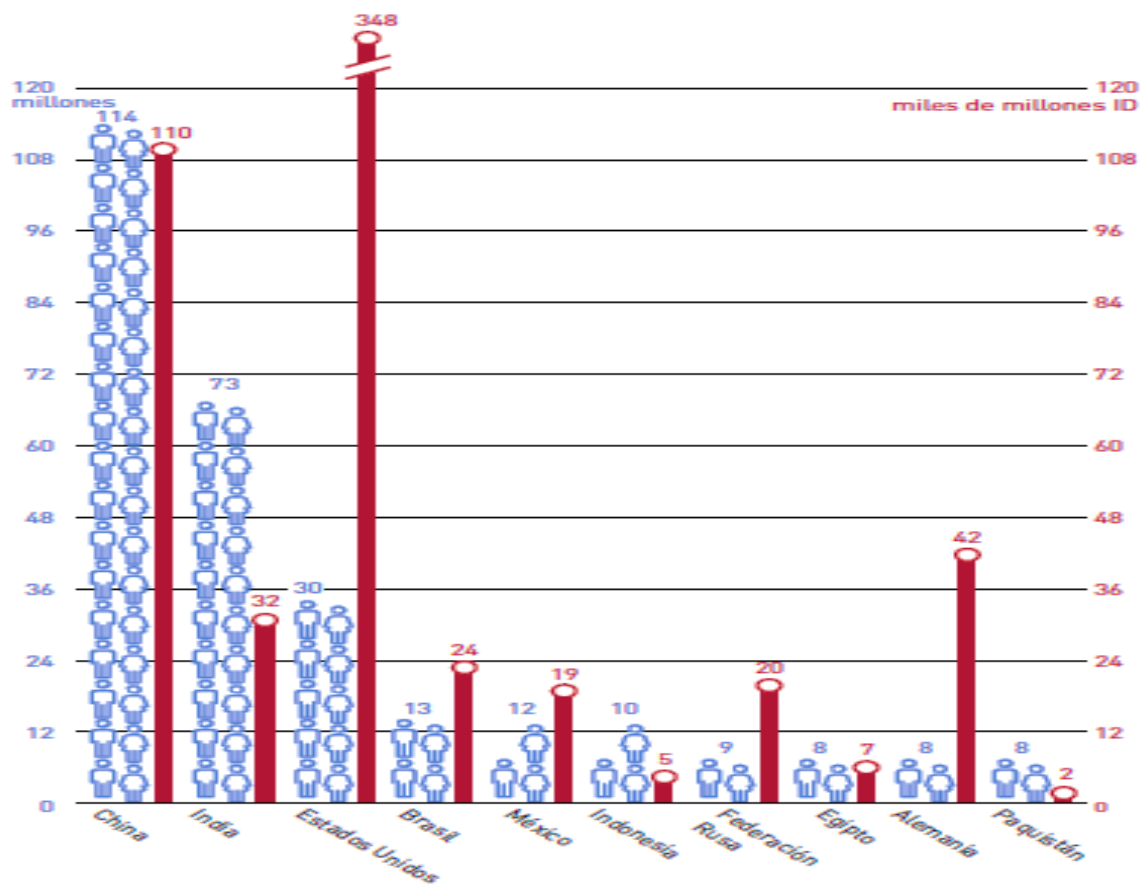


Figura 2. Adultos con diabetes (azul) y sus gastos sanitarios (rojo) en diferentes países. FID, 2017.

Se distinguen 4 principales tipos de diabetes:

- Diabetes tipo 1 (insulinodependiente).
- Diabetes tipo 2 (no insulinodependiente).
- Diabetes Gestacional.
- Otros tipos de diabetes

1.1.1 Diabetes tipo 1

Es causada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, lo que generalmente conduce a un déficit absoluto de insulina. Las células β se ven crónicamente afectadas por un infiltrado inflamatorio de tipo autoinmune con una gran cantidad de productos (citocinas y derivados de la oxidación) que son dañinos para las células β , lo que promueve mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque inmunológico, debido a esto, las células terminan expresando moléculas que inducen la apoptosis de manera específica y terminan por destruirse (Manrique y Silva, 2006). Los principales síntomas asociados a este padecimiento se muestran la figura 3.



Figura 3. Principales síntomas de la diabetes tipo 1. FID, 2017.

1.1.2 Diabetes tipo 2

Es la forma más frecuente de diabetes, en la cual la hiperglucemia es causada por la producción inadecuada de insulina y/o la incapacidad del organismo en responder a esta hormona (resistencia a la insulina), debido presumiblemente a defectos en su señalización en las células blanco por lo son incapaces de responder adecuadamente a la insulina (Olivares y Arellano, 2008; FID, 2017). Los síntomas principales asociados a este padecimiento se muestran en la fig.4.

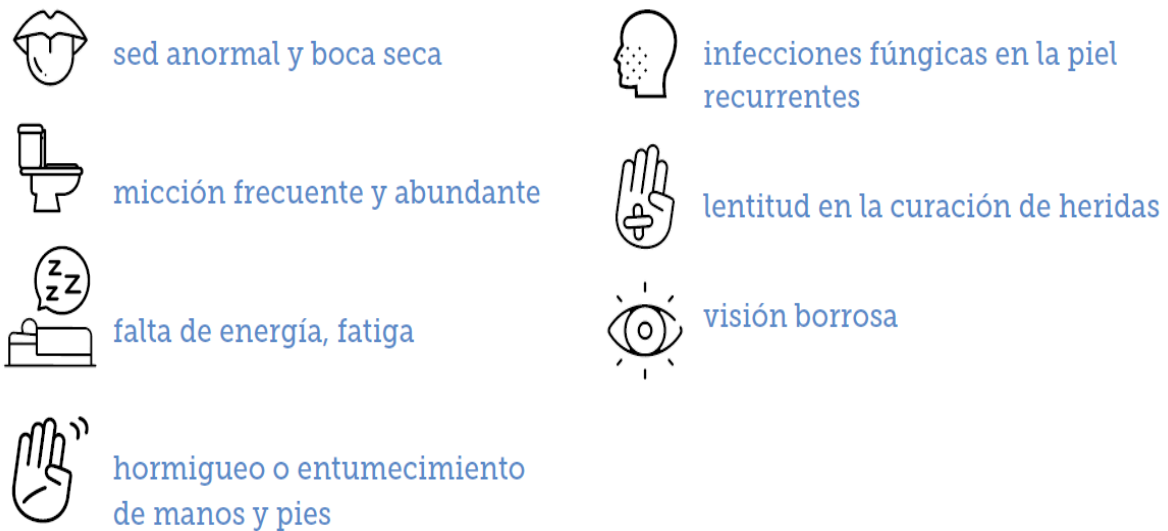


Figura 4. Principales síntomas de la diabetes tipo 2. FID, 2017.

1.1.3 Diabetes gestacional

Este tipo de diabetes afecta a mujeres embarazadas, durante el segundo y tercer trimestre de embarazo, aunque se puede dar en cualquier momento del mismo; suele presentarse como un trastorno transitorio y suele desaparecer al finalizar el embarazo. Este trastorno surge porque la acción de la insulina se ve disminuida (resistencia a la insulina) debido a la producción de hormonas en la placenta. En algunas mujeres puede diagnosticarse durante el primer trimestre, pero es probable que la diabetes ya estuviese presente antes del embarazo (IFD, 2017).

1.1.4 Otros tipos de diabetes

Existen otros tipos específicos de diabetes debido a otras causas, síndrome de diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y la diabetes del adulto joven), enfermedad del páncreas exocrino (como la fibrosis quística) e inducido por drogas o sustancias químicas (como en el tratamiento del VIH o después del trasplante de órganos) (ADA, 2017).

1.2 Complicaciones de la diabetes

La diabetes ocasiona complicaciones vasculares y disfunción de diferentes órganos, las altas tasas de mortalidad y morbilidad se deben principalmente a estas complicaciones (Sallam *et al.*, 2011); se ha reportado que las personas con diabetes tipo1 y 2 tienen un riesgo muy alto de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV) siendo las principales causas de mortandad (fig. 5) (Larsson *et al.*, 2018). Las arterias del paciente diabético tienen alterada la función vasomotora afectando la función tanto del músculo liso como del endotelio (Beckam *et al.*, 2002).

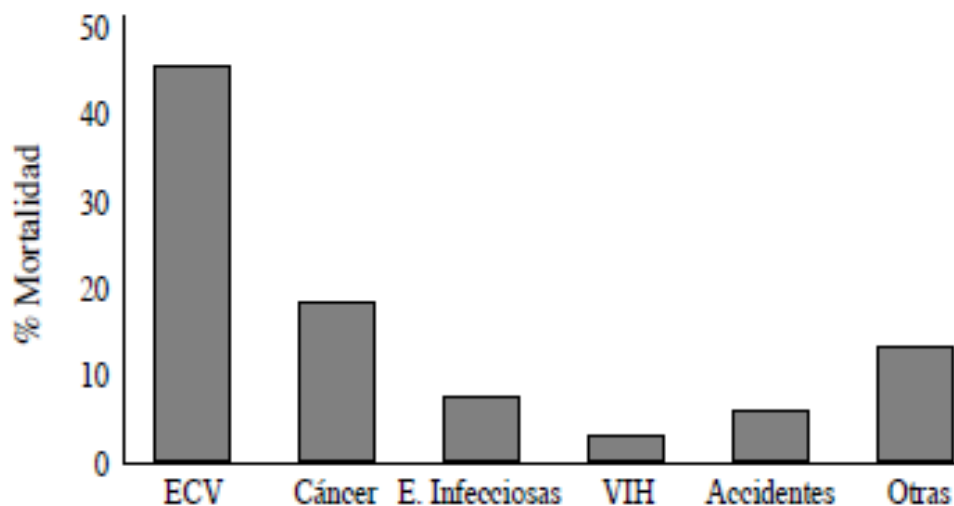


Figura 5. Causas de muerte en el “Mundo Occidental”. Esteller, 2005.

1.3 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son un sistema de conductos que transportan sangre desde el corazón hasta los tejidos (Sandoo, *et al.* 2010). Debido a su función, se pueden

dividir en venas y arterias, las venas se encargan de llevar la sangre desde los capilares hasta el corazón y las arterias cumplen la tarea inversa, conducen la sangre oxigenada desde el corazón hacia los capilares (Guyton y Hall, 2006).

El comportamiento de la pared arterial es muy complejo, por ejemplo, la arteria aorta recibe la sangre del ventrículo izquierdo durante la contracción del corazón, dicha sangre fluye por la aorta a los órganos viscerales y a las regiones periféricas del organismo, esta arteria tiene la función principal de amortiguar las oscilaciones del pulso cardiaco y de conducir el flujo sanguíneo con el fin de nutrir de sangre oxigenada a los diferentes tejidos y órganos del cuerpo (Otero *et al.*, 2014). Para que la aorta pueda cumplir estas funciones necesita de un alto grado de elasticidad en la pared vascular, la cual le permite mantener una adecuada propulsión a la sangre para que circule por todo el sistema vascular (Tsamis, *et al.*, 2013).

Un gran número de enfermedades cardiovasculares afectan a la población debido a las modificaciones que ocurren en los parámetros hemodinámicos y en el comportamiento de las paredes arteriales. La pared de los vasos sanguíneos puede ser dividida anatómicamente en tres túnicas: la capa íntima, media y adventicia. La capa íntima consiste en una monocapa de células endoteliales poligonales (endotelio), estas células son las que están sometidas a la tensión tangencial provocada por el flujo sanguíneo. Una de las funciones del endotelio es mantener a la sangre en estado líquido. La media y la adventicia son el principal sostén de cargas y determinan las propiedades mecánicas de la pared vascular. La media es la más gruesa de las tres capas y presenta la mayor capacidad de soporte de la estructura, es mucho más rígida que la adventicia y está sujeta a las mayores tensiones. La adventicia está compuesta principalmente de colágeno, elastina y fibroblastos (Otero *et al.*, 2014) (fig.6).

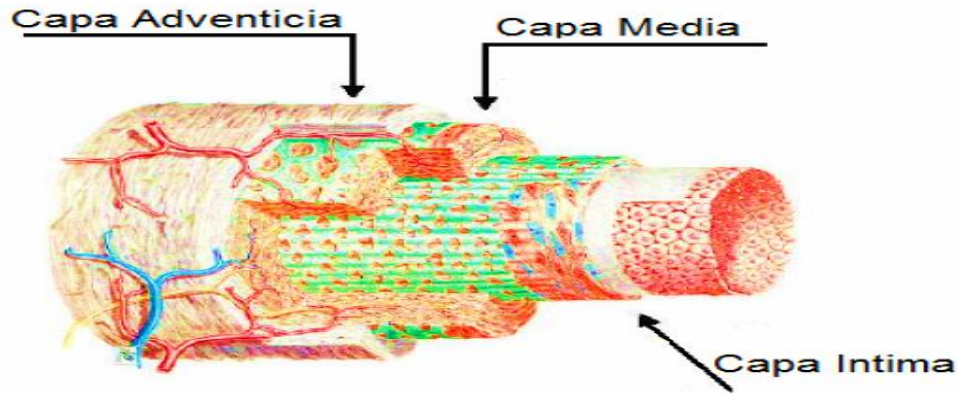


Figura 6. Estructura de un vaso sanguíneo. Otero et al., 2014.

1.4 Tono vascular

Es el estado de tensión de las paredes de los vasos sanguíneos capaces de relajarse o contraerse según las necesidades fisiológicas del organismo. Para que los vasos transporten la sangre apropiadamente necesitan de un tono vascular adecuado, para regular la presión sanguínea y la distribución del flujo sanguíneo entre los tejidos y órganos del cuerpo. La regulación del tono vascular se logra por medio del equilibrio de los estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores, tales estímulos pueden ser hormonales, nerviosos o endoteliales. El endotelio libera distintos vasodilatadores, los cuales pueden regular la vasodilatación (FRDE) como la PGI₂ y el NO, ambos son los principales vasodilatadores derivados del endotelio; también libera vasoconstrictores (FCDE) como TXA₂, PGF_{2α}, entre otros como se muestra en la figura 7 (fig.7) (Jackson, 2000; Wong *et al.*, 2010).

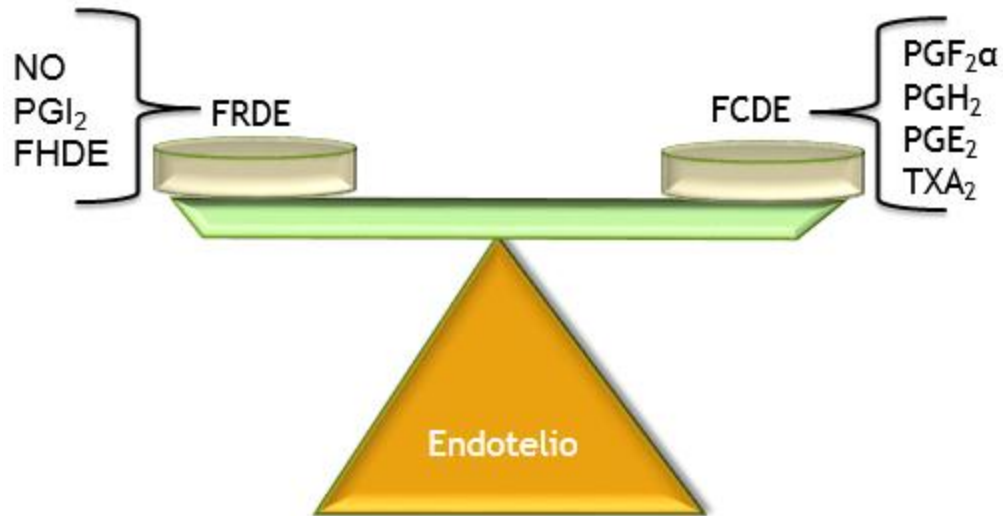


Figura 7. Equilibrio vasodilatador y vasoconstrictor del endotelio. FRDE (factores relajantes derivados del endotelio), FCDE (factores constrictores derivados del endotelio), FHDE (factor hiperpolarizante derivado del endotelio). Modificado de Wong et al., 2010.

1.5 Endotelio y función vascular

Las células endoteliales son células epiteliales planas que forman una monocapa que recubre el lumen de los vasos sanguíneos (Popov, 2010), son metabólicamente activas, como se muestra en la figura 8, presentan importantes funciones paracrinas, endocrinas y autocrinas indispensables para el mantenimiento de la homeostasis vascular en condiciones fisiológicas. El endotelio desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular, controla el flujo sanguíneo tisular, las respuestas inflamatorias y mantiene la fluidez en la sangre. Por lo tanto, es un importante regulador de la homeostasis vascular, mantiene el equilibrio entre la vasodilatación y la vasoconstricción, la inhibición y la promoción de la migración y la proliferación de las células musculares lisas, la fibrinólisis y la trombogénesis, así como la prevención y estimulación de la

adhesión y agregación de plaquetas. Perturbar este equilibrio estrechamente regulado conduce a una disfunción endotelial (Sena *et al.*, 2013).

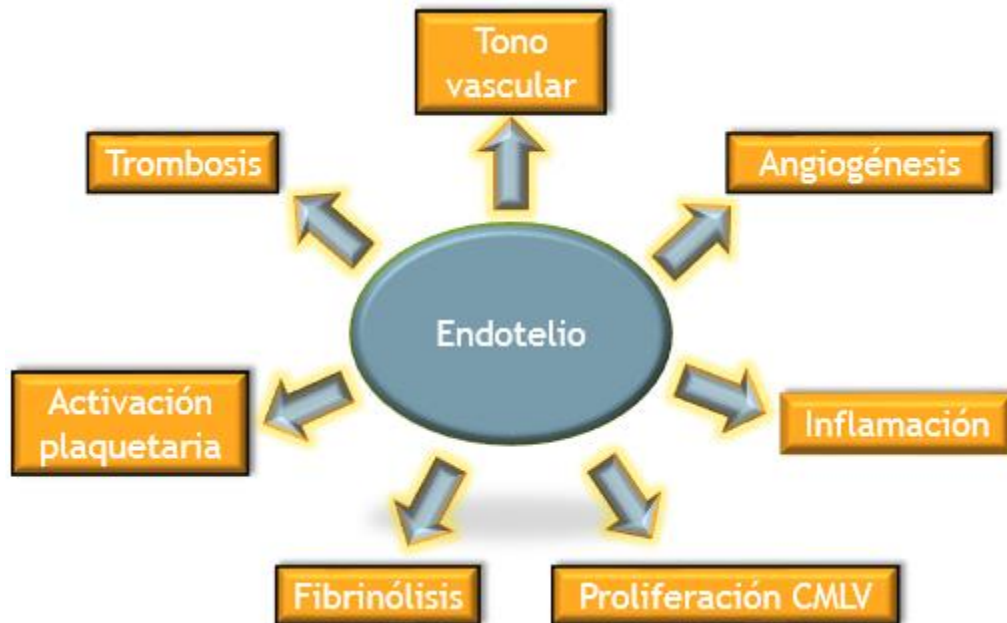


Figura 8. Múltiples funciones del endotelio. CMLV (células del músculo liso vascular). Modificado de Sena *et al.*, 2013.

1.6 Regulación del tono vascular por las ciclooxygenasas y sus prostanoides

La prostaglandina endoperóxido sintasa también conocida como ciclooxygenasa, es la enzima clave en la síntesis de prostanoides vasoactivos que regulan la homeostasis vascular a través de la oxidación del ácido araquidónico (García y Gómez, 2000). La síntesis de prostanoides se inicia con la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (fig.9); posteriormente, el ácido araquidónico se convierte en prostaglandina G₂ (PGG₂), y después en prostaglandina H₂ (PGH₂), ambos pasos por acción de la ciclooxygenasa. La PGH₂ se metaboliza a 5 prostanoides principales (PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂α y TXA₂) a través de sus respectivas enzimas, las sintasas de prostglandinas correspondientes (Ozen y Norel, 2017).

La prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano (TXA₂) son sintetizados por las enzimas prostaciclina sintasa (PGIS) y tromboxano sintasa (TXAS), respectivamente. Estos desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis vascular; la PGI₂, actúa como un vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, y el TXA₂ como un vasoconstrictor y promotor de la agregación plaquetaria. Estos al unirse a sus receptores específicos IP (receptor de PGI₂) y TP (receptor de TXA₂) inician cascadas de señalización que culminan en vasodilatación o vasoconstricción respectivamente (Yuhki *et al.*, 2011).

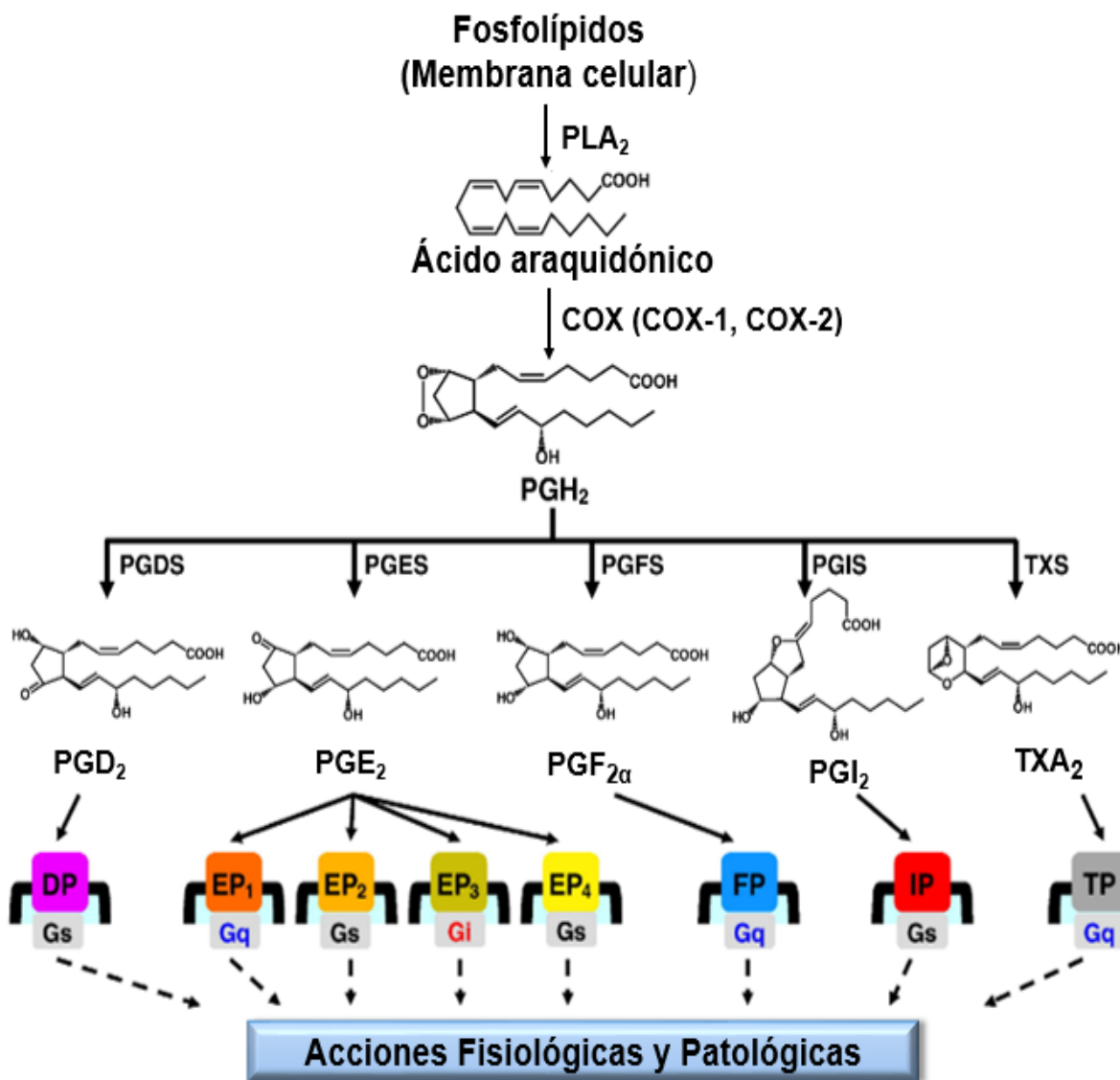


Figura 9. Biosíntesis de prostanoideos. PGDS (prostaglandina D₂ sintasa), PGES (prostaglandina E₂ sintasa), PGFS (prostaglandina F_{2α} sintasa), PGIS (prostaciclina sintasa), TXS (tromboxano sintasa). Modificado de Yuhki *et al.*, 2011.

1.7 Ciclooxygenasas

La ciclooxigenasa (COX) cataliza la primera etapa de la síntesis de prostaglandinas a través de la conversión del ácido araquidónico a PGH_2 ; esta enzima es una proteína de membrana que se encuentra en el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. Las estructuras cristalinas de COX revelan la forma dimérica completa de estas enzimas (fig. 10 A). El monómero revela una estructura compuesta por tres dominios: un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico N-terminal (EGF); un dominio de unión a membrana (MBD) que consiste en una espiral de cuatro hélices antipáticas; y un dominio catalítico globular que contiene los sitios activos de ciclooxigenasa y peroxidasa (fig. 10 B) (Garavito y DeWitt, 1999). Se han identificado dos isoenzimas principales de COX, denominadas COX-1 y COX-2, codificadas por dos genes distintos (Iñiguez *et al.*, 2008).

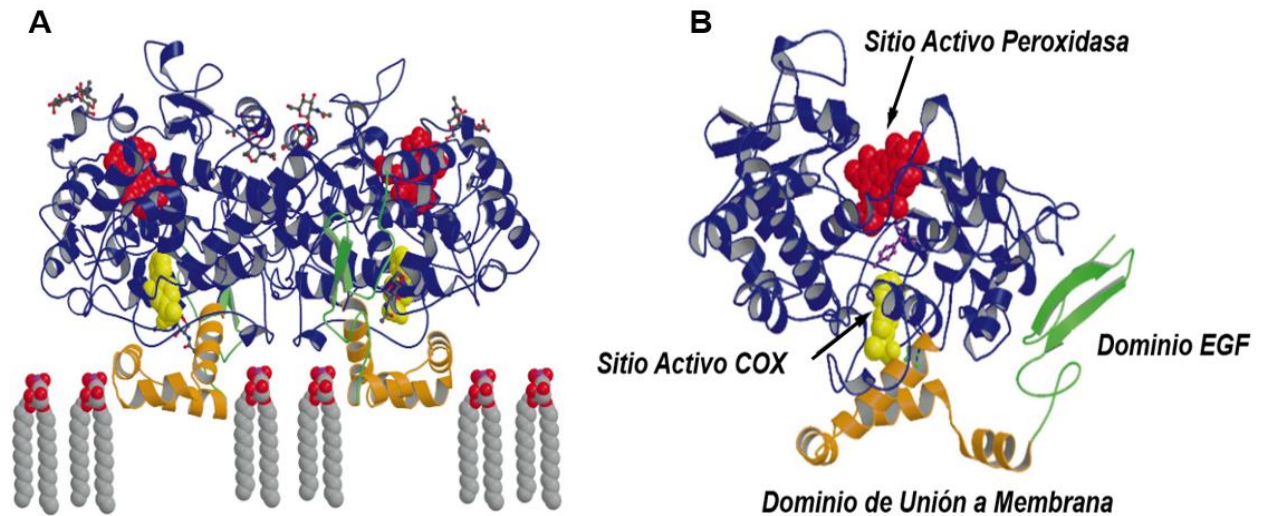


Figura 10. Estructura de la ciclooxygenasa. A. Dibujo en cinta de la estructura del dímero COX-1 de ovino que muestra la relación entre el grupo hemo (rojo), a posición de la valva luminal de la bicapa del retículo endoplásmico. B. Monómero de COX-1 de ovino, relación entre los sitios activos de peroxidasa y COX y la estructura del dominio de la enzima es claramente visible. EGF (por sus siglas en inglés) dominio similar al factor de crecimiento epidermal. Modificado de Garavito y DeWitt, 1999.

1.7.1 Ciclooxygenasa 1

La COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y tipos de células, se encuentra altamente expresada en las plaquetas, células del endotelio, mucosa gástrica y en el túbulo colector de las nefronas, realizando funciones homeostáticas a través de la producción de prostaglandinas, contribuyendo al funcionamiento normal del riñón, la integridad de la mucosa gástrica y la función cardiovascular (Garavito y DeWitt, 1999; Wong et al., 2010; Félétoú *et al.*, 2011).

1.7.2 Ciclooxygenasa 2

La COX-2 se ha considerado una enzima inducible, sin embargo, se expresa de manera constitutiva en algunos órganos y tipos de células entre ellas se encuentran las células endoteliales que responde a estímulos como el estrés por cizallamiento cardiovascular y mediadores inflamatorios. (Wong et al., 2010; Félétou *et al.*, 2011).

1.8 Efecto de la diabetes en la vasculatura

La diabetes también es considerada una enfermedad vascular debido a su efecto en la macro y microcirculación de muchos lechos vasculares. El vínculo entre la diabetes y el aumento de la incidencia de enfermedades cardiovasculares está bien establecido (Nesto, 2004; Sena *et al.*, 2013). Concentraciones de glucosa por arriba de valores normales perturban la homeostasis y la bioquímica de las células, desencadenando modificaciones tanto en la macrovasculatura como en la microvasculatura (Popov, 2010). La hiperglucemia crónica y aguda afecta la función del musculo liso y del endotelio en lechos vasculares, causando daño en diferentes células de la pared vascular. las condiciones metabólicas en la diabetes (hiperglucemia, exceso de liberación de ácidos grasos libres y resistencia a la insulina) induce un círculo vicioso de eventos en la pared vascular que aumenta la disfunción endotelial, estrés oxidativo, inflamación de bajo grado e hiperactividad plaquetaria, en las primeras etapas de enfermedad diabética (fig. 11) (Sena *et al.*, 2013).

La disfunción endotelial es una condición en la que el endotelio pierde sus propiedades fisiológicas (Avogaro *et al.*, 2011). El deterioro endotelial se encuentra en todas las formas de enfermedad cardiovascular, obesidad y diabetes. Se caracteriza por: reducción de la vasodilatación mediada por el endotelio, desregulación hemodinámica, alteración de la capacidad fibrinolítica, sobreproducción de factores de crecimiento, aumento de la expresión de moléculas de adhesión y genes inflamatorios, deficiencia de óxido nítrico (NO),

generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento del estrés oxidativo y mayor permeabilidad de la capa celular (Sena *et al.*, 2013).

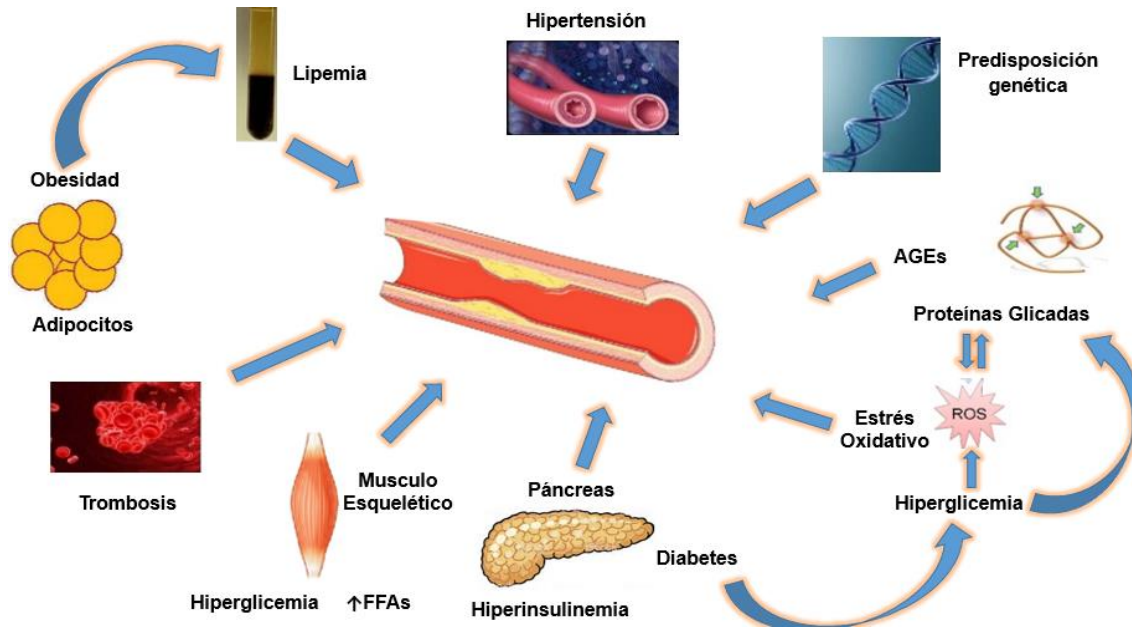


Figura 11. Mecanismos que alteran la función de la vasculatura durante la diabetes. Modificado de Sena *et al.*, 2013.

La diabetes afecta la función del músculo liso y del endotelio en lechos vasculares, se ha sugerido que la habilidad de estos para regular el tono vascular se ve afectada tanto en la diabetes humana (de Tejada *et al.*, 1989) como en la experimental (Furchgott, 1983). Wakabayashi y colaboradores (1987) evaluaron el papel del endotelio en la regulación del tono vascular en aortas de ratas diabéticas, observando que la respuesta a la tensión isométrica inducida por KCl en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas no cambian al remover el endotelio; pero sí hay una menor contracción de los anillos de ratas diabéticas con respecto a las normoglucémicas. Un estudio similar evaluó el daño producido por

la diabetes en la contracción y relajación de aortas de ratas diabéticas (Cameron y Cotter, 1992), encontrando que al estimular con K^+ , fenilefrina, serotonina y noradrenalina la contracción en aortas de ratas diabéticas es menor que las normoglucémicas con una diferencia más marcada al estimular con fenilefrina; la relajación en respuesta a acetilcolina y el ionóforo A23187 mostró ser menor en las arterias del grupo diabético, sin embargo no se observaron diferencias al utilizar nitroglicerina.

Las COX's ejercen un papel muy importante en la regulación del tono vascular, al sintetizar mediadores vasoactivos; sin embargo, durante la diabetes sufren alteraciones en su expresión, según lo reportado por Bagi et al., (2005), en donde evaluaron el efecto de la diabetes sobre la expresión de las isoformas de COX en la aorta de ratones, encontrando que la expresión de COX-1 en aortas de ratones control y diabéticos no se modifica significativamente, pero COX-2 se encuentra significativamente más expresada en aortas de ratones diabéticos. Ahora bien, Wong *et al.*, (2009) observaron la predominante ubicación de COX-2 en el endotelio, midiendo los niveles de RNA y proteína de COX-2 en aorta de hámster con y sin endotelio, y observaron que estos disminuyen significativamente al remover el endotelio de las arterias. Además de una mayor expresión de COX-2 en condiciones diabéticas, Bagi et al., 2005 también evaluaron la acción del TXA_2 y las isoformas COX-1 y COX-2 en el tono arteriolar inducido por presión; observando que al bloquear el receptor de TXA_2 (TP) con el antagonista SQ 29548 en arteriolas normales, no se observó diferencia con respecto al control, pero en arteriolas de ratones diabéticos al bloquear el receptor TP el diámetro de la arteriola fue mayor al del control; al inhibir COX-1 con SC560 y COX-2 con NS-398, en arteriolas de ratones normales, no se observó cambio en el diámetro de la arteriola en comparación con el control, pero en arteriolas de ratones diabéticos se observó un aumento del diámetro al inhibir COX-2, lo que indica que esta enzima actúa liberando prostanoïdes vasoconstrictores en el animal diabético.

La producción de prostanoïdes es diferente en cada tejido, por ejemplo, Qi y colaboradores (2006), realizaron un perfil de prostanoïdes basales en corteza renal, médula renal y aorta de ratones normales; encontrando que en corteza y

médula renal el prostanoides que más se produce es la PGE₂, seguida por la PGI₂ y la PGF_{2α} quedando al último el TXA₂ y en la aorta la PGI₂ es la que se produce más, seguida por PGE₂ y TXA₂ y por último la PGF_{2α}. Los prostanoides ejercen un papel muy importante en la regulación de la homeostasis vascular, durante la diabetes la producción de prostanoides derivados de COX's se modifica, produciendo alteraciones en el funcionamiento de la vasculatura; según lo reportado en un estudio (Peredo *et al.*, 2006), en donde se midió la liberación de los prostanoides en aortas de ratas con 30, 120 y 180 días de diabetes, observando que a 30 días no hay diferencias significativas en los niveles de prostanoides aunque ya se aprecia una tendencia a disminuir, a 120 días se observa una disminución significativa únicamente de PGI₂, y a 180 días una disminución en la liberación de PGI₂ y PGE₂ pero aun aumento significativo en los niveles de TXA₂.

La PGI₂ y TXA₂ son prostanoides importantes que regulan el tono vascular, uno como vasodilatador y otro como vasoconstrictor, estos son sintetizados por sintasas específicas, PGIS es la enzima que sintetiza PGI₂ y TXAS sintetiza al TXA₂ (Yuhki *et al.*, 2011). Sin embargo, durante algunas patologías, la expresión de estas se ve alterada, según lo reportado por Mokhtar *et al.*, (2013), en donde midieron la expresión de PGIS y el receptor IP en arterias subcutáneas de pacientes diabéticos, encontrando que la expresión de PGIS fue significativamente menor en arterias subcutáneas de pacientes diabéticos comparándolos con los no diabéticos, aunque la expresión del receptor IP no presentó diferencias significativas en ambos grupos. También se han realizado estudios en modelos de hipertensión y envejecimiento, en donde Tang y Vanhoutte, (2008) evaluaron la expresión génica de las sintasas en células endoteliales cultivadas de ratas hipertensas (SHR) y WKY de 72 semanas, encontrando que la expresión de TXAS aumenta en células de ratas SHR y WKY de 72 semanas, en comparación con las WKY control de 36 semanas; además la expresión de PGIS aumenta significativamente sólo en las células endoteliales cultivadas de ratas SHR.

Por lo antes mencionado, resulta importante evaluar la participación de la vía COX-PGI₂-TXA₂ en la contracción vascular de la arteria aorta, por lo que se

decidió analizar su efecto, usando inhibidores específicos en la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta en ratas diabéticas y evaluar su papel durante la evolución de esta enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

La disfunción vascular en la diabetes se manifiesta principalmente como alteraciones en el tono vascular, donde los prostanoïdes derivados de COX desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular, principalmente PGI₂ como un vasodilatador y el TXA₂ como un vasoconstrictor. Por sus roles opuestos, un desequilibrio en la producción de estos, se ha relacionado con la fisiopatología de muchos trastornos cardiovasculares. Por lo que resulta importante investigar en un modelo de ratas diabéticas la influencia de la vía COX-PGI₂-TXA₂ en la regulación de la actividad contráctil de la aorta durante la diabetes.

3. HIPÓTESIS

Las COXs, PGIS y TXAS son enzimas que participan en la regulación del tono vascular a través de la producción de prostanoïdes, se sabe que durante la diabetes se altera la producción de prostanoïdes, por lo que un desequilibrio de estas enzimas podría explicar las alteraciones en el tono vascular de la aorta en el animal diabético.

4. OBJETIVO GENERAL

-Evaluar la participación de las COX (COX-1 y COX-2), PGIS y TXAS en la función vascular de la aorta de ratas con diabetes mellitus experimental.

4.1 Objetivos particulares

- 1.- Evaluar la participación de COX-1 en la respuesta contráctil provocada por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas con 1 y 4 semanas de evolución de diabetes.
- 2.- Evaluar la participación de COX-2 en la respuesta contráctil provocada por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas con 1 y 4 semanas de evolución de diabetes.
- 3.- Evaluar la participación de la PGIS, en la contracción inducida por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas con 1 y 4 semanas de evolución de diabetes.
- 4.-Evaluar la participación de la TXAS, en la contracción inducida por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas con 1 y 4 semanas de evolución de diabetes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 250 a 300 g, las cuales fueron adquiridas y mantenidas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en condiciones ambientales controladas, con comida y agua *ad libitum*. El manejo de las ratas fue realizado conforme a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999, México).

5.1 Inducción de diabetes

Los animales se dividieron en dos grupos:

El grupo de ratas normoglucémicas: se les administró buffer de citratos 50 μ M (pH 4.4) (1ml/kg de peso), el vehículo para la estreptozotocina (STZ), vía intraperitoneal (i.p).

Grupo de ratas diabéticas: se les aplicó STZ en una dosis de 65 mg/Kg (disuelta en el buffer de citratos) (i.p). Para comprobar la hiperglucemia se midió la glucosa en sangre con un glucómetro (Accu-Chek) después de 72 horas de la administración de STZ y solo aquellas ratas que presentaron valores mayores a 200mg/dl se consideraron hiperglucémicas y se dejaron a libre evolución durante 1 y 4 semanas.

5.2 Obtención de la aorta torácica

Después de concluidos los tiempos de evolución de diabetes, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico en dosis de 60 mg/kg de peso, vía i.p. Después se realizó una laparotomía torácica para la obtención de la arteria aorta, una vez obtenida, la arteria se colocó en una caja de Petri con solución Krebs, se le removió el tejido adiposo y conectivo. Posteriormente la arteria fue cortada en anillos de aproximadamente 4-5 mm unos anillos se les removió el endotelio por frotación de la superficie de la íntima con la punta de una pinza Kelli.

5.3 Registro de la contracción isométrica

Para medir los cambios en la tensión isométrica provocados por fenilefrina, se utilizó un equipo de órgano aislado en donde cada anillo se colocó entre dos ganchos de acero inoxidable (Nikrom) (fig. 12), uno sujeto a la parte inferior de la cámara y el otro a un transductor de tensión isométrica, que se acopló a un sistema de adquisición de datos MP100, los datos de la tensión isométrica fueron registrados mediante el software Acqknowledge (versión 3.9.1).



Figura 12. Aorta colocada entre dos ganchos de acero en una cámara del equipo de órgano aislado

Los anillos se sometieron a una tensión arterial de 3 g y se lavaron 3 veces cada 10 minutos con 10 ml de solución Krebs con la siguiente composición; NaCl, 118 mM; KCl, 4.6 mM; MgSO₄·7H₂O, 1.2 mM; CaCl₂·2H₂O, 1.5 mM; dextrosa, 5.5 mM; NaHCO₃, 24.9 mM; y EDTA, 0.027 mM, con burbujeo constante de 95% de O₂ y 5% de CO₂, a un pH de 7.4 y a una temperatura de 37°C.

Posteriormente, durante el periodo de estabilización los anillos se estimularon 3 veces con fenilefrina a una concentración de 1×10^{-7} M, dejando reposar 30 minutos entre cada estimulación. Para verificar la funcionalidad del endotelio se analizó la respuesta relajante a carbacol (el cual es un análogo sintético de la acetilcolina) a una concentración de 1 μ M; los fármacos fueron retirados del medio mediante lavados con solución Krebs (fig. 13).

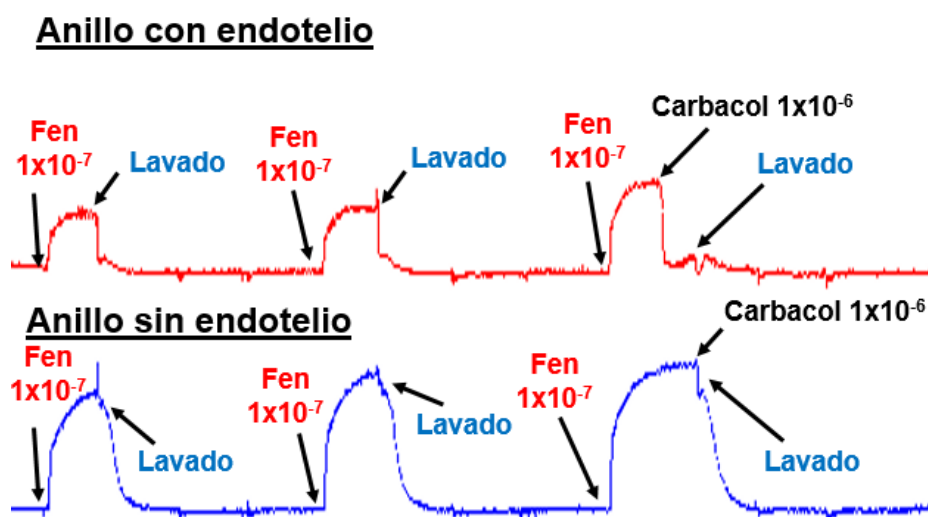


Figura 13. Periodo de estabilización con 3 estimulaciones con fenilefrina, y la estimulación con carbacol para comprobar presencia de endotelio.

Posteriormente, se realizó una curva concentración-respuesta al agonista adrenérgico fenilefrina (1×10^{-9} M a 1×10^{-6} M). Al finalizar la primera curva (control) la fenilefrina fue retirada mediante lavados con solución Krebs y se dejó recuperar el tejido durante una hora. Después del periodo de recuperación se realizó una segunda curva de fenilefrina en presencia de los inhibidores selectivos (el cual se agregó 30 minutos antes de realizar la segunda curva) (fig.14 y 15); SC560 (1×10

10^{-7} M) para COX-1, NS-398 (1×10^{-5} M) para COX-2, indometacina (1×10^{-5} M) (inhibidor no selectivo de COX), Ozagrel 1×10^{-7} M (inhibidor de la TXAS) y 2PCPA (Tranilcipromina) 1×10^{-5} M (inhibidor de la PGIS).

Por el diseño del equipo y la disponibilidad de transductores y cámaras, el número de los animales diabéticos y normoglucémicos fue variable.

Anillo con endotelio

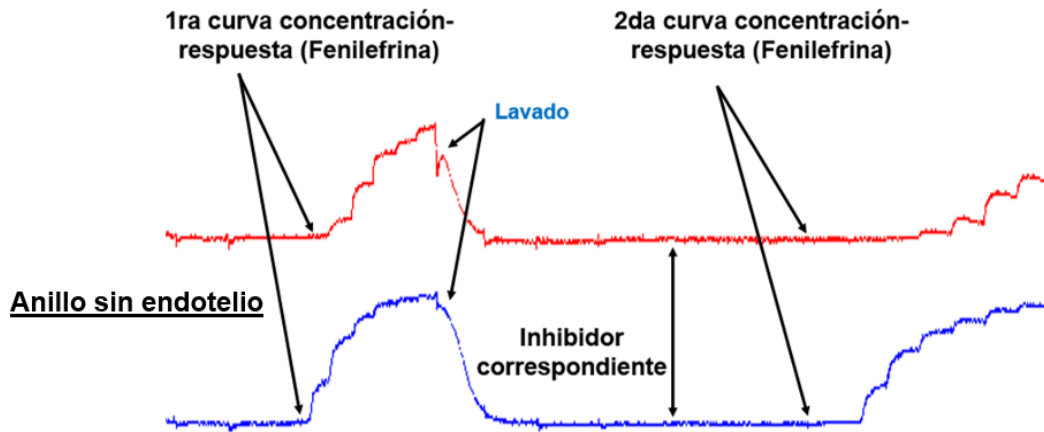


Figura 14. Primera y segunda curva concentración-respuesta a fenilefrina.

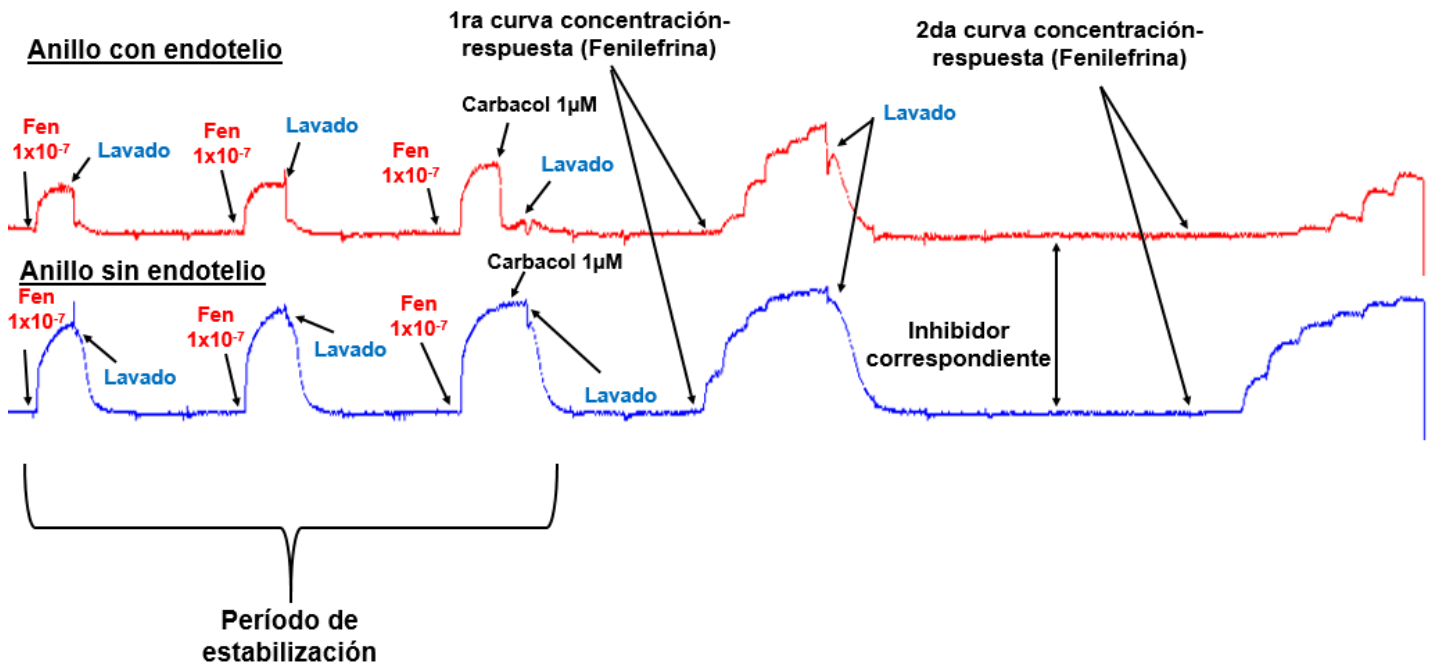


Figura 15. Protocolo de experimentación completo, realizado para el registro de la tensión isométrica de los anillos aórticos con y sin endotelio montados en el equipo de órgano aislado.

6. RESULTADOS

6.1 Peso y concentración de glucosa en sangre

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en ratas Wistar con 1 y 4 semana de evolución de diabetes. Se observó un aumento significativo en el peso corporal de ratas normoglucémicas, al transcurrir la edad de los animales, con respecto a su peso inicial.

El peso corporal de las ratas diabéticas de 1 y 4 semanas fue significativamente menor en comparación con el peso inicial, pero se mantuvo igual en ambas edades (1 vs 4 semanas). Por lo tanto, la diabetes inhibió la tasa de crecimiento normal por lo que el peso de las ratas diabéticas fue menor que el de las ratas normoglucémicas tanto en 1 como en 4 semanas (Fig. 16 A). La concentración de glucosa en sangre de las ratas diabéticas fue significativamente mayor en comparación con las normoglucémicas tanto en 1 como en 4 semanas (fig. 16 B).

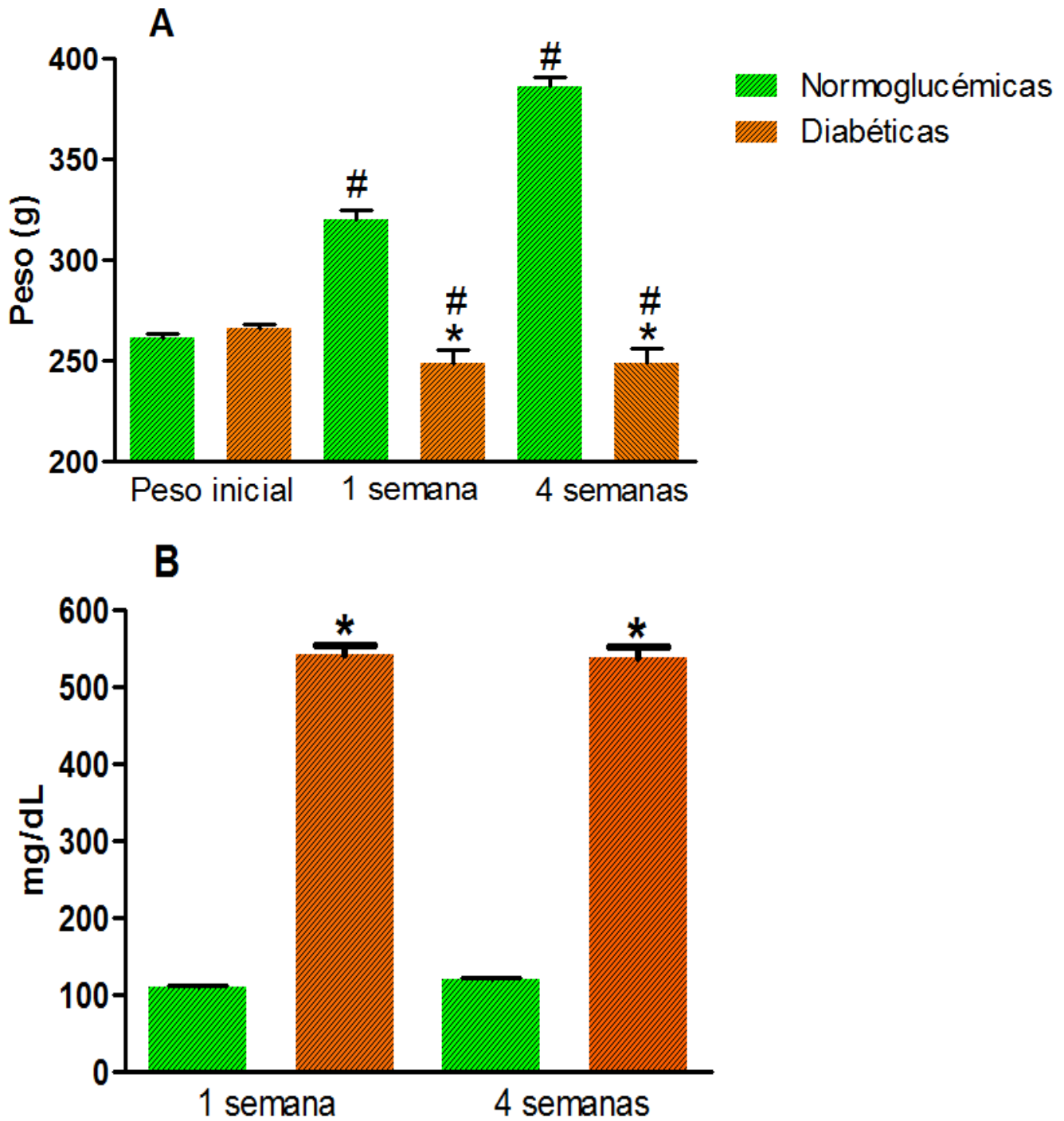


Figura 16. A. Peso corporal de ratas diabéticas y normoglucémicas 1 semana. Normoglucémicas n= 29, Diabéticas n=33, 4 semanas normoglucémicas n= 40, Diabéticas n=46. B. Concentración de glucosa en sangre de ratas normoglucémicas y diabéticas. 1 semana normoglucémicas n= 31, Diabéticas n=36, 4 semanas normoglucémicas n= 37, Diabéticas n=43. *p<0.05 vs normoglucémica, #p<0.05 vs peso

6.2 Reproducibilidad de las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina de la aorta

Con la intención de verificar si la contracción inducida por fenilefrina en anillos aórticos es reproducible, se realizaron en un solo anillo dos curvas consecutivas a fenilefrina en ausencia de inhibidores. Se observó que la segunda curva concentración-respuesta en los anillos de aortas con y sin endotelio de ambos grupos (normoglucémico y diabético) no fue significativamente diferente a la primera curva, tanto en 1 como en 4 semanas (fig. 17 y 18), confirmando así que la duración del experimento no afectó a la contracción de la aorta de animales normales y diabético, por lo que es posible realizar dos curvas concentración-respuesta en la misma preparación, sin que la respuesta a la fenilefrina se modifique.

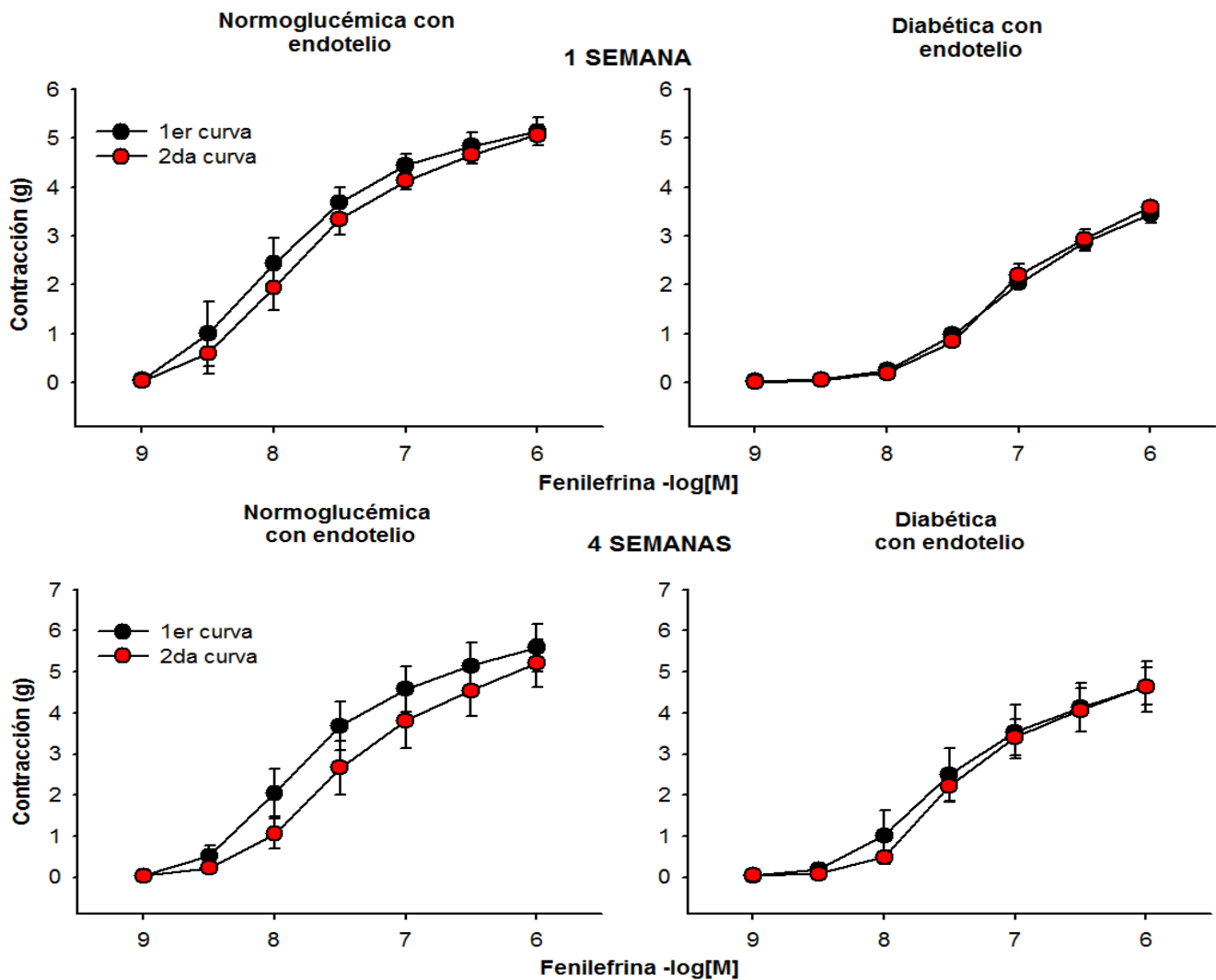


Figura 17. Efecto del tiempo de experimentación sobre la contracción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas 1 y 4 semanas (con endotelio). Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n=4 diabéticas n= 3; 4 semanas normoglucémicas n= 4 diabéticas n= 2.

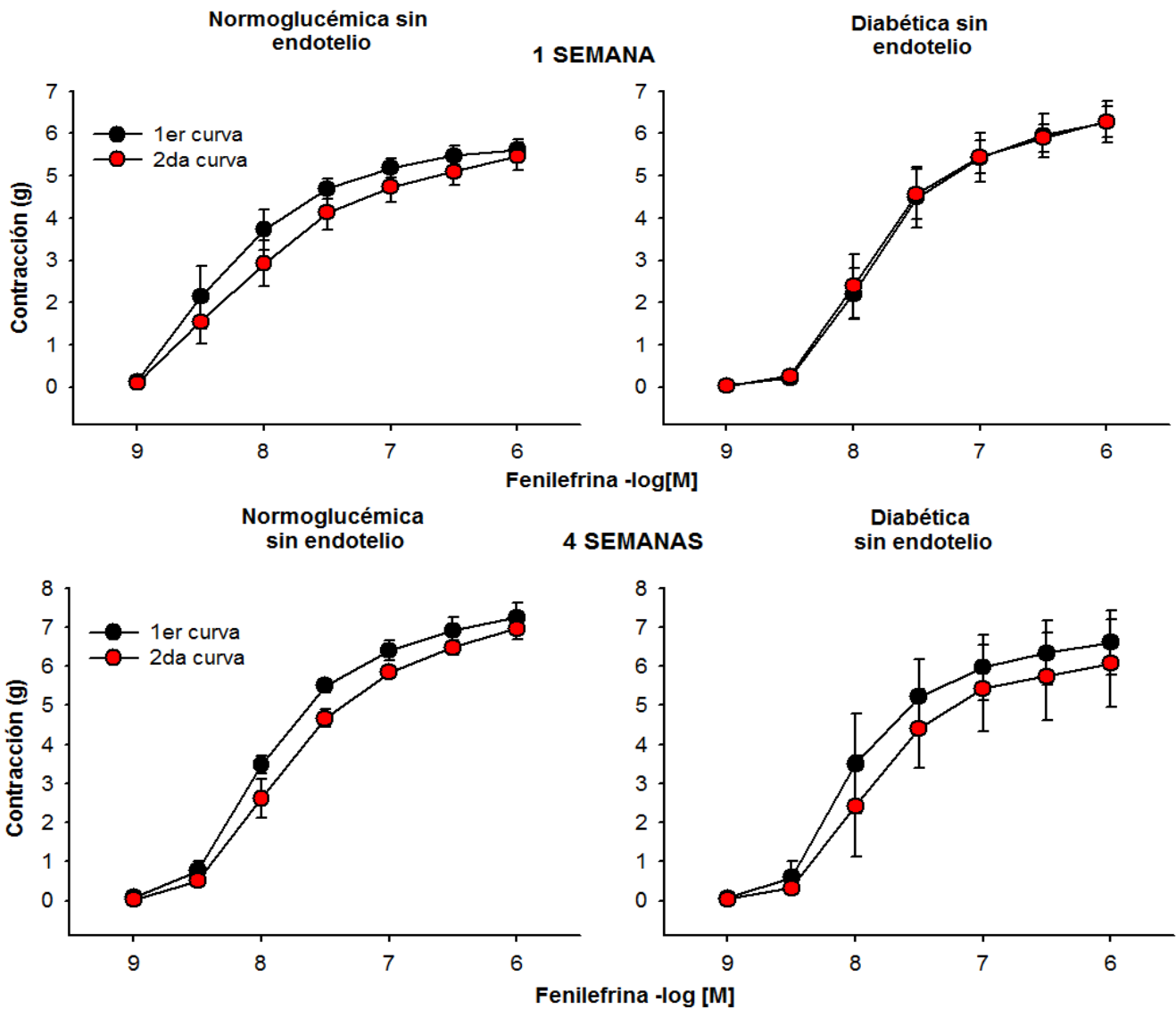


Figura 18. Efecto del tiempo sobre la contracción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglicémicas y diabéticas 1 y 4 semanas (sin endotelio). Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglicémicas n=4 diabéticas n= 3; 4 semanas normoglicémicas n= 4 diabéticas n= 2.

6.3 Efecto de la diabetes en la contracción de la aórtica

Para poder analizar los cambios asociados a la diabetes en la función contráctil de la aorta se realizaron curvas concentración-respuesta en ausencia de inhibidores. En anillos con endotelio de aortas de ratas diabéticas, se observó una respuesta contráctil significativamente menor en comparación con los anillos de ratas normoglucémicas en ambas edades (fig. 19), aunque la disminución de esta respuesta parece ser mayor a las 4 semanas. La remoción del endotelio aumentó la contracción inducida por fenilefrina en ambos grupos y edades, pero en el grupo diabético la contracción se mantuvo significativamente menor a las normoglucémicas.

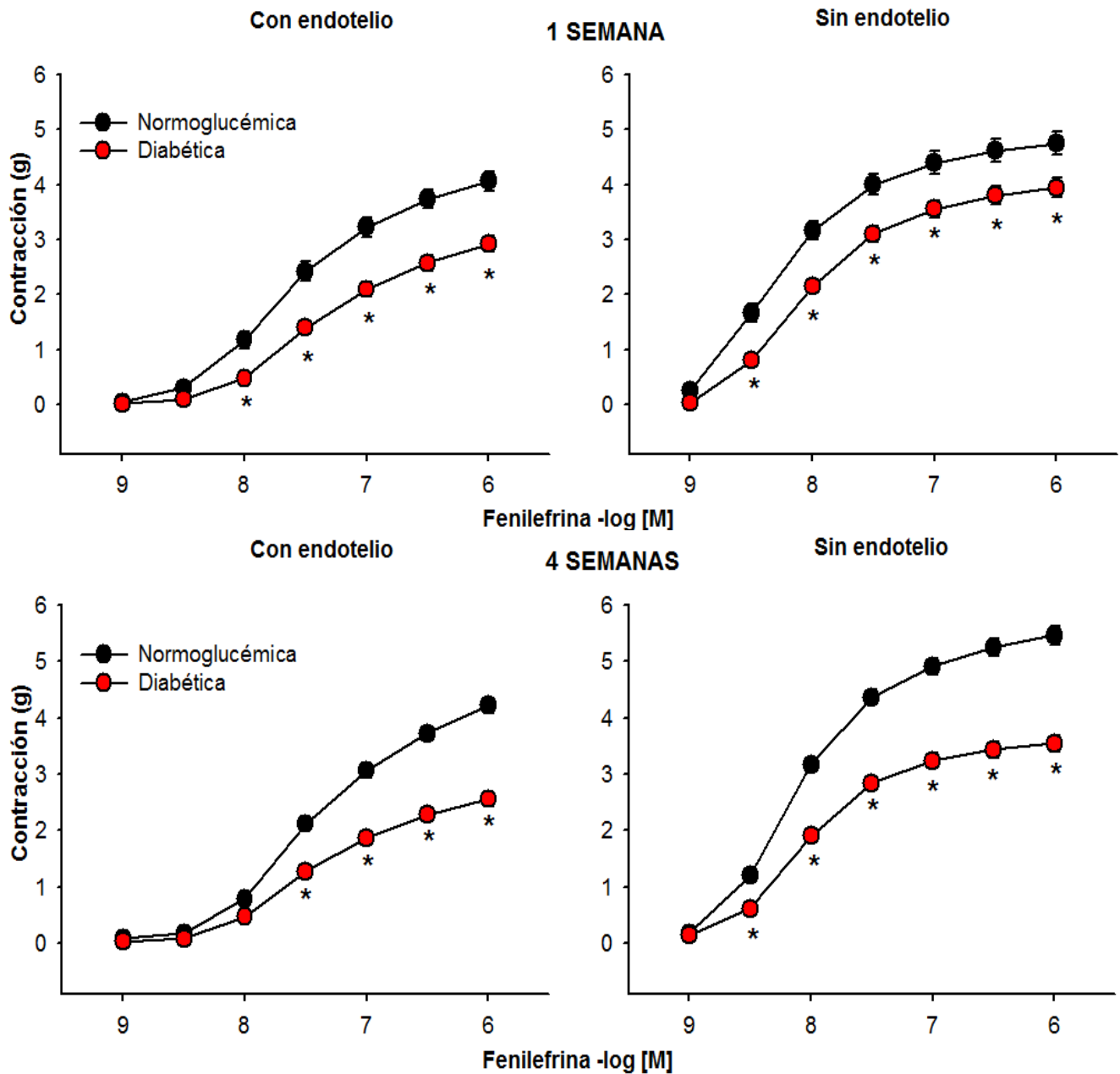


Figura 19. Influencia de la diabetes (1 y 4 semanas) sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (con y sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 33 diabéticas n= 41; 4 semanas normoglucémicas n= 51 diabéticas n= 65. * $p < 0.05$ vs normoglucémicas.

6.4 Efecto de la Indometacina sobre la contracción aórtica

Para evaluar la participación de los prostanoideos derivados de las COX's en la respuesta contráctil a la fenilefrina, los anillos aórticos se incubaron con indometacina (Inhibidor no selectivo de COX).

En los anillos aórticos con endotelio (fig. 20), la indometacina no provocó cambios significativos en la contracción a la fenilefrina, tanto en el grupo normoglucémico como en el diabéticos en ambos tiempos de evolución (1 y 4 semanas). En anillos de aortas sin endotelio (fig. 21), tampoco se observaron cambios con del inhibidor sobre la contracción en ambos grupos y edades. Lo que nos indica que la COX no participa en la contracción a fenilefrina o que ambas isoformas de COX ejercen efectos contrarios en la aorta. Para poder dilucidar el papel de las isoformas de COX fue necesario realizar la inhibición selectiva de cada una de estas.

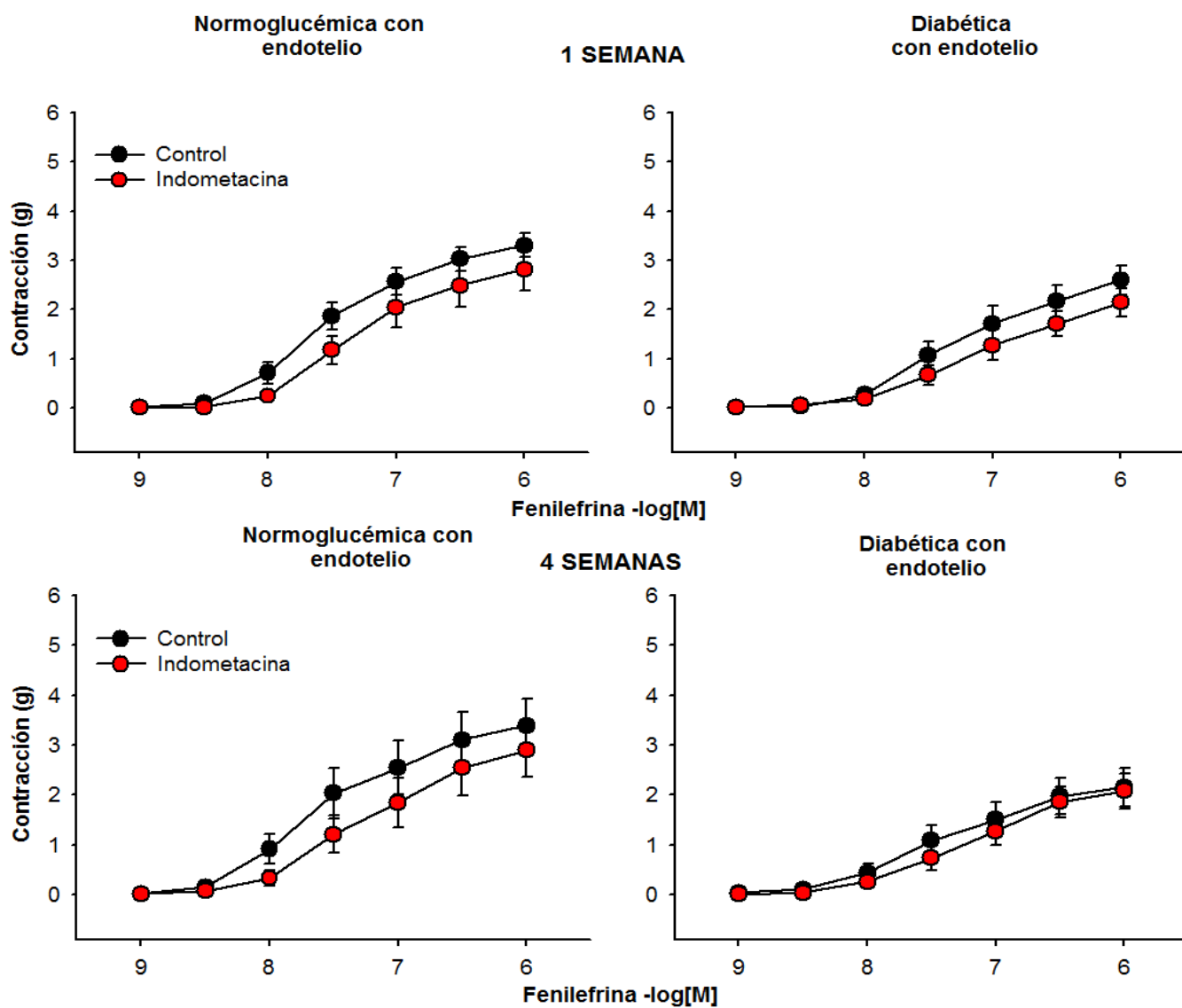


Figura 20. Efecto de la inhibición de COX con indometacina, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 5 diabéticas n= 9; 4 semanas normoglucémicas n= 4 diabéticas n= 8.

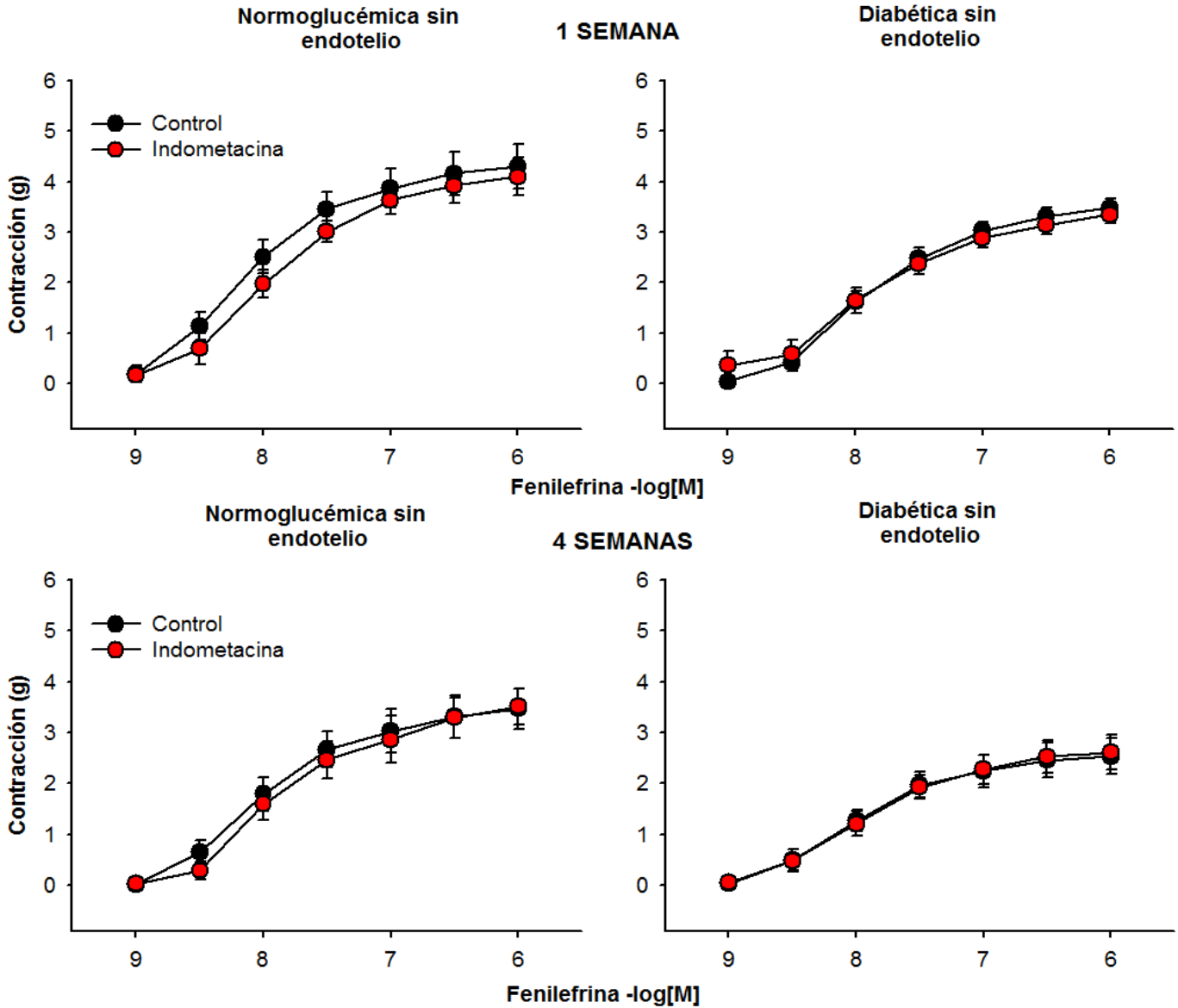


Figura 21. Efecto de la inhibición de COX con indometacina, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 5 diabéticas n= 9; 4 semanas normoglucémicas n= 4 diabéticas n= 8.

6.5 Efecto de SC560 sobre la contracción de la aortica

Con el propósito de evaluar la participación de los prostanoïdes derivados de COX-1 en el efecto contráctil a la fenilefrina en la aorta de ratas diabéticas y normoglucémicas, los anillos aórticos se incubaron con SC560 (Inhibidor selectivo de COX-1). En los anillos aórticos con (fig. 22) y sin endotelio (fig. 23) la inhibición de COX-1 no provocó cambios en la contracción inducida por fenilefrina, en el grupo normoglucémico y diabético a 1 y 4 semanas de evolución. Lo que nos sugiere que los metabolitos derivados de esta isoforma no están participando en la actividad contráctil inducida por fenilefrina.

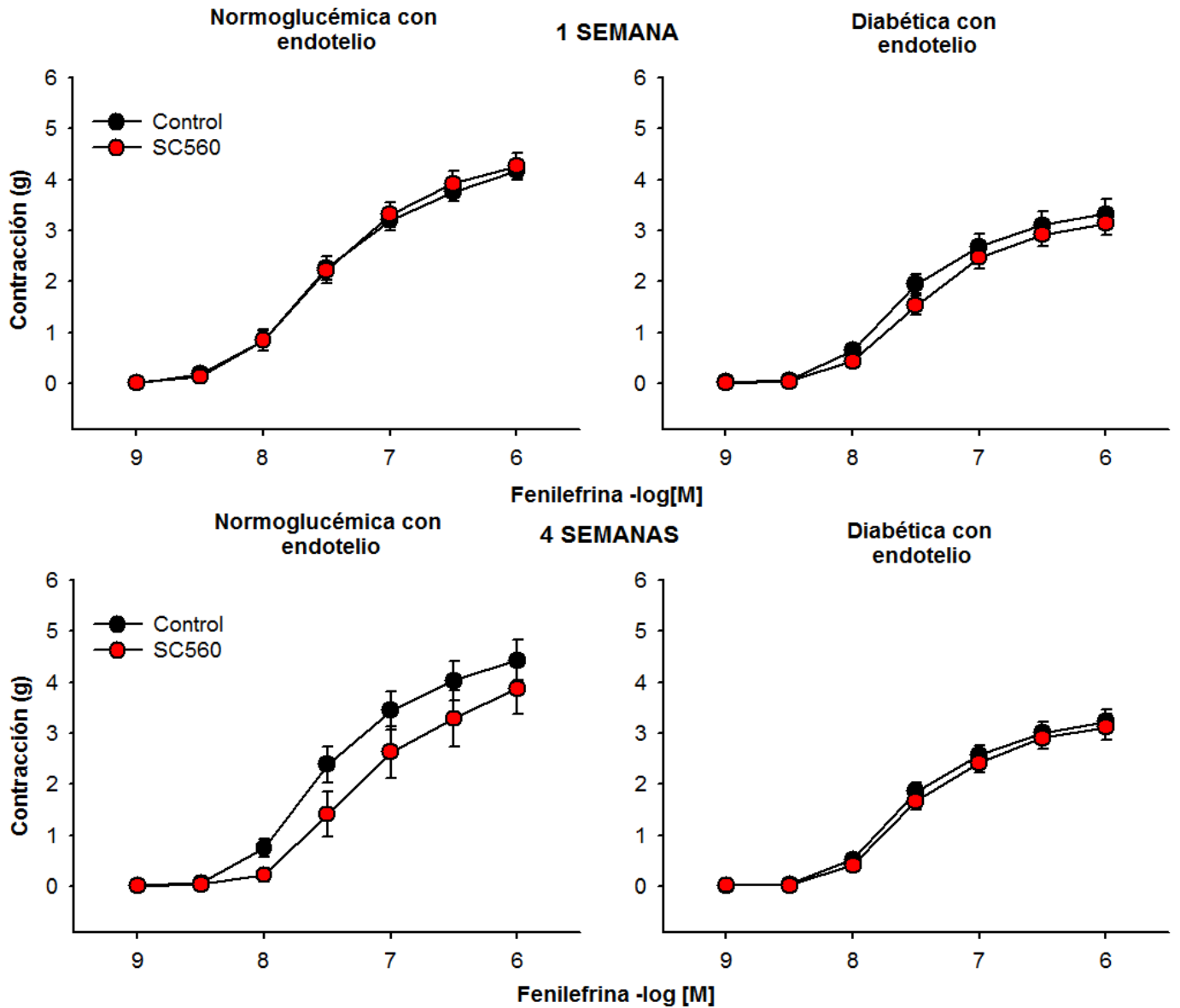


Figura 22. Efecto de la inhibición de COX-1 con SC560, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 5; 4 semanas normoglucémicas n= 4 diabéticas n= 5.

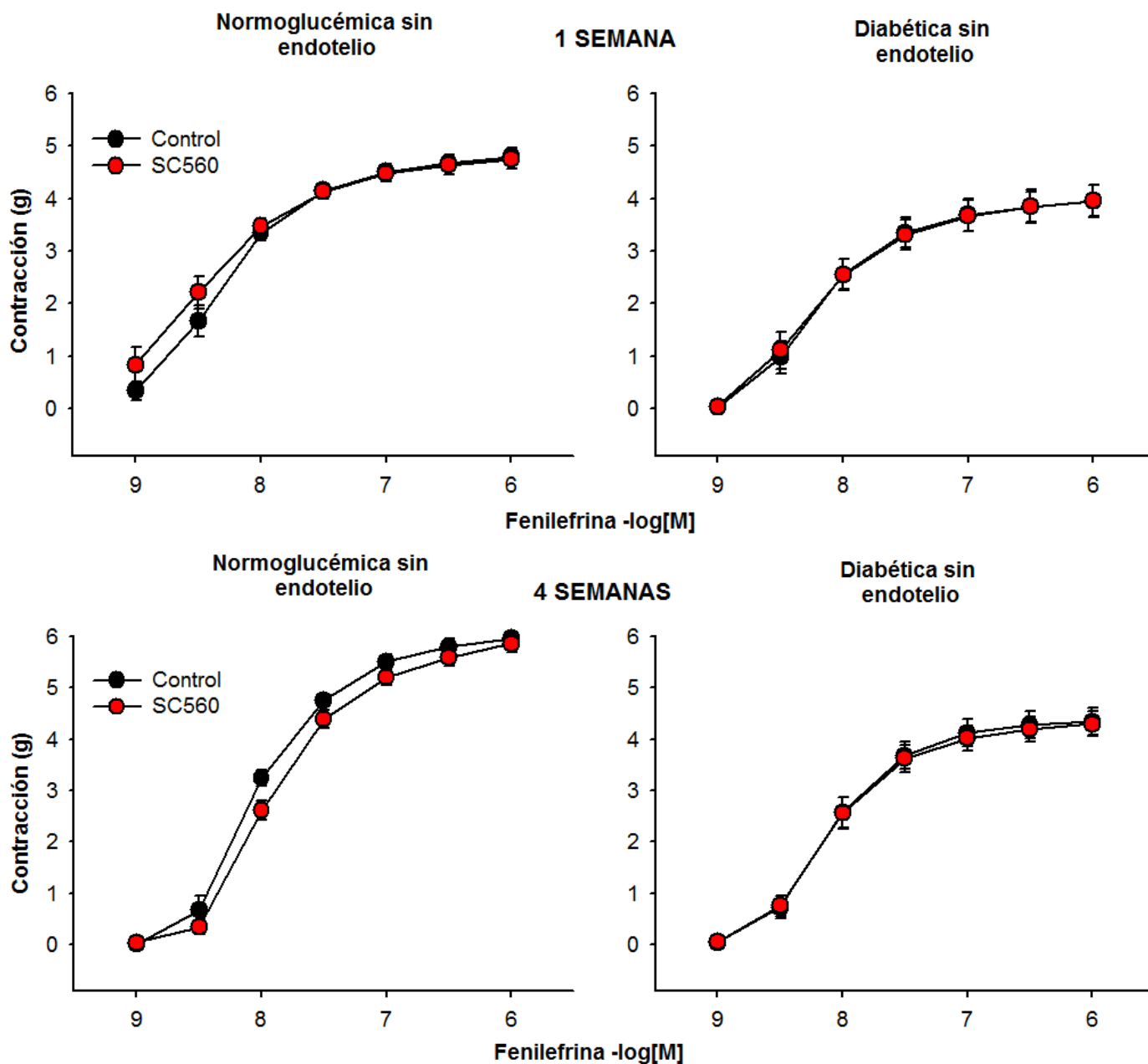


Figura 23. Efecto de la inhibición de COX-1 con SC560, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 5; 4 semanas normoglucémicas n= 4 diabéticas n= 5.

6.6 Efecto de NS-398 sobre la contracción de la aorta

Para analizar la participación de los prostanoïdes derivados de COX-2 en la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina se usó NS-398 (inhibidor selectivo de COX-2). Se observó que, en presencia de este inhibidor, la contracción inducida por fenilefrina disminuyó significativamente en anillos de aortas con endotelio (fig. 24) de ratas normoglucémicas y diabéticas de 1 y 4 semanas de evolución. Sin embargo, el efecto del NS-398 fue menor durante la diabetes experimental, lo que sugiere que la influencia de los prostanoïdes derivados de la COX-2 en la contracción a la fenilefrina disminuyó durante la diabetes. En contraste, al remover el endotelio de los anillos de aortas normoglucémicas y diabéticas (fig. 25) se observó que el inhibidor de la COX-2 no provocó cambios en la respuesta contráctil a fenilefrina en ambas edades. Se comprobó la presencia de COX-2 en el endotelio tanto en condiciones de normoglucémia como en la diabetes.

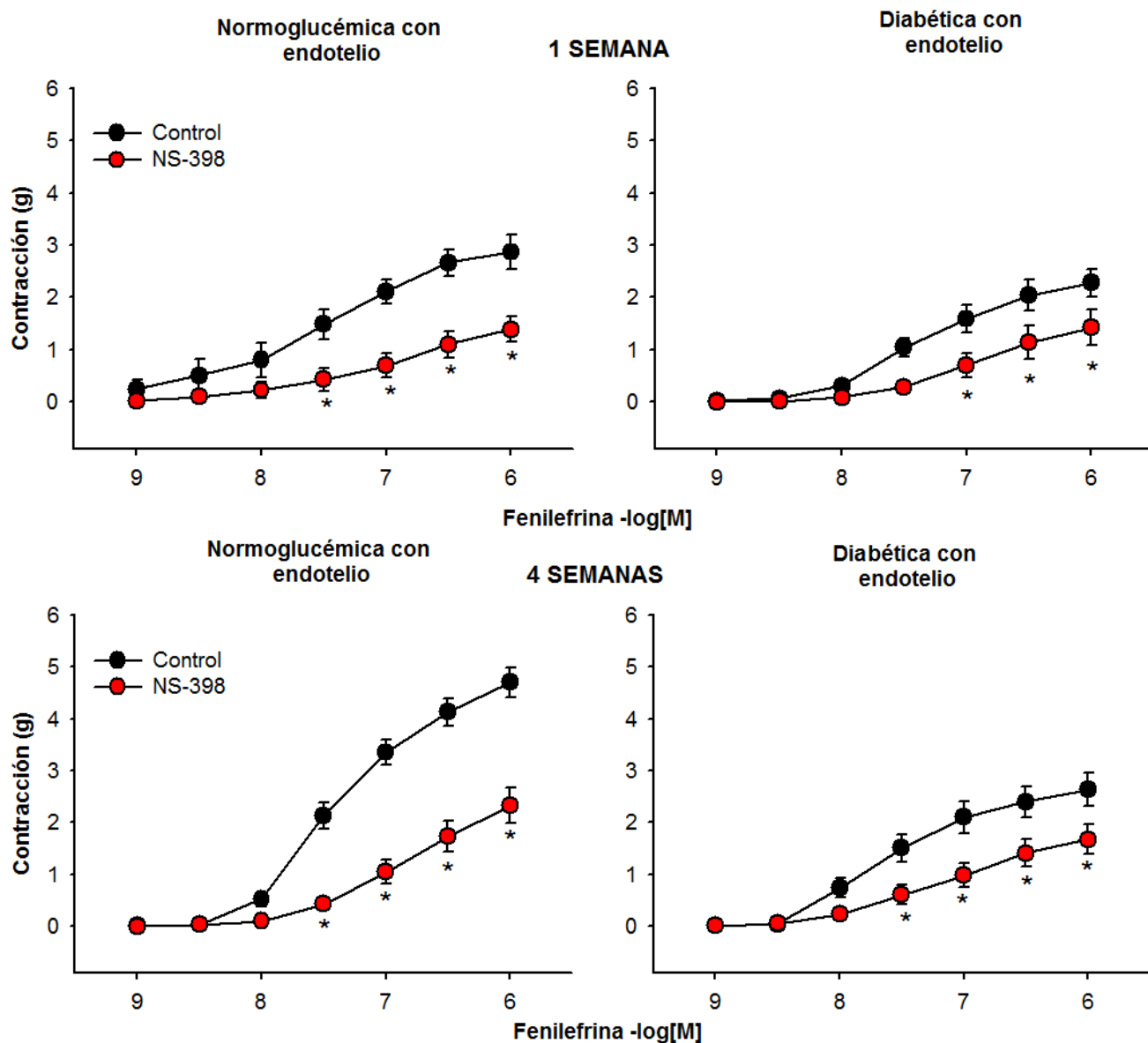


Figura 24. Efecto de la inhibición de COX-2 con NS-398, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 Semana normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 8; 4 semanas normoglucémicas n= 5 diabéticas n= 7. *p<0.05 vs control.

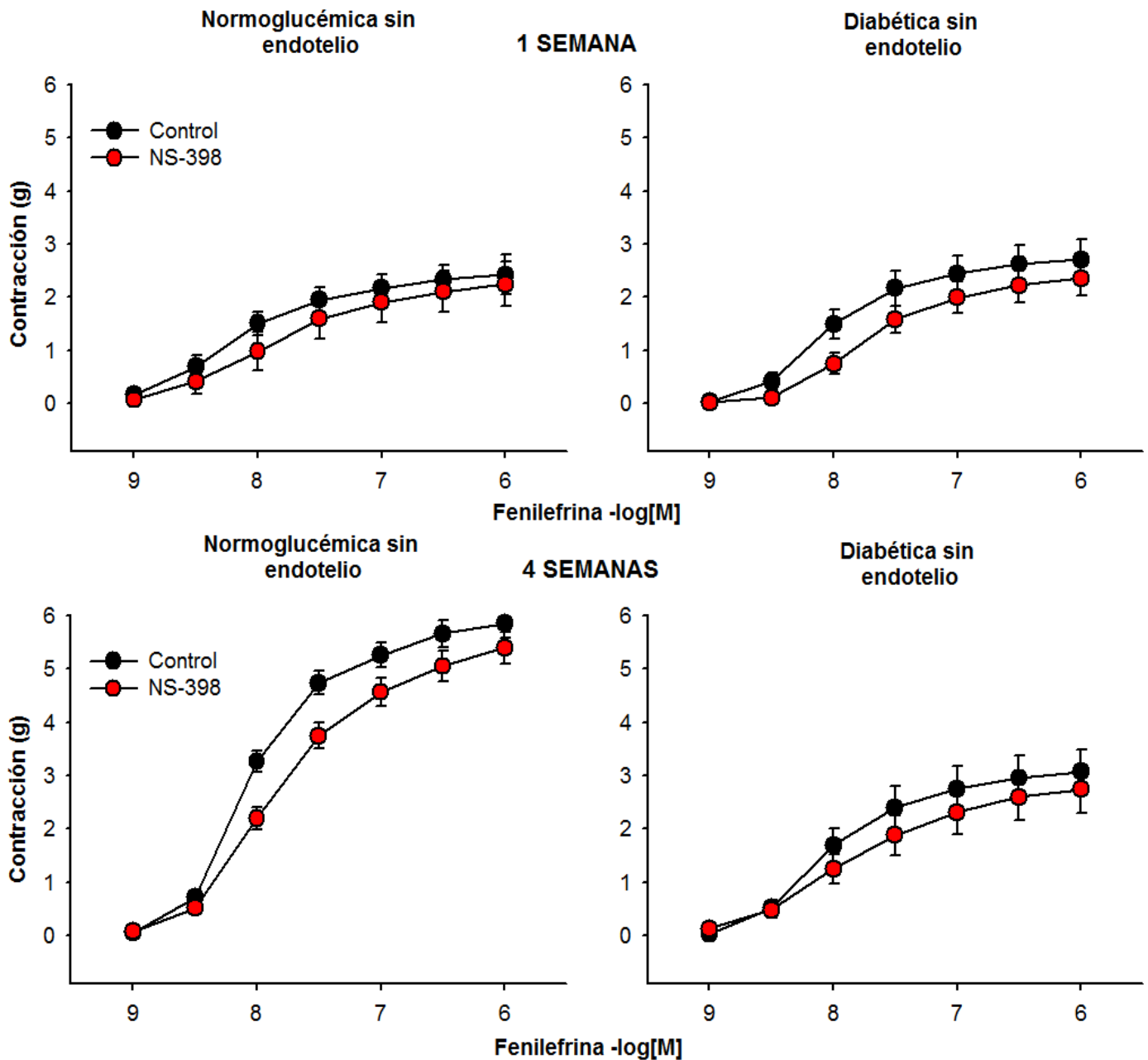


Figura 25. Efecto de la inhibición de COX-2 con NS-398, sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 8; 4 semanas normoglucémicas n= 5 diabéticas n= 7.

6.7 Influencia del NO en el efecto de los inhibidores selectivos de las COX

Para evaluar si el NO influye en los efectos provocados por los inhibidores selectivos de las COX en la respuesta contráctil a fenilefrina, los anillos aórticos (de ratas de 4 semanas únicamente) se incubaron con L-NAME (Inhibidor no selectivo de NOS) o en combinación con inhibidores selectivos de COX-1 (SC560) y COX-2 (NS-398). Al incubarse con L-NAME los anillos aórticos con endotelio (fig. 26), se observó un aumento significativo de la respuesta a fenilefrina en comparación con su control, en ambos grupos (normoglucémicos y diabéticos). Lo que indica que el NO es capaz de modular negativamente la respuesta contráctil de la aorta tanto en animales normales como diabéticos. Cuando los anillos con endotelio fueron incubados con L-NAME+SC560 (fig. 26) se pudo observar un incremento de la contracción similar a la que causó el L-NAME solo. En contraste, el L-NAME bloqueó la depresión de la contracción provocada por el NS-398, lo que sugiere la participación del NO en el efecto del NS-398 (fig. 26). En anillos aórticos sin endotelio incubados tanto con L-NAME como con las combinaciones (L-NAME+SC560 y L-NAME+NS-398), no se observaron cambios significativos en la contracción inducida por fenilefrina en animales normales y diabéticos (fig. 27).

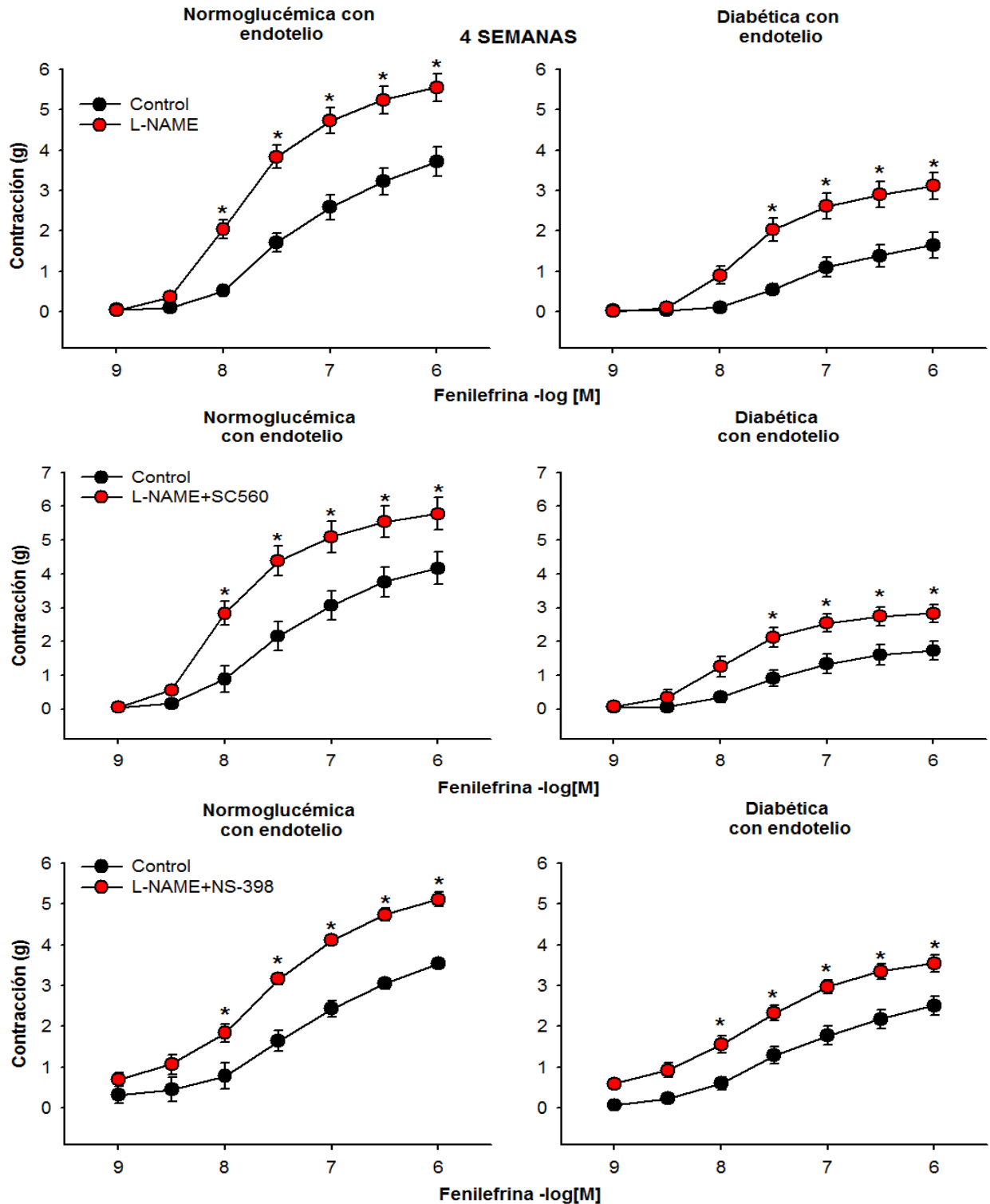


Figura 26. Efecto de la inhibición de NOS (L-NAME), COX-1 (SC560) y COX-2 (NS-398), sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. L-NAME normoglucémicas n= 10 diabéticas n= 10, L-NAME+SC560 normoglucémicas n=5 diabéticas n=8, L-NAME+NS-398 normoglucémicas n= 8 diabéticas n= 9. *p<0.05 vs control.

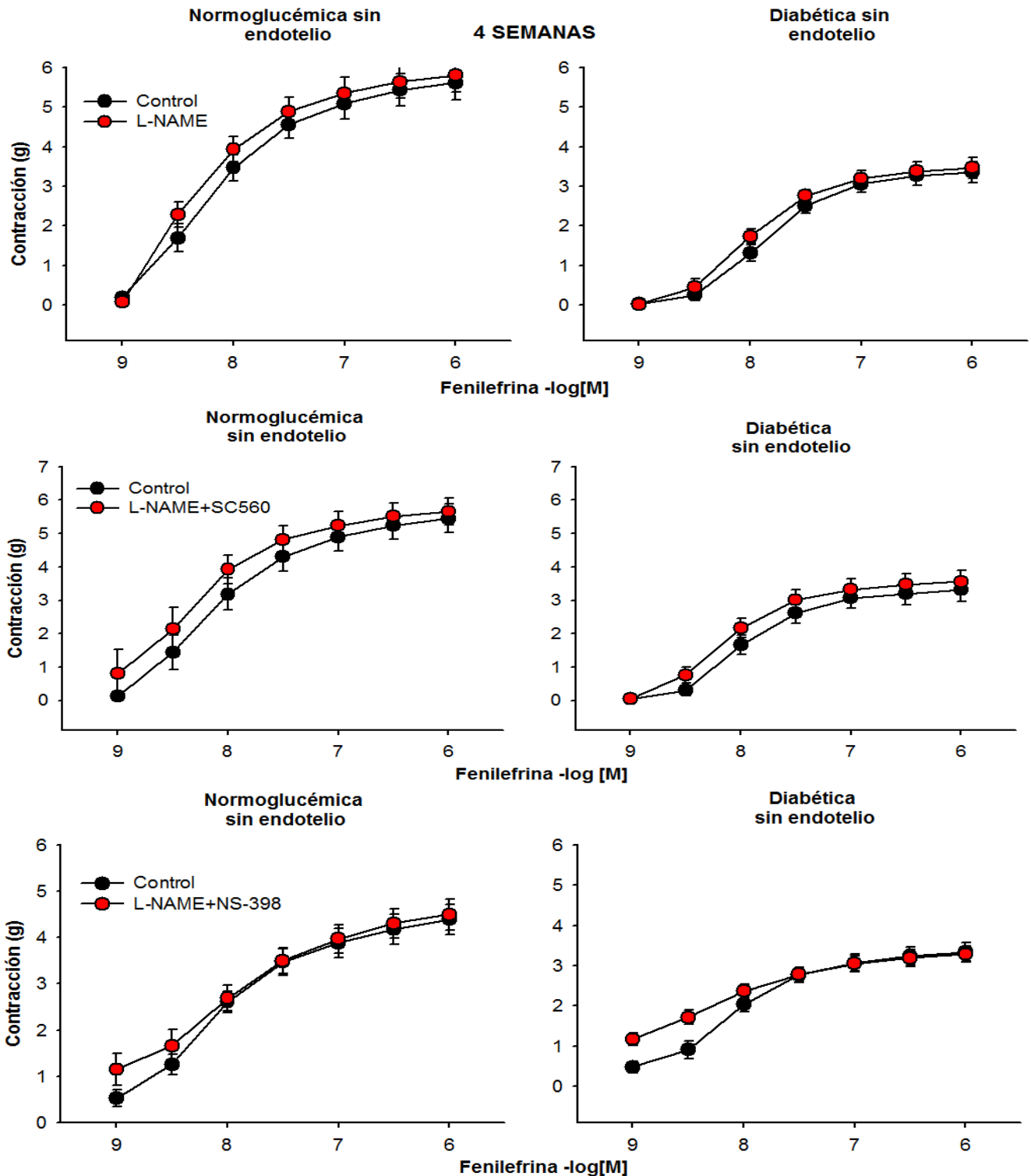


Figura 27. Efecto de la inhibición de NOS (L-NAME), COX-1 (SC560) y COX-2 (NS-398), sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. L-NAME normoglucémicas n= 10 diabéticas n= 10, L-NAME+SC560 normoglucémicas n=5 diabéticas n=8, L-NAME+NS-398 normoglucémicas n= 8 diabéticas n= 9

6.8 Participación de la Tromboxano sintasa en la respuesta contráctil de la aorta

Para analizar la influencia del TXA₂ (metabolito vasoconstrictor de la vía AA-COX) en la respuesta contráctil a fenilefrina, los anillos aórticos se incubaron con el inhibidor de TXAS, Ozagrel. La inhibición de TXAS en anillos con endotelio (fig. 28) de ambos grupos, no provocó cambios de la respuesta a fenilefrina en ningún tiempo estudiado. En anillos sin endotelio de los dos grupos (fig. 29), la inhibición de la TXAS tampoco tuvo efecto sobre la respuesta presora a fenilefrina en ambas edades.

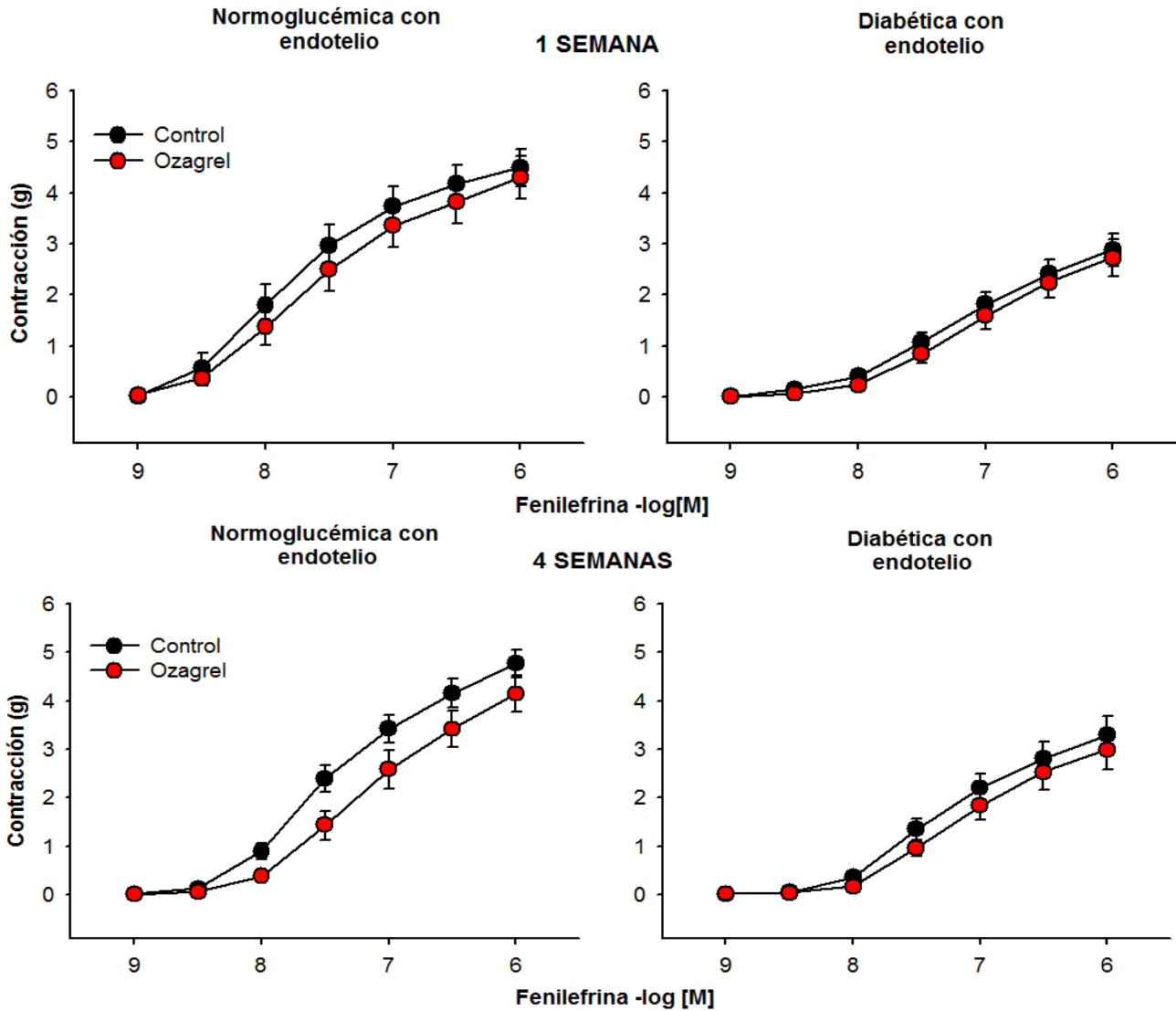


Figura 28. Efecto de la inhibición de TXAS (Ozagrel) sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 10 diabéticas n= 11; 11; 4 semanas normoglucémicas n= 9 diabéticas n= 10.

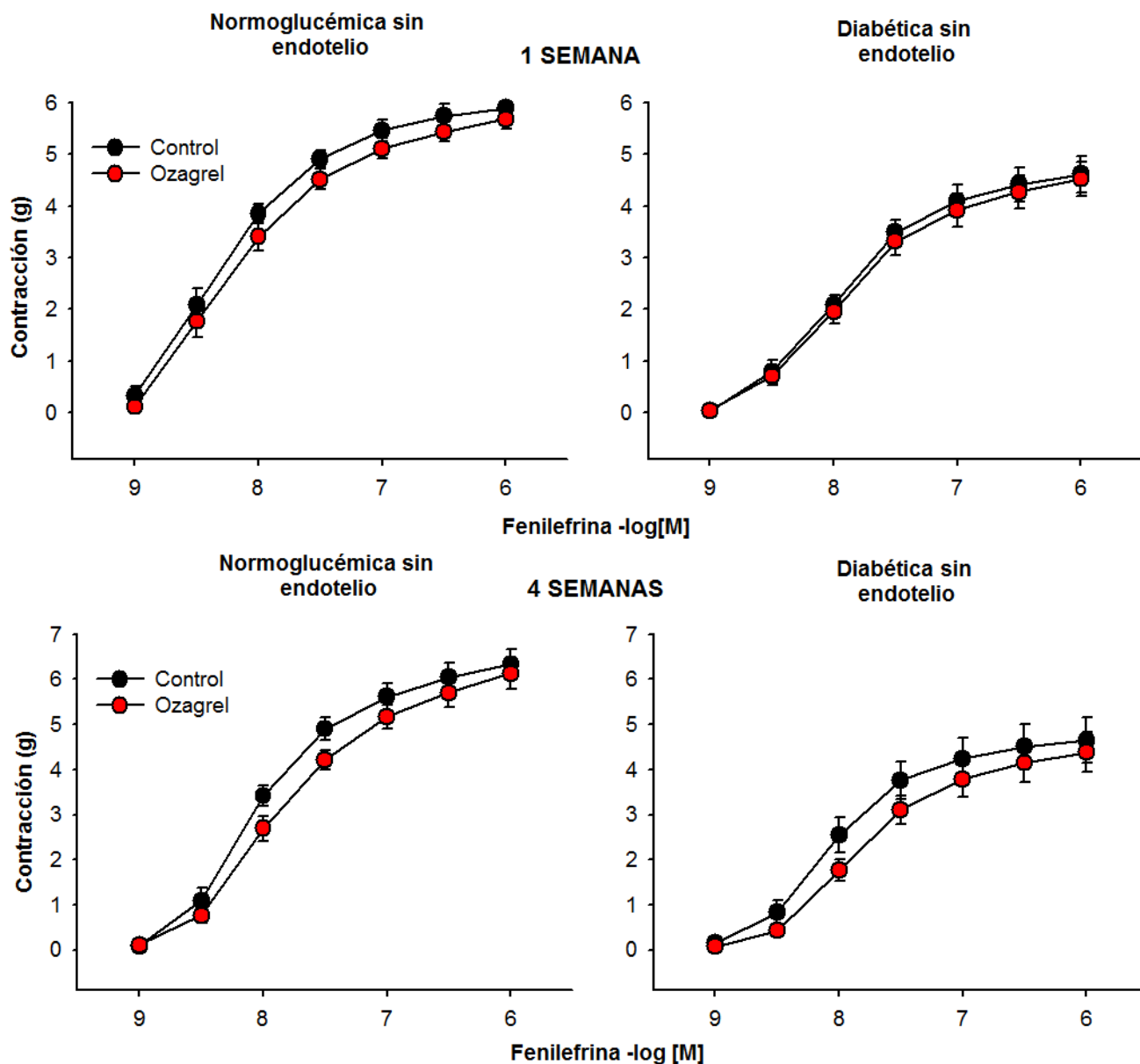


Figura 29. Efecto de la inhibición de TXAS (Ozagrel) sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 10 diabéticas n= 11; 4 semanas normoglucémicas n= 9 diabéticas n= 10.

6.9 Participación de la prostaciclina sintasa en la respuesta contráctil de la aorta

Para analizar la influencia de la prostaciclina (metabolito vasodilatador) en la respuesta contráctil a la fenilefrina, los anillos aórticos se incubaron con el inhibidor de la prostaciclina, Tranilcipromina (2PCPA). El inhibidor de PGIS provocó menor respuesta contráctil en anillos con endotelio (fig. 30) de ratas normoglúcemicas de 4 semanas, pero no tuvo efecto en los anillos de ratas diabéticas ni tampoco en los anillos de ratas normoglucémicas de 1 semana. Sin embargo, en anillos sin endotelio (fig. 31) se observó disminución de la contracción a la fenilefrina en ratas controles y diabéticas de ambas edades. Estos datos sugieren que tranilcipromina parece tener un efecto inhibitorio directo sobre el tono vascular independiente de la vía COX.

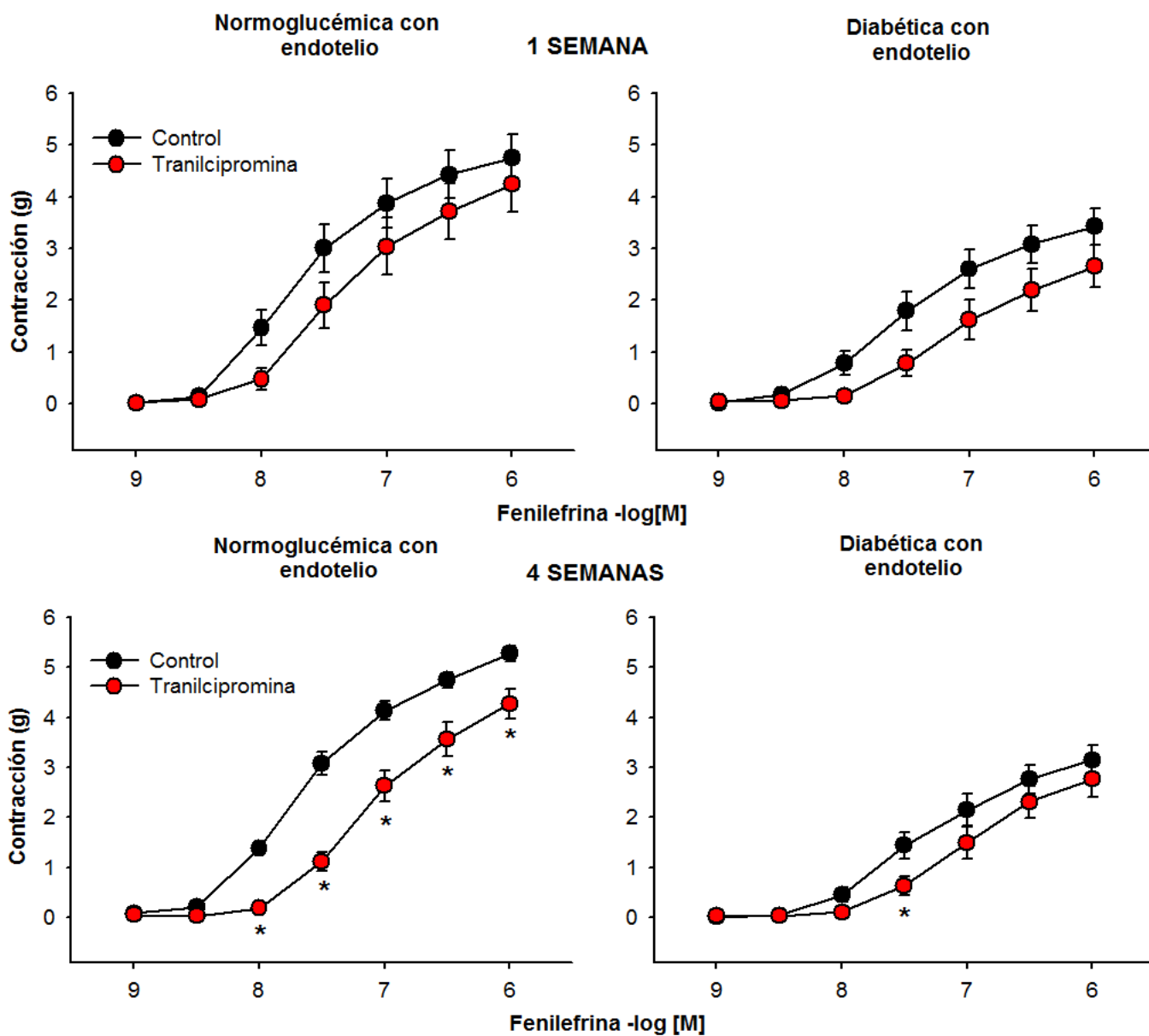


Figura 30. Efecto de la inhibición de PGIS con tranilcipromina sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglicémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) con endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglicémicas n= 6 diabéticas n= 8; 4 semanas normoglicémicas n= 6 diabéticas n= 8. *p<0.05 vs control.

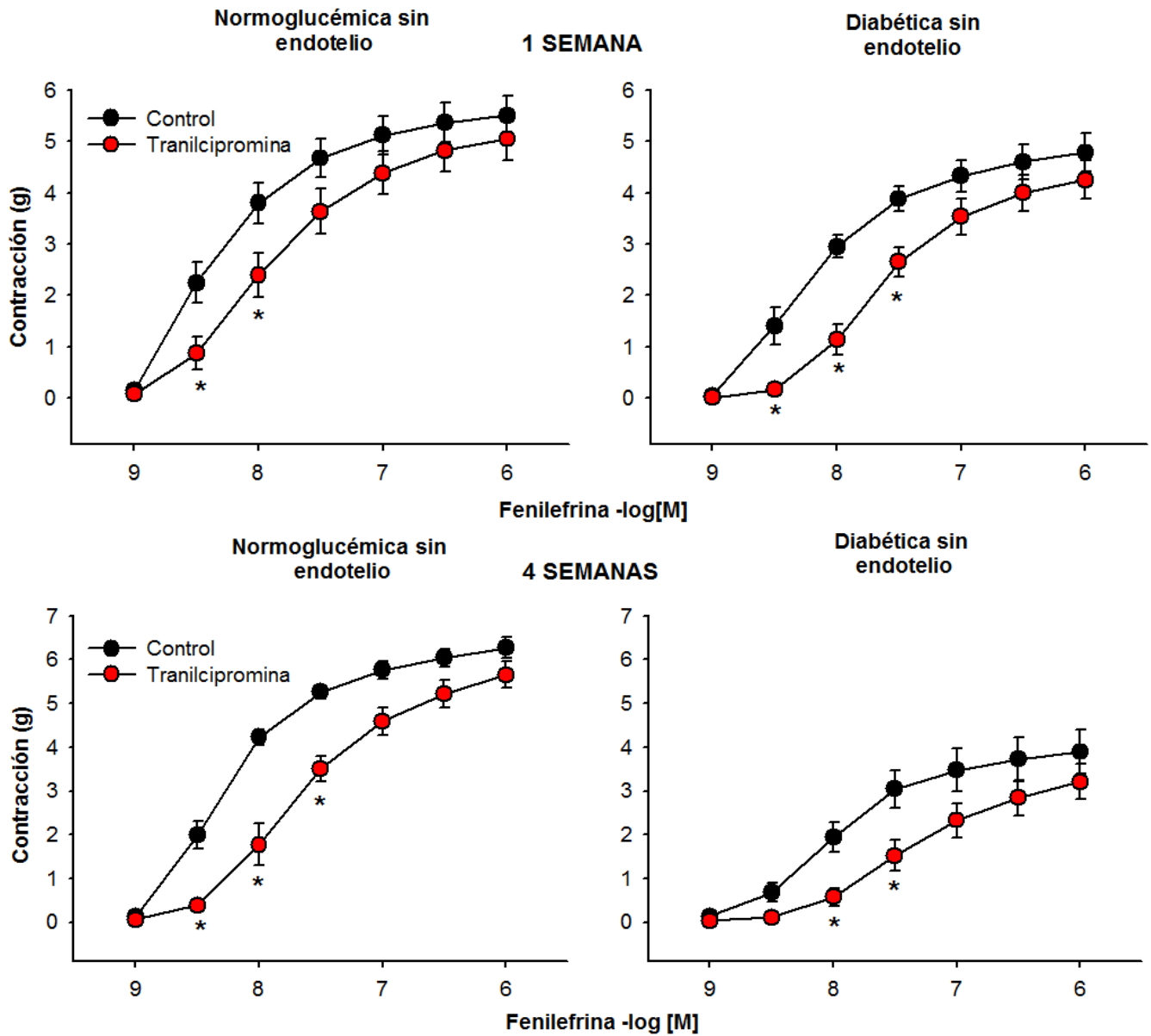


Figura 31. Efecto de la inhibición de PGIS con tranilcipromina sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas) sin endotelio. Los datos representan la media \pm E.E. 1 semana normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 8; 4 semanas normoglucémicas n= 6 diabéticas n= 8. *p<0.05 vs control.

7. DISCUSIÓN

La diabetes se ha vinculado con enfermedades cardiovasculares, de hecho, algunos autores la consideran como una enfermedad vascular por su efecto en la macro y microcirculación de los lechos vasculares (Sena *et al.*, 2013). En el presente estudio se evaluó el efecto del tiempo de evolución de la diabetes (1 y 4 semanas) sobre la contracción aortica inducida por el agonista adrenérgico fenilefrina, también se evaluó el papel de las COX's, TXAS y PGIS en la respuesta contráctil aórtica en ratas Wistar con diabetes experimental.

Los resultados del presente estudio muestran que la contracción inducida por fenilefrina se ve disminuida en ambos tiempos de evolución de diabetes (1 y 4 semanas) incluso en anillos sin endotelio, lo que nos sugiere que la diabetes se asocia con disminuciones en las contracciones aórticas por un posible daño al músculo liso, además de una alteración en los mecanismos de contracción. La inhibición de las COX's demostró que la isoforma que participa en la regulación del tono vascular en la aorta es la COX-2, liberando prostanoïdes vasoconstrictores. La inhibición de la TXAS nos indicó que el TXA₂ no participa en la regulación del tono vascular en ratas con diabetes experimental; sin embargo, no se puede descartar alteraciones a nivel de su receptor. Por otra parte, la inhibición de la PGIS nos mostró efectos contrarios a los esperados ya que tratándose de una enzima que libera PGI₂ se esperaba que al inhibirla, la contracción aumentara y no que disminuyera como se observó, esto nos sugiere que la tranilcipromina reduce el la respuesta contráctil de la aorta, por mecanismos diferentes a la inhibición de la PGIS.

7.1 Respuesta contráctil a la fenilefrina en aortas de ratas normoglucémicas y diabéticas

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en anillos aórticos de ratas diabéticas la respuesta contráctil de la fenilefrina fue menor en comparación con los normoglucémicos, este cambio fue independiente del endotelio o del tiempo de evolución de la enfermedad, lo que nos sugiere que el daño provocado por dicha

patología afecta no sólo al endotelio sino también a las células del músculo liso. Estos resultados son consistentes con los de Aloysius *et al* (2012), en los que se muestra que durante la diabetes ocurre una disminución en la contracción inducida por fenilefrina en anillos con endotelio de ratas diabéticas; sin embargo también reportaron que en los anillos sin endotelio de ratas diabéticas se observa una mayor contracción comparada con los anillos de ratas normoglucémicas; resultados que difieren a los presentados en este trabajo, las discrepancias pueden depender de la duración y gravedad de la diabetes, del lecho vascular o tejido y finalmente el modelo con el que se trabaje.

A corto plazo la diabetes aumenta la vasodilatación dependiente del endotelio y en etapas más avanzadas disminuye, esto se le podría atribuir en parte a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Ya que dependiendo de la duración de la patología las ROS producidas por cambios metabólicos y la inflamación alteran la función vasodilatadora y/o vasoconstrictora de la vasculatura (Aloysius *et al.*, 2012). De acuerdo con estos hallazgos, la disminución de la contracción observada en nuestros resultados podría deberse a un aumento en los niveles de PGI₂, como mecanismo compensatorio temprano en respuesta al daño provocado por las ROS. Sin embargo, esta no podría ser una única explicación, ya que los resultados de este trabajo muestran una disminución en la contracción también en anillos de aorta sin endotelio del grupo diabético, que también indica daño al músculo liso, con respecto a esto un estudio previo (Pfaffman *et al.*, 1982) evaluó las contracciones inducidas por fenilefrina (produce contracciones por medio de receptores aumentando las concentraciones de Ca²⁺ intracelular) y KCl (actúa por medio de canales iónicos aumentando las concentraciones de Ca²⁺ intracelular) en aortas de ratas diabéticas tratadas y no tratadas con insulina, y encontró que la diabetes causa disminución en las contracciones a fenilefrina y KCl, y que el tratamiento con insulina revirtió la disminución, lo que sugiere que en condiciones diabéticas la disfunción vascular puede deberse en parte al daño al músculo liso y a una respuesta disminuida de los receptores.

Tanto en el estudio de Pfaffman *et al.* (1982) como en nuestros resultados la contracción inducida por fenilefrina se ve disminuida en condiciones diabéticas, lo que nos podría sugerir que hay alteraciones en los mecanismos que producen la contracción del músculo liso en esta patología o que los receptores adrenérgicos no funcionan adecuadamente cuando son estimulados por fenilefrina.

Lo anterior podría explicarse por los siguientes mecanismos 1) la diabetes podría estar afectando la señalización de los receptores α 1-adrenérgicos a diferentes niveles (Bolton, 1979) o bien disminuyendo la cantidad de receptores α 1-adrenérgicos como fue reportado por Latifpour y McNeill, (1984) en tejido cardiaco, reduciendo así la respuesta a la fenilefrina. 2) Alteraciones en el manejo del Ca^{2+} por la célula por ejemplo; la disminución de la entrada, almacenamiento y mecanismos de unión del Ca^{2+} pueden disminuir la contracción inducida por fenilefrina como se muestra en nuestros resultados y también de KCl como se observó en el estudio de Pfaffman *et al.*, 1982 y datos recientes de nuestro laboratorio. 3) una disminución de la utilización de Ca^{2+} por las proteínas miofibrilares o una reducción en la sensibilidad de actina-miosina al Ca^{2+} también conlleva a que la contracción disminuya. 4) disminución de la síntesis o aumento del metabolismo de las proteínas podría conducir a la reducción de las proteínas contráctiles y en consecuencia provocar menor contracción (Pfaffman *et al.*, 1982). 5) glicosilaciones de actina, miosina y calmodulina pueden causar disminución de la respuesta contráctil en la aorta de ratas diabéticas (Koboyashi *et al.*, 1999), sustentando lo anterior algunos autores han reportado aumento en las glicosilación de estas proteínas en plaquetas, cerebro y cristalino de ratas diabéticas; por lo que es posible pensar que en el músculo liso de la aorta ocurra lo mismo (Cohen *et al.*, 1989; Muruganandam *et al.*, 1993; Pekiner *et al.*, 1993; Evcimen y Nebioglu, 1996).

7.2 El papel de la vía de las ciclooxigenasas en la reactividad vascular

La inhibición de las COX's con indometacina no afectó significativamente la contracción aórtica en animales normales y diabéticos, lo que nos podría sugerir que las COX's no participan en la regulación del tono vascular o que ambas isoformas de COX ejercen papeles opuestos una de la otra (una como vasodilatadora y otra como vasoconstrictora) de tal manera que la inhibición de ambas isoformas enmascara su participación en el proceso contráctil provocado por la fenilefrina. Los resultados son consistentes con investigaciones anteriores (García Hurtado *et al.*, 2006), en un modelo de aorta de ratas diabéticas de 4 semanas, en donde al inhibir con indometacina no encontraron diferencias significativas en la reactividad vascular al estimular con fenilefrina, en anillos con endotelio y sin endotelio, lo que observamos en nuestros resultados. Pero difiere con lo reportado por Aloysius *et al* (2012) en un modelo de diabetes de 8 semanas en donde la contracción inducida por fenilefrina en aorta de rata aumenta significativamente en el grupo diabético al inhibir COX con indometacina. También se ha reportado el porcentaje de dilatación inducida por bradicinina en arteriolas coronarias de pacientes diabéticos se mostró que la indometacina disminuyó la dilatación dependiente del endotelio a la bradicinina en pacientes diabéticos mientras que en pacientes normoglucémicos no tuvo efecto significativo (Szerafin *et al.*, 2006). Las discrepancias en estos hallazgos pueden deberse a la duración, gravedad, y tiempo de evolución de la diabetes, además del tejido con el que se estudia y del modelo experimental. Nuestros resultados indican claramente que las COX's no ejercen una participación en la regulación del tono vascular en la aorta, sin embargo, es bien sabido que cada isoforma puede tener funciones diferentes en la regulación del tono vascular (Wong *et al.*, 2010; Félétou *et al.*, 2011) por lo que fue necesario realizar la inhibición selectiva de cada isoforma de COX y así poder dilucidar cuál es el papel que estas tienen en la reactividad vascular.

7.3 El papel de las isoformas de COX en la reactividad vascular

La inhibición de COX-1 con SC560 no mostró efectos significativos sobre la contracción en los anillos aórticos con y sin endotelio de ambos grupos (normoglucémicos y diabéticos). Por el contrario, la inhibición específica de COX-2 con NS-398 disminuyó significativamente la contracción aórtica en anillos con endotelio de ratas normoglucémicas y diabéticas (1 y 4 semanas), mientras que en los anillos sin endotelio no se observó un efecto significativo del inhibidor sobre la contracción aórtica. Los hallazgos mencionados sugieren que los prostanoídes provenientes de COX-1, no participan en la regulación del tono vascular en las condiciones estudiadas al no observarse efectos significativos del inhibidor selectivo (SC560) en la respuesta contráctil de la aorta. En contraste, la COX-2 endotelial tiene una importante participación en la respuesta contráctil a través de la liberación de prostanoídes vasoconstrictores en nuestro modelo de diabetes experimental, entre los cuales podrían encontrarse: TXA₂, PGF_{2α}, PGE₂ y PGH₂. Esto es consistente con lo reportado por Bagi *et al.*, (2005) en un modelo de ratones diabéticos en donde observan que el diámetro arteriolar inducido por presión intraluminal no cambia al inhibir COX-1 con SC560, pero al inhibir COX-2 con NS-398 el diámetro arteriolar aumenta (relajación) sugiriéndoles que la COX-2 actúa liberando prostanoídes vasoconstrictores. Guo *et al* (2005) también reporta disminución de la contracción, al inhibir COX-2 en un modelo de aorta de ratones diabéticos. Efectos semejantes se han reportado en arterias cerebrales isquémicas en donde inhiben a la COX-2 con NS-398 y observan una disminución en la contracción inducida por noradrenalina, atribuyéndole a COX-2 un papel como liberador de prostanoídes vasocontractiles en presencia de esta patología (Monge *et al.*, 2010).

Finalmente sabemos que en estos modelos la COX-2 participa en la liberación de prostanoídes vasoconstrictores, lo que se atribuye a un aumento en la expresión COX-2 en condiciones diabéticas. El TXA₂ podría ser el prostanoide involucrado en este fenómeno según con lo mencionado por Consentino *et al.*, (2003). Ellos reportaron que las células endoteliales humanas expuestas a altas concentraciones de glucosa expresaron una mayor cantidad de COX-2 y liberaron

mayor cantidad de TXA₂. Peredo *et al.*, (2006) reportan resultados informando una disminución en los niveles de PGI₂ y un aumento de TXA₂ en aorta a 180 días de diabetes. Lo que nos indicaría que la COX-2 libera TXA₂ principalmente, aunque no se descarta la posibilidad de que otro prostanoide vasoconstrictor esté participando en la regulación de la contracción en nuestro modelo experimental.

7.4 Papel de la PGIS y TXAS

Los resultados mostraron que la inhibición de la TXAS con ozagrel no provocó cambios significativos en la contracción inducida por fenilefrina en anillos (con y sin endotelio) de ratas diabéticas y normoglucémicas, lo sugiere que la TXAS no participa en la regulación del tono vascular en la aorta. Nuestros resultados no coinciden con lo reportado por Lee y colaboradores (2008) en donde se encontró que el ozagrel revierte las constricciones y restablece el flujo sanguíneo sólo en las arteriolas de retina de ratas diabéticas. Estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en la duración e intensidad de la diabetes y en el tejido sobre el que se trabaja. Por otro lado, la inhibición de PGIS con tranilcipromina (2PCPA) bloqueo significativamente la respuesta a fenilefrina principalmente en anillos sin endotelio en ambos tiempos de exposición a diabetes (1 y 4 semanas) y en ambas condiciones (normoglucémicas y diabéticas). La Tranilcipromina disminuyó la reactividad vascular inducida por fenilefrina, lo que es consistente con lo reportado por Ribback *et al.*, (2012) en donde evalúan el efecto de tres fármacos, entre ellos Tranilcipromina y se observan que tiene propiedades vasodilatadoras en aortas de ratas, manteniendo el efecto relajante después de remover el endotelio como se observa también en nuestros resultados. Ellos sugieren que la Tranilcipromina puede reducir el tono de las arterias mediante la inhibición de los receptores suprarrenales o de prostaglandinas, interfiriendo así con la vía farmacomecánica o por un efecto en el mecanismo electromecánico. Hong y colaboradores, (1980) examinaron el efecto inhibidores de la PGIS, reportando que la Tranilcipromina además de inhibir la síntesis de PGI₂ también inhibe el proceso que conduce a la liberación de ácido araquidónico (aunque no está claro cómo se produce este último), por lo que afectaría la producción de prostanoides y a la reactividad

vascular (como lo podemos observar en nuestros resultados con la disminución de la contracción); además mencionan que algunas dosis de Tranilcipromina (mayores a 800 µg/ml) son tóxicas para las células. Se ha propuesto que tranilcipromina pudiera actuar directamente sobre la fosfolipasa o mediante algún otro mecanismo que pudiese estar relacionado con los mecanismos de contracción del músculo liso, pudiendo afectar la entrada de Ca²⁺ y su reconocimiento por algunas enzimas que participan en el proceso contráctil, por ejemplo, algunas cinasas, fosfatasas, proteínas miofibrilares etc. (Pfaffman *et al.*, 1982). La tranilcipromina forma parte del grupo de los inhibidores de la MAO (enzima que degrada catecolaminas), se piensa que estos inhibidores producen hipotensión ya sea por mecanismos periféricos o centrales (Marwood *et al.*, 1985).

8. CONCLUSIONES

La reactividad de la aorta a la fenilefrina está disminuida en ratas diabéticas de 1 y de 4 semanas de evolución.

La participación de los prostanoideos derivados de la COX-2 en la contracción de la aorta inducida por la fenilefrina no se modifica por la diabetes.

La inhibición de TXAS con Ozagrel no tuvo efecto en la reactividad vascular, lo que indica que el tromboxano parece no participar en la reactividad de la aorta en este modelo experimental.

La tranilcipromina reduce la contracción inducida por fenilefrina, posiblemente por un efecto directo del fármaco sobre el músculo liso de la aorta, siendo más evidente en anillos de ratas diabéticas sin endotelio.

9. LITERATURA CITADA

- Aloysius, U. I., Achike, F. I., & Mustafa, M. R. (2012). Mechanisms underlining gender differences in Phenylephrine contraction of normoglycaemic and short-term Streptozotocin-induced diabetic WKY rat aorta. *Vascular pharmacology*. 57(2-4): 81-90.
- American Diabetes Association. (2017). 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*. 40(Supplement 1): S11-S24.
- Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., de Kreutzenberg, S., & Fadini, G. P. (2011). Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes care*. 34(2): S285-S290.

- Bagi, Z., Erdei, N., Toth, A., Li, W., Hintze, T. H., Koller, A., & Kaley, G. (2005). Type 2 Diabetic Mice Have Increased Arteriolar Tone and Blood Pressure: Enhanced Release of COX-2-Derived Constrictor Prostaglandins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 25(8): 1610-1616.

- Beckman, J. A., Creager, M. A., & Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama*. 287(19): 2570-2581.

- Bolton, T. B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological reviews*, 59(3), 606-718.

- Cameron, N. E., & Cotter, M. A. (1992). Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*. 35(11): 1011-1019.

- Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., & Lüscher, T. F. (2003). High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 107(7): 1017-1023.

- Cohen, I., Burk, D., Fullerton, R. J., Veis, A., & Green, D. (1989). Nonenzymatic glycation of human blood platelet proteins. *Thrombosis research*. 55(3): 341-349.

- De Tejada, I. S., Goldstein, I., Azadzo, K., Krane, R. J., & Cohen, R. A. (1989). Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *New England journal of medicine*. 320(16): 1025-1030.

- Esteller Pérez, A. (2005). Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutrición hospitalaria*. 20(1): 5-17.

- Evcimen, N. D., & Nebioglu, S. (1996). Calmodulin glycation in diabetic rat lenses. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 74(12): 1287-1293.

- Federación Internacional de Diabetes. (2017). Atlas de Diabetes De La FID. Octava Edición 2017. 150 p.

- Félétou, M., Huang, Y., & Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British journal of pharmacology*. 164(3): 894-912.

- Furchgott, R. F. (1983). Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation research*. 53(5): 557-573.

- García-Hurtado, J. P., Sosa-Luna, C. A., & Ibarra-Barajas, M. (2006). Efecto del tratamiento con ramipril en la reactividad de la aorta de ratas con diabetes mellitus: participación del óxido nítrico y prostanoïdes. *Revista de Sanidad Militar*, 60(5), 324-333.

- García J.A.M., y Gómez J.J.R.C. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*. 27(1): 33-5.

- Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1441(2-3): 278-287.

- Guo, Z., Su, W., Allen, S., Pang, H., Daugherty, A., Smart, E., & Gong, M. C. (2005). COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. *Cardiovascular Research*. 67(4): 723-735.

- Guyton, A.C. y Hall, J.E. 2006. *Tratado de Fisiología Medica*. Editorial: Elsevier, Mss Graw Hill, décimo primera edición. pp: 171-176.

- Hong, S. L., Carty, T., & Deykin, D. (1980). Tranylcypromine and 15-hydroperoxyarachidonate affect arachidonic acid release in addition to inhibition of prostacyclin synthesis in calf aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 255(20): 9538-9540.

- Iñiguez, M. A., Cacheiro-Llaguno, C., Cuesta, N., Díaz-Muñoz, M. D., & Fresno, M. (2008). Prostanoid function and cardiovascular disease. *Archives of physiology and biochemistry*. 114(3): 201-209.

- Jackson, W. F. 2000. Ion channels and vascular tone. *Hypertension. Journal of the American heart association*. 35:173-178.

- Kobayashi, T., & Kamata, K. (1999). Effect of insulin treatment on smooth muscle contractility and endothelium-dependent relaxation in rat aorta from established STZ-induced diabetes. *British journal of pharmacology*. 127(4): 835-842.

- Larsson, S. C., Wallin, A., Håkansson, N., Stackelberg, O., Bäck, M., & Wolk, A. (2018). Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases. *International journal of cardiology*. 262: 66-70.

- Latifpour, J., & McNeill, J. H. (1984). Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 230(1), 242-249.

- Lee, S., Morgan, G. A., & Harris, N. R. (2008). Ozagrel reverses streptozotocin-induced constriction of arterioles in rat retina. *Microvascular research*. 76(3): 217-223.

- Manrique, C., & Silva, D. G. (2006). Apoptosis de las células Beta del páncreas durante la diabetes de tipo I. *Revista de la Facultad de Medicina*: 54(3): 181-190.

- Marwood, J. F., Huston, V., & Wall, K. T. (1985). Some cardiovascular effects of monoamine oxidase inhibitors in unanaesthetized rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 12(2): 161-168.

- Mokhtar, S. S., Vanhoutte, P. M., Leung, S. W., Yusof, M. I., Sulaiman, W. A. W., Saad, A. Z. M., & Rasool, A. H. G. (2013). Reduced expression of prostacyclin synthase and nitric oxide synthase in subcutaneous arteries of type 2 diabetic patients. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 231(3): 217-222.

- Monge, L., Fernández, N., Salcedo, A., García-Villalón, Á. L., & Diéguez, G. (2010). Role of α -adrenoceptors and prostacyclin in the enhanced adrenergic reactivity of goat cerebral arteries after ischemia-reperfusion. *Brain research*. 1346: 121-131.

- Muruganandam, A., Romsa, G. J., Thibert, R. J., Cheung, R. M., Draisey, T. F., & Mutus, B. (1993). Glycated calmodulin from platelets as an index of glycemic control. *Clinical chemistry*. 39(5): 815-819.

- Nesto, R. W. (2004). Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *The American journal of medicine*. 116(5): 11-22.

- NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., & LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Ozen, G., & Norel, X. (2017). Prostanoids in the pathophysiology of human coronary artery. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 133: 20-28.

- Pfaffman, M. A., Ball, C. R., Darby, A., & Hilman, R. (1982). Insulin reversal of diabetes-induced inhibition of vascular contractility in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 242(4): H490-H495.

- Peredo, H. A., Rodriguez, R., Susemihl, M. C., Villarreal, I., & Filingier, E. (2006). Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. 26(4): 355-360.

- Pekiner, C., Cullum, N. A., Hughes, J. N., Hargreaves, A. J., Mahon, J., Casson, I. F., & McLean, W. G. (1993). Glycation of brain actin in experimental diabetes. *Journal of neurochemistry*. 61(2): 436-442.

- Popov, D. (2010). Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus*. 2(3): 189-195.

- Qi, Z., Cai, H., Morrow, J. D., & Breyer, M. D. (2006). Differentiation of cyclooxygenase 1-and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension*. 48(2). 323-328.

- Olivares, J. A. R, & Arellano, A. P. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. 27(1): 9-18.

- Otero, D. M, Otero, P. L. L., & González, V. F. (2014). Análisis del comportamiento del material de la arteria aorta ascendente para su modelación. *Ingeniería Mecánica*, 17(2): 108-117.

- Ribback, S., Pavlovic, D., Herbst, D., Nedeljkov-Jancic, R., Wendt, M., Nedeljkov, V., & Frieling, H. (2012). Effects of amitriptyline, fluoxetine, tranylcypromine and venlafaxine on rat vascular smooth muscle in vitro—the role of the endothelium. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 63(2): 119.

- Sallam, N., Fisher, A., Golbidi, S., & Laher, I. (2011). Weight and inflammation are the major determinants of vascular dysfunction in the aortae of db/db mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 383(5): 483-492.

- Sandoo, A., van Zanten, J. J. V., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The open cardiovascular medicine journal*. 4: 302.

- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seíça, R. (2013). Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1832(12): 2216-2231.

- Szerafin, T., Erdei, N., Fülöp, T., Pasztor, E. T., Édes, I., Koller, A., & Bagi, Z. (2006). Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated

dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circulation research*. 99(5):e12-317.

- Tang, E. H., & Vanhoutte, P. M. (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiological genomics*. 32(3): 409-418.

- Tsamis, A., Krawiec, J. T., & Vorp, D. A. (2013). Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *Journal of The Royal Society Interface*: 10(83): 20121004–20121004.

- Wakabayashi, I., Hatake, K., Kimura, N., Kakishita, E., & Nagai, K. (1987). Modulation of vascular tonus by the endothelium in experimental diabetes. *Life sciences*. 40(7): 643-648

- Wong, S. L., Leung, F. P., Lau, C. W., Au, C. L., Yung, L. M., Yao, X., & Huang, Y. (2009). Cyclooxygenase-2–derived prostaglandin F₂α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circulation research*. 104(2): 228-235.

- Wong, S. L., Wong, W. T., Tian, X. Y., Lau, C. W., & Huang, Y. (2010). Prostaglandins in action: indispensable roles of cyclooxygenase-1 and-2 in endothelium-dependent contractions. In *Advances in pharmacology* (Vol. 60, pp. 61-83). Academic Press.

- Yuhki, K. I., Kojima, F., Kashiwagi, H., Kawabe, J. I., Fujino, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2011). Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacology & therapeutics*. 129(2):195-205.

