

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE INDUCCIÓN DE
HIPERTENSIÓN ARTERIAL POR MEDIO DE L-NITRO-N-ARGININA METIL
ÉSTER (L-NAME) EN RATAS

JENNIFER ALEJANDRA CARDONA MARTÍNEZ

QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE INDUCCIÓN DE
HIPERTENSIÓN ARTERIAL POR MEDIO DE L-NITRO-N-ARGININA METIL
ÉSTER (L-NAME) EN RATAS.

Informe de Tesis

Presentado por:

JENNIFER ALEJANDRA CARDONA MARTÍNEZ

Para optar al título de

QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios fuente de toda sabiduría, mi universo y mi guía espiritual que nunca me ha dejado sola.

A la Virgen María guía de mi diario caminar, mi fortaleza para seguir adelante.

A mi madre Elizabeth Martínez, mi profunda gratitud; porque hoy soy quien soy gracias a usted, por todos los esfuerzos y sacrificios a lo largo de los años, por su amor incondicional, dedicación y por creer siempre en mí, esto es para usted mami.

A mi padre Óscar Cardona, gracias mi propio angelito en el cielo, un beso inmenso, gracias por cuidarme siempre.

A mis hermanos Karla María, por su incondicional, por su cariño y por confiar en mí siempre, por aguantarme y aun así aceptarme como soy. César Estuardo, por apoyarme siempre y tenerme paciencia. Los quiero con toda el alma.

A mi sobrino por llenarme de alegría y felicidad cada día.

A mis abuelitos por su cariño, abuelito Carlos por ser como mi papá y por consentirme tanto; y mama Alsi, por estar siempre a mi lado, por sus oraciones.

A mis tíos Luis Alberto y Pilar, por ser una guía y apoyarme siempre, por dejarme ser parte de su familia.

A mis gordas Adriana y Gabriela, por lo juegos, las risas y todo. Las quiero mucho mis niñas.

A la familia Morales Ortíz por dejarme ser parte de su familia, infinitas gracias por su cariño y apoyo.

A mis amigos Carol, mi hermana hija de otros padres, a vos por tanto vivido y tanto que nos queda por vivir, por ser una persona excepcional que me abrió la puerta de su hogar, por nuestra hermandad no de sangre pero si de corazón, por aceptarme, por tu hermosa amistad y por todo. Alicia, Majo, Lulu, gracias muchis por cada aventura en la U, por cada risa, lagrima, alegría, enojo, estrés, por los desvelos, por estar siempre ahí y por nuestra linda amistad. Claudia, Vera, Jordana, mis amigos de Huehue, los quiero mucho. Doña Chus por consentirme tanto, y tenerme “bonita y gordita”, la quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme grandemente todos los días de mi vida.

A mi madre por el infinito apoyo y confianza que ha depositado en mí, por estar siempre a mi lado, gracias por todo mamita bella.

A la Tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala alma máter que me dio la oportunidad de convertirme en profesional día a día dentro de sus aulas.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por darme las herramientas de la sabiduría, por regalarme experiencias inolvidables, momentos memorables y amigos excepcionales.

Al Bioterio Dra. Amarillis Saravia por enseñarme el amor por la investigación, por todo el apoyo que me brindaron durante esta investigación, en especial gracias a Cristian López y a la Licda. Dulce Santiago por sus consejos y su ayuda.

A mis asesores infinitas gracias por haberme regalado la oportunidad de emprender esta aventura con ustedes:

Licda. Delia Arriaza gracias por tus consejos, tu amistad, por todo lo que me enseñaste y tu presión durante este tiempo, por ser una gran amiga.

Lic. André Chocó gracias por todas las enseñanzas, por la ayuda invaluable que me brindó y por su amistad.

A mi revisora Licda. Raquel Pérez, por sus consejos y su valioso aporte a esta investigación.

A quienes han sido y son parte de mi vida, gracias por los buenos y malos momentos, las risas, las lágrimas, las alegrías y las tristezas...

Índice

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Hipertensión arterial (HTA)	3
3.1.1. Definición	3
3.1.2. Etiología	4
3.1.2.1. Interacción genética-ambiente	4
3.1.2.2. Historia familiar de hipertensión arterial.....	4
3.1.2.3. Papel de la genética en la hipertensión arterial.....	4
3.1.3. Factores de riesgo.....	6
3.1.3.1. Edad.....	6
3.1.3.2. Sexo.....	6
3.1.3.3. Raza.....	6
3.1.3.4. Historia Familiar	6
3.1.3.5. El Tabaco.....	6
3.1.3.6. Alcohol.....	7
3.1.3.7. Control de Peso	7
3.1.3.8. Actividad Física	7
3.1.3.9. Ingesta de Sodio.....	7
3.1.3.10. Ingesta de Potasio y Calcio.....	7
3.1.3.11. Colesterol.....	8
3.1.3.12. Ocupación y/o Profesión	8
3.1.3.13. Diabetes Mellitus	8
3.1.3.14. Otras Enfermedades	8
3.1.4. Fisiopatología.....	9
3.1.4.1. Hipertensión causada por un factor único	9
3.1.4.2. Hipertensión causada por trastornos múltiples.....	9
3.1.6. Diagnóstico.....	14

3.1.7.	Tratamiento.....	14
3.1.7.1.	Tratamiento Farmacológico	15
3.1.7.1.1.	Diuréticos	15
3.1.7.1.2.	De acción en el sistema nervioso simpático.....	17
3.1.7.1.3.	Vasodilatadores.....	19
3.1.7.1.4.	Inhibidores de angiotensina	21
3.1.7.2.	Tratamiento No Farmacológico	23
3.1.8.	Consecuencias patológicas de la hipertensión.....	25
3.2.	Ensayos preclínicos	26
3.2.1.	Organismos reguladores	27
3.2.1.1.	ICH: International Conference of Harmonisation.....	27
3.2.1.2.	EMA: European Medicines Agency	28
3.2.1.3.	OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico .	29
3.2.1.4.	FDA: Food and Drug Administration.....	29
3.2.2.	Farmacología preclínica	29
3.2.2.1.	Farmacodinamia	29
3.2.2.2.	Farmacocinética.....	30
3.2.2.3.	Toxicología preclínica	32
3.2.3.	Modelos experimentales de estudio	32
3.2.3.1.	Elección del animal	32
3.2.3.2.	Características de los animales de experimentación.....	32
3.2.3.3.	Bioterios	33
3.3.	Modelo experimental de hipertensión arterial por L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME).....	35
3.3.1.	Óxido nítrico (ON).....	36
3.3.2.	Inhibición del óxido nítrico	40
3.4.	Estudios realizados	44
4.	JUSTIFICACIÓN.....	47
5.	OBJETIVOS	48
4.1.	Objetivo general:.....	48
4.2.	Objetivos específicos:	48

6. HIPÓTESIS	49
7. MATERIALES Y MÉTODOS	50
7.1. Universo y Muestra:	50
7.2. Recursos Humanos.....	50
7.3. Materiales:	50
7.3.1. Reactivos	50
7.3.2. Equipo de laboratorio.....	51
7.3.3. Equipo de bioterio.....	51
7.3.4. Material de oficina	52
7.3.5. Cristalería.....	52
7.3.6. Material médico-quirúrgico.....	52
7.4. Métodos.....	53
7.4.1. Diseño de la investigación	53
7.4.1.1. Cálculo de tamaño de la muestra	53
7.4.1.2. Método de muestreo	53
7.5. Aspectos bioéticos a utilizar.....	54
7.5.1. Métodos de experimentación.....	54
7.5.1.1. Incorporación método de las tres R's.....	54
7.5.2. Técnicas para realizar una muerte humanitaria	55
7.5.3. Instalaciones óptimas para la experimentación.....	55
7.5.4. Medio ambiente, limpieza y mantenimiento de los animales	55
7.6. Inducción de Hipertensión Arterial	55
7.7. Determinación de variables bioquímicas	56
7.7.1. Determinación de hematología	56
7.7.2. Determinación de glucosa.....	57
7.7.3. Determinación de Creatinina sérica.....	57
7.7.4. Determinación de Nitrógeno de Urea (BUN).....	58
7.7.5. Determinación de Triglicéridos	59
7.7.6. Determinación de Colesterol	59
7.7.7. Determinación de LDL	60

7.7.8. Determinación de HDL	60
7.7.9 Determinación de Alanina Aminotransferasa (ALAT).....	60
7.7.10. Determinación de Asparagina aminotransferasa (ASAT)	61
7.8. Realización de examen histopatológico.....	61
7.9. Recolección de datos.....	62
7.10. Tabulación de datos.....	62
7.11. Análisis estadístico.....	62
8. RESULTADOS.....	64
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	78
10. CONCLUSIONES.....	85
11. RECOMENDACIONES.....	86
12. REFERENCIAS	87
13. ANEXOS	94

1. RESUMEN

En esta investigación, se evaluó la relación existente entre la dosis administrada del reactivo L-nitro N-arginina Metil Ester (L-NAME), que inhibe la síntesis de óxido nítrico endotelial, con la respuesta observada en el aumento de presión arterial (PA) para inducir hipertensión arterial (HTA). El Óxido Nítrico (ON) fue descrito como la sustancia que relaja el endotelio dependiente de la liberación de acetilcolina, con diversas acciones paracrinas es capaz de relajar el músculo liso vascular, inhibir la agregación plaquetaria y, la adhesión de leucocitos al endotelio; entre otras. Se utilizaron ratas Wistar macho, a las cuales se les administraron cuatro dosis de L-NAME y para determinar el cambio en Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Pulsaciones; así como el efecto sobre las variables bioquímicas hematología, química sanguínea y perfil lipídico, y los cambios histopatológicos después de la inducción de HTA por la administración de L-NAME.

Se separaron cuatro grupos de animales y a cada grupo se administró una dosis diferente de la solución del reactivo L-NAME, siendo estas 25 mg/kg, 35 mg/kg, 45 mg/kg y 55 mg/kg, haciendo uso de sondas orogástricas para rata. Se llevaron a cabo cinco mediciones de PA en el Bioterio "Amarillis Saravia PhD.", haciendo uso de un equipo de marca UgoBasile® con transductor para cola de rata, en un ambiente tranquilo y libre de sonidos que alteraran el comportamiento; se realizaron tres lecturas diarias de medición y se utilizó la media de los datos de PAS, PAD y Pulsaciones. El último día de medición de PA, se recolectó sangre de la cola de los animales para realizar análisis de hematología, química sanguínea y perfil lipídico; por último, se realizó un examen histopatológico de un animal de cada grupo por medio de una necropsia y evaluar el daño producido en corazón, hígado, páncreas, riñones y pulmones a causa de la inducción de HTA.

Los resultados analizados muestran que existe una estrecha relación entre la dosis administrada de 45 mg/kg y las mediciones de PAS, y que al aumentar la dosis administrada disminuye la variación de los datos obtenidos; en el caso de PAD y Pulsaciones, se observa que su aumento no depende de la dosis administrada sino de los días de medición. Los cambios en valores de hematología, química sanguínea y perfil lipídico demuestran que la inhibición de la síntesis de Óxido Nítrico (ON) afecta la homeóstasis del organismo. El análisis histopatológico mostró edema, congestión, degeneración hidrópica y daño tisular en los órganos estudiados a causa del aumento de la PA.

2. INTRODUCCIÓN

El entorno en el que vivimos cambia constantemente y estos cambios afectan progresivamente la salud humana, lo cual se observa con el aumento en el padecimiento de enfermedades en la población de tipo no congénito relacionados con el estilo de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que en los últimos años ha habido un aumento en el padecimiento de patologías de tipo cardiovascular. Una de estas patologías y quizás la más frecuente en la población es la hipertensión arterial (HTA) la cual es una enfermedad silenciosa y en la mayoría de personas es asintomática, además es el inicio de enfermedades más graves de tipo cardiovascular (OMS, 2013).

El tratamiento para la HTA en países con ingresos elevados se ha enfocado en el uso de drogas sintéticas; más sin embargo, en países de ingresos medios o bajos, donde la prevalencia de HTA alcanza un 40%, se ha recurrido al uso de plantas medicinales, a las cuales con el pasar del tiempo se les han atribuido propiedades terapéuticas específicas. La validación de propiedades terapéuticas de plantas medicinales les da el respaldo científico para poder usarlas, además provee de la información necesaria para que se les dé un uso seguro (OMS, 2013).

Los estudios preclínicos son una herramienta que permite obtener datos sobre toxicología (aguda, crónica y subcrónica), farmacodinamia y farmacocinética de un compuesto químico contribuyendo al descubrimiento de tratamientos médicos innovadores con moléculas apropiadas para su administración al hombre. Con base a una fase preclínica desarrollada de manera exitosa puede procederse a un ensayo clínico, en el cual la molécula puede ser administrada a seres humanos sanos y enfermos, y poder ser llevada al mercado y evaluar su funcionamiento en la población para la que fue desarrollada.

El método de inducción de HTA por inhibición del óxido nítrico administrando L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME) es un método que cuenta con las características de ser simple, reproducible y rentable para llevarse a cabo en investigaciones, produciendo principalmente vasoconstricción, agregado plaquetario y aterosclerótico y, daño renal. La validación de un método de estudio preclínico implica un proceso ya estandarizado que futuros investigadores podrán utilizar para el desarrollo de nuevos proyectos que beneficiaran la salud humana y abrirán una brecha a nuevas posibles opciones terapéuticas.

3. ANTECEDENTES

3.1. Hipertensión arterial (HTA)

3.1.1. Definición

La HTA es una elevación sostenida y en reposo de las cifras de PA por encima de los valores considerados normales. Es ante todo un factor de riesgo cardiovascular (FRCV), entendido como factor de riesgo “cualquier rasgo o característica medible en un individuo que predice la probabilidad de desarrollar una enfermedad cardiovascular”. La HTA duplica el riesgo de cardiopatía isquémica, muerte súbita y enfermedad vascular periférica, y cuadruplica los accidentes cerebrovasculares (ACV) (Sabán & Sánchez, 2012).

En el informe de la Sociedad Europea de Hipertensión se rescató la definición que Evans y Rose en 1971 dieron a la HTA, que sería el nivel de presión sanguínea por encima de la cual su tratamiento sea beneficioso para el enfermo (Sabán & Sánchez, 2012).

La HTA se clasifica según su causa en primaria (idiopática) o secundaria. La HTA primaria se produce cuando existe una PA constantemente elevada y una evaluación diagnóstica no logra identificar la causa de HTA. La HTA secundaria se produce por una causa conocida, generalmente una enfermedad que altera las funciones renales y neurohormonales. La HTA idiopática representa un 95 % de los casos de HTA en personas (Brown 2006).

Tabla No. 1 Categorización de la Hipertensión arterial

Categoría	Sistólica [mmHg]	Diastólica [mmHg]
Optima	< 120	< 80
Normal	120 - 129	80 - 84
Normal alta	130 - 139	85 - 89
Hipertensión		
Grado 1 (ligera)	140 - 159	90 - 99
Grado 2 (moderada)	160 - 179	100 - 109
Grado 3 (severa)	> 180	> 110
Sistólica aislada	> 140	< 90

FUENTE: Alcázar, J. *et al.* (2013). Hipertensión arterial esencial. *European Society Of Cardiology*.

3.1.2. Etiología

3.1.2.1. Interacción genética-ambiente

La interacción entre variaciones genéticas y factores ambientales tales como el estrés, la dieta y la actividad física, contribuyen al desarrollo de la HTA esencial. Esta interacción origina los denominados fenotipos intermedios, mecanismos que determinan el fenotipo final HTA a través del gasto cardíaco y la resistencia vascular total. Los fenotipos intermedios incluyen, entre otros: el sistema nervioso autónomo, el sistema renina angiotensina, factores endoteliales, hormonas vasopresoras y vasodepresoras, volumen líquido corporal (Maicas, *et al.*, 2003).

3.1.2.2. Historia familiar de hipertensión arterial

La historia familiar de HTA predice de forma significativa la afectación futura por la HTA en miembros de esa familia. La fuerza de la predicción depende de la definición de historia familiar positiva y del sexo y la edad de la persona en riesgo: es mayor el riesgo de padecerla cuantos más familiares de primer grado la presenten, cuando la presentaron a edad más temprana, cuanto más joven es el sujeto en riesgo, y para la misma definición y edad, siempre mayor en las mujeres (Maicas, *et al.*, 2003).

3.1.2.3. Papel de la genética en la hipertensión arterial

Los estudios de familias han indicado que menos de la mitad de las variaciones de la PA en la población general son explicadas por factores genéticos. La mayoría de ellos están involucrados, directa o indirectamente, en la reabsorción renal de sodio (Maicas, *et al.*, 2003).

- a) Síndromes mendelianos monogénicos: estas mutaciones tienen como resultado excesiva retención renal de sodio, bien por defectos primarios en los sistemas de transporte en la nefrona distal, bien por estimulación de la actividad del receptor de mineralocorticoides (Maicas, *et al.*, 2003).

- b) Hiperaldosteronismo que responde a glucocorticoides (GRA): Reside en el cromosoma 8. Resultado de la fusión de secuencias del nucleótido de la región promotora-reguladora de la 11 β -hidroxilasa, controlada por la hormona adrenocorticotrófica, y la porción estructural del gen de aldosterona sintetasa (Maicas, *et al.*, 2003).
- c) Síndrome de Liddle's: Reside en el cromosoma 16. Consiste en mutaciones en el canal epitelial del sodio sensible a amilorida, que conducen a incremento de su actividad. La aldosterona está suprimida (Maicas, *et al.*, 2003).
- d) Exceso aparente de mineralocorticoides: Este gen puede ser un locus para la hipertensión esencial sensible a la sal (Maicas, *et al.*, 2003).
- e) Genes del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona:
- Variantes del gen del angiotensinógeno, que interactúa con la sensibilidad al sodio de la dieta.
 - Polimorfismos de inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La delección de una parte del gen que codifica la enzima aumenta su actividad (Maicas, *et al.*, 2003).
 - Gen de la aldosterona sintetasa: se encuentran mutaciones en los pacientes hipertensos con renina más baja. También es responsable de una forma monogénica de hipertensión con bajos niveles de renina (Maicas, *et al.*, 2003).
 - Gen del receptor tipo I de la Angiotensina II (Maicas, *et al.*, 2003).
 - Gen de la Kalicreina (enzima que transforma el quininógeno en bradicinina) (Maicas, *et al.*, 2003).
- f) Anomalías del transporte celular:
- Alfa-adducina: Incrementa la reabsorción tubular del sodio. Se asocia con respuesta aumentada a la hidroclorotiazida (reduce dos veces más la PA).
 - Contratransporte eritrocitario Na-Li.
 - Lugares de unión a la oubanina.
 - Ácido úrico (Maicas, *et al.*, 2003).

3.1.3. Factores de riesgo

3.1.3.1. Edad

La edad es un factor de riesgo importante en HTA, teniendo una prevalencia alta en adultos, en edades comprendidas entre 18 y 65 años, su frecuencia aumenta con la edad lo cual produce un incremento importante en su incidencia a partir de los 65 años, mientras más joven se presenta la HTA, su pronóstico es adverso con presentación de complicaciones cardiovasculares a menor edad (Rojas, 2007).

3.1.3.2. Sexo

Entre los 35 y 40 años se tiene una mortalidad por esta enfermedad de cuatro a cinco veces más en el sexo masculino que en la mujer, y esto sugiere que las hormonas sexuales podrían influir en la adaptación cardiaca a una carga dada. Esta diferencia desaparece con la menopausia, en concordancia con la disminución de los estrógenos, cuyo efecto vasodilatador periférico es bien conocido (Rojas, 2007).

3.1.3.3. Raza

En los países europeos, africanos y asiáticos la HTA es más frecuente y más severa a cualquier edad en los individuos de raza negra en comparación con los individuos de raza blanca. En Latinoamérica por su profunda mezcla étnica no se evidencia esa prevalencia según la raza (Rojas, 2007).

3.1.3.4. Historia Familiar

El riesgo es mayor si existen antecedentes familiares de enfermedades del corazón, siendo más alto si un pariente cercano murió joven por infarto al miocardio. Estudios han sugerido una alteración en la información genética al recibir estímulos específicos del medio ambiente que permite su expresión fenotípica y se manifiesta la enfermedad (Rojas, 2007).

3.1.3.5. El Tabaco

Es un poderoso factor que acelera la aterosclerosis y el daño vascular producido por la HTA. Este incrementa los niveles de colesterol sérico y la obesidad. El tabaquismo eleva la PA por la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas adrenérgicas estimuladas por la nicotina (Rojas, 2007).

3.1.3.6. Alcohol

Produce una elevación aguda de la PA mediada por activación simpática central cuando se consume en forma repetida y puede provocar una elevación persistente de la misma. El consumo de bebidas alcohólicas aumenta la PA aun cuando se ingiera en pequeñas cantidades, la ingestión de mayores cantidades causa un número significativo de casos de HTA (Rojas, 2007).

3.1.3.7. Control de Peso

Se ha demostrado que la obesidad y la HTA son importantes predictores independientes de morbimortalidad cardiovascular; estos dos trastornos frecuentemente coexisten y cada uno de ellos puede asociarse con el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda. La obesidad tiene efectos aditivos pero no sinérgicos sobre la carga que debe soportar el ventrículo izquierdo, lo cual puede aumentar el riesgo de insuficiencia cardiaca congestiva (Rojas, 2007).

3.1.3.8. Actividad Física

La inactividad física es perjudicial para la salud en general ya que propicia la inmovilización de colesterol y ácidos grasos, y la acumulación del mismo en el organismo lo que conlleva a las dislipidemias y aterosclerosis. El ejercicio disminuye la estimulación simpática al potenciar el efecto de los barorreceptores e igualmente disminuye la rigidez de las arterias. Aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y reduce las de baja densidad (LDL), relaja los vasos sanguíneos y puede disminuir la PA (Rojas, 2007).

3.1.3.9. Ingesta de Sodio

La adecuada alimentación es de vital importancia tanto para pacientes normotensos como hipertensos, es una medida preventiva y de control en la HTA. Una alimentación con restricción del sodio es una forma segura y eficaz para reducir ligeramente la PA (Rojas, 2007).

3.1.3.10. Ingesta de Potasio y Calcio

Diversos estudios han reportado que una ingesta alta pero adecuada de potasio (50 a 90 mmol/día) provenientes de frutas frescas y vegetales en la dieta puede proteger en el

desarrollo de HTA y mejorar el control de la enfermedad. Al igual que el potasio, una ingesta adecuada de calcio (1 a 2 g/día) en la dieta puede disminuir la PA (Rojas, 2007).

3.1.3.11. Colesterol

Las cifras normales de colesterol total son entre 180 y 200 mg/dl. Cifras mayores a 240 mg/dl, en pacientes mayores de 40 años aumenta el riesgo de obstrucción de las arterias coronarias. Se recomienda mantener niveles de colesterol LDL menores a 100 mg/dl, ya que son altamente aterogénicas que influyen negativamente en el organismo y niveles de HDL mayores a 45 mg/dl que son la de mayor valor predictivo para infarto al miocardio y angina de pecho (Rojas, 2007).

3.1.3.12. Ocupación y/o Profesión

La ocupación y/o profesión influyen significativamente sobre la elevación de la PA, condicionado por stress, preocupaciones constantes diarias, creando un estado de ansiedad la cual actúa sobre el sistema nervioso simpático produciendo un aumento de catecolaminas plasmáticas que conlleva a un estado de hiperreactividad vascular y un aumento del tono simpático con el consiguiente aumento de la PA. También destacan la personalidad del individuo y el estatus socio – económico (Rojas, 2007).

3.1.3.13. Diabetes Mellitus

La HTA se halla presente en el 66% de pacientes con diabetes mellitus de larga data con nefropatía diabética asociada, evidenciándose un aumento de la prevalencia de HTA esencial en la población global de diabéticos. Los pacientes diabéticos y además hipertensos que presentan insuficiencia renal progresiva, en consecuencia suelen presentarse valores muy bajos de renina (Rojas, 2007).

3.1.3.14. Otras Enfermedades

La HTA se asocia con otras enfermedades como la policitemia, con hematocrito elevado, aumento en la viscosidad sanguínea, pero con volumen plasmático disminuido y normalidad de la masa eritrocitaria y de valores séricos de eritropoyetina; así como elevación del fibrinógeno plasmático. La hiperuricemia se presenta en el 25 a 50% de los individuos con HTA esencial no tratada (Rojas, 2007).

3.1.4. Fisiopatología

La descripción de la fisiopatología de la HTA no es sencilla, debido a que la elevación de PA no representa una enfermedad por sí mismo sino que es una manifestación sintomática aislada de diversos trastornos que afectan mecanismos homeostáticos cardiovasculares. Sin embargo, es útil caracterizar a la HTA como un trastorno generalizado que puede ser inducido por una causa solitaria identificable o por varias alteraciones primarias. Estos dos tipos de HTA no se excluyen mutuamente, dado que, en la mayor parte de los llamados estados hipertensivos secundarios, es posible identificar una causa definida de HTA (Argente & Álvarez, 2013).

3.1.4.1. Hipertensión causada por un factor único

La gran mayoría (sino la totalidad) de las variantes de la enfermedad hipertensiva pueden considerarse una desviación del balance homeostático normal del sistema circulatorio. Esta desviación desencadena diversas reacciones compensadoras que, desde una perspectiva teleológica, se pueden ver como un intento del organismo contrarrestar las consecuencias de la alteración inicial. Si la causa primitiva persistente, se desarrollan nuevas reacciones compensadoras que conducen al cuadro clínico bien definido de la HTA (Argente & Álvarez, 2013).

3.1.4.2. Hipertensión causada por trastornos múltiples

Se sabe que el control global de la PA depende de numerosos mecanismos homeostáticos. Sin embargo, las evidencias derivadas de los estudios experimentales han demostrado que una alteración específica en uno de ellos no induce una modificación significativa de la PA, salvo que sea de suficiente magnitud como para contrarrestar los efectos compensadores de los restantes (Argente & Álvarez, 2013).

a) Hiperactividad simpática

El incremento de la actividad del sistema nervioso simpático incrementa la PA y contribuye al desarrollo y mantenimiento de la HTA a través de la estimulación del corazón, la vasculatura periférica y del riñón, lo que causa un aumento del gasto cardiaco, de la resistencia vascular y la retención hídrica (Hernández, *et al.*, 2009).

Existe también, un desequilibrio autonómico (incremento del tono simpático con reducción del tono parasimpático), asociado a disturbios metabólicos, hemodinámicos y tróficos que resultan en un incremento de la morbimortalidad cardiovascular. Sin embargo, no está claro si esta hiperactividad simpática es causa o consecuencia de la enfermedad, ya que como ha sugerido hay un aumento en la actividad de la renina-angiotensina cerebral se acompaña de un aumento de estímulos simpáticos; por otro lado, se ha observado que los vasos arteriales del paciente hipertenso son hiperreactores a las catecolaminas por la influencia de neuropéptidos locales, que al actuar en forma endocrina, autocrina y paracrina condicionan respuestas aumentadas a las mismas (Hernández, *et al.*, 2009).

Asimismo, se ha demostrado que la presión diastólica se relaciona más con la resistencia vascular que con la función cardiaca, lo que sugiere que un aumento del tono simpático puede incrementar esta variable por efecto trófico en la musculatura lisa vascular y en la remodelación vascular resultante (Hernández, *et al.*, 2009).

b) Alteración de la curva de relación presión/diuresis.

En individuos normales, la PA guarda una relación directa con la eliminación de sodio y agua por el riñón, de tal manera que si las cifras tensionales aumentan, se excretan más agua y sodio en forma compensadora para reducirla a sus niveles normales. Si esta relación se altera, de tal forma que disminuye el mecanismo protector, pueden perpetuarse las cifras tensionales elevadas (Hernández, *et al.*, 2009).

Se cree que la pérdida de este mecanismo compensador se debe a un defecto congénito que reduce la tasa de filtración, ya sea por una disminución anatómica o por disfunción glomerular. Por otro lado, en modelos animales, la estimulación de los nervios renales induce una reabsorción tubular de sodio y agua, y reduce su excreción urinaria, lo que resulta en una expansión del volumen intravascular e incremento de la PA (Hernández, *et al.*, 2009).

c) Teoría metabólica.

Esta teoría postula que existe un defecto genético de fondo, responsable de modular el metabolismo de lípidos, carbohidratos y ácido úrico, entre otros, y que es el responsable fisiopatológico de la resistencia a la insulina, definida como una respuesta subnormal de los

tejidos a una concentración determinada de insulina, mediada por hipofunción de los receptores tisulares cuya expresión es la hiperinsulinemia, y es este quizá el punto clave de la enfermedad, ya que la hiperinsulinemia es sólo una de las respuestas compensatorias a la baja sensibilidad a la insulina de algunos tejidos; mas el aumento de la insulina no es el factor más importante que condiciona la enfermedad cardiovascular (Hernández, *et al.*, 2009).

La hiperinsulinemia ejerce múltiples efectos como:

- retención de Na^+ ,
- acúmulo de Ca^{++}
- actividad simpática aumentada
- expresión de proto-oncogenes que condicionan HTA, hipertrofia, fibrosis y disfunción tisular (Hernández, *et al.*, 2009).

La hiperuricemia ha sido claramente asociada con HTA y enfermedad cardiovascular en humanos; sin embargo, no ha sido aclarado si ésta constituye un factor de riesgo independiente o solamente un marcador asociado al resto de los factores de riesgo cardiovasculares. La hiperuricemia en humanos ha sido asociada con vasoconstricción y correlaciona positivamente con la actividad de la renina plasmática en hipertensos, lo que sugiere que el ácido úrico podría tener efectos adversos mediados por una sobreactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Además, la hiperuricemia secundaria a la terapia con diuréticos ha sido implicada como un factor de riesgo cardiovascular (Hernández, *et al.*, 2009).

d) Teoría de la disfunción endotelial.

La disfunción endotelial debe concebirse como un proceso nosológico que disminuye o elimina la respuesta vasodilatadora inducida por el endotelio, ya sea por deficiencia absoluta o relativa en la disponibilidad local de óxido nítrico (ON), con importante repercusión en los procesos de génesis o aceleración de la aterosclerosis. Cuando el endotelio disfunciona se altera la cadena oxidativa, generándose radicales libres de oxígeno en exceso; se pierde el equilibrio entre agentes vasopresores y vasodilatadores; se activa la expresión de agentes neurohumorales que producen remodelación, fibrosis e hipertrofia, produciendo, la enfermedad (Hernández, *et al.*, 2009).

La falta de disponibilidad de ON en un momento y sitio determinados, no significa obligadamente que exista disfunción endotelial, ya que la disminución del ON puede estar condicionada por alteraciones en diferentes niveles del proceso de su síntesis o degradación. El incremento del estrés oxidativo y la disfunción endotelial pueden predisponer al desarrollo de HTA. También, la disfunción endotelial puede contribuir al endurecimiento de las arterias. Aún no se sabe si la HTA, al aumentar el estrés de rozamiento, es la causa o la consecuencia de la disfunción endotelial (Hernández, *et al.*, 2009).

e) Teoría genética.

La HTA es una enfermedad familiar, poligénica. Las evidencias sugieren que una alteración en la información genética, al recibir estímulos específicos del medio ambiente, permite su expresión fenotípica y manifiesta la enfermedad. Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en 10 genes, lo que causa formas mendelianas de HTA en humanos. Estas alteraciones interfieren con la PA al alterar la regulación renal de sodio, reforzando la teoría de que el desarrollo de HTA depende de la disfunción renal determinada genéticamente con la resultante retención hídrica y de sodio. El candidato más fuerte para explicar buena parte del fenómeno hipertensivo es el gen del angiotensinógeno y quizá el más relacionado con sus complicaciones, mismo que se ha asociado con incremento de los niveles circulantes de angiotensinógeno y de la PA (Hernández, *et al.*, 2009).

En la interrelación aterosclerosis/hipertensión es el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) el que tiene una relación más estrecha. La causa de hipertensión monogénica mejor estudiada es el síndrome de Liddle, una alteración en la que la activación de los canales de sodio epiteliales predispone al desarrollo de HTA grave y resistente al tratamiento. Esto se ha ligado a mutaciones en las subunidades beta y gamma del canal, lo que resulta en una retención inapropiada de sodio a nivel del túbulo colector renal (Hernández, *et al.*, 2009).

3.1.5. Manifestaciones clínicas y diagnóstico.

Por lo general se trata de un proceso asintomático. Esto significa que el médico debe medir la PA a todo paciente que asista, sea cual fuere el motivo de la consulta. Cuando los síntomas de la HTA son el motivo de la consulta, estos pueden deberse a: a) la propia elevación de la PA; b) la lesión vascular secundaria a la HTA en el SNC, el corazón o el riñón, y c) los síntomas y signos propios de la etiología de dicha HTA, en caso de que esta sea secundaria. Los síntomas más comunes son totalmente inespecíficos, tales como cefalea, disnea, “mareo” y trastornos de la visión. Respecto a la cefalea incluyendo la de los pacientes con HTA, la mayoría de las veces no tiene relación alguna con el nivel de PA. En ocasiones, el paciente refiere cefalea una vez que sabe que es hipertenso (Farreras & Rozman, 2008).

La cefalea es propia de presiones arteriales diastólicas superiores a 110mm Hg; se localiza comúnmente en la región occipital, sobre todo en individuos jóvenes, y con frecuencia aparece al despertar por la mañana y desaparece, a menudo espontáneamente, a cabo de unas horas. En ocasiones, los pacientes refieren cierta dificultad al respirar que puede ser secundaria a una coronariopatía isquémica o insuficiencia cardíaca incipiente (Farreras & Rozman, 2008).

La sensación de mareo es frecuente en hipertensos no tratados, aunque también puede aparecer como resultado del descenso de la PA, con compromiso de la circulación cerebral. La visión borrosa puede estar causada por una retinopatía hipertensiva grave. Otras manifestaciones frecuentes son epistaxis, acúfenos, palpitaciones, fatiga muscular e impotencia, que tampoco guardan relación con las cifras de PA. Pueden presentarse episodios bruscos de debilidad e incluso pérdida de conciencia como consecuencia de una isquemia cerebral transitoria. Muy a menudo el paciente refiere nicturia, incluso con poca o nula afección del funcionalismo renal (Farreras & Rozman, 2008).

Otras veces se refieren manifestaciones debidas a complicaciones directas de HTA, como disnea, ortopnea, edema agudo de pulmón o insuficiencia cardíaca congestiva, o a procesos como infarto al miocardio, angina de pecho o dolor propio de la disección de la aorta, descubriéndose entonces la HTA (Farreras & Rozman, 2008).

3.1.6. Diagnóstico

Se aconseja que en adultos mayores de 18 años con una presión arterial sistólica inferior a 130mm Hg y diastólica inferior a 85mm Hg ha de medirse cada 2 años, entre sistólica y diastólica de 130-139mm Hg y diastólica de 85 – 89mm Hg, al cabo de 1 año; entre sistólica de 140 – 159mm Hg y diastólica de 90 – 99mm Hg, se confirmará a los 2 meses; entre sistólica de 160 – 179mm Hg y diastólica de 100 – 109mm Hg (ver anexo No. 2) se confirmará en menos de 1 mes; si la sistólica es superior a 180mm Hg o la diastólica supera 110mm Hg, se debe iniciar su estudio o remitir inmediatamente al paciente a un centro de referencia. Con mucha frecuencia, cuando se detecta la HTA ésta ya presenta repercusiones orgánicas graves (Farreras & Rozman, 2008).

El diagnóstico de HTA debe basarse en al menos dos determinaciones de PA por visita y como mínimo en 2 ó 3 visitas; en algunos casos, con cifras de PA muy elevadas, el diagnóstico puede hacerse con la toma efectuada en una sola visita (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.7. Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento del paciente hipertenso es alcanzar la máxima reducción del riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular a largo plazo. Esto requiere un tratamiento de todos los factores de riesgo reversibles identificados, como el tabaquismo, la dislipidemia, la obesidad abdominal y la diabetes, así como el tratamiento apropiado de las enfermedades clínicas asociadas y de la elevación de la PA (Alcázar, *et al.*, 2013).

La Presión Arterial (PA) debe reducirse de forma general a valores inferiores a 140/90mmHg en todos los pacientes hipertensos. La reducción de la PA por debajo de 130/80mmHg en los pacientes diabéticos y en aquellos pacientes de riesgo alto o muy alto, así como en los que presentan enfermedades clínicas asociadas (ictus, infarto de miocardio, insuficiencia renal) (Alcázar, *et al.*, 2013).

La American Diabetes Association recomienda un objetivo de presión arterial sistólica inferior a 130mmHg en pacientes diabéticos jóvenes. La última edición de las guías sobre Evaluación y Manejo de la insuficiencia renal crónica, se recomienda un objetivo de

control tensional general $\leq 140/\leq 90$ mmHg si el cociente albúmina/creatinina es < 30 mg/g. Si dicho cociente es ≥ 30 mg/g, se sugiere un objetivo más estricto $\leq 130/\leq 80$ mmHg (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.7.1. Tratamiento Farmacológico

3.1.7.1.1. Diuréticos

Los diuréticos fueron uno de los primeros grupos de fármacos antihipertensivos que se desarrollaron. Inicialmente se prescribían a dosis más elevadas; más recientemente se emplean a dosis más bajas en el tratamiento de la HTA, hecho que contribuye a minimizar sus efectos secundarios. Los diuréticos potencian los efectos de todos los antihipertensivos, debido a la disminución del volumen circulante (Alcázar, *et al.*, 2013).

a) Tiazidas

Las tiazidas actúan inhibiendo el cotransporte sodio-cloro en la membrana luminal del segmento inicial del túbulo contorneado distal, donde se reabsorbe el 5-8% del sodio filtrado. Por todo ello, disminuyen el volumen de líquido extracelular y plasmático, y desciende el gasto cardíaco. Además, aumentan notablemente la eliminación de potasio porque, al incrementar la carga de sodio en el túbulo distal, aumenta su posibilidad de intercambio con potasio. Por último, y a diferencia de los diuréticos de asa, reducen la eliminación urinaria de calcio (Alcázar, *et al.*, 2013).

Las reacciones adversas de las tiazidas derivan fundamentalmente de sus acciones renales: hiponatremia, hipocloremia, hipomagnesemia e hipopotasemia. La dosis diaria recomendada de tiazidas se ha ido reduciendo progresivamente, desde cifras tan elevadas como 200 mg/día de hidroclorotiazida en los años sesenta, a 12.5-25 mg en la actualidad (Alcázar, *et al.*, 2013).

b) Del Asa de Henle

Son diuréticos que producen una diuresis copiosa y, en general, de corta duración. Su sitio crítico de acción es el segmento diluyente medular y cortical, y concretamente el epitelio de la porción o segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle, razón por la cual frecuentemente son denominados diuréticos del asa. Actúan desde la luz tubular

sobre la membrana tubular, para lo cual tienen que ser segregados previamente en el túbulo proximal, bien por el sistema de transporte activo para ácidos orgánicos, bien por difusión pasiva si poseen elevada lipofilia (caso de la bumetanida y la muzolimina). La furosemida, la bumetanida y, con menor certeza, el ácido etacrínico inhiben también el transporte de Na^+ en el túbulo contorneado proximal (Florez, 2011).

La furosemida y demás diuréticos del asa se fijan a la proteína cotransportadora $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ situada en la membrana luminal del segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle y la inhiben; en consecuencia impiden este importante transporte de iones. Los diuréticos del asa inhiben también la reabsorción de Ca^{2+} y Mg^{2+} en la rama gruesa ascendente, con lo que incrementan su eliminación; esto se debe a que suprimen la diferencia de potencial transepitelial que normalmente existe entre la luz del túbulo y el espacio intersticial, la cual provoca la reabsorción de estos iones (Florez, 2011).

La mayoría de las reacciones adversas derivan de la propia acción diurética y su incidencia y gravedad dependen de la intensidad del tratamiento y de la propia enfermedad base del paciente. Destacan la hipopotasemia y la alcalosis hipoclorémica, la hipovolemia y la retracción del volumen extracelular, la hiponatremia de dilución cuando la administración es mantenida y la hipomagnesemia; ésta puede ser suficientemente grave para producir, al igual que la hipopotasemia, alteraciones del ritmo cardíaco y agravamiento de la toxicidad digitalica (Florez, 2011).

c) Ahorradores de potasio

La espironolactona se ha utilizado en monoterapia para tratar la HTA. También como ahorrador de potasio en combinación con una tiazida. Constituye el tratamiento principal para el hiperaldosteronismo secundario a hiperplasia suprarrenal. Más recientemente, se ha observado que controla eficazmente a pacientes con HTA resistente (Alcázar, *et al.*, 2013).

Tanto amilorida como triamtereno inhiben de forma directa la reabsorción de sodio por los canales de sodio epiteliales en el túbulo distal renal. Al no tener un potente efecto natriurético, se utilizan casi exclusivamente en asociación con tiazidas que, al liberar más sodio en los lugares de acción de los ahorradores de potasio, aumentan su efecto ahorrador

y, al mismo tiempo, contrarrestan la hipopotasemia inducida por la tiazida (Alcázar, *et al.*, 2013).

d) Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Son derivados sulfamídicos que inhiben la anhidrasa carbónica que se encuentra en las células de los túbulos renales, sobre todo en el túbulo contorneado proximal. Los más conocidos son la acetazolamida y la diclorfenamida (Florez, 2011).

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica inhiben ambas formas de la enzima, tanto la que se encuentra en la membrana del borde luminal como la citoplásmica, suprimiendo casi por completo la reabsorción de NaHCO_3 en el túbulo proximal. De este modo, aumenta la eliminación de bicarbonato y consiguientemente la de Na^+ y Cl^- que llegarán en gran proporción al asa de Henle. Produce alcalinización de la orina que provoca acidosis, que reduce la eficacia de las dosis siguientes del diurético (Florez, 2011).

Pueden ocasionar acidosis metabólica hiperclorémica, fosfaturia e hipercalciuria con producción de cálculos renales, hipopotasemia intensa y reacciones de hipersensibilidad (Florez, 2011).

3.1.7.1.2. De acción en el sistema nervioso simpático

a) Simpaticolíticos de acción central

La metildopa fue el fármaco más utilizado después de los diuréticos en la década de los sesenta y setenta, hasta la entrada de los betabloqueantes. Su mecanismo de acción consiste en la formación de metilnoradrenalina, que actúa como un potente agonista de los receptores adrenérgicos alfa en el sistema nervioso central (Alcázar, *et al.*, 2013).

Su uso principal en la actualidad es la HTA durante el embarazo. La hipotensión postural y la retención hidrosalina son sus efectos secundarios más frecuentes, seguidos por la alteración de la función retículo endotelial y una serie de alteraciones inmunitarias, que cursan con fiebre y disfunción hepática, entre otros muchos (Alcázar, *et al.*, 2013).

La clonidina actúa a nivel central en los receptores alfa-2 y los receptores de imidazolina. Sus efectos secundarios más importantes son la sedación y la sequedad de

boca. Si se suspende bruscamente se puede producir un síndrome de rebote o de supresión de la medicación, que refleja el restablecimiento rápido de la secreción de catecolaminas suprimida durante el tratamiento (Alcázar, *et al.*, 2013).

b) Antagonistas adrenorreceptores α

El bloqueo de los receptores alfa vasculares produce vasodilatación, más arteriolar que venosa, e hipotensión mantenida. Los alfabloqueantes no selectivos, fenoxibenzamina y fentolamina, se utilizan casi exclusivamente en el tratamiento médico del feocromocitoma. El bloqueo selectivo de los receptores α_1 postsinápticos es el efecto principal de la prazosina, compartido con doxazosina y terazosina (Alcázar, *et al.*, 2013).

La eficacia antihipertensiva de doxazosina y terazosina es similar a la de otros grupos de fármacos antihipertensivos, como los diuréticos, betabloqueantes, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina o calcioantagonistas (Alcázar, *et al.*, 2013).

Los efectos secundarios más frecuentes de los alfabloqueantes son la cefalea, somnolencia y astenia. Además, favorecen la retención de volumen, por lo que se recomienda el uso combinado con un diurético (Alcázar, *et al.*, 2013).

c) Fármacos bloqueadores de adrenorreceptores β

Producen una inhibición competitiva de los receptores β -adrenérgicos, lo que conlleva una disminución de la PA a través de diversos mecanismos, como la reducción del gasto cardiaco, la disminución de la liberación de renina, reducción de flujo nervioso simpático central, bloqueo presináptico que inhibe la liberación de catecolaminas y una probable disminución de la resistencia vascular periférica (Alcázar, *et al.*, 2013).

Todos los betabloqueantes antagonizan de forma competitiva los receptores β_1 cardiacos, pero varían en su grado de bloqueo de receptores β_2 extracardiacos. Se admite que una mayor cardioselectividad se acompaña de menos efectos extracardiacos, si bien ningún betabloqueante es cardioselectivo puro. La actividad simpaticomimética intrínseca, también conocida como actividad agonista parcial, puede asociarse clínicamente a ciertos beneficios clínicos, como menos bradicardia, menos broncoespasmo, menos descenso del flujo sanguíneo periférico y menos alteración del perfil lipídico. Por último, la mayor liposolubilidad se relaciona con una mayor facilidad de captación y metabolismo en el

hígado. Los menos liposolubles presentan una vida media más larga y una acción más duradera (Alcázar, *et al.*, 2013).

Los efectos secundarios más frecuentes en los pacientes tratados con betabloqueantes son la astenia, disminución de la capacidad de esfuerzo, ganancia de peso, disminución de la sensibilidad a la insulina, aparición de diabetes, aumento de los triglicéridos y descenso del colesterol HDL (Alcázar, *et al.*, 2013).

d) α - β -bloqueantes

Cabe destacar aquí el labetalol, en el que predomina el bloqueo de los receptores alfa-1 y el carvedilol, con menos efecto sobre alfa-1, pero con gran capacidad vasodilatadora directa por la generación de óxido nítrico.

El bloqueo combinado alfa y beta del labetalol se acompaña de un descenso de la PA, secundaria a la disminución de la resistencia vascular periférica. También se utiliza en el tratamiento de las urgencias hipertensivas y la hipertensión durante el embarazo. Por su parte, el carvedilol se utiliza principalmente en la insuficiencia cardíaca y, en menor medida, como antihipertensivo. El carvedilol produce una vasodilatación dependiente de la liberación de óxido nítrico en el endotelio (Alcázar, *et al.*, 2013).

El efecto secundario más frecuente de labetalol es la hipotensión ortostática sintomática, especialmente durante el tratamiento inicial a dosis elevadas (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.7.1.3. Vasodilatadores

a) Hidralazina

La hidralazina produce una relajación del músculo liso de las arteriolas periféricas, reduciendo la resistencia vascular y la PA. Además, induce vasodilatación arteriolar al evitar la oxidación del óxido nítrico. Junto con la vasodilatación periférica, se produce un aumento de la frecuencia cardíaca, del volumen sistólico y del gasto cardíaco. Destacan la cefalea, rubefacción y la taquicardia, que pueden minimizarse con el uso de un inhibidor adrenérgico (Alcázar, *et al.*, 2013).

b) Minoxidil

Por su parte, el minoxidil es más potente que la hidralazina, tiene una acción más duradera, e induce diversas reacciones por vasodilatación arteriolar directa en un grado también mayor. Requiere el uso asociado de diuréticos de asa y bloqueantes adrenérgicos. El minoxidil produce una relajación del músculo liso mediante la apertura de canales de potasio sensibles a ATP (Alcázar, *et al.*, 2013).

c) Nitroprusiato de sodio

Es un vasodilatador que actúa por medio de la liberación de óxido nítrico y este actúa a su vez activando la vía del guanilatociclasa-GMP cíclico-PKG y ocasiona vasodilatación; la producción de óxido nítrico remodela las células del endotelio vascular. El nitroprusiato dilata arteriolas y vénulas y la respuesta hemodinámica a su administración es consecuencia de una combinación de acumulación venosa y menor impedancia arterial. El nitroprusiato es un vasodilatador no selectivo, conserva la perfusión renal y la filtración y aumenta la actividad de la renina plasmática (Brunton, Chabner y Knollmann, 2012).

El nitroprusiato de sodio se utiliza principalmente para emergencias hipertensivas y también en muchas situaciones en que se intenta disminuir a breve plazo la precarga, la postcarga o ambos elementos. Sus efectos adversos a corto plazo son la vasodilatación excesiva, con hipotensión y sus consecuencias. Con menor frecuencia, los efectos tóxicos pueden ser consecuencia de conversión del nitroprusiato en cianuro y tiocianato, el primero ocasiona acidosis láctica (Brunton, Chabner y Knollmann, 2012).

d) Antagonistas de conductos de calcio

Los antagonistas del calcio se utilizaron inicialmente como antianginosos en los años setenta, y como antihipertensivos en los ochenta. Es una clase de fármacos muy heterogénea, en la que podemos separar tres grupos: una benzotiazepina, el diltiazem; una fenilalquilamina, el verapamil; y el amplio grupo de las dihidropiridinas, con diferencias importantes en su estructura y efectos cardiovasculares. Aunque sus principales efectos antihipertensivos están mediados por el bloqueo de los canales de calcio de tipo L, en los últimos años se han ido describiendo otros subtipos de canales de calcio, por los que los antagonistas del calcio presentan diferente grado de especificidad (Alcázar, *et al.*, 2013).

Los más antiguos presentan acción más corta, y se describieron descensos bruscos de la PA, que no se observaban con los de duración de acción más prolongada. Este fenómeno se solventó con la aparición de sistemas de liberación especiales. En conjunto, su eficacia antihipertensiva es similar y aportan una protección frente a episodios cardiovasculares equivalente a la de otros grupos, con la excepción del desarrollo de insuficiencia cardíaca (Alcázar, *et al.*, 2013).

Los efectos secundarios de los antagonistas del calcio están relacionados con su efecto vasodilatador: cefalea, rubefacción, edema maleolar (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.7.1.4. Inhibidores de angiotensina

a) Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

El primer inhibidor de la ECA (IECA) fue la teprotida, que disminuía los niveles de PA tras su administración intravenosa, y el primer IECA eficaz por vía oral, el captopril (Alcázar, *et al.*, 2013).

El mecanismo responsable de la disminución de la PA por los IECA es la reducción de la concentración de angiotensina II circulante, con la consiguiente disminución de la vasoconstricción inducida por ella. No obstante, se ha descrito un fenómeno de escape de angiotensina II, en parte debido a la liberación de más renina, libre del mecanismo de retroalimentación y la existencia de vías no clásicas de síntesis de angiotensina (Alcázar, *et al.*, 2013).

El efecto secundario más frecuente de los IECA es una tos seca, no productiva. También pueden producir broncoespasmo. Se supone que el mecanismo de la tos es un aumento de la bradiquinina, secundario a la disminución de su degradación por la inhibición de la ECA. Los IECA también pueden producir angioedema. Los IECA están contraindicados en el segundo y tercer trimestre del embarazo por producir daño y muerte fetal (Alcázar, *et al.*, 2013).

b) Antagonistas de receptores de angiotensina (ARA)

El primer antagonista de los receptores de angiotensina II (ARA), la saralasin, mostró su capacidad para disminuir la PA incluso antes que los IECA. Los antagonistas del

receptor AT1 de la angiotensina II desplazan a ésta del receptor específico, antagonizando todos sus efectos conocidos, con una disminución de la resistencia periférica. Los ARA se pueden combinar con otros fármacos antihipertensivos para incrementar el efecto de reducción de la PA (Alcázar, *et al.*, 2013).

Además de su eficacia antihipertensiva, los ARA se han utilizado con éxito en estudios de nefroprotección de pacientes diabéticos tipo 2, pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda y pacientes con insuficiencia cardiaca. Los ARA presentan el perfil de tolerabilidad más favorable de todos los grupos de antihipertensivos, ya que es superponible a placebo. Al igual que los IECA, los ARA están contraindicados durante el embarazo (Alcázar, *et al.*, 2013).

c) Inhibidores directos de renina

La angiotensina II es el principal efector del sistema renina-angiotensina. Se sintetiza a partir de la transformación del angiotensinógeno en angiotensina I, reacción mediada por una peptidasa, más conocida como renina. El primer representante de este grupo de fármacos es aliskiren, un inhibidor no peptídico selectivo de la renina, activo por vía oral, que bloquea el sistema renina-angiotensina en su fase inicial, en la conversión de angiotensinógeno a angiotensina I (Alcázar, *et al.*, 2013).

d) Otros fármacos en fase de experimentación

Existen varios fármacos en fases avanzadas de investigación, como los antagonistas de la endotelina o los inhibidores de la vasopectidasa. Los antagonistas de la endotelina han demostrado su capacidad para inhibir la vasoconstricción inducida por ésta, si bien tienen un efecto antihipertensivo débil (Alcázar, *et al.*, 2013).

Por su parte, el principal representante de los inhibidores de la vasopectidasa fue el omapatrilato, que inhibía simultáneamente la endopeptidasa y la ECA y que tuvo que ser retirado, por un incremento de la incidencia de angioedema, cuando ya se encontraba en una fase muy avanzada de su desarrollo. También se ha descrito como estrategia terapéutica eficaz el doble bloqueo de la endopeptidasa y del receptor AT1 de angiotensina (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.7.2. Tratamiento No Farmacológico

- Cambios del estilo de vida

Las modificaciones del estilo de vida deben instaurarse en todos los pacientes, incluidos los que tienen una PA normal alta y los que necesitan tratamiento farmacológico. El objetivo es reducir la PA, controlar otros factores de riesgo y trastornos clínicos y reducir el número de dosis de fármacos antihipertensivos que luego se podrían tener que utilizar. Las medidas de estilo de vida sobre las que hay amplio acuerdo para la reducción de la PA o el riesgo cardiovascular (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Abandono del consumo de tabaco

El tabaquismo causa un aumento agudo de la PA y la frecuencia cardiaca, que persisten durante más de 15 min después de fumar un cigarrillo. Es probable que el mecanismo sea una estimulación central y de las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático que originan un aumento de las catecolaminas plasmáticas paralelo al aumento de la PA (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Moderación del consumo de alcohol

La relación entre el consumo de alcohol, los valores de presión arterial y la prevalencia de la HTA es lineal en las poblaciones. El alcohol atenúa los efectos del tratamiento con fármacos antihipertensivos, pero este efecto es al menos parcialmente reversible en 1-2 semanas al moderar el consumo de alcohol. Diversos estudios sobre la reducción del consumo de alcohol han mostrado una reducción significativa de la presión arterial sistólica y diastólica (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Restricción de sodio

El consumo de sal en la dieta contribuye a elevar la PA y a la prevalencia de la HTA. La reducción del consumo de 4,7-5,8 g de cloruro sódico al día, respecto a un consumo inicial de alrededor de 10,5 g de cloruro sódico reduce la PA en una media de 4-6mmHg, aunque con una gran variabilidad entre distintos pacientes. El efecto de la restricción de sodio en la PA es mayor en los individuos de raza negra, los de mediana edad y los ancianos, así como en los individuos con HTA, diabetes mellitus o enfermedad renal

crónica, es decir, los grupos que tienen menor capacidad de respuesta del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Otros cambios de la dieta

En la última década, se ha planteado que un aumento del consumo de potasio y un patrón de alimentación basado en la dieta DASH (una dieta rica en frutas, hortalizas y productos lácteos con poca grasa, y con un contenido reducido de colesterol, grasas saturadas y grasas totales) tiene también un efecto de reducción de la PA. Se debe aconsejar a los pacientes hipertensos que consuman más frutas y hortalizas (4-5 raciones ó 300 g de hortalizas al día) y más pescado y reduzcan el consumo de grasas saturadas y colesterol (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Reducción del peso corporal

Es bien sabido que el peso corporal está directamente relacionado con la PA y que el exceso de grasa corporal predispone a un aumento de los niveles de PA. La reducción del peso corporal reduce la PA en los individuos obesos y tiene efectos beneficiosos sobre otros factores de riesgo asociados, como la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus, la hiperlipidemia, la hipertrofia ventricular izquierda y la apnea obstructiva durante el sueño. La estabilización del peso puede considerarse también un objetivo que es útil alcanzar (Alcázar, *et al.*, 2013).

- Ejercicio físico

La falta de actividad física es un predictor potente de la mortalidad cardiovascular, independiente de la PA y otros factores de riesgo. El ejercicio de resistencia aerobio dinámico reduce la presión arterial sistólica y diastólica en reposo en 3,0/2,4mmHg y la PA ambulatoria diurna en 3,3/3,5mmHg. Así pues, a los pacientes sedentarios se les debe recomendar que realicen ejercicio de intensidad moderada de manera regular, por ejemplo, 30-45 min/día. El tipo de ejercicio debe ser principalmente una actividad física de tipo continuo (Alcázar, *et al.*, 2013).

3.1.8. Consecuencias patológicas de la hipertensión

- Corazón

Las cardiopatías constituyen la causa más común de muerte en sujetos hipertensos. La cardiopatía por HTA es el resultado de adaptaciones estructurales y funcionales que culminan en hipertrofia de ventrículo izquierdo, anormalidades del flujo sanguíneo por arteropatía coronaria aterosclerótica y enfermedad microvascular, así como arritmias cardíacas (Longo, *et al.*, 2012).

- Riñón

Los riñones son órganos que pueden recibir efectos de la HTA a su vez ser causa de ella. La nefropatía primaria constituye la entidad más común que origina hipertensión secundaria. Entre los mecanismos de hipertensión renal están la menor capacidad de los riñones para excretar sodio, la secreción excesiva de renina en relación con el estado volumétrico y la hiperactividad del sistema nervioso simpático (Longo, *et al.*, 2012).

- Cerebro

La apoplejía (o accidente cerebrovascular) ocupa el segundo lugar en frecuencia como causa a nivel mundial. El factor de mayor peso en el riesgo de que surja la apoplejía es la hipertensión. En promedio, 85% de las apoplejías provienen de infarto y el resto, de hemorragia intracerebral o subaracnoidea. La incidencia de apoplejía aumenta progresivamente conforme lo hacen las cifras de PA, en particular la sistólica en personas mayores de 65 años de edad (Longo, *et al.*, 2012).

- Arterias periféricas

Los vasos sanguíneos, además de contribuir en la patogenia de la HTA, pueden recibir efectos de la enfermedad aterosclerótica que es consecuencia de la HTA de larga evolución. Los sujetos hipertensos con arteriopatía de las extremidades pélvicas están expuestos a un mayor riesgo de presentar futuras enfermedades cardiovasculares. Los individuos con lesiones escleróticas de las extremidades inferiores posiblemente no tengan síntomas, pero uno de los síntomas clásicos de las arteriopatías periféricas es la claudicación intermitente, se caracteriza por dolor molesto de las pantorillas o en la región de las nalgas durante la marcha, que cede con el reposo (Longo, *et al.*, 2012).

3.2. Ensayos preclínicos

La investigación biomédica preclínica es importante para aumentar el conocimiento de los mecanismos biológicos básicos. Los estudios comúnmente se realizan en instituciones o departamentos preclínicos en campos tales como anatomía, bioquímica, biología celular, inmunología, microbiología, biología molecular, neurociencia, farmacología y fisiología. La investigación preclínica puede contribuir al descubrimiento de nuevos tratamientos médicos (Karlberg & Speers, 2010).

El desarrollo preclínico de un medicamento hace referencia al conjunto de estudios de eficacia y seguridad del principio activo que se deben realizar en sistemas biológicos diferentes al ser humano. Debido a que un determinado grupo de estudios debe realizarse antes de comenzar las primeras pruebas en humanos (ensayo clínico) y otros antes de comenzar las restantes fases clínicas, es por lo que a esta parte del desarrollo se le llama “preclínico”. El objeto de la fase preclínica es caracterizar la eficacia y seguridad del medicamento en animales o sistemas “*in vitro*” (De Miguel, *et al.*, 2012).

El desarrollo preclínico comprende una fase inicial de selección de las nuevas moléculas candidatas, seguida de la investigación de su potencial acción farmacológica, y finalmente de la evaluación de su seguridad. La clave del éxito es que las moléculas candidatas posean ciertas propiedades favorables: actividad biológica y solubilidad adecuada, capacidad para atravesar barreras críticas, razonable estabilidad metabólica y seguridad en su administración al hombre (De Miguel, *et al.*, 2012).

Cada fármaco particular necesita su propio desarrollo preclínico debiendo tenerse en cuenta diversos factores: tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicaciones clínicas. Es especialmente importante conocer el ámbito regulatorio y las guías que aplican. En este sentido es fundamental contemplar dónde se va a realizar el desarrollo clínico, ya que en ocasiones los requisitos regulatorios de EEUU (“Food and Drug Administration”, FDA) y Europa (“European Medicines Agency”, EMA) pueden diferir, etc. Igualmente importante para definir el desarrollo preclínico más adecuado es tener en cuenta el diseño del ensayo clínico, así como duración del tratamiento, vía y pauta de administración, tipo de población sujeta a estudio, etc., (De Miguel, *et al.*, 2012).

3.2.1. Organismos reguladores

Los desarrollos preclínicos y clínicos se monitorean atentamente bajo estrictas normas gubernamentales en la mayoría de los países para asegurar que se hayan estudiado todos los aspectos del compuesto, y que la investigación haya utilizado diseños adecuados para los ensayos con alta calidad, de acuerdo con los estándares éticos internacionales y locales para la investigación en seres humanos (Karlberg & Speers, 2010).

En la etapa preclínica, la autoridad regulatoria generalmente pedirá que el patrocinador:

- Desarrolle un perfil farmacológico del fármaco.
- Determine la toxicidad aguda del fármaco en al menos dos especies de animales.
- Realice estudios de toxicidad a corto plazo que abarquen entre 2 semanas y 3 meses, dependiendo de la duración propuesta de uso de la sustancia en los ensayos clínicos propuestos (Karlberg & Speers, 2010).

3.2.1.1. ICH: International Conference of Harmonisation

La Conferencia Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano es el organismo, por excelencia a nivel mundial, que reúne a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica de Europa, Japón y Estados Unidos (De Miguel, *et al.*, 2012).

Su misión es lograr una armonización en las directrices técnicas y los requisitos para el registro de productos farmacéuticos, para asegurar la inocuidad y eficacia de los medicamentos (De Miguel, *et al.*, 2012).

La armonización en la reglamentación ofrece muchos beneficios directos a los organismos reguladores de cada región. Entre estos beneficios cabe destacar:

- Evitar la duplicación de los ensayos clínicos en seres humanos y reducir al mínimo los ensayos con animales sin comprometer la seguridad y la eficacia.

- Racionalizar el proceso de evaluación legal de las solicitudes de nuevos medicamentos.
- Reducir los tiempos de desarrollo y recursos para el desarrollo de medicamentos (De Miguel, *et al.*, 2012).

3.2.1.2. EMA: European Medicines Agency

Es un organismo descentralizado de la Unión Europea responsable de la evaluación científica de los medicamentos desarrollados por las compañías farmacéuticas para su uso en la Unión Europea. La EMA se responsabiliza de:

- Evaluación científica de solicitudes de autorización para comercialización en Europa de medicamentos humanos y veterinarios mediante un procedimiento centralizado.
- Aprobación de todos los medicamentos para usos humanos y animales, generados biotecnológicamente o mediante otros procesos, por el procedimiento centralizado (De Miguel, *et al.*, 2012).

Así mismo para los medicamentos de terapia avanzada de uso humano, para el tratamiento del VIH, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, trastornos autoinmunes, enfermedades virales, así como todos los medicamentos huérfanos para tratamiento de enfermedades raras (De Miguel, *et al.*, 2012).

- Supervisión constante de la seguridad de los medicamentos a través de una red de farmacovigilancia.
- Estimulación de la innovación y la investigación en el sector farmacéutico. La Agencia ofrece asesoramiento científico y ayuda a las empresas para el desarrollo de nuevos medicamentos. Emite directrices de calidad, seguridad y eficacia (De Miguel, *et al.*, 2012).

3.2.1.3. OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

Su misión es la de promover políticas que mejoren el bienestar económico y social de las personas alrededor del mundo (De Miguel, *et al.*, 2012).

La OCDE emite guías muy específicas acerca de cómo llevar a cabo los estudios preclínicos de seguridad. Estas guías están enfocadas a la evaluación de sustancias químicas en general para muy diferentes aplicaciones, sin embargo en la mayoría de casos, las recomendaciones que establecen son aplicables también a medicamentos, por lo que habitualmente a la hora de diseñar un estudio preclínico siempre se tiene en cuenta o se hace referencia a estas guías de la OCDE (De Miguel, *et al.*, 2012).

3.2.1.4. FDA: Food and Drug Administration

La FDA estadounidense también emite directrices para la realización de ensayos preclínicos dirigidos a soportar ensayos clínicos y para la autorización de comercialización de medicamentos en Estados Unidos (De Miguel, *et al.*, 2012).

3.2.2. Farmacología preclínica

3.2.2.1. Farmacodinamia

Los estudios farmacodinámicos servirán para demostrar el efecto terapéutico previsto del medicamento y, siempre que sea posible, su mecanismo. Por otra parte, estos estudios deben extenderse a los sistemas principales del organismo para revelar otros efectos del medicamento, convenientes o nocivos (OMS, 1975).

Deben buscarse datos que pueden referirse no sólo a los efectos terapéuticos sino también a:

- a) Los posibles efectos adversos
- b) Los tejidos en que es más necesario el estudio morfológico
- c) Los sistemas metabólicos que deben estudiarse (OMS, 1975).

El uso de animales con enfermedades espontáneas o provocadas puede proporcionar una valiosa información terapéutica (OMS, 1975).

La relación entre la concentración y la respuesta (relación dosis-respuesta) permite estimar parámetros farmacodinámicos empleados en el descubrimiento de fármacos así como en la práctica clínica. Los parámetros farmacodinámicos comúnmente empleados son la eficacia y la potencia. La eficacia se refiere al efecto máximo (E_{max}) que puede generar el fármaco. Por otro lado, la potencia está relacionada con la concentración necesaria para alcanzar el 50% del máximo efecto (CE_{50}) generado. Estos parámetros permiten predecir el efecto en cualquier concentración independientemente de cómo se hayan inducido. Según la teoría clásica de ocupación de receptores, el efecto está en relación directamente proporcional con el número de receptores ocupados, alcanzando el efecto máximo (E_{max}) cuando todos los receptores están ocupados, y por mucho que se incremente la concentración del fármaco la respuesta no va a ser mayor (sí en cambio se pueden aparecer los efectos adversos) (Aguirre & Sánchez, 2010; Aguilera, sf).

3.2.2.2. Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos (de la absorción, distribución, biotransformación y excreción) sirven para evaluar la eficacia y la toxicidad de un medicamento; son importante en todas las etapas de la preparación de un medicamento y no deben considerarse como exclusivos de los estudios de la fase preclínica (OMS, 1975).

a. Absorción, distribución y excreción

Una forma cómoda para evaluar la absorción consiste en comparar el área situada por debajo de la curva de concentración plasmática tiempo después de la administración oral y después de la administración parenteral. La magnitud y velocidad de la absorción de un medicamento dependen de diversos factores como distribución lípidos/grasa, la forma farmacéutica y la solubilidad en los constituyentes orgánicos. Los factores fisiológicos, como el tiempo de vaciamiento gástrico y de tránsito intestinal, pueden influir considerablemente en la velocidad y magnitud de la absorción; así mismo la biotransformación o almacenamiento (OMS, 1975).

La distribución de los medicamentos difiere en función de su capacidad para atravesar las membranas, para ligarse a proteínas u otras macromoléculas de la sangre o los tejidos, y para almacenarse en los tejidos. El enlace con proteínas puede explicar los efectos farmacológicos o toxicológicos cuando los estudios se hacen con animales enfermos o especies diferentes (OMS, 1975).

Cuando sea posible, debe determinarse la relación entre los efectos farmacodinámicos y toxicológicos de un medicamento y su concentración en plasma. Si no hay relación, se considera la existencia de un metabolito activo, enlace irreversible a los receptores o distribución lenta, diferencia en actividad de isómeros u otros factores (OMS, 1975).

Los medicamentos se excretan inalterados o en forma de metabolitos, sobre todo en riñón, hígado y pulmones. La magnitud y velocidad de excreción depende de factores como distribución lípidos/agua, disociación ácida o básica o el peso molecular. Es necesario conocer la vía de eliminación de un medicamento, ya que la enfermedad de los sistemas que realizan la biotransformación y la excreción puede influir sobre las concentraciones de la sustancia activa (OMS, 1975).

b. Biotransformación

Puede influir no solo en la actividad terapéutica prevista sino también en la toxicidad, y tanto como otra puede aumentar o disminuir. Las enzimas que metabolizan los medicamentos catalizan procesos como la oxidación, reducción, hidrólisis y síntesis (OMS, 1975).

Factores que influyen en la biotransformación:

- a) Diferencias inespecíficas e individuales
- b) Inducción de la enzima
- c) Inhibición de la enzima
- d) Edad y sexo del animal
- e) Fenómenos de saturación (OMS, 1975).

3.2.2.3. Toxicología preclínica

Los estudios toxicológicos sirven para determinar la toxicidad del medicamento en animales de experimentación en diversas condiciones de administración. Suelen dividirse en:

- a) Estudios de toxicidad aguda mediante la administración de una dosis única o de un pequeño número de dosis en un periodo corto de tiempo.
- b) Estudios a largo plazo (toxicidad crónica), basados en la administración repetida durante varios periodos hasta de un año o incluso más, según las indicaciones previstas para el medicamento y las especies animales que se van a utilizar.
- c) Estudios especiales: de reproducción (teratología y efectos sobre fecundidad y el desarrollo postnatal), mutagenicidad, carcinogenicidad y riesgo de dependencia (OMS, 1975).

3.2.3. Modelos experimentales de estudio

3.2.3.1. Elección del animal

Las especies animales difieren considerablemente en su respuesta a los medicamentos y en la manera en la que éstos se absorben, distribuyen, metabolizan y excretan. La rata, el perro, el mono y el cerdo se utilizan con frecuencia. Debe fomentarse la evaluación de especies distintas de las clásicas con el fin de seleccionar a las que reacciones a los medicamentos de modo más similar al hombre. Deben mantenerse registros exactos del origen y la filiación de todos los animales de laboratorio. En estudios toxicológicos conviene usar estirpes exogámicas (OMS, 1975).

3.2.3.2. Características de los animales de experimentación

Este es un animal que tiene una calidad genética y ambiental controlada y asegurada y es capaz de dar una respuesta confiable y reproducible, se debe considerar para su bienestar las características de la especie y sus requerimientos etológicos (Victoria y Morón, 2010).

Los principales factores ambientales que afectan a los animales pueden ser de diferentes tipos: climáticos, fisicoquímicos, habitacionales, nutricionales, presencia de microorganismos y parásitos, situación experimental, entre otros (Quezada, 2007; Victoria y Morón, 2010).

Para poder obtener este tipo de animal se deben establecer estrictas medidas y condiciones bajo las cuales se producen y reproducen los animales en los bioterios, esto se conoce como barreras, abarca la temperatura, nivel de ruido, intensidad de la luz, esterilización de agua, comida y cama, control microbiológico, ropa adecuada para el personal que labora, etc. Estas garantizan las condiciones tanto genéticas como sanitarias (Victoria y Morón, 2010).

Las barreras que permiten la separación del ambiente externo, minimizan el riesgo de posibles contaminaciones con organismos no deseados o microorganismos patógenos.

Se deben definir las características somáticas (peso, sexo, edad), genéticas y sanitarias, según los requerimientos del experimento (Victoria y Morón, 2010).

No es posible el empleo en el laboratorio de un animal cuya genética no sea conocida o completamente definida. Es requisito exigido universalmente que el animal utilizado en investigación biológica o biomédica sea obtenido de un centro de producción certificado (Victoria y Morón, 2010).

3.2.3.3. Bioterios

Los bioterios son el conjunto de instalaciones destinadas al mantenimiento y/o producción de estos animales, que serán empleados como reactivos biológicos; son los espacios donde se cuida y usa el animal como modelo experimental. Requieren condiciones mínimas adecuadas para su desarrollo y se separan por áreas según la función que en ella se realice (Victoria & Morón, 2010).

Algunas de las especies más utilizadas en las investigaciones biomédicas y sus características más significativas son:

- Ratón (*Mus musculus*): tamaño pequeño, alta fecundidad, fácil manejo, bajo costo, variabilidad, tienen hábitos nocturnos y viven en jerarquía (Victoria & Morón, 2010).
- Rata (*Rattus norvegicus*): el más usado en fisiología, toxicología, farmacología etc.; su tamaño facilita técnicas de microcirugía es de 10 a 15 veces mayor al del ratón y menor agresividad (Victoria & Morón, 2010).
- Cobayo (*Cavia porcellus*): utilizado en producción de sueros, vacunas etc., se han desarrollado técnicas *in vitro* utilizando sus órganos. Son herbívoros, cortos períodos de sueño, crías bien desarrolladas al nacer, no sintetizan vitamina C y debe adicionarse en la dieta (Victoria & Morón, 2010).
- Conejo (*Oryctolagus cuniculus*): docilidad, fertilidad, grandes vasos en las orejas, se utilizan en pruebas de pirógeno. Son herbívoros, desarrollado sentido del olfato y la audición, ovulación inducida por el coito, deben ser alojados en jaulas individuales (Victoria & Morón, 2010).

Estos animales pequeños tienen grandes ventajas económicas sobre los de mayor tamaño porque son de menor costo de producción, el mantenimiento es más fácil, requieren condiciones más sencillas, y menos costosas, esto disminuye el costo de los proyectos de investigación. Además, con estos animales más pequeños se han logrado desarrollar técnicas *in vitro* que permiten la utilización de menor cantidad (Victoria & Morón, 2010).

Los métodos alternativos son técnicas en las que 1, se incorpora un *refinamiento* de los procedimientos; 2, se *reduce* el número de animales; 3, se *reemplaza* el uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos. Estos métodos tienen como objetivo cumplir con el principio de las tres R (*reemplazo, reducción y refinamiento*) creado por *Russell y Bursh*, que postula el concepto de ciencia humanitaria y sensible para el trabajo científico y buscan garantizar el uso racional y respetuoso del animal experimental (Rusche, 2003; Victoria & Morón, 2010).

3.3. Modelo experimental de hipertensión arterial por L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME)

Durante los últimos 60 años varios modelos animales de HTA han sido desarrollados, muchos en ratas (Szallasi & Biró, 2012).

Un modelo animal de HTA debe llenar los siguientes criterios:

1. Debe mantener niveles elevados de PA comparables a la HTA humana.
2. Debe presentar daños funcionales y patológicos relacionados al escenario clínico.
3. Debe ser reproducible entre y con otros experimentos.
4. Debe ser un modelo simple y rentable para el desarrollo farmacéutico.
5. Debe permitir pruebas cruzadas de una serie de compuestos (Szallasi & Biró, 2012).

La especie más utilizada para modelos experimentales es la rata debido a la extensiva caracterización de su fisiología cardiovascular la cual tiene muchas similitudes con la del ser humano, fáciles de criar y reproducirse, y rentable. Las ratas transgénicas han sido desarrolladas para apuntar a genes específicos de los sistemas reguladores en orden progresivo para el entendimiento del sistema cardiovascular. Los ratones “knockout” han sido también desarrollados y reconocidos como útiles para la fisiopatología, además del fenotipo cardiovascular ha mostrado ser más complicado. Animales grandes como los perros, cerdos y monos han sido utilizados también como modelos experimentales para la HTA. Sin embargo, la crianza y los costos han hecho de estos animales no son apropiados para estos estudios (Szallasi & Biró, 2012).

El modelo que produce HTA con la administración del reactivo L-NAME, produce principalmente vasoconstricción, agregado y adhesión plaquetaria, así como remodelado endotelial en el organismo a partir de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico endotelial (eONS), el principal efecto de la inhibición de eONS es un aumento sostenido en la PA, debido a que su falta bloquea relajación en los vasos sanguíneos induciendo hipertrofia cardíaca como compensación en respuesta a la falla cardíaca, lo que lo convierte en un modelo experimental de gran aplicación en el campo de las enfermedades cardiovasculares.

3.3.1. Óxido nítrico (ON)

En 1980 Furchgott y Zawadzki descubrieron que la presencia de endotelio era necesaria para que se produjese la relajación de un anillo de aorta de conejo inducida por la acetilcolina (Ach), se concluyó que la relajación endotelio dependiente producida por la Ach resultaba de la liberación de una sustancia difusible liberada por el endotelio que se llamó "endothelium-derived-relaxing factor" (EDRF), factor relajante derivado del endotelio; el cual en 1987 Palmer y colaboradores identificaron como óxido nítrico (ON) (Alderton, *et al.*, 2001; Sanz, 2014).

El óxido nítrico es un mensaje molecular ortodoxo, el cual tiene numerosas dianas moleculares. Controla las funciones servoregulatoras como la neurotransmisión o el tono vascular (por la estimulación de la guanilil ciclasa sensible a óxido nítrico), regula genes de transcripción y translocación de mRNA y produce modificaciones post-translocacionales de proteínas (Brune, *et al.*, 1994; Förstermann & Sessa, 2011).

En cuanto al mecanismo de acción, el ON actúa mediante la activación del enzima guanilatociclasa soluble, incrementando los niveles intracelulares de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). El ON sintetizado en una célula difunde hacia la célula diana, donde se libera y fija al grupo hemo de la guanilatociclasa soluble, induciendo un cambio conformacional y la activación de dicho enzima, que transforma la guanosín 5'-trifosfato (GTP) en GMPc. El incremento posterior de los niveles intracelulares de GMPc modifica la actividad de diversas proteínas diana, como proteínas cinasa dependientes de GMPc, fosfodiesterasas reguladas por GMPc y canales iónicos regulados por GMPc (Ver anexo No. 1) (Drew & Leeuwenburgh, 2002; Sanz, 2014).

El ON es un factor de acción paracrina cuyas acciones principales son: la relajación del músculo liso vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células del músculo liso y la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio. Como consecuencia, el ON desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, estructura e integridad vascular (Sanz, 2014).

El ON se libera de las células endoteliales en respuesta a factores físicos y humorales, siendo el principal factor físico las llamadas fuerzas de cizallamiento ejercidas por la sangre sobre el endotelio vascular y también factores humorales como la acetilcolina, bradiquinina, catecolaminas, angiotensina II, endotelina-1, vasopresina, trombina, adenosíntrifosfato y adenosindifosfato, sustancia P, ácido araquidónico, histamina, ionóforo de calcio (A23187), etc. La liberación del ON en respuesta a ciertas hormonas como la angiotensina II, la vasopresina y las catecolaminas sería responsable de la vasodilatación inducida por estas hormonas sobre territorios vasculares específicos, y modularía la acción constrictora de éstas producida por su interacción con receptores de angiotensina tipo 1, de vasopresina tipo 1 o $\alpha 1$ situados en las células musculares lisas (Sanz, 2014).

3.3.1.1. Mecanismo de síntesis de óxido nítrico

Todas las isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa (ONS) utilizan L-arginina como sustrato, oxígeno molecular y requieren los cofactores Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), y (6R-)5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄). Todas las proteínas de ONS son homodímeros. Una molécula funcional de ONS transfiere electrones del NADPH, haciendo uso de las flavinas FAD y FMN del dominio carboxilo reductasa terminal, al dominio amino oxigenasa terminal del grupo hemo. El dominio oxigenasa además une el cofactor BH₄, oxígeno molecular, y el sustrato L-arginina. En el sitio hemo, los electrones son utilizados para reducir y activar el O₂ y para oxidar L-arginina a L-citrulina y ON. El orden de la síntesis de ON, la enzima ONS cumple dos pasos; en el primero, la ONS hidroxila L-arginina a N^ω-hidroxi-L-arginina, que sigue ligado a la enzima. En el segundo paso, ONS oxida N^ω-hidroxi-L-arginina a L-citrulina y ON. Todas las isoformas se unen a calmodulina. En nONS y eONS, la calmodulina se liga por el incremento de Ca²⁺ intracelular. Cuando la afinidad de calmodulina a ONS incrementa, esto facilita el flujo de electrones del NADPH en dominio reductasa al dominio oxigenasa del grupo hemo. En la ONS inducible (iONS), calmodulina se une a bajas concentraciones intracelulares de Ca²⁺ debido a las diferentes estructuras de aminoácidos unidos a los sitios de la calmodulina. Todas las proteínas de ONS contienen un grupo zinc-tiolato, formado por zinc que está tetraédricamente coordinado con dos CysXXXXCys en la interface del dímero de ONS. El zinc en ONS tiene una función más estructural que catalítica. El ON formado por ONS puede actuar en un sinnúmero de

enzimas y proteínas diana, siendo la más importante la activación de guanilil ciclasa soluble y la generación de GMP cíclico (Nishimura, *et al*, 1995; Hemmens & Mayer, 1998; Förstermann & Sessa, 2011).

3.3.1.2. Óxido nítrico sintasa neuronal (nONS, ONS I)

La nONS está constitutivamente expresado en neuronas periféricas y centrales, y en otros tipos de células. Esta enzima está regulada por Ca^{2+} y calmodulina. nONS cerebral se encuentra en partículas y formas solubles en las células y en diferentes localizaciones subcelulares. En adición al tejido vertebral, nONS has sido identificado por inmunohistoquímica en la espina cordal, en los ganglios simpáticos y en glándulas adrenales, en nervios nitrérgicos periféricos, en células epiteliales de varios órganos, en células de la mácula densa del riñón, en células de islotes pancreáticos, y en vasculatura de músculo liso. Entre las funciones fisiológicas de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal han sido implicadas la modulación de funciones como el aprendizaje, la memoria y la neurogenesis. En el sistema nervioso central, nONS media la regulación a mediano plazo de la transmisión sináptica. El bloqueo de la actividad de nNOS en la médula y el hipotálamo causa HTA sistémica. En la periferia, muchos tejidos musculares lisos son inervados por nervios nitrérgicos. El óxido nítrico producido por nNOS en nervios nitrérgicos es un inusual neurotransmisor que estimula el ON sensible a guanilil ciclasa en su efector celular, donde disminuye el tono de varios tipos de musculo liso incluyendo los vasos sanguíneos. Niveles altos de ON puede también producir depleción de energía, debido a la inhibición de la respiración mitocondrial y la inhibición de glucolisis, así como problemas gastrontestinales (Brune, *et al*, 1994; Förstermann, 2000; Förstermann & Sessa, 2011).

3.3.1.3. Óxido nítrico sintasa inducible (iONS, ONS II)

La óxido nítrico sintasa inducible, no es usualmente expresada por células, pero su expresión puede ser inducir por lipopolisacáridos bacteriales, citocinas, y otros agentes. Aunque al principio fue identificada en macrófagos, la expresión de esta enzima puede ser virtualmente estimulada en cualquier célula o tejido. Una vez expresada, la iONS se mantiene constantemente activa y no es regulada por Ca^{2+} intracelular. Las funciones fisiológicas de la óxido nítrico sintasa inducible cuando es inducida en macrófagos, produce grandes cantidades de ON, lo que representa una mayor citotoxicidad a las células

principales. Debido a la afinidad de las uniones proteína-hierro, el ON puede inhibir las enzimas clave que contienen hierro en sus centros catalíticos. Estos incluyen agrupaciones hierro-sulfuro dependientes de enzimas (complejos I y II) que participan en el transporte mitocondrial de electrones, ribonucleótido reductasa (la enzima limitante de la replicación de ADN), y cis-aconitasa (una enzima clave del ciclo del ácido cítrico) (50). Además, altas concentraciones de ON, producidas en macrófagos, puede interferir directamente con el ADN de las células diana y causar roturas de cadena y fragmentaciones. La producción excesiva de ON por iONS tiene un rol crucial en el shock séptico, situación caracterizada por masiva vasodilatación arteriolar, hipotensión y daño microvascular. Estos síntomas son iniciados por endotoxinas bacterianas. Mediadores como el factor de activación plaquetaria, tromboxano A2, prostanoïdes y citocinas como inteleucina-a, factor de necrosis tumoral- α e interferón- γ son elevados en el shock séptico y han sido implicados en su fisiopatología (Förstermann, 2000; Förstermann & Sessa, 2011).

3.3.1.4. Óxido nítrico sintasa endotelial (eONS, ONS III)

El ONS endotelial es el mayormente expresado en celular endoteliales. Esta isoenzima, ha sido también detectada en miocitos cardiacos, plaquetas, algunas neuronas cerebrales, sincitiotrofoblastos de la placenta humana y en células epiteliales de los túbulos renales. De manera similar nONS, la presencia de Ca^{2+} y calmodulina es importante para la regulación de la actividad de eONS. ONS endotelial sintetiza ON de manera pulsátil con el incremento de Ca^{2+} intracelular. Ca^{2+} induce la unión de calmodulina a la enzima. Varias proteínas interactúan con eONS regulando su actividad (Förstermann, 2000; Förstermann & Sessa, 2011). Las funciones fisiológicas principales de la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eONS) son:

- Vasodilatación e inhibición de agregación y adhesión plaquetaria

ONS endotelial parece ser un regulador homeostático de numerosas funciones cardiovasculares. El ON derivado de ONS endotelial dilata todo tipo de vasos sanguíneos por la estimulación de guanilil ciclasa soluble y el incremento de GMP cíclico en células de tejido muscular liso. La supresión del gen de eONS conlleva a una PA elevada. El óxido nítrico liberado hacia la luz vascular es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y la adhesión a la pared vascular. Además de la protección de la trombosis, también previene

la liberación plaquetaria derivada de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de músculo liso y su producción de moléculas madres. ONS endotelial también es crítica para la remodelación vascular de adaptación en los cambios crónicos del flujo de adhesión de leucocitos y la inflamación vascular endotelial NO controla la expresión de genes implicados en la aterogénesis (Förstermann & Sessa, 2011).

- Inhibición de la adhesión leucocitaria y la inflamación vascular

El ON controla la expresión de los genes involucrados en la aterogénesis. El óxido nítrico puede también inhibir la adhesión leucocitaria en las paredes vasculares por la interferencia con la habilidad del leucocito de adherir la molécula CD11/CD18 a la superficie de la célula endotelial. El ON derivado de ONS endotelial previene la apoptosis inducida por citocinas pro-inflamatorias y factores pro-ateroescleróticos incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS) y angiotensina II (AT) (Förstermann & Sessa, 2011).

- Control de la proliferación del músculo liso vascular

Se ha demostrado que el ON inhibe la síntesis de ADN, mitogénesis y la proliferación de las células vasculares del músculo liso. Estos efectos antiproliferativos son mediados por el GMP cíclico. La inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria protege al músculo liso de su exposición a factores de crecimiento derivados. ON previene los pasos tardíos en la aterogénesis, la formación de placas fibrosas (Förstermann & Sessa, 2011).

- Estimulación de la angiogénesis por el óxido nítrico endotelial derivado de eONS

El ON endotelial juega un rol crítico en la angiogénesis post-natal, con señales mediadoras de factores angiogénicos. La eONS es crítica para la formación colateral de angiogénesis post-isquemia. Los efectos positivos del ON en células endoteliales también contribuyen a los efectos pro-angiogénicos del ON (Förstermann & Sessa, 2011).

3.3.2. Inhibición del óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) y sus similares aumentan las concentraciones de GMP cíclico y causan vasodilatación, mientras que un bloqueo del ON constitucional induce vasoconstricción y es causa de hipertensión severa. Se espera que se induzca hipertrofia cardíaca como compensación fundamental en respuesta a la conservación del

funcionamiento sistólico del ventrículo izquierdo en al existir sobrecarga en la presión sistólica y como prevención para el fallo cardíaco. Además, el GMP cíclico-ON inhibe las vías de crecimiento celular en sistemas *in vitro*. Así, se espera que la inhibición crónica en el sistema ON induzca hipertrofia cardíaca significativa; sin embargo, el tratamiento con L-Nitro N-Arginina Metil Ester (L-NAME) parece suprimir los efectos esperados en el incremento de masa del ventrículo izquierdo. Este efecto inhibitorio en el crecimiento es independiente de los efectos en la síntesis de ON en el tejido y mediado por efectos en la liberación de aminoácidos y la utilización por competencia de transporte de aminoácidos y por la alteración en el metabolismo de la ornitina. Esto sugiere que el tratamiento crónico con L-NAME provee una herramienta poderosa para experimentar con el aumento de la carga sistólica y suprimir simultáneamente la hipertrofia compensatoria (Bartunek, *et al.*, 2000).

La vasoconstricción en respuesta a L-NAME es mediada por el impulso simpático, el cual juega un papel muy importante en el inicio y mantenimiento de la HTA. Aparentemente el impulso simpático tiene un rol más importante en la fase crónica que en la fase temprana de la HTA. La HTA con L-NAME es reversible por un bloqueo agudo de los ganglios linfáticos (Biancardi, *et al.*, 2007).

Tanto en ratas inconscientes como anestesiadas, el sistema nervioso simpático juega un papel mayor en el mantenimiento de la HTA por L-NAME. Un bloqueo simpático agudo causa disminución del gasto cardíaco y de la resistencia periférica total en ratas normotensas, mientras que en ratas hipertensas solamente desciende la resistencia periférica total, indicando que la hipertensión es causada por una vasoconstricción mediada por impulsos simpáticos (Biancardi, *et al.*, 2007).

La inducción crónica de hipertensión por L-NAME no causa expansión del volumen plasmático sino vasoconstricción extendida. La fase inicial en el incremento de la actividad nerviosa simpática mediada por la síntesis de ON es compensada en parte por la actividad de los barorreceptores (Biancardi, *et al.*, 2007).

Las inyecciones intravenosas de L-NAME incrementan la PA y la actividad nerviosa simpática renal y la PA aumenta solo cuando el SNS se halla intacto (Sakuma, *et al.*, 1992; Ramchandra, Barret & Malpas, 2005; Biancardi, *et al.*, 2007).

El tratamiento crónico con L-NAME causa HTA severa. El tratamiento con L-NAME fue asociado con una disminución de peso corporal, no hubo aumento en la longitud tibial un índice de crecimiento corporal independiente en la masa corporal. El peso del ventrículo izquierdo y el radio ventrículo izquierdo/peso corporal fue similar entre las ratas con L-NAME y las ratas control. El uso potencial de L-NAME suprime la hipertrofia patológica, pero es limitado debido a la vasoconstricción que este provoca (Bartunek, *et al.*, 2000).

Una posibilidad del mecanismo de acción de L-NAME es que el ON dentro del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo puede funcionar como un regulador fisiológico del SNS. Las neuronas del NPV se proyectan a diversas áreas dentro del SNC implicadas las áreas de regulación cardiovascular, incluyendo el tracto nucleoso solitario, la medula ventrolateral y la médula espinal. La perfusión del NPV con fluidos cerebroespinales conteniendo ON o microinyecciones de nitroprusiato en el NPV han mostrado una reducción significativa de la PA (Horn, *et al.*, 1994; Biancardi, *et al.*, 2007).

La infusión aguda de L-NAME causa activación simpática renal en animales conscientes cuando la influencia de confusión de los barorreceptores sinoaórticos es eliminada bajo barodeneriación, apoyando la idea de la inducción de actividad simpática por L-NAME (Augustyniak, *et al.*, 2006; Biancardi, *et al.*, 2007).

La administración *in vivo* de inhibidores de la ON sintasa como el L-NAME producen elevación de la PA e incremento en la resistencia vascular periférica que es asociada con otros cambios estructurales. La inhibición crónica de ON sintasa en ratas adultas produce disfunción endotelial, incrementa la respuesta vascular a estímulos adrenérgicos e inflamación perivascular. Otros factores incluyendo el sistema renina-angiotensina, factores de constricción endotelial, remodelado arterial y el sistema nervioso simpático parecen estar involucrados en la HTA inducida por L-NAME. Morfológicamente, los estudios revelan hipertrofia cardíaca y vascular, fibrosis y aterosclerosis. Por otro lado, disminución de la densidad del volumen de músculo liso, indicadores de hipertrofia en arterias conductoreas fue encontrado en ratas tratadas con L-NAME (Török, 2008).

L-NAME inhibe la ON sintasa, incluyendo la que se encuentra dentro de la barrera hematoencefálica. El tratamiento con L-NAME incrementa significativamente la presión arterial sistólica, principalmente durante horas de la noche, y tiene una marcada disminución en el ritmo cardíaco (Lee & Azar, 2011).

El óxido nítrico (ON) desempeña un papel importante en la regulación de la resistencia vascular sistémica ejerciendo un efecto vasodilatador tónico. La administración oral crónica de un inhibidor de la ON sintasa, L-NAME, promovió una HTA persistente asociada con la lesión renal, caracterizado por glomeruloesclerosis, isquemia glomerular e infiltración intersticial en el riñón. Esto se asocia con HTA intensa vasoconstricción periférica y el consiguiente aumento de la resistencia vascular periférica. En cuanto a la carga cardíaca, alguna evidencia parece indicar una reducción incluso durante la inhibición crónica de la ON sintasa. Una acción simpático-excitatorio probable de origen central también ha sido propuesto, que mostró que la vasoconstricción en respuesta a L-NAME por el tono simpático desempeña un papel importante en la iniciación y mantenimiento de la HTA (Dornas & Silva, 2011).

En relación a anomalías cardíacas, el nivel de la hipertrofia en este modelo es relativamente menor en comparación con otros modelos con niveles de PA similares. Inducida por L-NAME-sobrecarga de PA está asociado con un patrón distinto de ventrículo izquierdo (VI) remodelación caracteriza por una disminución en el tamaño de la cámara ventricular izquierda con relación al grosor de la pared en la ausencia de un aumento de la masa del ventrículo izquierdo (Dornas & Silva, 2011).

3.4. Estudios realizados

En Guatemala no se ha realizado ningún estudio sobre validación y estandarización del método, por ende, no existen investigaciones acerca del efecto antihipertensivo de alguna planta o sustancia. El método que se plantea ha sido ampliamente utilizado en centros de investigación alrededor del mundo, no sólo para conocer el efecto hipotensor de plantas, sino también, para conocer más acerca del mecanismo de remodelado endotelial que sufre el organismo al inhibir la síntesis de óxido nítrico, el efecto de la ACE en el organismo, así como la relación HTA-nefropatías.

Rossi, M., Ramos, S. & Prado C. (2003); el uso de L-NAME está asociado con la remodelación de los cardiomiocitos mitocondriales del área ventricular izquierda y la fibrosis intersticial discreta tanto en los ventrículos izquierdo y derecho. En este estudio realizado en la Universidad de Sao Paulo, Brazil, se demostró que la remodelación se caracteriza por un aumento en el número y tamaño de las mitocondrias. Es importante destacar que la sobrecarga de presión sistólica no resultó en la descompensación ventrículo izquierdo. Sugiere que, en el modelo L-NAME de la HTA, disminución de la producción de óxido nítrico podría ser un medio importante para controlar el estrés cardiovascular hipertensiva mediante la regulación de la biogénesis y función mitocondrial en el tejido.

Estudio realizado en México por Sánchez, M. y colaboradores (2003); estudiaron el papel modulador del óxido nítrico y los metabolitos del ácido araquidónico vía citocromo P450 y su interacción con la PA y el contenido renal de citocromo P450. Se encontró que tanto el óxido nítrico como el ácido araquidónico regulan la PA, sin embargo el óxido nítrico contribuye en mayor proporción regulando, además, la expresión de la familia 4^a del CYP renal.

Estudio realizado por Pecháňová, O. *et al.*, en República Checa (2004), determinaron que la contribución del sistema nervioso central para el mantenimiento de la PA en la hipertensión L-NAME es más importante que el sistema renina-angiotensina-aldosterona. En ratas hipertensas con L-NAME la inhibición de óxido nítrico se convierte en una fuente importante de hemodinámicamente importante la producción de óxido nítrico, que todavía es insuficiente para compensar la vasoconstricción prevaleciente.

Estudio realizado por Sharifi, A., Akabarloo, N. & Darabi, R. (2005) en la Escuela de Medicina de la Universidad de Irán, administró L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME) a 4 grupos de reactivos biológicos durante 2, 4, 8 y 12 semanas, para luego analizar la concentración de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en fluidos, aorta, hígado, corazón y pulmón de cada uno de los reactivos biológicos los cuales fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados indicaron que la actividad de la ECA en el corazón y la aorta incrementó durante el proceso de desarrollo de la HTA, demostrando así la relación de la regulación de la HTA por medio de la ECA en corazón y aorta durante el desarrollo de la inducción de HTA con L-NAME.

Estudio realizado por Ramírez, J., Palacios, M. & Gutiérrez, O. en la Universidad del Valle, Cali, Colombia (2006), se describe el estudio del efecto hipotensor de *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensivas inducidas por medio del reactivo L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME) demostró que es un modelo caracterizado por la disfunción endotelial, vasoconstricción, activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y disminución de la tasa de filtración glomerular; uno de los distintivos del modelo con L-NAME es el grado de fibrosis cardíaca y aterosclerosis en comparación a otros modelos de HTA, además también se caracteriza por hipertrofia cardíaca y daño renal, con lo cual se diferencia de las ratas por modelo de Goldblatt (estenosis unilateral de la arteria renal) y las ratas hipertensas de tipo Dahl (ratas hipertensas luego de administrar una dieta hipernatrémica).

Estudio realizado en la tesis doctoral de Fritz, M. en la Universidad de Plata, Argentina (2009); describe el desarrollo de un sistema de adquisición de datos para la medición de PA en la rata y su uso para evaluar los efectos hipotensores en este caso del amaranto. En este estudio se describe la utilización de un método de toma de PA de manera directa e indirecta combinadas, en el cual se toma muy en cuenta las condiciones de los reactivos biológicos como agua y alimento, se desarrolló un método de inmovilización simple para la toma de PA en la forma indirecta a partir de un manguito oclisor con aire a presión en la cola, permitiendo la adquisición de datos con precisión de 1mmHg pudiendo recuperar los datos obtenidos y ser analizados. La medición de la PA de forma directa se realizó por cateterización de la carotídea crónica en ratas previamente anestesiadas y operadas, pudiendo comparar la precisión de los datos obtenidos de cada forma de toma de PA.

Estudio realizado en la tesis doctoral de Pereira, C. en la Universidad Austral de Chile (2010); se realizó una comparación del efecto antihipertensivo de plantas en ratas hipertensas inducidas con el reactivo L-NAME y con el método de Goldblatt. Se concluyó que el método de inducción por medio de L-NAME es más efectivo que el uso del método Goldblatt; ya que el primero aumenta la PA en un 25% al séptimo día de inducción, mientras que el método Goldblatt produjo un mayor efecto hipertensivo, con un aumento de la presión sistólica de 50.5% en un período de 8 semanas.

Estudio realizado por Lee, J. & Azar, S. (2011); estudiaron la inhibición de la óxido nítrico sintasa a partir de L-nitro N-arginina metil éster (L-NAME), incluyendo la que se encuentra dentro de la barrera hematoencefálica. El tratamiento con L-NAME incrementa significativamente la presión arterial sistólica, principalmente durante horas de la noche, y tiene una marcada disminución en el ritmo cardíaco.

Estudio realizado por Niadjey y colaboradores (2013) en la Universidad de Camerún; donde se investigó los efectos antihipertensivos crónicos y agudos del extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum* en ratas con HTA inducida por L-nitro N-arginina metil éster (L-NAME). Se recolectó el corazón y la arteria aorta para determinar los niveles de Óxido Nítrico en tejidos. Los resultados fueron positivos para el extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum*, que demostró disminuir la disminuir la PA y regular los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol LDL, producidos por acción de L-NAME.

4. JUSTIFICACIÓN

Según datos de OMS, anualmente las enfermedades cardiovasculares son responsables de 17 millones de muertes, casi un tercio del total de muertes anuales; donde las complicaciones por hipertensión arterial ascienden a 9.4 millones anuales. La HTA se ha convertido en una causa silenciosa de muerte en la población a nivel mundial, y nuestro país no se queda atrás, actualmente se conoce que la prevalencia de HTA en la población guatemalteca en general ronda el 13%; sin embargo, la prevalencia de la misma en > 40 años se encuentra alrededor del 30% y se incrementa con la edad. Además, la población urbana tiene un mayor riesgo de padecerla y el promedio de PA en este grupo es 3 mmHg mayor que la encontrada en área rural.

La metodología para poder validar el efecto terapéutico de cualquier sustancia química de manera *in vivo*, incluye el uso de reactivos biológicos que cumplan con el requisito de padecer la patología contra la cual se va a evaluar la sustancia química. En este caso, al evaluar una sustancia química que se considere que posea actividad hipotensora, es necesario el uso de animales que padezcan HTA; condición que puede inducirse mediante modificación genética, o, por inducción de HTA mediante algún mecanismo que produzca vasoconstricción.

El procedimiento para validación de plantas o sustancias químicas con actividad hipotensora *in vivo* en nuestro país aún no ha podido llevarse a cabo por la falta de un modelo que presente HTA, con el cual medir los cambios de PA para concluir si la planta o la sustancia evaluada es efectiva o no en su actividad hipotensora; y, el uso de animales genéticamente modificados elevaría demasiado el costo de este tipo de estudios en el país. Al validar y estandarizar un método de inducción de HTA *in vivo*, se provee la herramienta necesaria para iniciar la investigación de plantas y otras sustancias con actividad hipotensora en Guatemala. Esta investigación aportará un método confiable y reproducible, el cual proporcionaría las herramientas para poder inducir HTA en reactivos biológicos a condiciones estables.

5. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

- Validar y estandarizar un método de inducción de hipertensión arterial en ratas macho Wistar haciendo uso del reactivo L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME) para su posterior uso en evaluaciones farmacológicas.

4.2. Objetivos específicos:

- Crear un modelo de predicción que permita obtener los valores promedio del aumento de presión arterial sistólica a partir de la dosis de L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME) administrada a grupos de ratas.
- Establecer un modelo de predicción que permita obtener los valores promedio del aumento de presión arterial diastólica a partir de la dosis de L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME) administrada a grupos de ratas.
- Crear un modelo de predicción que permita obtener los valores promedio del aumento de las pulsaciones cardíacas a partir de la dosis de L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME) administrada a grupos de ratas.
- Determinar los cambios en las variables bioquímicas implicadas en la inducción de hipertensión arterial según la dosis administrada de L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME).
- Evaluar el daño producido a nivel histopatológico en corazón, riñones, hígado, páncreas y pulmones a partir de la administración de L-NAME para inducir hipertensión arterial en ratas.

6. HIPÓTESIS

Existe una relación dosis-respuesta entre la dosis administrada de L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME) y la respuesta obtenida en la presión arterial de las ratas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo y Muestra:

- Universo: Ratas macho Wistar con un peso aproximado de 200 ± 20 g.
- Muestra: 40 ratas macho Wistar con un peso aproximado de 200 ± 20 g, con dieta controlada y agua *ad libitum*, divididas en 4 grupos de 10 ratas cada uno.

7.2. Recursos Humanos

- Autora de la investigación: Br. Jennifer Alejandra Cardona Martínez
- Asesora de la investigación: Licda. Delia María Arriaza
- Asesor de la investigación: Lic. André Chocó
- Revisora del trabajo de investigación: Licda. Raquel Pérez Obregón

7.3. Materiales:

7.3.1. Reactivos

- L-Nitro N-Metil Arginina Éster (L-NAME).
- Kit para determinación de Glucosa GOD FS
- Kit para determinación de Urea FS
- Kit para determinación de Creatinina FS
- Kit para determinación de HDL inmuno FS
- Kit para determinación de Colesterol FS
- Kit para determinación de Triglicéridos FS
- Kit para determinación de ASAT FS
- Kit para determinación de ALAT FS
- Formol al 10%
- Agua destilada

7.3.2. Equipo de laboratorio

- Medidor de presión arterial UgoBasile®.
- Balanza analítica.
- Balanza para ratas.
- Pipetas automáticas de 100 a 1000 μL
- Pipetas automáticas de 10 a 200 μL
- Estufa.
- Refrigeradora.
- Espectrofotómetro MICROLAB 300
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Baño maría
- Cronómetro de tiempo
- Analizador multiparamétrico ADVIA 120 SIEMENS
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Microtubos para muestra sanguínea con EDTA
- Tubos para muestra sanguínea sin anticoagulante
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Gel para ultrasonidos.
- Puntas para pipetas de 1000 μL
- Puntas para pipetas de 200 μL

7.3.3. Equipo de bioterio

- Cajas plásticas
- Tapaderas de aluminio.
- Cepos contenedores de ratas.
- Concentrado para ratas.
- Bebederos.
- Agua purificada.

- Sondas orogástricas.
- Pachas de 16 onzas.
- Viruta.

7.3.4. Material de oficina

- Software SPSS 2.0
- Software G*Power 3.1.9.2
- Software Epidat 3.1

7.3.5. Cristalería

- Beakers de 100 mL
- Beakers de 500 mL
- Varillas de agitación.

7.3.6. Material médico-quirúrgico

- Guates de nitrilo
- Guantes de látex
- Cofias.
- Mascarillas.
- Batas.
- Zapatos protectores.
- Jeringas de 1cc
- Jeringas de 5cc.
- Alcohol 70%
- Algodón
- Equipo de disección
- Frascos de plástico para muestras

7.4. Métodos

7.4.1. Diseño de la investigación

7.4.1.1. Cálculo de tamaño de la muestra

El método de muestreo para el cálculo de muestra se basó en una regresión lineal simple, con el método de un test de T de Student, regresión lineal bivariada en un grupo, tamaño de la pendiente en el Software de cálculo de tamaño de muestra G*Power 3.1.9.2.

Los datos utilizados para el cálculo fueron:

- Prueba de una cola para la pendiente
- Nivel de significancia: 5%
- Poder: 80%
- Pendiente de la hipótesis nula: 0
- Pendiente de la hipótesis alterna: 0.5 (basados en una pendiente de regresión lineal con los datos a obtener).
- Desviación estándar en el eje X: 15 unidades mg/Kg*día de la dosis L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME).
- Desviación estándar en el eje Y: 20 unidades de cambio en la presión arterial en los individuos experimentales luego de la administración de una dosis de L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME).

El tamaño de muestra calculado fue de 40 ratas, el cual se distribuyeron proporcionalmente entre los 4 grupos de dosis correspondiendo 10 ratas a cada grupo de dosis.

7.4.1.2. Método de muestreo

Se asignaron correlativos a cada una de las 40 ratas y luego en el software Epidat 3.1 se opera el comando asignación de sujetos a tratamientos, tratándose los tratamientos de las cuatro dosis posibles.

7.5. Aspectos bioéticos a utilizar

Desde el punto de vista bioético los animales no son sujetos, pero sí objetos morales, por lo cual la responsabilidad de no ocasionar daños innecesarios recae en el ser humano. Por carecer de autonomía, los animales no pueden negarse a ser objeto de experimentos y por tanto, no se puede validar el hecho de infligir dolor y sufrimiento ilimitado a animales de investigación (Rodríguez, 2007).

El deber ético fundamental de no causar daño innecesario o nomaleficencia mediante los procedimientos de investigación, equivale a no hacerle mal innecesario a un animal y por ende al ecosistema; este deber es inseparable del precepto de justicia, en cuanto que ambos deberes cobijan a todos los seres vivos por igual y aún con independencia de la voluntad de los implicados. Por tal motivo, puede exigirse su cumplimiento en forma coactiva (Osorio, 2000).

En el artículo "Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que implique el Uso de Animales" del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas –CIOMS-, se establece que los experimentos con animales deben realizarse solamente después de la debida consideración de su relevancia para la salud humana o animal, para el avance del conocimiento biológico y que los investigadores y el resto del personal deben tratar siempre a los animales como seres sensibles, considerando su cuidado y uso apropiado un imperativo ético, minimizando el estrés o dolor (Macrae, 2007).

7.5.1. Métodos de experimentación

7.5.1.1. Incorporación método de las tres R's

- Reducción de animales a utilizar en el estudio sin disminuir la precisión en la validación del método de inducción de HTA, pero teniendo la cantidad necesario.
- Refinamiento de procedimientos de técnicas, con el fin de reducir el dolor y mantener un buen cuidado del animal, principalmente haciendo uso de un método no invasivo en la toma de presión arterial.
- Reemplazo, evitando el uso de animales por técnicas *in vitro*.

7.5.2. Técnicas para realizar una muerte humanitaria

El proceso se hizo de forma individual buscando reducir el dolor al animal y evitando el riesgo en la persona que lo realizó, usando un método confiable y reproducible la administración de pentobarbital por vía intraperitoneal.

7.5.3. Instalaciones óptimas para la experimentación

El estudio se llevó a cabo en el Bioterio “Amarillis Saravia PhD.” de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, el cual cuenta con amplias y adecuadas instalaciones. Los animales fueron clasificados en cajas plásticas, de manera que se asegure la protección del animal de amenazas externas, pero al mismo tiempo proporcione el espacio adecuado para su libre movimiento dentro de la misma evitando el hacinamiento. Estas cajas se mantuvieron limpias y secas, según los protocolos de limpieza que maneja el Bioterio “Amarillis Saravia PhD.”

7.5.4. Medio ambiente, limpieza y mantenimiento de los animales

La temperatura debe fue controlada entre 20-25°C con el uso de aire acondicionado para lograrla, una humedad relativa de 40-70%, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con sistema de aire acondicionado óptimo con el fin de evitar recirculación partículas, contaminantes y gases tóxicos.

7.6. Inducción de Hipertensión Arterial

La inducción de la HTA se realizó mediante el método presentado por Ramírez, Palacios & Gutiérrez, 2006 con algunas modificaciones; en el cual, en el primer día de administración se midieron PAS, PAD y Pulsaciones para obtener los valores basales, los cuales según la literatura debían encontrarse cercanos a 100 – 120 mmHg, 80 mmHg y 300 pulsaciones/minuto, para PAS, PAD y pulsaciones respectivamente, utilizando un equipo de medición de PA marca UgoBasile®.

Para la inducción de la HTA se utilizó el reactivo L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME), cuya solubilidad en agua purificada es de 50 mg/mL, este reactivo debe protegerse del calor para evitar su descomposición, por medio de su almacenamiento en refrigeración antes y después de ser administrado (Ver hoja de especificaciones Anexo No. 3).

Se administró el reactivo L-NAME por vía oral con sondas orogástricas por un período de cinco días. Al inicio del estudio se procedió a pesar a cada reactivo biológico, cuyo peso debía estar comprendido entre 200 ± 20 g. Así mismo se distribuyeron los reactivos en cuatro grupos utilizando cuatro diferentes dosis a administrar, siendo estas 25 mg/kg, 35 mg/kg, 45 mg/kg y 55 mg/kg, para los grupos A, B, C y D respectivamente.

El sexto día de estudio se tomó como día 1 para iniciar la medición de PA, este procedimiento se llevó a cabo cada 3 días durante los días siguientes, teniendo un total de 6 mediciones de PAS, PAD y Pulsaciones, tomando en cuenta la medición inicial de PA normotensa.

La medición de la PA se llevó a cabo según el método descrito por Saravia, A., 2005; en el cual la medición de la PA se realiza en la arteria caudal, para esto la cola de cada reactivo biológico fue descamada para colocar el transductor de la señal de PA, los reactivos biológicos se colocaron en cepos contenedores para mejorar la manipulación de los mismos. Previo a la medición se aplicó gel transductor para que la transmisión de los ultrasonidos no sufra modificación, y se procedió realizar tres lecturas, donde el dato final a utilizar fue la media de estas tres mediciones.

7.7. Determinación de variables bioquímicas

La determinación de las variables bioquímicas se realizó en el último día de medición de Presión Arterial, a todos los grupos de animales que serán inducidos con L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME) para desarrollar HTA, por medio de extracción sanguínea en la cola.

7.7.1. Determinación de hematología

Se utilizaron un mínimo 500 μ l de muestra sanguínea y fueron colocados en un microtubo con EDTA, mantenidos a 4°C hasta que se realizó su análisis. La hematología completa de cada muestra fue analizada en el equipo ADVIA 120 SIEMENS, un analizador multiparamétrico completamente automatizado, con tecnología de Citometría de Flujo, que es un método de separación de células individuales y permite que las mismas pasen en fila dentro de un flujo por el aparato, midiendo simultáneamente múltiples características físicas

de una sola célula, aprovechando las propiedades intrínsecas de la célula y características controladas; proporcionando de esta manera los valores de hematocrito, hemoglobina, leucocitos y plaquetas de cada muestra (Salgado, 2002).

7.7.2. Determinación de glucosa

Se utilizó el test fotométrico enzimático GOD-PAP, método de punto final, donde se determinó la cantidad de glucosa después de la oxidación enzimática por la glucosa oxidasa. El indicador colorimétrico a utilizar fue la quinoneimina, la cual genera 4-aminoantipirina y el fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (reacción de Trinder) (DyasYs, 2012).

Se prepararon las siguientes muestras en tubos limpios e identificados: 1) 10 µL de estándar con 1000 µL de reactivo; 2) 10 µL de la muestra a analizar con 1000 µL de solución reactiva. Cada muestra debe ser mezclada e incubada a 37°C por 10 minutos y posteriormente se midió su absorbancia a 546 nm (DyasYs, 2012). El cálculo de glucosa con estándar se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa [mg/dL]} = \frac{\text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]}$$

7.7.3. Determinación de Creatinina sérica

Se realizó el test cinético sin desproteinización según el método de Jaffé, desarrollado en 1882, cuyo principio indica que la creatinina forma un complejo coloreado rojo-anaranjado en una solución de picrato alcalina. La diferencia en la absorbancia a tiempos fijos durante la conversión es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (DyasYs, 2012).

Se preparó el monoreactivo, mezclar 4 partes de Reactivo No. 1 (Hidróxido sódico 0,2 mmol/L) + 1 parte de Reactivo No. 2 (Ácido pícrico 20 mmol/L); este monoreactivo posee estabilidad de 5 horas a 25°C (DyasYs, 2012).

En la determinación de creatinina, se utilizaron: 1) 50 μL de estándar con 1000 μL de reactivo de uso; 2) 50 μL de blanco (agua destilada) con 1000 μL de reactivo de uso; y, 3) 1000 μL de muestra a analizar con 1000 μL de reactivo de uso. Se mezcló e incubó por aproximadamente 60 segundos a 25°C y procedió a leer la absorbancia A1; se incubó por 120 segundos adicionales a 25°C y leyó la absorbancia A2, ambas absorbancias se fueron leídas a 492 nm. El cálculo de creatinina sérica se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Creatinina [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]} \text{ (DyasYs, 2012).}$$

7.7.4. Determinación de Nitrógeno de Urea (BUN)

La urea es el producto final nitrogenado del catabolismo de las proteínas. Se hizo uso del método de test UV enzimático “Ureasa-Glutamato Deshidrogenasa (GLDH)” (DyasYs, 2012).

Para el reactivo de uso, se mezclaron 4 partes de Reactivo No. 1 + 1 parte del Reactivo No. 2 y se reposaron por 30 minutos a temperatura ambiente antes de comenzarse a utilizar (DyasYs, 2012).

Para la determinación de urea se prepararon: 1) 10 μL de estándar con 1000 μL de reactivo de uso; 2) 10 μL de blanco (agua destilada) con 1000 μL de reactivo de uso; y, 3) 1000 μL de muestra con 1000 μL de reactivo de uso previamente preparado, las cuales se mezclaron e incubaron aproximadamente 60 segundos a 25°C y hizo la lectura de la absorbancia A1; se incubaron otros 60 segundos y realizó la lectura la absorbancia A2, ambas absorbancias se leerán a 340 nm. El cálculo de urea se obtuvo mediante la siguiente ecuación (DyasYs, 2012):

$$\text{Urea [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]}$$

La obtención del cálculo de nitrógeno de urea sanguíneo o BUN se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

Nitrógeno de urea sanguíneo [mg/dL] = Urea [mg/dL] * 0,467

7.7.5. Determinación de Triglicéridos

Se hizo uso del test colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3- fosfato-oxidasa (GPO); cuyo principio indica que la determinación de los triglicéridos se lleva a cabo después de la división enzimática con lipasa lipoproteína. El indicador es la quinoneimina la cual se genera a partir de la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (DyasYs, 2012).

En la determinación de triglicéridos, se utilizaron: 1) 10 µL de estándar; 2) 10 µL de blanco (agua destilada); y, 3) 1000 µL de blanco con 1000 µL de muestra. Se mezclaron e incubaron cada uno durante 20 minutos a 25°C y procedió a leer la absorbancia contra el blanco a 500 nm (DyasYs, 2012).

$$\text{Triglicéridos [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]}$$

Para corregir el glicerol libre, se restaron 10 mg/dL (0,11 mmol/L) del valor de los triglicéridos calculado (DyasYs, 2012).

7.7.6. Determinación de Colesterol

Para la determinación del colesterol total, se utilizó la prueba enzimática fotométrica CHOD-PAP, cuyo principio indica que la determinación del colesterol se llevará a cabo después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador colorimétrico es el quinoneimino que se genera de 4-aminopiridina y fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (Reacción de Trinder) (DyasYs, 2012).

En la determinación de colesterol, se analizaron tubos conteniendo lo siguiente: 1) 10 µL de estándar; 2) 10 µL de blanco (agua destilada); y, 3) 1000 µL de blanco con 1000 µL de muestra. Se mezclaron e incubaron durante 20 minutos a 25°C y se procedió a leer la absorbancia contra el blanco a 500 nm. El cálculo de colesterol se obtuvo mediante la siguiente ecuación (DyasYs, 2012):

$$\text{Colesterol [mg/dL]} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]}$$

7.7.7. Determinación de LDL

El valor serológico para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se obtuvo mediante la ecuación descrita en Evans, 2000; donde a partir de los valores de colesterol, triglicéridos y HDL, se obtiene la cantidad de LDL.

$$\text{Colesterol LDL [mg/dL]} = \text{Colesterol} - \text{HDL} - \frac{\text{Triglicéridos}}{219}$$

7.7.8. Determinación de HDL

Se utilizó el método HDL Inmuno FS, el cuál es un método homogéneo para la determinación del colesterol HDL sin centrifugación. Se utilizan anticuerpos contra lipoproteínas para la formación de complejos antígeno anticuerpo con LDL, VLDL y quilomicrones de forma que solo se determina selectivamente el colesterol HDL mediante una medición enzimática del colesterol (DyasYs, 2012).

En la determinación de colesterol, se utilizaron tubos conteniendo lo siguiente: 1) 2,4 µL de estándar; 2) 240 µL de blanco (agua destilada) y 240 µL de muestra, las cuales se mezclaron e incubarse por 5 minutos a 37°C para proceder a la lectura de absorbancia A1 a 600nm; y, 3) 60 µL de blanco con 60 µL de muestra, mezclar e incubar durante 5 minutos a 37°C y proceder a leer la absorbancia A2 a 700nm. El cálculo de HDL se obtendrá mediante la siguiente ecuación (DyasYs, 2012):

$$\text{HDL [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ muestra}}{\Delta A \text{ estándar}} * \text{concentración estándar [mg/dL]}$$

7.7.9 Determinación de Alanina Aminotransferasa (ALAT)

Se utilizó de un test UV optimizado según la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, donde el incremento o disminución de la misma

demuestra un daño a nivel hepático que puede correlacionarse con otras patologías (DiaSys, 2007).

Mezclando 4 partes de buffer y 1 parte de reactivo iniciador y se incubó a 37°C por un minuto. Se mezclaron 1000µL de la solución preparada anteriormente con 100µL de la muestra de suero a analizar, y se realizó la lectura de absorbancia inmediatamente en el aparato a una longitud de onda de 340nm.

7.7.10. Determinación de Asparagina aminotransferasa (ASAT)

De la misma manera que en la determinación de ALAT, se utilizó de un método UV optimizado y modificado por la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, donde el incremento o disminución de esta enzima indica un daño a nivel hepático el cual se podrá relacionar con demás patologías esqueléticas, cardíacas o del parénquima hepático (DiaSys, 2007).

Mezclando 4 partes de buffer y 1 parte de reactivo iniciador y se incubó a 37°C por un minuto. Se mezclaron 1000µL de la solución preparada anteriormente con 100µL de la muestra de suero a analizar, y se realizó la lectura de absorbancia inmediatamente en el aparato a una longitud de onda de 340nm.

7.8. Realización de examen histopatológico

Se tomó al azar un animal de cada grupo por dosis para la realización de un examen histopatológico por medio de una necropsia. La necropsia se define como un examen visual post-mortem de un cuerpo animal, donde se facilita información de enfermedades, causas de muerte, comprobar eficacias de tratamientos o como medio de enseñanza (De Aluja & Constantino, 2002).

Se preparó todo el material necesario, en un área debidamente desinfectada con alcohol, los materiales utilizados fueron pinzas, tijeras, alcohol, algodón y rasuradoras lavadas y desinfectados. Los animales fueron previamente sometidos a eutanasia por dislocación cervical, en este caso se utilizó la dislocación cervical ya que el uso de pentobarbital puede influir en los resultados a obtener en las enzimas hepáticas; y, se

procedió a iniciar la necropsia, verificando que el animal presentara signos de muerte como rigidez, frialdad, palidez y ojo cadavérico (De Aluja & Constantino, 2002).

Primero, se procedió a retirar la piel y pelo corporal por medio de una rasuradora y una tijera desde el mentón hasta la sínfisis púbica, luego se levantó la piel a ambos lados cortando los músculos pectorales, se ubicaron los órganos a extraer en la cavidad abdominal haciendo los cortes pertinentes para obtener hígado, riñones y páncreas; así como de la cavidad torácica donde se extrajeron corazón y pulmones. Dichos órganos fueron previamente lavados con suficiente agua estilada antes de colocarse en frascos con formol al 10% para su fijación y posterior envío a patología, de esta manera obtener cortes histopatológicos que demuestren un daño generalizado a partir de la inducción de HTA con L-NAME (De Aluja & Constantino, 2002).

7.9. Recolección de datos

Ficha técnica para recolección de datos validada por asesor.

7.10. Tabulación de datos

En una hoja electrónica en Excel la cual se trasladará posteriormente al software SPSS.

7.11. Análisis estadístico

7.11.10. Análisis estadístico de los valores de presión arterial

Los análisis se realizaron con Excel y SPSS 23.

Se hizo resumen y organización de los resultados a través de tablas; resumen de variables cuantitativas a través de media y desviaciones estándar o mediana y cuartiles, según la distribución de probabilidad de los datos; se utilizaron gráficas de dispersión para representar el cambio de las variables respuesta según las diferentes mediciones y las dosis administradas de L-NAME. Se calcularon intervalos de confianza del 95% de medias

y medianas de las variables del análisis sanguíneo.

Descripción comparativa con la referencia con barras de error (media, desviación estándar). Una prueba inferencial de T de Student para una muestra contra una constante.

Se utilizó regresión lineal para evaluar la respuesta media, del cambio en los niveles de PA, y de la cantidad de pulsaciones cardiacas en función de las dosis administradas. Se reportaron los coeficientes de la ecuación de regresión, el análisis de varianza de la regresión, el coeficiente de determinación ajustado y el intervalo de confianza de los coeficientes.

El efecto de la dosis sobre las variables respuesta se evaluó a través de una prueba de Welch (grupos de comparación mostraron distribución normal y heterocedasticidad); las comparaciones múltiples a través de la prueba de Games-Howell. La normalidad se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk y la homoedasticidad con la prueba de Levene.

Se utilizó un modelo de mediciones repetidas para determinar la influencia de las dosis y de la repetición de medidas sobre las variables respuesta. La bondad de ajuste se evaluó con el supuesto de Esfericidad de Mauchly.

8. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la investigación titulada “Validación y Estandarización de un método de inducción de Hipertensión arterial por medio de L-Nitro N-arginina Metil (L-NAME) Ester en Ratas”, utilizando una muestra de 40 ratas macho Wistar. Primero se presenta la descripción de las mediciones obtenidas de las variables Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y las Pulsaciones, posteriormente el análisis de la varianza entre las variables ya mencionadas, y los resultados de la varianza de mediciones repetidas. En una última sección, se presenta la descripción de mediciones obtenidas para la hematología, química sanguínea y perfil lipídico.

Tabla 1

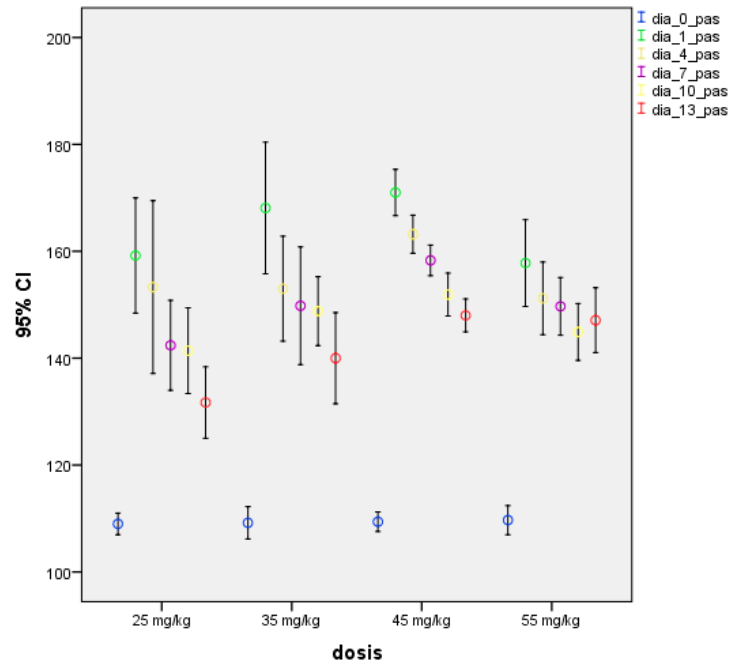
Resumen numérico de PAS para cada día de medición de presión arterial según la dosis administrada de L-NAME

Dosis		Día 0 PAS (Basal)	Día 1 PAS	Día 4 PAS	Día 7 PAS	Día 10 PAS	Día 13 PAS
25 mg/kg	Media	109.0	159.2	153.3	142.4	141.4	131.7
	Desviación estándar	2.8	15.1	22.6	11.8	11.2	9.3
35 mg/kg	Media	109.2	168.1	153.0	149.8	148.8	140.0
	Desviación estándar	4.2	17.2	13.7	15.4	9.0	11.9
45 mg/kg	Media	109.4	171.0	163.2	158.3	151.9	148.0
	Desviación estándar	2.5	6.1	5.0	4.0	5.6	4.3
55 mg/kg	Media	109.7	157.8	151.2	149.7	144.9	147.1
	Desviación estándar	3.8	11.3	9.5	7.5	7.4	8.5

Los valores de medias para las mediciones de PAS disminuyen del día de medición 1 al día 13 entre dosis, los valores más altos de PAS de las 5 mediciones realizadas se encuentran situados en la dosis de 45 mg/kg. Se observa un aumento mayor a 50 mmHg entre la presión basal y el día 1 de medición; también se evidencia que los valores mínimos de desviación estándar se hallan en la dosis de 45 mg/kg y los mayores se encuentran en la dosis de 35 mg/kg.

Gráfica 1

Comparación de Medias de Presión Arterial Sistólica por día según la dosis administrada de L-NAME (n=40)



Todas las dosis administradas presentan un aumento significativo entre la PA basal y la PA del día 1. Se observa que en las mediciones de 25 mg/kg y 35 mg/kg existen rangos muy amplios en las mediciones, en el caso de 55 mg/kg estos rangos disminuyen y en la dosis de 45 mg/kg se observan los rangos menos amplios; además, en 45 mg/kg hay una disminución gradual en la PAS medida entre los días 1 y 13, lo que no ocurre con las demás dosis.

Tabla 2

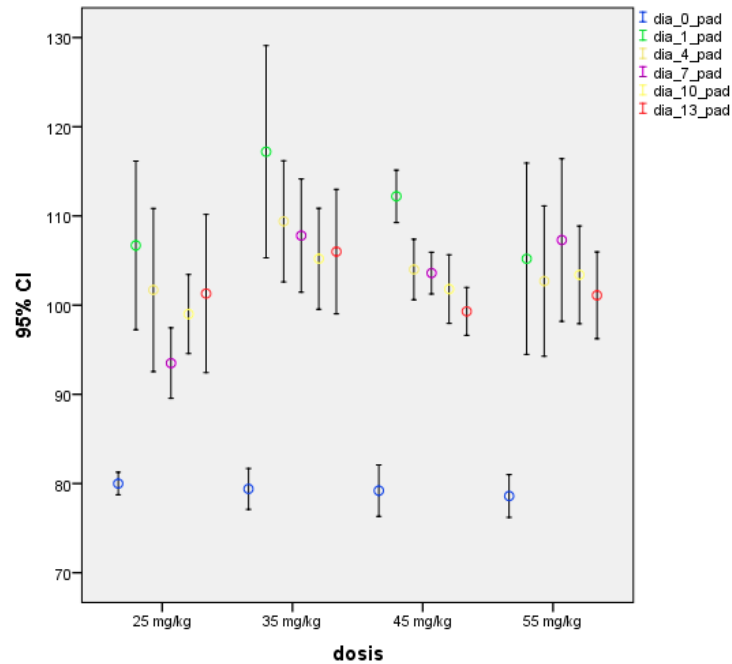
Resumen numérico de PAD para cada día de medición de presión arterial según la dosis administrada de L-NAME (n=40)

Dosis		Día 0 PAD (Basal)	Día 1 PAD	Día 4 PAD	Día 7 PAD	Día 10 PAD	Día 13 PAD
25 mg/kg	Media	80.0	106.7	101.7	93.5	99.0	101.3
	Desviación estándar	1.8	13.2	12.8	5.5	6.2	12.4
35 mg/kg	Media	79.4	117.2	109.4	107.8	105.2	106.0
	Desviación estándar	3.2	16.6	9.5	8.9	7.9	9.8
45 mg/kg	Media	79.2	112.2	104.0	103.6	101.8	99.3
	Desviación estándar	4.0	4.1	4.7	3.3	5.4	3.7
55 mg/kg	Media	78.6	105.2	102.7	107.3	103.4	101.1
	Desviación estándar	3.3	15.0	11.8	12.7	7.7	6.8

Hay una disminución entre el total de las medias de mediciones entre los días 1 y 13 de medición de PAD, lo que ocurre también con la desviación estándar. Al igual que en las mediciones de PAS, se observa que en la dosis de 45 mg/kg de L-NAME hay un comportamiento de disminución en la medición de PAD al pasar los días, así como también disminuye la desviación estándar de las medias y existe un aumento de PA entre la medición basal y el día 1.

Gráfica 2

Comparación de Medias de Presión Arterial Diastólica por día según la dosis administrada de L-NAME (n=40)



Al igual que ocurre con las mediciones por día de PAS, en esta gráfica se observan rangos muy amplios y variados entre mediciones de PAD para 25 mg/kg, 35 mg/kg y 55 mg/kg, en el caso de 45 mg/kg se observan rangos de medición disminuidos; también es visible el aumento de PAD entre la medición basal y el día 1 de medición después de la administración de L-NAME. En este caso, se observa una disminución gradual de la PAD en 35 mg/kg y 45 mg/kg.

Tabla 3

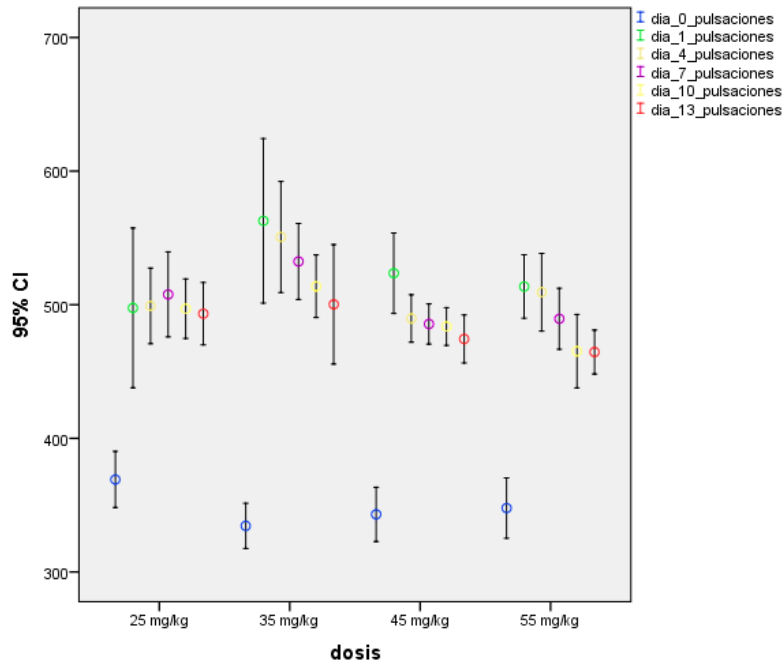
Resumen numérico de Pulsaciones para cada día de medición de presión arterial según la dosis administrada de L-NAME (n=40)

Dosis		Día 0 Pulsaciones (Basal)	Día 1 Pulsaciones	Día 4 Pulsaciones	Día 7 Pulsaciones	Día 10 Pulsaciones	Día 13 Pulsaciones
25 mg/kg	Media	369.2	497.6	499.1	507.7	497.0	493.3
	Desviación estándar	29.3	83.5	39.6	44.5	31.1	32.7
35 mg/kg	Media	334.5	562.8	550.7	532.4	513.8	500.3
	Desviación estándar	23.6	86.0	58.2	39.8	32.7	62.6
45 mg/kg	Media	343.1	523.6	489.7	485.6	483.7	474.4
	Desviación estándar	28.4	42.1	24.9	21.0	19.7	25.1
55 mg/kg	Media	347.8	513.6	509.3	489.5	465.2	464.6
	Desviación estándar	31.6	33.2	40.6	32.0	38.4	23.0

Las medias muestran un comportamiento variado en las mediciones de los días 1 al día 13, en 35 mg/kg se observa el mayor aumento de pulsaciones después de la administración de L-NAME al compararlo con los valores basales.

Gráfica 3

Comparación de Medias de Pulsaciones por día según la dosis administrada de L-NAME
(n=40)



Al igual que en PAS y PAD, para las dosis de 25 mg/kg y 35 mg/kg de Pulsaciones medidas se observa más variabilidad que en las dosis mayores, donde esta se ve disminuida. Existe un aumento de poco más de 100 pulsaciones en cada dosis después de su administración. En el caso de 35 mg/kg se observa que hay disminución en el número de pulsaciones de manera lineal entre el día 1 y 13 de medición, y, también disminuye para las dosis de 45 mg/kg y 55 mg/kg aunque no de manera lineal.

Tabla 4

Modelos de regresión lineal para las variables dependientes

(n=40, Significancia = 5%)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		R cuadrado ajustado	F	Valor p	95% intervalo de confianza para B	
		B	Error estándar				Límite inferior	Límite superior
PAS	(Constante)	37.750	2.972	0.042	2.708	0.108	31.733	43.767
	dosis	1.786	1.085				-0.411	3.983
PAD	(Constante)	22.630	2.742	0.000	0.989	0.326	17.079	28.181
	dosis	0.996	1.001				-1.031	3.023
Pulsaciones	(Constante)	158.170	20.557	-0.025	0.48	0.827	116.555	199.785
	dosis	-1.650	7.506				-16.846	13.546

Valores para el modelo de ecuación de la recta, donde se puede observar que poseen valores de R cuadrado demasiado bajos, por lo que hacen que esta opción no sea funcional para hacer el modelo predictivo de la administración de L-NAME.

Tabla 5

Prueba de Welch para la contrastación de las medias poblacionales del cambio en PAS, PAD y Pulsaciones según dosis administrada de L-NAME.

(n=40, Significancia = 5%)

	Estadístico de Welch	Valor p	Tamaño del efecto
Cambio PAS	9.012	0.001	0.576
Cambio PAD	2.917	0.060	0.440
Cambio Pulsaciones	3.194	0.046	0.500

Cambio = (Sumatoria de los días/5) – Día 0 de medición

Prueba de robustez para la igualdad de medias demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa para las diferencias poblacionales en el cambio en PAS y el cambio en Pulsaciones (valor p <0.05); estas dos variables también demuestran un buen tamaño en el efecto. Se utilizó el Test de Welch ya que los datos demostraron ser paramétricos y no homocedásticos.

Tabla 6

Comparación de varianzas poblacionales de mediciones de PAS, PAD y Pulsaciones entre las dosis administradas de L-NAME

(n=40, Significancia = 5%)

Variables	(I) dosis		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Valor p	95% de intervalo de confianza para diferencia	
						Límite inferior	Límite superior
Presión Arterial Sistólica	45 mg/Kg	25 mg/Kg	12.880	2.696	<0.001	5.353	20.407
		35 mg/Kg	6.540	2.696	0.122	-0.987	14.067
		55 mg/Kg	8.340	2.696	0.023	0.813	15.867
Presión Arterial Diastólica	25 mg/Kg	35 mg/Kg	-8.680	2.555	0.010	-15.813	-1.547
		45 mg/Kg	-3.740	2.555	0.911	-10.873	3.393
		55 mg/Kg	-3.500	2.555	1.000	-10.633	3.633
Pulsaciones	35 mg/Kg	25 mg/Kg	33.060	13.919	0.138	-5.801	71.921
		45 mg/Kg	40.600	13.919	0.036	1.739	79.461
		55 mg/Kg	43.560	13.919	0.021	4.699	82.421

Ho = No se observa diferencia significativa entre la diferencia de medias de la variable respuesta de los grupo A, B... cuando se comparan las diferentes dosis administradas de L-NAME.

Ho = Se observa diferencia significativa entre la diferencia de medias de la variable respuesta de los grupo A, B... cuando se comparan las diferentes dosis administradas de L-NAME.

Se observan valores de p variados, en el caso de PAS existen cambios al comparar las dosis de 45 mg/kg con 25 mg/kg y 55 mg/kg; para PAD existe diferencia significativa entre 25 mg/kg y 35 mg/kg, y en pulsaciones, se encontraron cambios significativos entre 35 mg/kg con 45 mg/kg y 55 mg/kg.

Tabla 7

Diferencia entre poblaciones sobre el efecto de la dosis en los días de medición de PAS, PAD y pulsaciones, modelo de mediciones repetidas

(n=40, Significancia = 5%)

Efecto	Lambda de Wilk	Valor p	Eta parcial al cuadrado	Potencia observada
Días (PAS)	0.242	<0.001	0.758	1.000
Días (PAD)	0.644	0.005	0.356	0.909
Días (Pulsaciones)	0.393	<0.001	0.607	1.000

Ho = No se observa diferencia significativa de la variable respuesta cuando se repiten sus mediciones durante días diferentes.

Ha = Se observa diferencia significativa de la variable respuesta cuando se repiten sus mediciones durante días diferentes.

Se observa que el análisis multivariante de Lambda de Wilks para el efecto de los días en las variables PAS, PAD y pulsaciones tiene una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 8

Comparación múltiple de mediciones de PAS, PAD y Pulsaciones entre días de administración de L-NAME

(n=40, Significancia = 5%)

Variable	Días	Diferencia de medias (I-J)	Valor P	95% de intervalo de confianza para diferencia		
				Límite inferior	Límite superior	
Presión Arterial Sistólica (PAS)	1	2	8.850	0.012	1.296	16.404
		3	13.975	<0.001	5.843	22.107
		4	17.275	<0.001	10.702	23.848
		5	22.325	<0.001	15.194	29.456
Presión Arterial Diastólica (PAD)	1	2	5.875	0.334	-2.067	13.817
		3	7.275	0.031	0.413	14.137
		4	7.975	0.003	1.943	14.007
		5	8.400	0.005	1.873	14.927
Pulsaciones	1	2	12.200	1.000	-20.464	44.864
		3	20.600	0.484	-9.550	50.750
		4	34.475	0.011	5.435	63.515
		5	41.250	<0.001	15.716	66.784

Ho = No se observa diferencia significativa de la diferencia de medias de la variable respuesta de los grupos A, B... cuando se repiten sus mediciones durante días diferentes.

Ho = Se observa diferencia significativa de la diferencia de medias de la variable respuesta de los grupos A, B... cuando se repiten sus mediciones durante días diferentes.

En la comparación entre días para las mediciones de PAS, PAD y Pulsaciones se observa un comportamiento de aumento en la diferencia de medias al comparar las mediciones del primer día con los demás días. Se observan valores de p estadísticamente significativos ($p < 0.05$) para PAS, para PAD se observa un valor no significativo (días 1 – 2) y para la variable pulsaciones se observan dos valores no significativos (días 1 – 2 y 1 – 3).

Tabla 9

Valores de variables bioquímicas (hematología, química sanguínea y perfil lipídico) tras la administración de L-NAME (n=40)

Variable	Dosis	Media	Desviación estándar	Intervalos de Confianza 95%		Valores normales
				Límite inferior	Límite superior	
Hemoglobina	25 mg/kg	16.3	0.58	15.914	16.746	13.6 - 17.4 mg/dL
	35 mg/kg	17.1	0.69	16.637	17.623	
	45 mg/kg	17.7	1.18	16.813	18.507	
	55 mg/kg	18.8	0.53	18.385	19.155	
Hematocrito	25 mg/kg	41.9	5.52	37.925	45.835	38.5 - 52%
	35 mg/kg	44.6	6.00	40.274	48.866	
	45 mg/kg	53.5	2.76	51.563	55.517	
	55 mg/kg	56.4	1.68	55.239	57.641	
Plaquetas	25 mg/kg	7573.8	2309.84	5921.435	9226.165	574 - 1253 *10 ³
	35 mg/kg	5689.7	3856.88	2930.652	8448.748	
	45 mg/kg	913.7	121.88	826.509	1000.891	
	55 mg/kg	853.1	90.14	788.617	917.583	
Leucocitos	25 mg/kg	16.1	2.78	14.157	18.131	1.98 - 11.06 *10 ³
	35 mg/kg	20.8	7.15	15.633	25.870	
	45 mg/kg	19.3	0.94	18.606	19.956	
	55 mg/kg	13.8	5.04	10.147	17.367	
Glucosa	25 mg/kg	201.9	17.95	189.057	214.743	106 - 184 mg/dL
	35 mg/kg	188.0	13.37	178.432	197.568	
	45 mg/kg	206.0	11.39	197.851	214.149	
	55 mg/kg	206.2	12.34	197.375	215.025	
BUN	25 mg/kg	48.4	4.59	45.11	51.690	43.4 - 44.4 mg/dL
	35 mg/kg	50.3	6.57	45.602	54.998	
	45 mg/kg	57.6	5.31	53.797	61.403	
	55 mg/kg	57.6	5.69	53.523	61.677	
Creatinina	25 mg/kg	0.43	0.12	0.351	0.518	0.3 - 0.5 mg/dL
	35 mg/kg	0.71	0.51	0.346	1.079	
	45 mg/kg	0.84	0.42	0.539	1.137	
	55 mg/kg	1.18	0.71	0.671	1.691	
ASAT	25 mg/kg	103.0	20.42	88.390	117.610	63 - 175 U/I
	35 mg/kg	42.7	20.19	28.250	57.150	
	45 mg/kg	54.4	22.18	38.532	70.268	
	55 mg/kg	65.9	23.86	48.833	82.967	

ALAT	25 mg/kg	70.3	27.47	50.648	89.952	19 - 48 U/l
	35 mg/kg	53.4	25.13	35.422	71.378	
	45 mg/kg	62.0	25.01	44.105	79.895	
	55 mg/kg	51.4	8.55	45.281	57.519	
Triglicéridos *	25 mg/kg	0%		61.150	100.000	27 - 160 mg/dL
	35 mg/kg	60%		26.238	87.845	
	45 mg/kg	50%		18.709	81.291	
	55 mg/kg	100%		61.150	100.000	
Colesterol	25 mg/kg	196.8	11.21	188.779	204.821	37 - 95 mg/dL
	35 mg/kg	209.2	20.41	194.599	223.801	
	45 mg/kg	153.4	15.10	142.597	164.203	
	55 mg/kg	219.6	21.49	204.223	234.977	
HDL	25 mg/kg	50.2	6.18	45.780	54.620	<40m mg/dL
	35 mg/kg	51.1	8.33	45.139	57.061	
	45 mg/kg	49.9	5.80	45.750	54.050	
	55 mg/kg	49.6	6.29	45.098	54.102	
LDL	25 mg/kg	145.9	16.14	134.369	157.460	80 - 190 mg/dL
	35 mg/kg	157.4	26.56	138.418	176.4119	
	45 mg/kg	102.8	14.79	92.230	113.400	
	55 mg/kg	169.3	22.63	153.125	158.505	

* = Los porcentajes representan el número de casos por dosis administrada de L-NAME que presentó valores séricos de triglicéridos mayores a 150 mg/dL.

Los resultados obtenidos del análisis sanguíneo muestran un cambio significativo al aumentar la dosis administrada de L-NAME en la mayoría de los parámetros analizados; siendo únicamente las plaquetas y LDL, las variables que no muestran cambios al ser comparados con sus valores referenciales.

Cuadro 1

Diagnóstico patológico de órganos después de administración de L-NAME para inducción de Hipertensión Arterial

	Órgano	Diagnóstico Histopatológico
Sujeto 1	Hígado	Congestión, hemorragia, degeneración hidrópica.
	Riñón	Congestión, hemorragia, hialinización.
	Pulmón	Congestión, edema, enfisema.
	Páncreas	Congestión.
	Corazón	Congestión, coágulos sanguíneos, hipertrofia de fibras musculares.
Sujeto 2	Hígado	Congestión, degeneración hidrópica.
	Riñón	Congestión, hemorragia, degeneración hidrópica, hialinización.
	Pulmón	Edema, congestión, hemorragia, enfisema.
	Páncreas	Congestión.
	Corazón	Congestión.
Sujeto 3	Hígado	Congestión, degeneración hidrópica.
	Riñón	Congestión, leve hialinización, degeneración hidrotrópica.
	Pulmón	Edema, enfisema, congestión.
	Páncreas	Congestión.
	Corazón	Congestión, formación de coágulos.
Sujeto 4	Hígado	Degeneración hidrópica.
	Riñón	Degeneración hidrópica, leve hialinización.
	Pulmón	Congestión, enfisema, edema.
	Páncreas	Sin cambios histológicos observables.
	Corazón	Congestión.

FUENTE: Datos Experimentales

Hallazgos encontrados en diagnóstico histopatológico de órganos de sujetos sometidos a inducción de hipertensión arterial, se encontró principalmente congestión y degeneración hidrópica en la mayoría de ellos después de haber administrado diferentes dosis de L-NAME para la inducción de Hipertensión Arterial.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta investigación se indujo hipertensión arterial (HTA) en ratas Wistar macho bajo la inhibición selectiva de la síntesis de óxido nítrico endotelial (eONS) haciendo uso de L-nitro N-metil arginina ester (L-NAME), se investigó el efecto sobre la Presión Arterial (PA) a partir de la administración de diferentes dosis del reactivo L-NAME; así como con cambios hematológicos, serológicos, lipídicos e histopatológicos. Este método ha sido ampliamente utilizado para estudios sobre HTA y su relación con el daño renal a causa de disfunción endotelial por la disminución de óxido nítrico, siendo su principal respuesta la vasoconstricción, aumentando de esta manera la PA (Biancardi, et al, 2007; Ribeiro, et al, 1992). El método de inhibición de óxido nítrico, es ampliamente usado para la determinación de actividad hipotensora de plantas y su relación con el remodelado endotelial, daño renal y presencia de aterosclerosis.

En este estudio se eligió la administración por vía oral con sonda orogástrica para garantizar que el animal ingiera la dosis necesaria de L-NAME que produciría HTA según su peso. Las dosis estudiadas se encuentran entre 25 mg/kg a 55 mg/kg, ya que por lo general las dosis utilizadas en los estudios se encuentran en este rango y suelen variar constantemente entre ellos; se ha descrito que el L-NAME tiene la cualidad de aumentar la presión arterial sistólica en un 20 a 40% en los animales de laboratorio (Ribeiro, et al, 1992; Arroyo, *et al*, 2012).

La PA posee diversos mecanismos de regulación, entre ellos de tipo autocrino y la producción de ON; el efecto hipertensivo de la administración de L-NAME se hace evidente en las Tablas 1, 2 y 3, donde se atribuye que al administrar cualquiera de las cuatro dosis estudiadas existe un incremento de PAS, PAD y Pulsaciones, que aunque no son de la misma magnitud, provocan un cambio en los valores observados. La evaluación de cada medición de las variables respuesta según la dosis administrada de L-NAME, para PAS (Tabla 1) se observa que es en la dosis de 45 mg/kg donde se hallan las mediciones mayores de PAS, así como desviaciones estándar de valores pequeños; el comportamiento de las mediciones totales por día sin distinción de dosis demuestran una tendencia de disminución al alejarse los días de medición de la administración de L-NAME. Un comportamiento similar ocurre con PAD (Tabla 2), donde ante 45 mg/kg se logran valores de desviación estándar bajos, y aunque la administración de esta dosis no proporcionó los

valores de media más altos, el aumento registrado se encuentra entre la capacidad reportada de aumento de PA por la literatura de administración de L-NAME (Condorhuamán, 2009). En el caso de la medición de pulsaciones, contrariamente a las otras variables, al aumentar la dosis de L-NAME administrada las pulsaciones van disminuyendo (Tabla 3).

Las gráficas de diferencia entre media de mediciones de PAS (Gráfica 1), muestran que las dosis pequeñas de L-NAME poseen mucha variación en sus medias; las dosis de 45 mg/kg y 55 mg/kg poseen menor variación entre los datos y aunque no existe un cambio tan grande de mediciones, son más confiables que las dosis menores. Para PAD (Gráfica 2) y Pulsaciones (Gráfica 3) indican que existe poca relación entre la dosis de L-NAME administrada y las variables respuesta. Las mediciones de las tres variables respuesta demuestran disminución en el total de mediciones por día sin distinción de dosis administrada.

Para la creación de los modelos de predicción de las variables respuesta, se obtuvieron dos datos numéricos, la dosis administrada y el cambio en la variable PAS, PAD o Pulsaciones, por lo que se recurrió a un modelo de regresión lineal. La Tabla 4 muestra los valores obtenidos para R^2 (coeficiente de determinación), los cuales están muy por debajo del valor requerido para que la ecuación sea considerada válida, por lo que no se adecua a los datos recolectados; además el valor p del análisis de varianza de la regresión indica que este modelo no es estadísticamente significativo. En esta investigación no se pudo crear un modelo predictivo debido a la variabilidad de los datos recolectados; pero si se desea encontrar la dosis más adecuada debe de cumplir los requisitos de poseer poca variabilidad y rangos de frecuencia de poca amplitud, ya que será esta la que proporcione datos más confiables.

Se utilizó el Test de Welch (Tabla 5) debido a que existe una distribución normal de los datos y no se cumple con homocedasticidad de los mismos, donde se demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el cambio de los valores de PAS y en el cambio de Pulsaciones, determinando que si existe un cambio en la respuesta de PAS y Pulsaciones según la dosis administrada. Esto no ocurre con PAD ya que los valores son $p > 0.05$. Además, las variables PAS y Pulsaciones muestran un tamaño del efecto mayor a 0.500 respaldando el hecho de que si existe un cambio en ellas según

la dosis administrada, los intervalos de confianza obtenidos para los cambios de las variables se encuentran en el anexo 3.

Se evaluó el efecto dentro de las variables, reportando el valor Lambda de Wilk en la Tabla 7 que indica que existe un efecto significativo del tiempo en las mediciones de PAS ($p < 0.001$), PAD ($p 0.005$) y Pulsaciones ($p < 0.001$), una interacción significativa indica que el efecto de una variable depende en el nivel de otra variable, en este caso, el efecto de las variables PAS, PAD y Pulsaciones depende de los días en que fueron medidas. El valor del efecto de la dosis se halla relacionado con los días, más no con las medidas observadas de PAS, PAD y Pulsaciones (Barton & Peat, 2005). Así mismo, utilizando el valor de Eta Parcial al Cuadrado (Tabla 6), donde a más cercanía a 1.000 (100%) posee el valor obtenido, se puede asegurar que la variable dependiente se ve altamente influenciada por la variable independiente (Barton & Peat, 2005); la relación de los días de medición con PAS se ve influenciada en un 76%, para el caso de PAD y Pulsaciones el valor de eta parcial al cuadrado disminuye, siendo 36% y 61% respectivamente, indicando que entre estas variables y los días de medición existe relación, más no tanta como en el caso de PAS.

La bondad de ajuste del modelo de mediciones repetidas se evaluó mediante el test de Esfericidad de Mauchly, que requiere que la diferencia de varianzas de todos los pares de mediciones repetidas sean constantes (Barton & Peat, 2005); en este análisis existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos de la respuesta de las variables y los días ya que poseen un $p \leq 0.001$ (Tabla 3, anexo 3), que indican que los datos no son esféricos, es decir, se hallan dispersos entre ellos. En caso de PAS y PAD, poseen un coeficiente épsilon de Greenhouse-Geisser < 0.75 por lo que la varianza entre las medidas repetidas no son constantes; aunque debido a que el valor de F no es significativo, no es necesaria la corrección de los datos, por lo que se puede decir que en las tres variables de medición de PA no hay esfericidad entre los datos analizados.

Al obtener un resultado favorable para la diferencia de medias poblacionales del cambio las variables respuesta PAS y Pulsaciones por el Test de Welch, se procedió a evaluar el comportamiento de estas variables con la comparación de las diferentes dosis administradas de L-NAME con el método comparativo múltiple de Games-Howell, que analiza varianzas no homogéneas con intervalos de confianza del 95% permitiendo

determinar cuáles medidas son las que difieren entre ellas (Barton & Peat, 2005). Se compararon las diferencias de medias entre dosis administradas que demostraron un mejor comportamiento de aumento para cada una de las variables respuesta con las demás dosis, al observar la Tabla 6, en el caso de PAS se eligió la dosis de 45 mg/kg y existen diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 25 mg/kg y 55 mg/kg, y se observó también que al comparar con dosis más altas la diferencia de medias disminuye y que los intervalos de confianza se mantienen constantes. Para PAD, también hay una disminución de diferencias de medias, y la dosis elegida fue de 25 mg/kg ya que es la que posee mejor significancia estadística. Y, la dosis de Pulsaciones fue 35 mg/kg que al ser comparada con las demás dosis de L-NAME administradas mostraron un valor $p < 0.05$ para 45 mg/kg y 55 mg/kg.

Es importante tomar en cuenta al elegir la mejor dosis de L-NAME que lo que se desea estudiar es la HTA con menor variabilidad en datos recolectados principalmente en PAS, por lo que basados en los datos obtenidos de la Lambda de Wilk, al escoger una dosis de L-NAME a administrar es más confiable guiarse por el cambio y las variaciones encontradas en PAS, ya que las otras dos variables pueden ser indistintas a la dosis que se administra de L-NAME.

Ya que anteriormente se determinó que existe una mayor relación entre las variables respuesta y los días de medición de PA (Tabla 7), se realizó una comparación de las diferencias de medias obtenidas al contrastar el primer día de medición con los demás días de medición (Tabla 8), de esta manera definir el tipo de comportamiento que tienen las variables respuesta al pasar los días desde la administración de L-NAME. La diferencia de medias indica claramente un aumento al comparar el día 1 de medición con los demás días en las tres variables respuesta. Para la variable PAS, todos los valores de p son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), al comparar el primer día de medición con el segundo día se ve un cambio de aproximadamente 9 grados y al compararlo con el quinto y último día de medición se observa un mayor aumento con 22 grados para la diferencia de sus medias.

Al evaluar las variables PAD y Pulsaciones, se observan también comportamientos ascendentes al comparar el primer día de medición de PA con los demás días; pero en estas variables respuesta se obtuvieron algunos valores de $p > 0.05$ (Tabla 8), para PAD al

comparar el día 1 y el día 2, y para Pulsaciones, al comparar los días 1 con el día 2 y con el día 3. El resto de comparaciones entre días muestra valores de $p < 0.05$, esto implica que entre estos días si hay un cambio significativo en la PAD medida, sin distinción de la dosis.

Los resultados obtenidos del análisis sanguíneo confirman la relación que tiene la inhibición de la síntesis de óxido nítrico con los diferentes marcadores que regulan la homeóstasis del organismo. En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos, donde son pocas las variables que no presentan alteración en función de la dosis administrada de L-NAME al ser comparada con los valores normales para ratas Wistar macho de 3 meses de edad.

La prevalencia de HTA se hace mayor al aumentar el hematocrito, siendo un factor importante en la viscosidad de la sangre, este también es un factor de riesgo para accidentes de tipo cardiovascular y actúa sinérgicamente con la PA aumentada (De La Cerna, 2000). Los resultados obtenidos de la hematología realizada indican aumento en los valores de hemoglobina y hematocrito en función al aumento de dosis administrada, respectivamente en 45 mg/kg y 55 mg/kg. El bloqueo de la síntesis de ON participa activamente en el aumento del estrés oxidativo, el cual se encuentra muy relacionado en la génesis de la HTA donde existe un aumento en la adhesión de leucocitos (Leiva, 2000; Bellido, *et al*, 2003), que se observa en la Tabla 9, lo que podría explicar la diferencia entre la elevación de leucocitos obtenida y los valores normales.

También la hiperactividad simpática generada por la falta de ON provoca activación plaquetaria (De La Cerna, 2000). El estudio de la hematología puede proporcionar mucha información sobre el efecto tuvo la administración de L-NAME para inducir HTA; ya que la inhibición del ON promueve la adhesión y agregación plaquetaria (Bellido, *et al*, 2003) y la remodelación endotelial, contribuyendo al desarrollo de trombosis y aterosclerosis; sin embargo, en esta investigación no se observó un aumento significativo en las cantidades sanguíneas de plaquetas al relacionarlas con la dosis administrada de L-NAME.

La Química Sanguínea realizada fue comprendida por glucosa, creatinina, BUN, ALAT y ASAT (Tabla 9), de los cuales ASAT fue la única variable que no demostró alteración en los valores obtenidos al aumentar la dosis administrada de L-NAME. La HTA se encuentra estrechamente relacionada con la hiperglicemia, nefropatías y aterosclerosis.

El 75% de la población que padece HTA también padece diabetes, en este estudio se pudo determinar que al bloquear la producción de ON endotelial hay una gran posibilidad de desarrollar hiperglucemia, ya que la disminución de ON induce la apoptosis de algunos tipo de células, entre ellos las células β pancreáticas aumentando la tolerancia a la glucosa (Zeini, 2005; Bellido, *et al*, 2003) lo que explicaría el aumento registrado en los niveles de glucosa, principalmente en los grupos de 45 mg/kg y 55 mg/kg.

Altos valores de BUN y creatinina son indicadores de daño a nivel renal, al inhibir la síntesis de óxido nítrico el aumento sobre el estrés oxidativo produce daño tisular y disminución del filtrado glomerular (Benavides & Pinzón, 2008); en este caso, BUN y creatinina muestran un aumento en sus valores sanguíneos al aumentar la dosis administrada de L-NAME y son manifestaciones de una posible insuficiencia renal crónica debido a que el ON pierde el balance de sodio en respuesta al aumento de la PA (Leiva, 2000).

El análisis alterado de transaminasas sugiere daño a nivel hepático, ALAT y ASAT son importantes marcadores de necrosis hepática y de prevalencia de infarto agudo al miocardio, el aumento de ALAT se ve principalmente afectado por la administración de dosis mayores de L-NAME (Tabla 9), situación que no se observa con ASAT; ALAT indica alteraciones en las funciones hepáticas debido a los efectos de la administración de L-NAME; estas enzimas escapan del citosol del hígado al torrente sanguíneo, donde la disfunción hepática y el defecto en la biosíntesis de estas enzimas hacen el cambio de permeabilidad de la membrana hepática (Selamoglu, Gogebakan & Orun, 2013).

El aumento en las mediciones de PA observados pueden ser causados por la acumulación de lípidos en los vasos sanguíneos formando placas ateroscleróticas que dificultan el paso libre de la sangre. La inhibición de la síntesis de ON ha demostrado ser un importante factor para la formación de placas ateroscleróticas e hiperlipidemia (Nyandjeu, *et al*, 2013); la hiperlipidemia consta de un aumento en niveles de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL, con una disminución de colesterol HDL.

En esta investigación, la dislipidemia observada fue caracterizada por valores alterados en triglicéridos y colesterol, con la particularidad de un aumento no dependiente de la dosis al ser comparados con sus valores referenciales (Tabla 9), como en el caso de algunas de las variables mencionadas anteriormente; por su parte, las lipoproteínas de baja

densidad (LDL) no mostraron cambio que afecten al organismo y, aunque, los valores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) no disminuyeron sino que aumentaron, este puede ser importante marcador que implica un envejecimiento prematuro del organismo (Nyandjeu, *et al*, 2013).

El aumento de la PA produce daño a nivel tisular en varios órganos blanco, principalmente a nivel del corazón, riñones, cerebro y periferia vascular (Sierra, *et al*, 2008; Longo, *et al*, 2012). Después de inducir HTA se realizó un análisis histopatológico para determinar el daño ocasionado descrito en el Cuadro 1; a nivel del corazón, la exposición a bajas concentraciones de ON y el estrés oxidativo que esto produce, conlleva a daño tisular e hipertrofia cardíaca (Benavides y Pinzón, 2008), de hecho en este estudio se encontró daño cardíaco en los sujetos estudiados; además de formación de coágulos sanguíneos dentro del órgano posiblemente por la remodelación endotelial y la agregación plaquetaria (Bellido, *et al*, 2003). Tanto el riñón como el hígado presentaron principalmente hialinización y degeneración hidrópica (Cuadro 1), la degeneración hialina suele observarse sobre todo en las arteriolas aferentes del riñón, es un engrosamiento irregular de la pared del vaso por depósitos de una sustancia eosinófila, se encuentra en el 15% de pacientes con nefroesclerosis y es muy frecuente en pacientes hipertensos con diabetes (Longo, *et al*, 2012).

La síntesis de ON en el pulmón ayuda a mantener la homeostasis de la vasculatura pulmonar, su disminución induce disfunción endotelial (Benavides & Pinzón, 2008); el pulmón presento principalmente edemas y congestión (Cuadro 1) que son la presencia de una cantidad anormal de líquido dentro de las células, que se encuentra estrechamente relacionado al aumento de PA (Mohan, 2010) con este resultado patológico se confirma el daño nefrótico a causar del estrés oxidativo que produce la inhibición de síntesis de ON (Benavides & Pinzón, 2008). El estudio histopatológico del páncreas mostró congestión en el órgano, la congestión es un indicador de posible pancreatitis aguda por una acumulación de anormal de células con más líquido de lo normal, además, la inhibición de síntesis de ON promueve la apoptosis de células pancreáticas β (Mohan, 2010; Bellido, *et al*, 2003).

10. CONCLUSIONES

- 10.7. No fue posible estandarizar la dosis a administrar de L-NAME para inducir HTA, porque no demostraron el mismo cambio en las variables medidas; y, el modelo predictivo no es funcional ya que el R^2 explica una porción muy pequeña del error.
- 10.8. Se determinó que si existe un cambio en las mediciones repetidas de Presión Arterial Sistólica, Presión Arterial Diastólica y Pulsaciones tras la administración por vía oral de L-NAME en ratas Wistar macho.
- 10.9. La dosis validada para inducir HTA en las ratas Wistar del Bioterio Dra. Amarillis Saravia fue 45 mg/kg, ya que esta mostró aumento significativo de la Presión Arterial Sistólica y cambios más homogéneos dentro del grupo para las demás variables.
- 10.10. El comportamiento de las mediciones totales por día sin distinción de dosis demuestra una tendencia de disminución de las variables respuesta estudiadas al alejarse los días de medición de la administración de L-NAME.
- 10.11. La variable Presión Arterial Diastólica mostró estar relacionadas con el día en que se mide la PA y no con la dosis administrada de L-NAME.
- 10.12. Tras la administración de L-NAME, los resultados del análisis sanguíneo mostró un aumento en los valores obtenidos al aumentar la dosis para hemoglobina, hematocrito, cantidad de leucocitos, glucosa, BUN, creatinina y ALAT; variables que se ven directamente afectadas por la inhibición de ON endotelial.
- 10.13. El estudio histopatológico mostró que la HTA por falta de ON endotelial causa estrés oxidativo provocando daño tisular en diversos órganos, como hipertrofia de fibras cardíacas, degeneración hidrópica en riñón e hígado, congestión y edema en páncreas y pulmones.

11. RECOMENDACIONES

- 11.7. Regular la temperatura de las áreas de trabajo, ya que la disminución o aumento de la temperatura puede ocasionar cambios en el comportamiento de los animales y provocar sesgo en las mediciones de PA.
- 11.8. Mantener un buen control de factores del ambiente como el ruido, ya que este estresa a los animales haciendo difícil la toma de PA.
- 11.9. Al escoger una dosis de L-NAME a administrar es más confiable guiarse por el cambio y las variaciones encontradas en PAS, ya que las otras dos variables son indistintas a la dosis que se administra de L-NAME.
- 11.10. Comparar la efectividad de este método de inducción de HTA con otros, por ejemplo, en ratas sensibilizadas a altas ingestas de sodio.
- 11.11. Realizar el estudio con un mayor número de animales para disminuir los intervalos de confianza.

12. REFERENCIAS

Aguirre, F. & Sánchez, J. (2010). ¿Qué sabe Ud. Acerca de... la curva dosis-respuesta? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacológicas*. 41(4): 57-59.

Aguilera, L. (sf). Conceptos Básicos de Farmacocinética y Farmacodinámica con TIVA. *Infomed Cuba*.

Alcázar, J. *et al.* (2013). Hipertensión arterial esencial. *European Society Of Cardiology*.

Alderton, W., Cooper, C., & Knowles, R. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357: 593-615.

Argente, H. & Álvarez, M. (2013). *Semiología Médica: Fisiopatología, Semiotécnica y Propedéutica*. (2ª. Edición). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Arroyo, J. *et al.* (2012). Efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* 'matico' sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Perú*. 73(4): 275 – 280.

Augustyniak, R., Victor, R., Morgan, D. & Zhang W. (2006). L-NAME and ADMA-induced sympathetic neural activation in conscious rats. *American Journal of Physiology*. 290: 726-732.

Bartunek, J. *et al.* (2000). Chronic NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Induced Hypertension: Novel Molecular Adaptation to Systolic Load in Absence of Hypertrophy. *Circulation*. 101: 423 - 429.

Barrios, E. *et al.* (2011). Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salud*. 15(2).

Benavides, M. & Pinzón, A. (2008). Óxido Nítrico: Implicaciones Fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología*. 36: 45 – 52.

Biancardi, V., Bergamaschi, C., Lopes, O. & Campos, R. (2007). Sympathetic activation in rats with L-NAME induced hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40: 401 – 408.

Brune, B., *et al.* (1994). Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sciences*. 54: 61– 70.

De Aluja, A. & Constantino, F. (2002). *Técnicas de necropsia en animales domésticos*. (2ª. Edición). México: Manual Moderno.

De La Serna, F. (2000). Hipertensión Arterial y Estado de Hipercoagulación. *Foro Argentino de Especialistas en Hipertensión Arterial*. Recuperado de <http://www.fac.org.ar/revista/00v29n2/foro/delaser.htm>

De Miguel, M., *et al.* (2012). Guía de desarrollo preclínicos. Genoma España. Recuperado de

Dornas, W. & Silva, M. (2011). Animal models for the study of arterial hypertension. *Journal of Biosciences*. 36(4): 731-737

Drew, B., & Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*. 959: 66-81.

DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos Glucosa GOD FS. Merck.

DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos Urea FS. Merck.

DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos Creatinina FS. Merck.

DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos LDL Precipitante. Merck.

DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos HDL Inmuno FS. Merck.

- DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos Colesterol FS. Merck.
- DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos Triglicéridos FS. Merck.
- DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos ALAT (GPT) FS*. Merck.
- DiasYs. (2006). Documentos de procedimientos técnicos ASAT (GOT) FS*. Merck.
- Evans, G.O. (2005). *Animal Clinical Chemistry*. England: Taylor & Francis Editions.
- Farreras, & Rozman. (2008). *Medicina Interna*. (16ª. Edición). España: ElSevier.
- Flores, J. (2008). *Farmacología Humana*. (6ª. Edición). España: ElSevier.
- Förstermann, U. & Sessa, W. (2011). Nitric Oxyde Synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 1-13.
- Fritz, M. (2009). Desarrollo de un sistema de adquisición de datos para la medición de la presión arterial en ratas. Su uso para el estudio de los efectos de hidrolizados de Amaranto sobre el sistema vascular. [Tesis doctoral]. Universidad de la Plata, Argentina.
- Hemmens, B. & Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Molecular Biology*. 100 : 1 –32.
- Hernández, A., *et al.* (2009). Tratamiento Farmacológico para la Hipertensión arterial 2009. *Revista Mexicana de Cardiología*. 20(2): 55-104.
- Hilari, E. *et al.* (2011). Bioética en la investigación con animales. *Revista de Actualización Clínica e Investigación*.
- Horn, T., *et al.* (1994). Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *American Journal of Physiology*. 266: 306 - 313.

Jalili, C., Reza, M. & Naderi, T. (2015). The effect of hydroalcoholic extract of *P. crispum* on sperm parameters, testis tissue and serum nitric oxide levels in mice. *Advanced Biomedical Research*. 4(40).

Karlberg, J. & Speers, M. (2010). Revisión de ensayos clínicos: una guía para el Comité de ética. Hong Kong: Pfizer.

Lee, J. & Azar, S. (2011). Ambulatory cardiovascular activities in L-NAME treated mice. *The Open Hypertension Journal*. 4: 23 – 32.

Leiva, L. (2000). Estrés oxidativo e hipertensión arterial esencial. Evidencias y Reflexiones. *Revista Cubana de Medicina*. 39(1): 3 – 6.

Leiva, L., Del Pozo, H. & Pérez, D. (2000). Óxido nítrico y su relación con la Hipertensión Arterial. *Revista Cubana de Medicina*. 39(3): 174 – 179.

Longo, D., et al. (2012). *Harrison: Principios de Medicina Interna*. (18ª. Edición). México: McGraw Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.

Macrae, D. (2007). The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Annals Of American Thoracic Society Journal*. 4: 176-8.

Maicas, C. et al. (2003). Etiología y Fisiopatología de la Hipertensión Arterial Esencial. *Sociedad Castellana de Cardiología*. 3(5): 141-160.

Nishimura, JS., (et al). (1995). Modular structure of neuronal nitric oxide synthase: localization of the arginine binding site and modulation by pterin. *Biochem Biophys Res Commun*. 210: 288 –294.

Nyadjeu, P. et al. (2013). Acute and chronic antihypertensive effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark metanol extract in L-NAME induced hypertensive rats. *BMC Complementary and alternative medicine*. 13(27): 1-10.

OMS. (1975). Pautas para la evaluación de los medicamentos destinados para el hombre. Recuperado de http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_563_spa.pdf

OMS. (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf

Osorio, J. (2000) Principios éticos de la investigación en seres humanos y en animales. *Medicina*. 60: 255-258.

Pecháñová, O. *et al.* (2004). Vasoactivesystems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *Hypertension*. 22(1): 167 – 173.

Pereira, C. (2010). Análisis comparativo del efecto antihipertensivo de los Extractos de diferentes especies vegetales en ratas hipertensas y de los métodos L-NAME y Goldblatt utilizados para generar hipertensión. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Austral de Chile.

Pérez, A., *et al.* (1997). El papel del Óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*. 34(2): 84-86.

Quezada A. (2007). El animal como sujeto de experimentación. Aspectos técnicos y éticos. Santiago de Chile: Andros Impresores.

Ramírez, J., Palacios, M. & Gutiérrez, O. (2006). Estudio del efecto hipotensor de *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensivas. *Colombia Médica*. 37(1): 53-60.

Ramchandra, R., Barrett, C. & Malpas, S. (2005). Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 32: 440-446.

Rodríguez E. (2007) Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethical*. 13:25-40.

Rojas, O. (2007). Hipertensión arterial: Prevalencia y Factores de Riesgo. Hospital Universitario "Ruiz y Paez". [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Oriente, Venezuela.

Rossi, M., Ramos, S. & Prado C. (2003). Chronic inhibition of nitric oxide synthase induces hypertension and cardiomyocyte mitochondrial and myocardial collagen remodelling in the absence of hypertrophy. *Hypertension*. 21(5): 993 – 1001.

Rusche B. (2003) The 3Rs and animal welfare-conflictortheway forward? *ALTEX* 20 (1): 63-76.

Sabán, M. & Sánchez, O. (2012). *Control Global del Riesgo Cardiometabólico*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. Pp. 385-386.

Sakuma, I., *et al.* (1992). N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity *in vivo*. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circulation Resolutions*. 70: 607-611.

Salgado, M. (2002). Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf>

Sánchez, M. (2003). Participación del óxido nítrico y los metabolitos del ácido araquidónico vía citocromo P450 en la regulación de la presión arterial. *Archivos de Cardiología de México*. 73(2): 98-104.

Sanz, D. (2014). Disfunción endotelial e inflamación en la hipertensión experimental: papel de angiotensina II. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, España.

Saravia, A. (2005). *Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos in vivo e in vitro*. Guatemala: Editorial Universitaria.

Sharifi, A., Akabarloo, N. & Darabi, R. (2005). Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME-induced hypertension. *Pharmacological Research*. 5(52): 438-444.

Sierra, A., *et al.* (2008). Evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial en España. *Medicina clínica*. 131(3): 104 – 116.

Szallasi, A. & Biró, T. (2012). TRP Channels in drug Discovery: Methods in Pharmacology and Toxicology. USA: Humana Press.

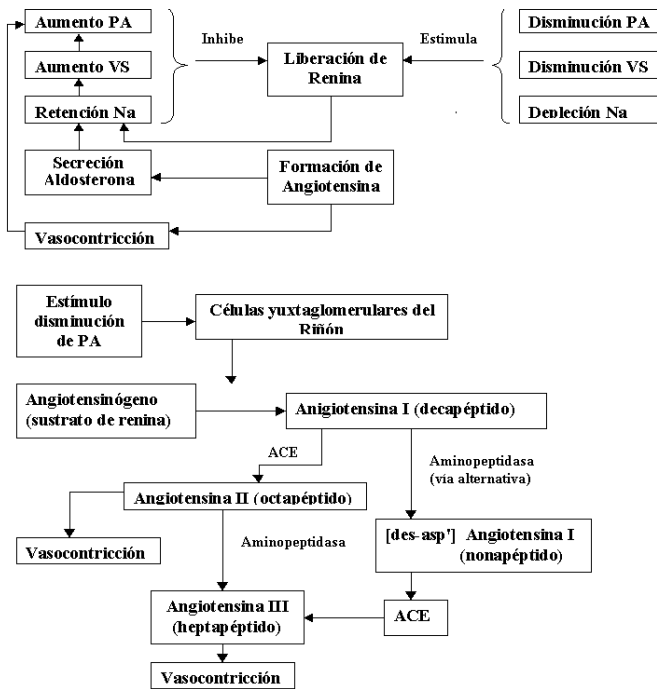
Török, J. (2008). Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. *Physiological Research*. 57: 813-825.

Victoria, M. & Morón, F. (2010). Bioética en experimentación animal para validar usos de plantas medicinales en el Laboratorio Central de Farmacología. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 15(3): 157-168.

13. ANEXOS

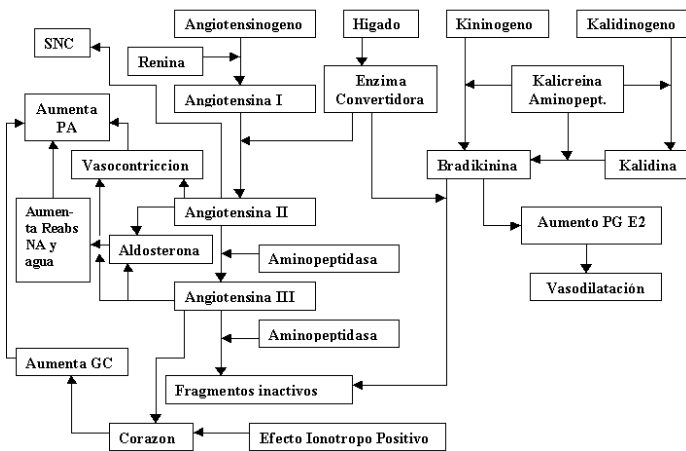
13.7. Anexo No. 1

Figura No. 1 Fisiopatología de la Hipertensión arterial



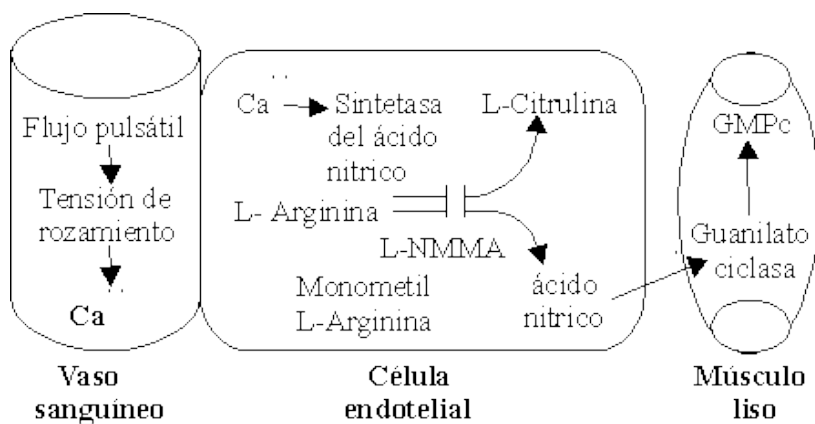
FUENTE: Rojas, O. (2007). Hipertensión arterial: Prevalencia y Factores de Riesgo. Hospital Universitario “Ruiz y Paez”. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Oriente, Venezuela.

Figura No. 2 Efectos fisiológicos del aumento de la presión arterial



FUENTE: Rojas, O. (2007). Hipertensión arterial: Prevalencia y Factores de Riesgo. Hospital Universitario “Ruiz y Paez”. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Oriente, Venezuela.

Figura No. 3 Mecanismo fisiológico de liberación del óxido nítrico y su regulación en el tono vascular.



FUENTE: Pérez, A., *et al.* (1997). El papel del Óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*. 34(2): 84-86.

13.8. Anexo No. 2

Especificaciones L-Nitro N-Arginina Metil Éster (L-NAME)

Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

Product Name	<i>N</i> _ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, ≥98% (TLC), powder
Product Number	N5751
Product Brand	SIGMA
CAS Number	51298-62-5
Molecular Weight	269.69
Storage Temp	-20°C

TEST

APPEARANCE

SOLUBILITY

IR SPECTRUM

ELEMENTAL ANALYSIS

SPECIFIC ROTATION

PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

SPECIFICATION

WHITE TO OFF-WHITE POWDER

CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY COLORLESS TO FAINT YELLOW
SOLUTION AT 50MG/ML IN WATER

CONSISTENT WITH STRUCTURE

30.6 TO 31.8% CARBON

25.4 TO 26.5% NITROGEN

+14.5 TO +17.1 DEG (C=3.2 IN METHANOL AT 25DEGC)

NLT 98%

DOCUMENT # N5751/07/09/02/3

13.9. Anexo No. 3

Tabla 1

***Evaluación de la Normalidad de los datos obtenidos con la prueba de Shapiro-Wilk
(n=40, Significancia = 5%)***

Variable	Dosis	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Valor P
Diferencia PAS	25 mg/Kg	0.901	10	0.224
	35 mg/Kg	0.869	10	0.099
	45 mg/Kg	0.861	10	0.078
	55 mg/Kg	0.925	10	0.405
Diferencia PAD	25 mg/Kg	0.948	10	0.649
	35 mg/Kg	0.967	10	0.866
	45 mg/Kg	0.949	10	0.660
	55 mg/Kg	0.862	10	0.081
Diferencia	25 mg/Kg	0.948	10	0.649
Pulsaciones	35 mg/Kg	0.967	10	0.866
	45 mg/Kg	0.949	10	0.660
	55 mg/Kg	0.862	10	0.081

FUENTE: Datos experimentales.

Los datos analizados mostraron tener una distribución paramétrica según la prueba de Shapiro-Wilk.

Tabla 2
Evaluación de la homocedasticidad de los datos obtenidos con el Estadístico de Levene (n=40, Significancia = 5%)

Variable	Estadístico de			Valor P
	Levene	gl1	gl2	
Diferencia PAS	9.239	3	36	<0.001
Diferencia PAD	3.798	3	36	0.018
Diferencia Pulsaciones	3.856	3	36	0.017

FUENTE: Datos experimentales.

Los datos recolectados mostraron se no homocedásticos, según el estadístico de Levene; por lo que se puede proceder a hacer una prueba de Welch.

Tabla 3
Análisis del supuesto de Esfericidad de Mauchly (n=40, Significancia = 5%)

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Valor p	Valor F	Épsilon		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Días (PAS)	0.364	34.780	9	<0.001	25.367	0.702	0.831	0.250
Días (PAD)	0.448	27.641	9	0.001	6.120	0.738	0.878	0.250
Días (Pulsaciones)	0.223	51.649	9	<0.001	8.797	0.632	0.740	0.250

FUENTE: Datos experimentales.

Se niega el supuesto de esfericidad de Mauchly, es decir los datos de PAS, PAD y Pulsaciones se hallan dispersos.

Tabla 4

Intervalos de confianza para cambios en las variables respuesta

(n=40, Significancia = 5%)

Variable	Dosis	Intervalos de Confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Cambio PAS	25 mg/kg	31.3156	41.8844
	35 mg/kg	37.1874	48.2926
	45 mg/kg	46.2424	51.9176
	55 mg/kg	35.661	45.219
Cambio PAD	25 mg/kg	15.7281	25.1519
	35 mg/kg	24.7058	34.7342
	45 mg/kg	21.6742	28.2858
	55 mg/kg	20.0161	30.6639
Cambio Pulsaciones	25 mg/kg	93.3685	166.1115
	35 mg/kg	160.3875	234.6125
	45 mg/kg	124.9487	171.6513
	55 mg/kg	104.3252	176.9548

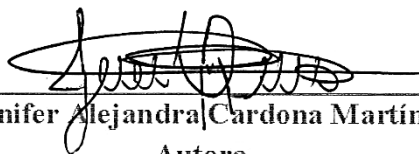
FUENTE: Datos experimentales.

Tabla 5

Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos para la hematología, química sanguínea y perfil lipídico con la prueba de Shapiro-Wilk (n=40, Significancia = 5%)

Variable	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Valor p
Hemoglobina	0.981	40	0.713
Hematocrito	0.904	40	0.002
Leucocitos	0.885	40	0.001
Plaquetas	0.777	40	0.000
Glucosa	0.967	40	0.293
BUN	0.979	40	0.661
Colesterol	0.773	40	0.000
HDL	0.960	40	0.168
ALAT	0.979	40	0.644
ASAT	0.975	40	0.509

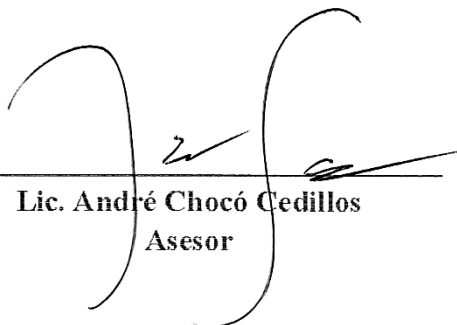
FUENTE: Datos experimentales.



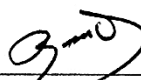
Jennifer Alejandra Cardona Martínez
Autora




Lda. Delia María Arriaza García
Asesora



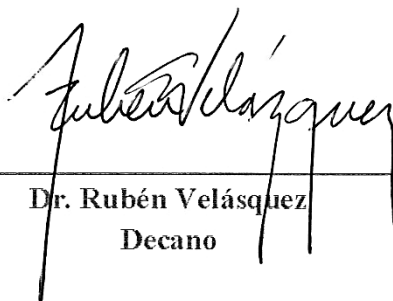
Lic. André Chocó Cedillos
Asesor



Lda. Raquel Pérez Obregón
Revisora



Lda. Hada Marieta Alvarado
Directora de Escuela



Dr. Rubén Velásquez
Decano

