



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA  
RESPUESTA ADRENÉRGICA ALFA<sub>1D</sub> EN LA  
HIPERTENSIÓN ARTERIAL”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA**

**Q.F.B. RICARDO ESPINO GARCÍA**

**ASESORES DE TESIS**

**DOCTOR EN CIENCIAS ASDRÚBAL AGUILERA  
MÉNDEZ**

**DOCTOR EN CIENCIAS DANIEL GODÍNEZ  
HERNÁNDEZ**

**MORELIA, MICHOACÁN. SEPTIEMBRE DE 2017.**

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Enfermedades cardiovasculares .....	3
1.2 Presión arterial .....	4
1.2.1 Regulación de la presión arterial.....	4
1.2.1.1 Mecanismos nerviosos .....	5
1.2.1.2 Sistema de líquidos renal-corporal.....	7
1.2.1.3 Mecanismos humorales .....	9
1.2.1.4 Receptores adrenérgicos .....	13
1.3. Contracción muscular .....	17
1.3.1. Músculo estriado.....	18
1.3.2 Músculo liso .....	20
1.4 Hipertensión arterial .....	22
1.4.1 Clasificación.....	23
1.4.2 Factores que aumentan el riesgo de padecer hipertensión arterial .....	24
1.4.3 Tratamiento farmacológico contra la hipertensión arterial .....	25
1.5 Biotina .....	27
1.5.1 Función de la biotina.....	28
1.5.2 Ciclo de la biotina.....	29
1.5.3 Funciones de la biotina a concentraciones farmacológicas .....	30
1.5.4 Activación de la guanilato ciclasa soluble .....	31
1.5.5 Biotinilación de histonas .....	32
2. ANTECEDENTES .....	33

3. JUSTIFICACIÓN .....	37
4. HIPÓTESIS .....	38
5. OBJETIVOS .....	38
5.1 Objetivo general .....	38
5.2 Objetivos particulares.....	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
6.1 Modelo experimental.....	39
6.2 Protocolo experimental .....	39
6.3 Extracción de la aorta de rata .....	40
6.4 Reactividad adrenérgica vascular .....	40
6.5 Evaluación de la reactividad vascular a calcio .....	41
6.6 Análisis estadístico.....	42
7. RESULTADOS .....	43
7.1. Registro del peso, consumo de agua y alimento de las ratas durante los diferentes tratamientos.....	43
7.2. Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata .....	45
7.3. Efecto de la biotina sobre la respuesta contráctil adrenérgica en aorta de rata.....	46
7.4. Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en el efecto vasorrelajante de la biotina.....	47
7.5. Participación del calcio extracelular e intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina.....	48
7.6. Respuesta contráctil vascular a una curva de serotonina en presencia de biotina .....	52
7.7. Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> de biotina y L-NAME sobre la respuesta contráctil vascular a fenilefrina.....	53

8. DISCUSIÓN .....	61
9. CONCLUSIÓN .....	64
10. PERSPECTIVAS.....	64
11. BIBLIOGRAFÍA .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo vasoconstrictor del sistema renina-angiotensina .....	9
Figura 2. Síntesis y función del óxido nítrico .....	11
Figura 3. Estructura general de los receptores adrenérgicos .....	14
Figura 4. Mecanismo vasodilatador de los receptores $\beta$ adrenérgicos.....	15
Figura 5. Mecanismo vasoconstrictor de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en el músculo liso vascular. ....	16
Figura 6. Estructura química de la biotina.. .....	27
Figura 7. Reacciones catalizadas por las carboxilasas que dependen de la biotina .....	29
Figura 8. Ciclo de la biotina.....	30
Figura 9. Mecanismo de acción de la biotina a través del GMPc.....	32
Figura 10. Incremento en la presión diastólica en respuesta a la fenilefrina en la rata descerebrada y desmedulada .....	35
Figura 11. Evaluación de la actividad constitutiva de los receptores $\alpha_{1D}$ . ....	36
Figura 12. Peso de las ratas en los diferentes tratamientos.....	43
Figura 13. Consumo de agua.....	44
Figura 14. Consumo de alimento. ....	45
Figura 15 Efecto del BMY 7378 sobre la respuesta a la fenilefrina en aorta sin endotelio de ratas.....	46
Figura 16. Efecto de la biotina sobre la respuesta a la fenilefrina en aorta sin endotelio de ratas.....	47
Figura 17. Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en el efecto vasorrelajante de la biotina.....	48

Figura 18. Participación del calcio extracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina.....	49
Figura 19. Participación de los canales de calcio tipo L en el efecto vasorrelajante de la biotina. ....	50
Figura 20. Participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en respuesta a fenilefrina.....	51
Figura 21. Participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en respuesta a serotonina.....	52
Figura 22. Efecto de la biotina sobre la respuesta contráctil a serotonina en aorta de rata. ....	53
Figura 23. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata control .....	54
Figura 24. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME .....	55
Figura 25. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo control .....	56
Figura 26. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME y biotina.....	57
Figura 27. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo control .....	58
Figura 28. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo tratado con L-NAME y biotina .....	59
Figura 29. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta con endotelio de rata de los tres grupos experimentales .....	60

## **ABREVIATURAS**

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina.
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato cíclico.
<b>Ang</b>	Angiotensina.
<b>AT</b>	Receptor a angiotensina.
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina.
<b>BRR</b>	Receptor a bradicinina.
<b>CA/CAM</b>	Complejo calcio-calmodulina.
<b>cGMP</b>	Monofosfato de guanosina cíclico.
<b>CGTP</b>	Trifosfato de guanosina cíclico.
<b>CO</b>	Monóxido de carbono.
<b>DAG</b>	Diacilglicerol.
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina.
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares.
<b>EE</b>	Error estándar.
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial.
<b>ET</b>	Endotelina.
<b>GCS</b>	Guanilato ciclasa soluble.
<b>HA</b>	Hipertensión arterial.
<b>HCS</b>	Holocarboxilasa sintetasa.
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad.
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato.
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible.
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad.
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster.
<b>MCC</b>	Metilcrotonil-CoA carboxilasa.
<b>MLCK</b>	Cinasa de cadena ligera de miosina.
<b>mm Hg</b>	Milímetros de mercurio.
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido.
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal.
<b>NO</b>	Óxido nítrico.

<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa.
<b>NP</b>	Péptidos natriuréticos.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PA</b>	Presión arterial.
<b>PC</b>	Piruvato carboxilasa.
<b>PCC</b>	Propionil-CoA carboxilasa.
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol bisfosfato.
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C.
<b>PKG</b>	Proteína cinasa G.
<b>RVPT</b>	Resistencia vascular periférica total.
<b>SMVT</b>	Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio.
<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>SNP</b>	Sistema nervioso parasimpático.
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático.

## RESUMEN

La principal causa de mortalidad a nivel mundial son las enfermedades cardiovasculares. Una de éstas es la hipertensión arterial, la cual es un trastorno donde los vasos sanguíneos tienen una presión persistentemente alta. Uno de los sistemas más importantes para mantener los niveles adecuados de presión arterial, es el sistema de receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ . Los receptores  $\alpha_1$ , provocan vasoconstricción por el aumento de la concentración de calcio intracelular. A pesar de la existencia de una gran variedad de fármacos antihipertensivos, en casi la mitad de los casos no logran mantener la presión arterial en niveles óptimos. Por tanto, la búsqueda de nuevos fármacos o coadyuvantes que ayuden en el tratamiento de la hipertensión es de gran importancia. Se ha reportado que la biotina a concentraciones farmacológicas tiene un efecto hipotensor en ratas espontáneamente hipertensas, pero se desconocen los mecanismos por los cuales lo realiza. Por lo que es de gran importancia dilucidar los mecanismos de acción para la utilización como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión. En el presente trabajo, investigamos la participación de los receptores  $\alpha_{1D}$  y la movilización de calcio intracelular y extracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en ratas Wistar. Se observó que la incubación de biotina reduce la respuesta contráctil a fenilefrina, a serotonina y a  $\text{CaCl}_2$  en aorta de rata con y sin endotelio. Se observó un aumento de la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de ratas tratadas con L-NAME durante 15 días y esto no se presenta cuando se administra L-NAME y biotina simultáneamente. Estos resultados sugieren que la biotina produce vasorrelajación mediante la participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y la movilización de calcio intracelular y extracelular. Además, la administración de biotina previene el daño producido por la administración de L-NAME.

**Palabras clave:** Adrenérgico, biotina, hipertensión, calcio, vasorrelajante.

## ABSTRACT

The main cause of mortality worldwide is cardiovascular disease. One of these is hypertension, which is a disorder where the blood vessels have persistently high blood pressure. One of the most important systems to maintain adequate blood pressure levels is the  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptor system. The  $\alpha_1$  receptors cause vasoconstriction by increasing the concentration of intracellular calcium. Despite the existence of a wide variety of antihypertensive drugs, in almost half of the cases they fail to maintain blood pressure at optimal levels. Therefore, the search for new drugs or adjuvants that help in the treatment of hypertension is of great importance. Biotin pharmacological concentrations has been reported to have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats, but the mechanisms by which it is performed are unknown. It is therefore of great importance to elucidate the mechanisms of action for the use as adjuvant in the treatment of hypertension. In the present work, we investigated the participation of  $\alpha_{1D}$  receptors and the mobilization of intracellular and extracellular calcium in the vasorelaxing effect of biotin in Wistar rats. We observed that incubation of biotin reduces the contractile response to phenylephrine, to serotonin and to  $\text{CaCl}_2$  in the rat aorta with and without endothelium. We observed an increase in contractile response in aorta of rats treated with L-NAME for 15 days and did not occur when L-NAME and biotin were administered simultaneously. The results suggest that biotin produces vasorelaxation through the participation of  $\alpha_{1D}$  adrenergic receptors and the mobilization of intracellular and extracellular calcium. In addition, administration of biotin prevents damage produced by the administration of L-NAME.

**Key words:** Adrenergic, biotin, hypertension, calcium, vasorelaxant.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos y son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2012 murieron 17.5 millones de personas en el mundo, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Entre las ECV se incluyen (WHO, 2015):

- *la cardiopatía coronaria*: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco
- *las enfermedades cerebrovasculares*: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro
- *las arteriopatías periféricas*: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores
- *la cardiopatía reumática*: lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias del genero estreptococos
- *Las cardiopatías congénitas*: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento
- *insuficiencia cardíaca*: incapacidad del corazón de bombear la sangre necesaria a los órganos
- *hipertensión arterial*: elevación sostenida de la presión ejercida por la sangre en las arterias.

Los datos epidemiológicos sugieren que la hipertensión arterial es el factor de riesgo principal para padecer otras enfermedades cardiovasculares. De aquí la importancia del cuidado de la presión arterial (Kasko *et al.*, 2012).

## 1.2. Presión arterial

La presión arterial (PA) es la presión que ejerce la sangre contra los vasos, el valor de la PA depende de:

- La frecuencia cardiaca, el volumen y la fuerza de contracción, que dependen del retorno venoso. El cual a su vez depende de factores como la actividad constrictora o dilatadora de las venas, la actividad del sistema renal, etc. (Ira, 2011).
- La PA es controlada por la resistencia vascular periférica total (RVPT), que depende de la actividad constrictora y dilatadora de las arteriolas (Dvorkin y Cardinali, 2003).

La PA se mide en milímetros de mercurio (mm Hg) porque el manómetro de mercurio se ha usado como patrón de referencia para medir la presión desde su invención en 1846 por Poiseuille. Sin embargo, en la actualidad se tiende a emplear dispositivos electrónicos pero el principio de las mediciones y las unidades son los mismos (Hall, 2011; Favela *et al.*, 2008).

La PA se genera con la contracción de los ventrículos durante la sístole ventricular. La presión arterial adquiere su valor máximo (presión sistólica) y sus valores son aproximadamente de 120 mm Hg. La presión mínima coincide con la diástole ventricular (presión diastólica) y sus valores son entre 60-80 mm Hg y está en relación con la elasticidad de las arterias que transmiten la energía desde sus paredes a la sangre durante la diástole, la presión mínima indica un estado de resistencia vascular periférica. La resistencia vascular, al igual que el gasto cardiaco y la retención de líquidos depende directamente del sistema nervioso central, cuando éste es estimulado incrementa la presión sanguínea y contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión a través de la estimulación del corazón, de la vasculatura periférica y de los riñones (Gamboa, 2006; Favela *et al.*, 2008).

### 1.2.1. Regulación de la presión arterial

Para mantener los niveles de PA dentro de los valores normales se cuenta con mecanismos internos, nerviosos y hormonales. La membrana del músculo liso vascular contiene muchos tipos de proteínas receptoras que pueden iniciar o

inhibir el proceso contráctil. Este proceso contráctil participa en la regulación de la presión arterial (Hall, 2011; Barret *et al.*, 2013).

El control de la PA a corto plazo por el sistema nervioso simpático, se produce principalmente a través de los efectos del sistema nervioso sobre la resistencia vascular periférica total, la capacitancia vascular y sobre la capacidad de la bomba cardíaca (Hall, 2011; Tortora y Derrickson, 2006).

Sin embargo, el organismo también dispone de mecanismos potentes para regular la PA semana tras semana y mes tras mes. Este control a largo plazo de la PA está íntimamente relacionado con la homeostasis del volumen de líquido en el organismo, que está determinada por el balance entre la ingesta y la eliminación de líquidos (Hall, 2011; Barret *et al.*, 2013).

#### **1.2.1.1. Mecanismos nerviosos**

La circulación sanguínea está regulada por mecanismos nerviosos y otros propios del sistema circulatorio. El sistema nervioso autónomo (SNA) es el encargado de regular a la circulación. Este se divide en dos partes relativamente antagónicas denominadas sistema nervioso simpático (SNS) y sistema nervioso parasimpático (SNP) (Estañol *et al.*, 2009).

Una característica especialmente importante del control nervioso de la PA es su rapidez de respuesta, comenzando en segundos (s) y aumentando a menudo la presión hasta dos veces con respecto a lo normal entre 5 y 10 s. Por el contrario, la inhibición brusca de la estimulación nerviosa cardiovascular disminuye la PA hasta la mitad de lo normal entre 10 y 40 s, por lo que el control nervioso de la PA es el más rápido de todos nuestros mecanismos de control de la presión (Hall, 2011).

##### **1.2.1.1.1. Sistema nervioso simpático**

El SNS inerva a casi todos los vasos sanguíneos, con predominio de las arteriolas, que se consideran como los vasos de resistencia y por lo tanto disminuye la velocidad del flujo sanguíneo a través de los tejidos. La inervación de los vasos grandes hace posible que la estimulación simpática disminuya su

volumen, lo que empuja la sangre hacia el corazón y desempeña un papel muy importante en la regulación de la función de bomba cardíaca. La inervación de corazón por el SNS produce un aumento en la fuerza de contracción y en el ritmo cardíaco, mientras que las inervaciones del SNP en el mismo órgano producen los efectos contrarios (Estañol *et al.*, 2009).

#### **1.2.1.1.2. Sistema nervioso parasimpático**

El SNP inerva a los vasos sanguíneos en las regiones craneal y sacra y tiene mayor participación en la regulación cardíaca en comparación con el SNS generando una disminución en la fuerza y el ritmo contráctil en el corazón (Estañol *et al.*, 2009).

Los niveles de PA varían todo el tiempo por lo que su monitoreo constante es de gran importancia. Por lo que existen mecanismos reflejos de retroalimentación encargados de mantenerla con la menor variación posible ya que ejercen su acción directamente en el SNA y el sistema cardiovascular (Guyenet, 2006; Floras, 2009).

#### **1.2.1.1.3. Barorreceptores**

Los barorreceptores son estructuras sensibles a la presión mecánica que se encuentran en la pared de la mayor parte de los vasos arteriales. Pero dos estructuras principales de este tipo se identifican: el seno carotídeo y el seno aórtico. Este último se desempeña con presiones 30 a 50 mm Hg más altas que el seno carotídeo, lo que explica por qué el tiempo de reacción del seno carotídeo es más rápido que el del seno aórtico. Los barorreceptores tienen una función predominante en la regulación de la PA a corto y largo plazo y se activan por el aumento de presión sistólica, diastólica y del pulso sobre las paredes arteriales, causando la inhibición de los eferentes cardíacos, renales y vasomotores simpáticos, lo que conduce a la normalización de la PA (Guyenet, 2006; Estañol *et al.*, 2009).

#### **1.2.1.1.4. Quimiorreceptores**

Los quimiorreceptores son células quimiosensibles a la disminución de la concentración de oxígeno y al aumento de dióxido de carbono y de hidrogeniones (sólo actúan cuando la PA está por debajo de 80 mm Hg) y se encuentran ubicadas sobre las paredes vasculares de las cuales los más importantes son el cuerpo carotideo y el cuerpo aórtico. La activación de los quimiorreceptores periféricos por hipoxia e hipercapnia causa un aumento generalizado de la actividad simpática lo que aumenta la PA. En las terminaciones simpáticas cardiacas existen otros tipos de quimiorreceptores que responden al ácido láctico, prostaglandinas y a la bradicinina (Guyenet, 2006; Estañol *et al.*, 2009).

#### **1.2.1.2. Sistema de líquidos renal-corporal**

Este sistema está relacionado en el control a largo plazo de la PA está íntimamente relacionado con la homeostasis del volumen de líquido en el organismo, que está determinada por el balance entre la ingestión y la eliminación de líquidos (Hall, 2011).

##### **1.2.1.2.1. Sistema renina-angiotensina**

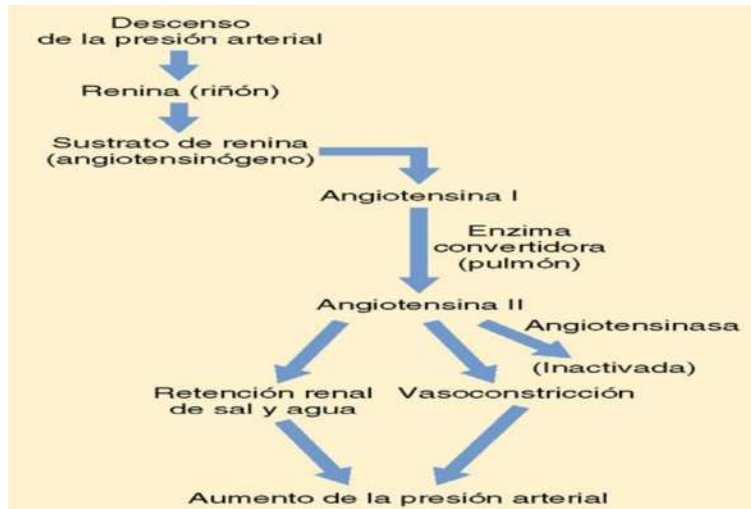
El sistema renina-angiotensina es un importante sistema regulador de la función cardiovascular y renal. El octapéptido angiotensina II (Ang II) es el principal mediador de este sistema y desempeña una participación importante en la función cardiovascular al influir en el tono vascular, la estructura, el equilibrio de líquidos y electrolitos a través de efectos directos sobre las células del músculo liso y el riñón (Schmieder *et al.*, 2007; Feldstein y Romero, 2007; Contra *et al.*, 2008; Bosnyak *et al.*, 2010).

La renina es una enzima proteolítica que se sintetiza en el aparato yuxtglomerular de la pared de la arteriola aferente renal, actúa sobre el angiotensinógeno producido por el hígado para generar angiotensina I, la cual, después es convertida proteolíticamente en angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), principalmente a nivel pulmonar (Figura 1). Aunque varios órganos tales como los vasos sanguíneos, el riñón, el corazón y el cerebro son capaces también de generar en forma local Ang II a

través de vías no dependientes de la ECA como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (cuyo sustrato es la angiotensina I) y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el angiotensinógeno). La Ang II estimula la sed y la secreción de hormona antidiurética y aldosterona (Schmieder *et al.*, 2007; Feldstein y Romero, 2007; Contra *et al.*, 2008; Bosnyak *et al.*, 2010).

Los efectos de la angiotensina II son mediados por receptores, de los que se han identificado los tipos 1 (AT<sub>1</sub>) y 2 (AT<sub>2</sub>). La Ang II ejerce la mayoría de los efectos fisiológicos a través de los receptores AT<sub>1</sub>. Los receptores AT<sub>2</sub> se expresan principalmente durante el periodo fetal y se asocian con la diferenciación y regeneración celular (Schmieder *et al.*, 2007; Feldstein y Romero, 2007; Contra *et al.*, 2008; Bosnyak *et al.*, 2010).

El receptor AT<sub>1</sub> para la angiotensina pertenece a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G, produce la activación de la fosfolipasa C y la movilización de calcio (aumenta el calcio intracelular estimulando la contracción muscular). Los receptores AT<sub>2</sub> antagonizan muchos efectos de los receptores AT<sub>1</sub>, como por ejemplo, la proliferación celular. La estimulación del receptor AT<sub>2</sub> puede proteger ciertos órganos contra la isquemia como por ejemplo el cerebro. En el músculo liso vascular o en las células endoteliales bloquea el intercambio de sodio por hidrogeniones en la pared celular lo que posteriormente resulta en el aumento de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y de la concentración de óxido nítrico, un potente vasodilatador (Schmieder *et al.*, 2007; Feldstein y Romero, 2007; Contra *et al.*, 2008; Bosnyak *et al.*, 2010).



**Figura 1. Mecanismo vasoconstrictor del sistema renina-angiotensina.** La renina actúa sobre el angiotensinógeno para catalizar la formación de angiotensina I, la cual se convierte en angiotensina II la cual por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II estimula la secreción de aldosterona y vasopresina provocando un aumento de la PA. (Imagen tomada de Hall, 2011).

### 1.2.1.3. Mecanismos humorales

Se refiere a un grupo de sustancias hormonales que de forma conjunta o individual regulan el aumento y el descenso de la PA (Robles-Cabrera *et al.*, 2014).

#### 1.2.1.3.1. Sustancias vasodilatadoras

##### *Cininas*

Las cininas son potentes péptidos vasorrelajantes generados en muchos tejidos y contribuyen de forma importante a la homeostasis de la PA. Las cininas actúan principalmente a través de dos receptores de membrana, el receptor B1R y B2R de bradicinina. Las cininas reducen la resistencia vascular y estimulan la excreción de agua y electrolitos (sodio) como una función del aumento del flujo sanguíneo renal. Una de estas cininas es la bradicinina, la cual es un péptido vasoactivo implicado en la regulación del flujo y presión sanguínea. La bradicinina provoca una dilatación arteriolar potente a través del óxido nítrico, lo cual reduce la presión sanguínea y aumenta la permeabilidad capilar (Hillmeister y Persson, 2012).

### *Histamina*

La histamina se almacena en los gránulos de células cebadas, mastocitos y plaquetas y es rápidamente liberada ante cualquier estímulo lesivo que afecte el tejido. Los efectos de la histamina que actúan a través de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> incluyen la vasodilatación y la permeabilidad vascular. Además, la porosidad capilar puede aumentar y con ello la pérdida de líquidos (Murali *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2007).

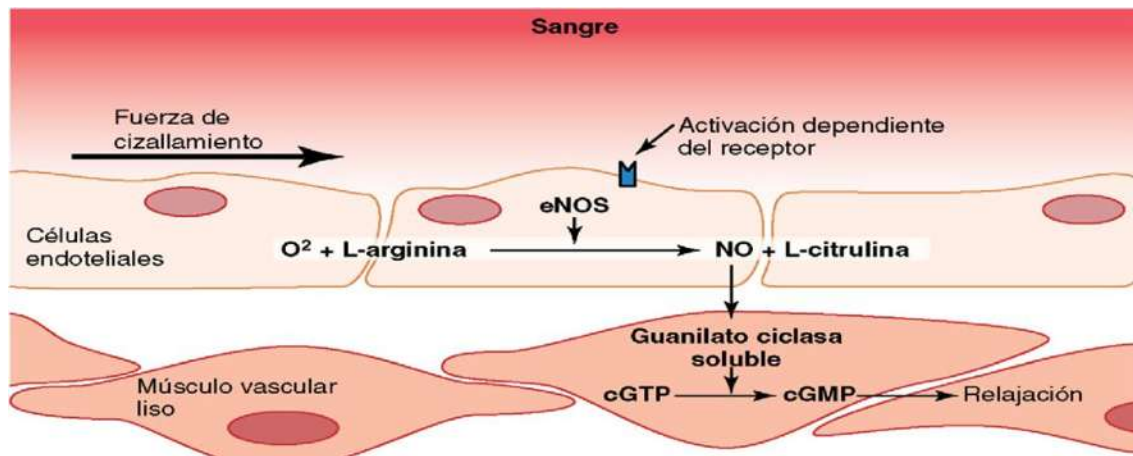
### *Péptidos natriuréticos*

El sistema péptido natriurético (NP) es un importante sistema endocrino, autócrino y parácrino, que consiste en una familia de péptidos que ejercen efectos cardiacos, renales (mediante la homeostasis del líquido y los electrolitos) y vasculares, los cuales provocan una relajación directa del músculo liso vascular, principalmente en las arterias aorta, renal e iliaca, debido al incremento de los niveles de cGMP, por lo cual tiene una función clave en el mantenimiento de la salud cardiovascular en general (Volpe, 2014).

### *Óxido nítrico*

El óxido nítrico (NO) es un gas que participa en la señalización de diferentes procesos biológicos, como la neurotransmisión y el tono vascular. Además, es un radical libre que presenta un electrón desapareado en la última capa y tiene una vida media de 4 a 8 segundos en medio acuoso oxigenado, por su inactivación por el anión superóxido formando peroxinitrito. El NO se genera por tres diferentes isoformas de la enzima NO sintasa (NOS). Las isoenzimas se denominan: NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS). Todas las isoformas de la NOS utilizan L-arginina como sustrato, oxígeno molecular y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como co-sustratos. Las NOS hidroxilan a la L-arginina dando como producto N $\omega$ -hidroxi-L-arginina, después las NOS oxidan N $\omega$ -hidroxi-L-arginina dando producto L-citrulina y NO. El NO producido por la NOS endotelial dilata todos los tipos de vasos

sanguíneos por medio de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y aumentando el cGMP en las células del músculo liso. (Figura 2) (Förstermann y Sessa, 2012; Dias *et al.*, 2011).



**Figura 2. Síntesis y función del óxido nítrico.** La enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) en las células endoteliales sintetiza el óxido nítrico (NO) a partir de arginina y oxígeno. El NO activa las guanilato ciclasas solubles en las células de músculos lisos vasculares, para producir la conversión de trifosfato de guanosina cíclico (cGTP) en monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que finalmente induce la relajación de los vasos sanguíneos (Imagen tomada de Hall, 2011).

Varios modelos experimentales existen para el estudio de la hipertensión arterial. Uno de los más utilizados es el modelo deficiente de óxido nítrico, en el estudio de la disfunción endotelial y se basa en la administración crónica *in vivo* de un inhibidor de la NOS tal como el N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). La inhibición crónica de las NOS disminuye los niveles de NO y con ello produce la disfunción endotelial que se caracteriza por el aumento de la respuesta adrenérgica y del remodelamiento arterial, renal y miocárdico, lo que conduce a una elevación sostenida de la PA, provocando hipertensión arterial (Török, 2008; Lopez-Mayorga, 2009).

### 1.2.1.3.2. Sustancias vasoconstrictoras

#### Endotelina-1

Las células endoteliales liberan sustancias vasoconstrictoras. Las endotelinas (ETs) son factores vasoconstrictores locales muy potentes, cerca de 10 a 100 veces más poderosos que la angiotensina II, se han identificado tres isoformas de la familia de las endotelinas: ET<sub>1</sub>, ET<sub>2</sub> y ET<sub>3</sub>. La ET<sub>1</sub> es la isoforma

principal, producida exclusivamente por las células endoteliales, que actúa como la contraparte natural del óxido nítrico. La ET-1 contribuye al tono vascular y regula la proliferación celular a través de la activación de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. El receptor ET<sub>A</sub> es el subtipo predominante en las células del músculo liso y la unión a su ligando fomenta la vasoconstricción como consecuencia del incremento citosólico de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> inducido por la activación de la fosfolipasa C. Además, la activación del receptor ET<sub>A</sub> provoca la disminución tanto de la expresión como de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), lo que acentúa la vasoconstricción (Marasciulo *et al.*, 2006; Ariza *et al.*, 2007; Wagner-Grau, 2010).

### *Vasopresina*

Es una hormona peptídica vasoconstrictora que es sintetizada por las neuronas magnocelulares del hipotálamo y se almacena en el lóbulo posterior de la glándula pituitaria y se activa en respuesta a la deshidratación y a por la disminución del volumen sanguíneo. La función importante de la vasopresina es la de aumentar la reabsorción de agua de los túbulos renales hacia la sangre. Para el control del volumen de líquido corporal y el control de la PA, por sus efectos constrictores sobre el músculo liso vascular. Estos efectos los lleva a cabo mediante la interacción con receptores específicos a la vasopresina acoplados a proteína G, de los cuales hay al menos tres tipos principales: V1, V2 y VS (o V1b). Los receptores V1 se localizan en las células del músculo liso vascular y median los efectos de la vasopresina sobre la PA a través de una variedad de vías de señalización, como la entrada de calcio y la activación de las fosfolipasas (Tortora y Derrickson, 2006; Petersen, 2006; Vincent, 2006).

### *Adrenalina y noradrenalina*

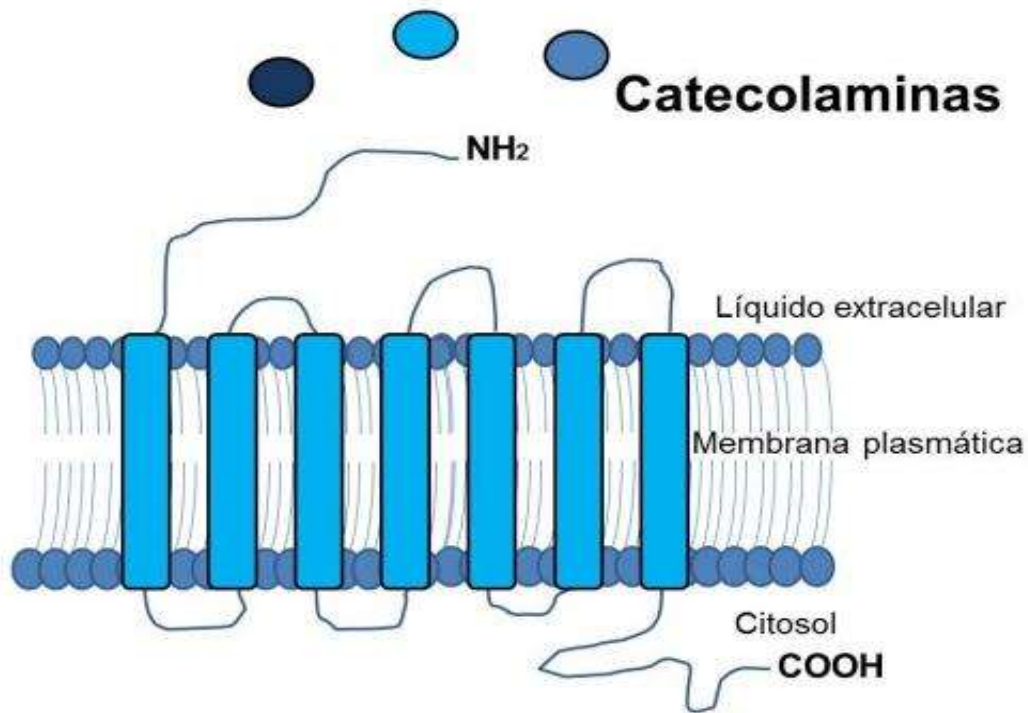
El término “catecolamina” designa a todos los compuestos que contienen el grupo catecol y una cadena lateral con un grupo amino, las de importancia fisiológica son la dopamina, la adrenalina y la noradrenalina. Son hormonas

secretadas por la médula suprarrenal conocidas como catecolaminas endógenas (Gutiérrez-García y Sánchez-Ocampo, 2016).

Los efectos de catecolaminas son desencadenados por acciones en dos clases de receptores, los adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ . La adrenalina activa ambos tipos de receptores de igual manera, en cambio la noradrenalina actúa en mayor grado en los receptores  $\alpha$ . La noradrenalina y la adrenalina intensifican la fuerza y la frecuencia de la contracción del corazón y dichas respuestas son mediadas por los receptores  $\beta_1$  (Barret *et al.*, 2013; Hall, 2011). El efecto sobre los receptores  $\alpha$ , causa vasoconstricción con isquemia en diversos territorios: hipertensión arterial pulmonar, oliguria por vasoconstricción renal, vasoconstricción de las arterias uterinas (Gutiérrez-García y Sánchez-Ocampo, 2016).

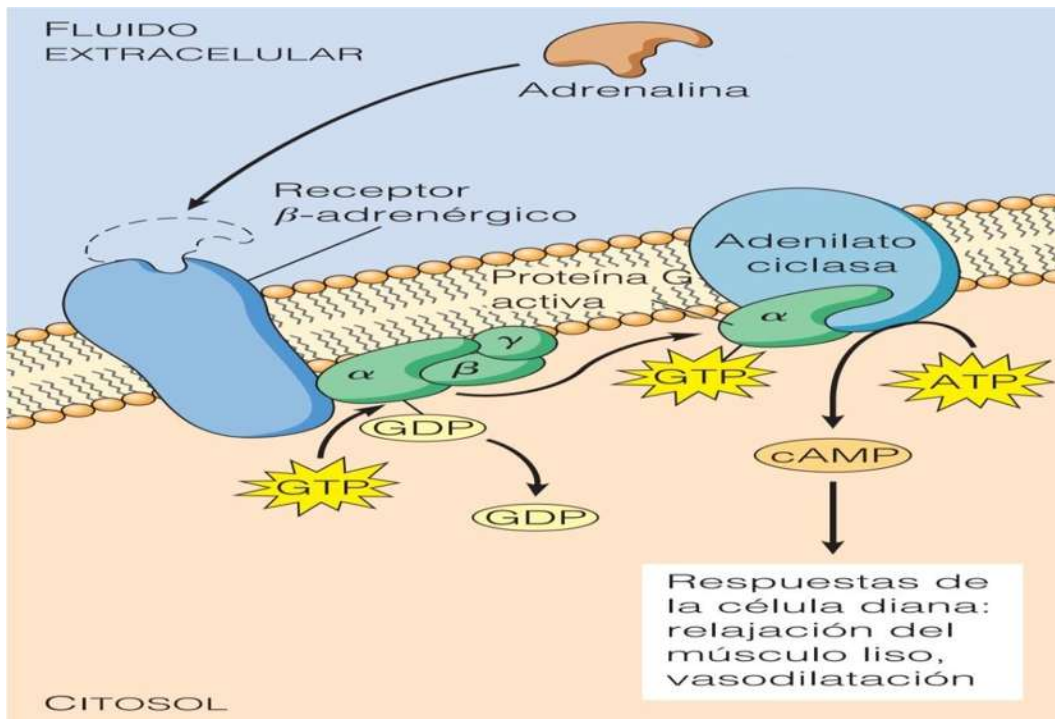
#### **1.2.1.4. Receptores adrenérgicos**

Son receptores de membrana, miembros de la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembranales, designados: adreorreceptores  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 3). Las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) endógenas los activan. Los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos estimulan vías de transducción de señales diferentes, debido a que están acoplados a proteínas G diferentes (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004; Shannon y Chaudhry, 2006).



**Figura 3. Estructura general de los receptores adrenérgicos.** Receptores de membrana de 7 dominios transmembranales, los cuales son activados por las catecolaminas endógenas.

Los *adrenorreceptores*  $\beta$  se dividen en tres subtipos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) y se consideran isorreceptores en la transducción hormonal, ya que generan la misma señal intracelular (Figura 4). Estimulan a la adenilato ciclasa, vía una proteína Gs, lo que incrementa el AMP cíclico (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004; Katzung, 2013). Al mismo tiempo activa una proteína cinasa (PKA), la cual en células cardiacas fosforila canales de calcio tipo L, lo que resulta en un efecto inotrópico y cronotrópico positivos, aumentando el gasto cardiaco (Nikolaev *et al.*, 2010).

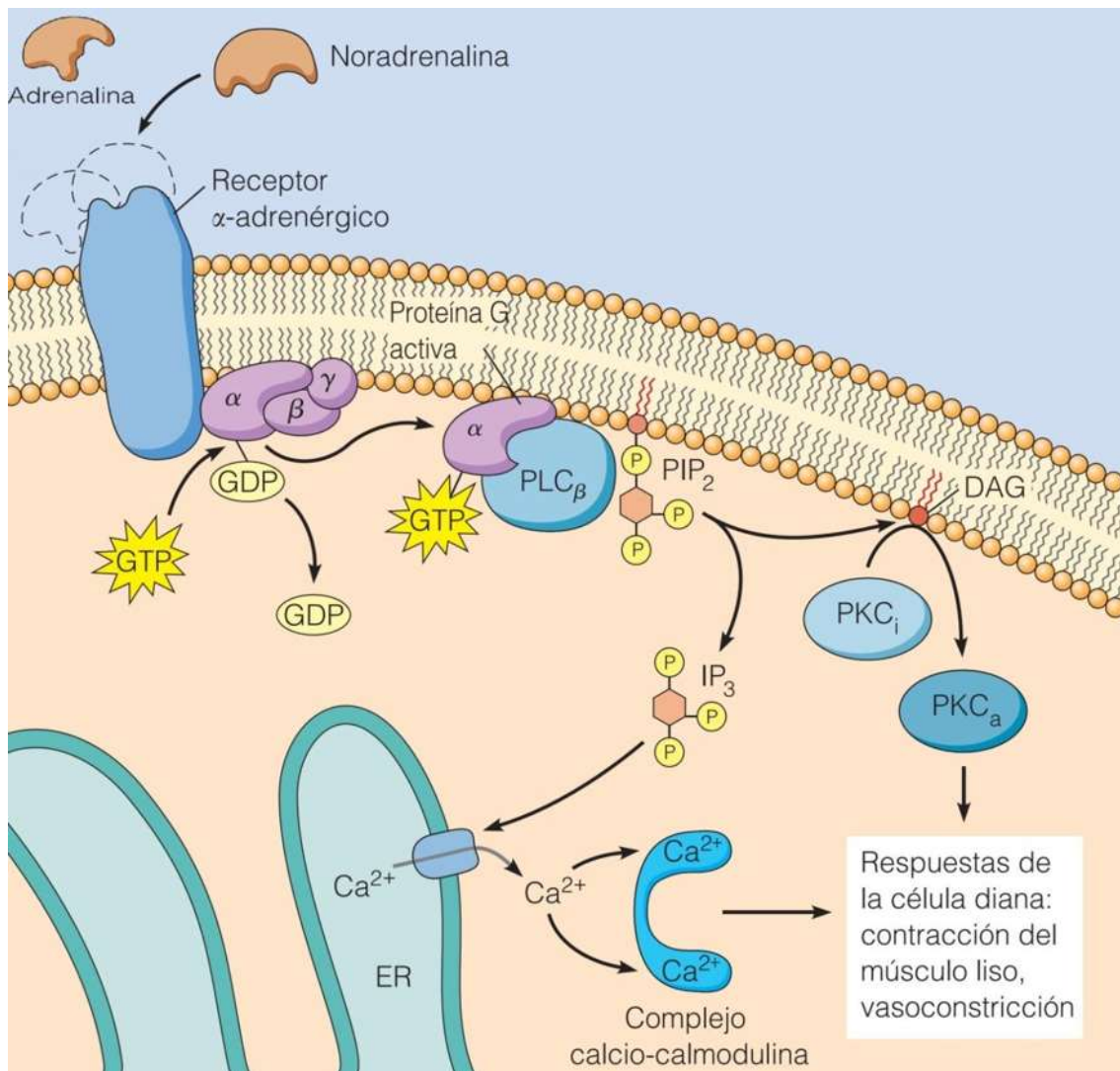


**Figura 4. Mecanismo vasodilatador de los receptores  $\beta$  adrenérgicos.** La unión de la catecolamina al receptor adrenérgico  $\beta$  estimula a la adenilato ciclasa, vía una proteína Gs, incrementando el AMP cíclico lo que produce vasodilatación. (Imagen modificada de Becker, 2007).

Los *adrenoreceptores*  $\alpha$  se dividen en dos familias ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ). Los receptores  $\alpha_2$ , que a su vez se dividen en  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ , disminuyen los niveles de AMP cíclico, al inhibir a la adenilato ciclasa vía una proteína  $G_i$ , lo que produce vasoconstricción aunque de manera débil (Molina *et al.*, 2004; Katzung, 2013).

Los receptores  $\alpha_1$ , que a su vez se dividen en  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ , actúan por medio de la activación de una proteína G específica llamada  $G_{q/11}$ , que estimula a una fosfolipasa C, conocida como  $C\beta$  (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004; Lyssand *et al.*, 2008), la cual escinde al fosfatidilinositol bisfosfato ( $PIP_2$ ) en dos moléculas: inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  es liberado al citosol, mientras que DAG permanece en la membrana. El DAG generado por la actividad de la fosfolipasa C, activa a miembros de la familia de la enzimas proteína cinasa C (PKC). Esta cinasa puede fosforilar grupos específicos de serina y treonina en canales de calcio tipo L lo que permite la entrada de calcio del espacio extracelular (Becker, 2007; Katzung, 2013). El inositol trifosfato es soluble en agua y se

difunde rápidamente a través del citosol, uniéndose a un canal de calcio dependiente del ligando, conocido como el receptor para IP<sub>3</sub> del retículo endoplásmico. Cuando el IP<sub>3</sub> se une, el canal se abre y libera iones de calcio al citosol. Entonces el calcio se une a la proteína calmodulina y el complejo calcio-calmodulina se une a la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) activándola, la cual fosforila a las cadenas ligera de miosina permitiendo la interacción con la actina produciéndose así la vasoconstricción (Figura 5) (Becker, 2007). Cada subtipo de los receptores  $\alpha_1$  tiene una eficacia diferente de acoplamiento a la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, el orden de eficacia de acoplamiento es:  $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$  (Schwinn y Afshari, 2006; Jensen *et al.*, 2011).



**Figura 5. Mecanismo vasoconstrictor de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos en el músculo liso vascular.** La unión de la catecolamina al receptor adrenérgico  $\alpha$  activa a una proteína G que

estimula a una fosfolipasa C, la cual escinde al PIP<sub>2</sub> formando IP<sub>3</sub> y DAG. El DAG activa a la PKC, la cual a su vez puede abrir canales de calcio tipo L. El IP<sub>3</sub> se une a canales de calcio del retículo endoplásmico liberando iones calcio los cuales se unen a la proteína calmodulina. Activándose así toda la maquinaria contráctil. (Imagen modificada de Becker, 2007).

En las arterias de las ratas, se ha detectado la presencia de RNAm para los tres adrenoreceptores  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ ) (Piascik *et al.*, 1994; Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004). Además, los adrenoreceptores  $\alpha_1$  se han implicado en procesos patológicos cardiovasculares como la hipertrofia cardiaca o las arritmias inducidas por isquemia (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004).

En las arterias que expresan el subtipo  $\alpha_{1D}$  como predominante para las respuestas contráctiles, se demostró que existe una población de receptores constitutivamente activos, lo que sugiere que los adrenoreceptores  $\alpha_{1D}$  ejercen una función moduladora en las arterias (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004).

Los receptores adrenérgicos se encuentran en diversos tipos musculares, en los cuales generan diferentes efectos, muchos de los cuales en conjunto regulan la PA. Mayormente los ubicados en el musculo liso y cardiaco.

### **1.3. Contracción muscular**

Los músculos son órganos cuya función es contraerse y relajarse y el resultado es la ejecución de los movimientos de los seres vivos. Los músculos pueden excitarse por medios químicos, eléctricos y mecánicos para producir un potencial de acción que se transmite a lo largo de sus membranas celulares (Tresguerres *et al.*, 2005 y Barret *et al.*, 2013). Dos tipos generales de músculos existen, el músculo estriado y el músculo liso. A su vez el primero se clasifica en esquelético y cardiaco. Algunos de los mismos principios básicos de la contracción se aplican a todos los tipos diferentes de músculo, como la proteína contráctil miosina y la proteína citoesquelética actina. Aunque la mayor parte de los músculos esqueléticos se contraen y relajan rápidamente, la mayor parte de las

contracciones del músculo liso son contracciones tónicas prolongadas, que a veces duran horas o incluso días (Tresguerres *et al.*, 2005 y Hall, 2011).

### **1.3.1. Músculo estriado**

El músculo estriado está formado por fibras musculares individuales, la mayor parte de los músculos comienza y termina en tendones. Las fibras musculares están dispuestas en forma paralela entre los extremos tendinosos y las fibras tendinosas a su vez se agrupan en haces para formar los tendones musculares, que después se insertan en los huesos. Cada fibra muscular es una sola célula multinucleada, larga, cilíndrica, rodeada por membrana celular, lo que se conoce como sarcolema (Barret *et al.*, 2013; Hall, 2011). El sarcolema contiene enzimas, lípidos y partículas de glucógeno y aloja a los núcleos, las mitocondrias, las miofibrillas, los sistemas tubulares y otros orgánulos especializados (Tresguerres *et al.*, 2005).

Las miofibrillas son las estructuras más abundantes dentro de la fibra muscular y son responsables de la contracción y la relajación. Se orientan paralelamente a lo largo de la fibra y están compuestas por tres tipos de filamentos proteicos: los delgados (principalmente formados por actina), los gruesos (principalmente formados por miosina) y los conectores (de titina) (Tresguerres *et al.*, 2005). Las fibras musculares están formadas por miofibrillas, las cuales se dividen en filamentos individuales. Estos miofilamentos contienen varias proteínas que en conjunto conforman la maquinaria contráctil del músculo estriado. El mecanismo contráctil del músculo estriado depende sobre todo de las proteínas miosina II, actina, tropomiosina y troponina. La troponina está formada por tres subunidades: la troponina I, la troponina T y la troponina C (Barret *et al.*, 2013).

El proceso por el cual se produce la contracción muscular es el deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos. El deslizamiento durante la contracción muscular ocurre cuando las cabezas de miosina se unen con firmeza a la actina, se flexionan en la unión de la cabeza con el cuello y luego se desprenden. En el músculo en reposo, la troponina I se une con la actina y la tropomiosina y cubre los sitios donde las cabezas de miosina interactúan con la

actina. También cuando está en reposo, la cabeza de miosina contiene ADP unido con fuerza. Después de un potencial de acción, aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y el  $\text{Ca}^{2+}$  libre se une con la troponina C. Esta unión induce el debilitamiento de la interacción de troponina I con la actina y expone el sitio de unión de la actina para la miosina a fin de permitir la formación de puentes cruzados de miosina. Cuando se forma el puente cruzado se libera ADP, lo que induce un cambio en la conformación de la cabeza de miosina que mueve el filamento delgado sobre el filamento grueso. El ATP se une rápidamente con el sitio libre en la miosina, lo que hace que la cabeza de miosina se desprenda del filamento delgado. El ATP se hidroliza y se libera fosfato inorgánico (Pi), lo que produce un nuevo levantamiento de la cabeza de miosina y esto completa el ciclo. Después de una fracción de segundo los iones calcio son bombeados de nuevo hacia el retículo sarcoplásmico por una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana y permanecen almacenados en el retículo hasta que llega un nuevo potencial de acción muscular; esta retirada de los iones calcio desde las miofibrillas hace que cese la contracción muscular (Barret *et al.*, 2013; Hall, 2011).

#### **1.3.1.1. Músculo esquelético**

Su nombre se debe porque la mayoría de los músculos se fijan a los huesos y permitan su movimiento, forma la mayor parte del tejido muscular del cuerpo. Está integrado por haces paralelos de fibras largas y multinucleadas con bandas transversales, es capaz de efectuar potentes contracciones y es innervado por nervios motores somáticos y branquiales casi siempre está bajo control voluntario. (Drake *et al.*, 2005). La contracción consiste en el acortamiento muscular que acerca entre sí el origen y la inserción correspondientes a cada músculo. Este acortamiento es consecuencia de la disminución en la longitud sarcomérica (Tresguerres *et al.*, 2005).

#### **1.3.1.2. Músculo cardíaco**

Las estriaciones del músculo cardíaco son similares a las del músculo estriado, este tipo de músculo se haya solo en las paredes del corazón y en algunos de los grande vasos en proximidad a la localización en la que éstos se

unen al corazón (Tortora y Derrickson, 2006). Consiste en una red ramificada de células individuales interrelacionadas eléctrica y mecánicamente para actuar como una unidad funcional. Sus contracciones son menos potentes que las del músculo esquelético y es muy resistente a la fatiga. El músculo cardíaco es innervado por nervios motores viscerales y su acción es involuntaria, es regulado por el sistema nervioso autónomo (Drake *et al.*, 2005).

### **1.3.2. Músculo liso**

El músculo liso se encuentra en las paredes de las estructuras huecas internas (excepto el corazón), como los vasos sanguíneos, las vías aéreas y gran parte de las vísceras de la cavidad abdominal pélvica. También puede hallarse en la piel asociado a los folículos pilosos (Tortora y Derrickson, 2006; Tresguerres *et al.*, 2005). Está compuesto por células uninucleadas, delgadas y fusiformes; carece de estrías y su acción suele ser involuntaria ya que al igual que el músculo cardíaco, es regulado por neuronas que forman parte de la división autónoma del sistema nervioso central y por hormonas liberadas por las glándulas endocrinas. Las capas que forman este tipo de músculo permiten la modificación continua del volumen del órgano y de esta manera, por ejemplo, ajustan el flujo sanguíneo en los vasos o la conductancia de las vías aéreas, o efectúan el vaciado de la vejiga y la propulsión de comida (Tresguerres *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2005).

El músculo liso tiene actina y miosina II y se deslizan una sobre otra para producir la contracción. Sin embargo, no están dispuestas en patrones regulares, como en el músculo estriado o el cardíaco, por lo que no existen estriaciones. Esta carencia de estriaciones es una característica que los distingue del músculo esquelético y cardíaco. El músculo liso también contiene tropomiosina, pero no cuenta con troponina. Las isoformas de actina y miosina difieren de las del músculo estriado. Las células tienen retículo sarcoplásmico, pero es menos extenso que el del músculo estriado o el cardíaco. En general, el músculo liso contiene pocas mitocondrias y depende en gran medida de la glucólisis para cubrir sus necesidades metabólicas (Barret *et al.*, 2013).

Como en el músculo estriado, el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una función prominente en el inicio de la contracción del músculo liso. La contracción se genera cuando ocurre

un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, debido a la liberación desde almacenes intracelulares o a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular a través de canales iónicos específicos operados por receptor. A diferencia del músculo estriado, el músculo liso carece de troponina, por lo que la regulación de la contracción está asociada a la miosina y no a la actina, la miosina del músculo liso debe fosforilarse para la activación de la ATPasa de miosina, lo cual ocurre cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se une con calmodulina y el complejo resultante activa la cinasa de la cadena ligera de miosina dependiente de calmodulina. Esta enzima cataliza la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en la serina de la posición 19; la fosforilación aumenta la actividad de la ATPasa. Cuando la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye, la miosina se desfosforila por acción de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina en la célula, la desfosforilación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina conduce a la relajación del músculo liso (Barret *et al.*, 2013; Tresguerres *et al.*, 2005; Hall, 2011).

La membrana de la célula muscular lisa tiene muchos más canales de calcio activados por el voltaje que el músculo esquelético, por lo que el flujo de iones calcio hacia el interior de la fibra es el principal responsable del potencial de acción en el músculo liso (Hall, 2011).

### **1.3.2.1. Tipos de músculo liso**

#### *Unitario*

Se refiere a una masa de cientos a miles de fibras musculares lisas que se contraen juntas como una única unidad. Las fibras habitualmente están dispuestas en láminas o fascículos, y sus membranas celulares están adheridas entre sí en múltiples puntos, de modo que la fuerza que se genera en una fibra muscular se puede transmitir a la siguiente. Además, las membranas celulares están unidas por muchas uniones en hendidura a través de las cuales los iones pueden fluir libremente desde una célula muscular a otra, de modo que los potenciales de acción o el flujo iónico simple sin potenciales de acción puede viajar desde una fibra a otra y hacer que las fibras musculares se contraigan simultáneamente. Este

tipo de músculo se encuentra en el aparato digestivo, las vías biliares, los uréteres, el útero y muchos vasos sanguíneos.

#### *Multiunitario*

Este tipo de músculo liso está formado por fibras musculares lisas separadas. Cada una de las fibras actúa independientemente de las demás y con frecuencia está inervada por una única terminación nerviosa, como ocurre en las fibras musculares esqueléticas. Cada una de las fibras se puede contraer independientemente de las demás, y su control se ejerce principalmente por señales nerviosas. Algunos ejemplos de este tipo de músculo liso son el músculo ciliar del ojo, el músculo del iris del ojo y los músculos piloerectores que producen la erección del pelo cuando los estimula el sistema nervioso simpático.

### **1.4. Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial es una enfermedad caracterizada por un aumento sostenido de la presión arterial a cifras  $\geq 140/90$  mm Hg (NOM, 2009), esta alteración en la presión es el factor de riesgo más importante para las enfermedades cardiovasculares (WHO, 2015).

La hipertensión arterial sostenida daña los vasos sanguíneos de los riñones, corazón y cerebro y eleva la incidencia de insuficiencia renal, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca, apoplejía y demencia. El diagnóstico de hipertensión se basa en mediciones repetidas y reproducibles de una PA alta (Hall, 2011).

En México el 25.5% de las personas mayores de 20 años padecen hipertensión arterial y solo 58.7% tienen la PA controlada de forma adecuada (ENSANUT, 2016).

### 1.4.1. Clasificación

#### 1.4.1.1. Clasificación según los niveles de presión sanguínea en mm Hg

Diferentes clasificaciones existen para estratificar el estadio de la hipertensión arterial y su riesgo para desarrollar complicaciones cardiovasculares, pero son muy arbitrarias, una de las más utilizadas es la definición y la clasificación establecidas por el *VIII Joint National Committee of Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 8; Tabla 1)*. Para la clasificación se toma en cuenta la cifra más alta, también se incluyen los casos con hipertensión arterial sistólica aislada (James *et al.*, 2014).

Presión arterial (PA)	PA sistólica (mm Hg)	PA diastólica (mm Hg)
Normal	< 120	y < 80
Prehipertensión	120-139	ó 80-89
Hipertensión Etapa 1	140-159	ó 90-99
Hipertensión Etapa 2	≥ 160	ó ≥ 100

Tabla1. Clasificación de la PA según el JNC 8.

#### 1.4.1.2. Clasificación de la hipertensión según su etiología

La hipertensión se puede clasificar según su etiología, en hipertensión primaria e hipertensión secundaria.

*Hipertensión primaria:* Se presenta en la mayor parte de los casos (90-95%), no hay una causa identificable. Entre los mecanismos participan la herencia genética, alteraciones en el sistema nervioso simpático, el volumen sanguíneo, el gasto cardíaco, las resistencias arteriolas periféricas, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la sensibilidad al sodio y la resistencia a la insulina (Kasko *et al.*, 2012; NOM, 2009).

*Hipertensión secundaria:* Es resultado de condiciones preexistentes, como insuficiencia cardíaca congestiva, arteriosclerosis, quemaduras, inducida por medicamentos, inducida por tóxicos, inducida por el embarazo, trastornos de riñón, trastornos del hígado, trastornos de glándula tiroidea y de glándulas suprarrenales. En alguno de estos casos, la elevación de la PA es reversible cuando la condición preexistente se trata con éxito o se revierte (Kasko *et al.*, 2012; NOM, 2009).

#### **1.4.2. Factores que aumentan el riesgo de padecer hipertensión arterial**

Un factor de riesgo se define como aquella situación o circunstancia que se asocia, estadísticamente, con una mayor incidencia de hipertensión.

*Edad y género:* A partir de los 50 años los valores de presión sistólica y diastólica aumentan debido a la rigidez de las arterias de conductancia por la aterosclerosis y la acción de sustancias vasoconstrictoras de las cuales aumenta su síntesis. Antes de los 45 años la prevalencia de hipertensión arterial es más alta en hombres que en mujeres, pero después de la menopausia la prevalencia se invierte, lo que hace sospechar que los estrógenos tienen en la mujer un efecto cardiovascular protector importante (García *et al.*, 2009; Tovar, 2008).

*Tabaquismo:* El tabaquismo es un factor de riesgo conocido para padecer hipertensión. El consumo de tabaco promueve el desarrollo de aterosclerosis y causa alteraciones en la estructura de las células endoteliales y el monóxido de carbono unido a la hemoglobina causa hipoxia, lo que conduce a disfunción endotelial, disminuyendo el óxido nítrico endotelial (Lekuona *et al.*, 2009; Erhardt, 2009; Morales *et al.*, 2013).

*Sedentarismo/dieta hipercalórica:* El sedentarismo incrementa la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo y por tanto, la obesidad, al disminuir las necesidades de energía del organismo (Ignarro *et al.*, 2007). El aumento de los lípidos en la sangre produce las hiperlipidemias, que favorecen el proceso aterosclerótico en las arterias coronarias lo cual ocasiona la disminución de la luz de las mismas (Freitas *et al.*, 2009).

*Historia familiar:* El riesgo de sufrir hipertensión arterial es mayor si existen antecedentes familiares de enfermedades del corazón (Robles, 2001). En la actualidad se acepta que la hipertensión arterial esencial es mayormente un síndrome con compromiso multifactorial y generalmente poligénico y familiar, ya que en ratones se demostró la posibilidad de generar modelos transgénicos hipertensivos. Entre las familias hipertensas, se estima que un 30 a 60% de ellas tienen una base genética poligénica (Gamboa, 2006). La hipertensión se cree que puede ser determinada por alteraciones en sistemas biológicos, originados a partir de la combinación de genes como por ejemplo padecimientos renales y la sobreproducción de sustancias vasoconstrictoras, contribuyendo al aumento en los niveles tensionales de la PA (Weschenfelder y Gue, 2012).

*Alta ingesta de sodio:* Existe una relación directa entre el mayor consumo de sodio y elevación de la PA. A medida que se acumula la sodio en el organismo aumenta indirectamente el volumen de líquido extracelular por dos razones: el aumento de la osmolalidad y esto a su vez estimula el centro de la sed en el cerebro haciendo que se beba cantidades extras de agua. Y el aumento de la osmolalidad causado por el exceso de sal en el líquido extracelular también estimula el mecanismo secretor del eje hipotálamo-hipófisis posterior para segregar cantidades mayores de hormona antidiurética, la cual provoca la reabsorción renal de cantidades mayores de agua del líquido tubular renal (Ignarro *et al.*, 2007). Este aumento de la reabsorción tubular renal de sodio pueden oponerse a los riñones de manera que se requiere un nivel más alto de presión de perfusión renal - arterial para mantener un equilibrio neto de sodio. En resumen la ingesta de sodio puede activar una serie de mecanismos neuronales, endocrinos o paracrinicos y vasculares, todos los cuales tienen el potencial de aumentar la PA (Kotchen *et al.*, 2013).

#### **1.4.3. Tratamiento farmacológico contra la hipertensión arterial**

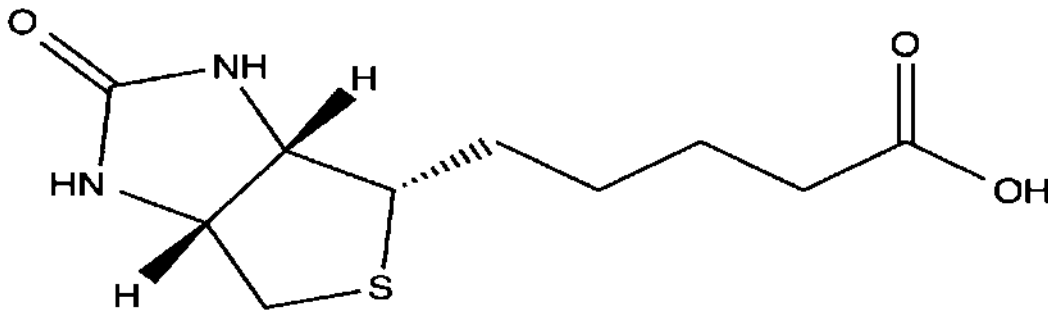
Con la finalidad de normalizar los niveles de PA, se apoya de tratamiento farmacológico, el cual incluye diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> para la angiotensina, antagonistas de

los receptores alfa-1 adrenérgicos y bloqueadores de los canales de calcio. En la mayoría de los casos los diuréticos se utilizan como terapia inicial en la mayoría de las personas con hipertensión, ya sea como único medicamento o en combinación con otras clases de antihipertensivos, aunque esto puede variar según la raza y las condiciones del paciente. A pesar de la existencia de una gran variedad de fármacos antihipertensivos, estos muchas veces no logran disminuir la PA a niveles seguros. Además, de que se debe prestar atención en los efectos secundarios de éstos, la cual es una de las razones por la que los pacientes suspenden el tratamiento, por lo que se sigue en la búsqueda de nuevos fármacos o coadyuvantes que ayuden en la disminución de la PA (James *et al*, 2014).

Por otro lado se han utilizado una variedad de vitaminas para el tratamiento de enfermedades del síndrome metabólico, por ejemplo los retinoides para el metabolismo de la glucosa y lípidos (Rhee y Plutzky, 2012). El ácido nicotínico (vitamina B3) se ha investigado como una terapia para el tratamiento de la aterosclerosis y aumenta los niveles de colesterol HDL y disminuye los niveles del LDL (Lee *et al.*, 2009) y se ha observado que la vitamina D3 mejora significativamente el metabolismo de la glucosa y que además disminuye los niveles de triglicéridos (Wehr *et al.*, 2011). También se ha reportado que la vitamina biotina tiene la capacidad de disminuir la PA de manera significativa en ratas espontáneamente hipertensas, pero se desconocen los mecanismos por los cuales logra este efecto, por lo que resulta de interés su abordaje, para evaluar el uso de la biotina como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión arterial (Watanabe *et al.*, 2008).

## 1.5. Biotina

La biotina o vitamina B7 o H, es una vitamina hidrosoluble esencial para todos los seres vivos. Su estructura consta de un anillo de imidazolidona enlazado a un anillo de tetrahidrotiofeno y unido con una cadena lateral de ácido valérico (Figura 6) (Fernández-Mejía y Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011; Vilches-Flores *et al.*, 2010).



**Figura 6. Estructura química de la biotina.** Es un compuesto heterocíclico, con un anillo ureido, unido a un anillo de tetrahidrotiofeno y a su vez el ácido valérico unido a éste. Y contiene tres centros quirales (Imagen tomada de Vásquez y Yasmín, 2016).

Los animales no pueden sintetizar biotina, por lo que nuestro requisito de biotina se cumple en parte a través de la reutilización endógena de la biotina, a través de la captura de biotina generada en la flora intestinal y a través de la dieta. La biotina se encuentra presente en la leche, en los productos lácteos, en los huevos, en los cereales, en las legumbres, en la coliflor, los cacahuates, en los tomates, etcétera; principalmente unida al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina formando el dímero biocitina, péptidos biotinilados o en forma libre. (Vilches y Fernández, 2005).

La ingesta requerida de biotina varía de acuerdo a las necesidades específicas, como la edad, el género, etc. La cual va desde los 5  $\mu\text{g}/\text{d}$  en lactantes y niños hasta los 30–35  $\mu\text{g}/\text{d}$  en personas adultas (Mock, 2006).

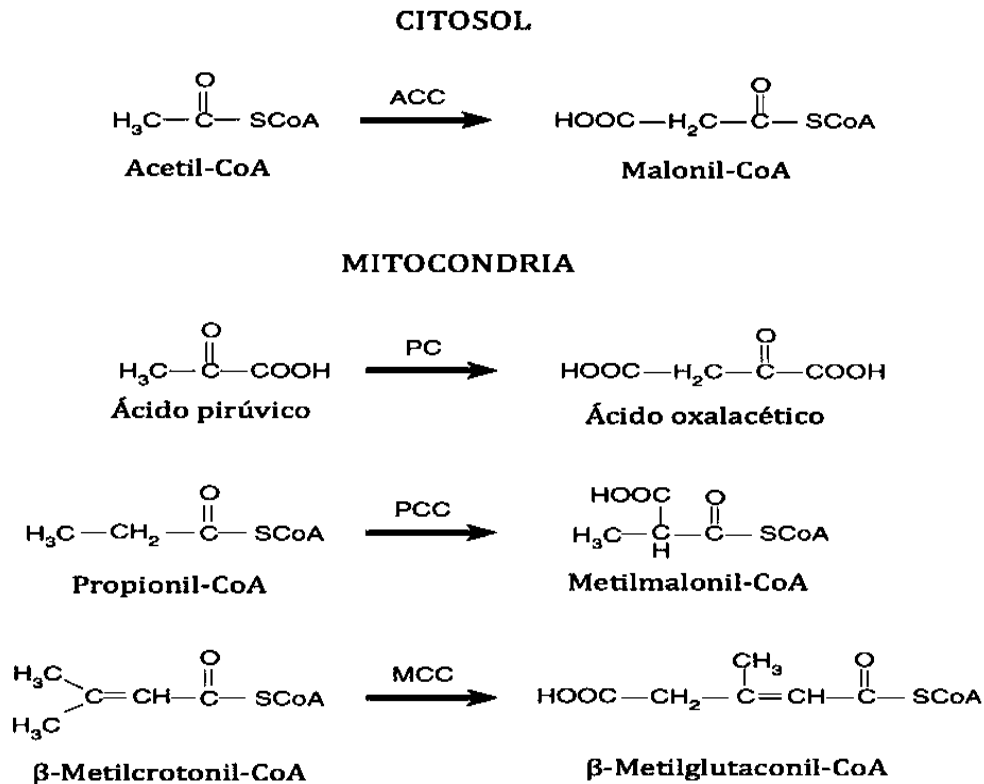
Para su absorción se requiere romper el enlace semipeptídico por acción de la biotinidasa pancreática. La biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno y posteriormente pasa al torrente

sanguíneo y entra a las células mediante un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) el cual reconoce principalmente la porción del ácido valérico (Chatterjee *et al.*, 1999; Vilches y Fernández, 2005;).

### **1.5.1. Función de la biotina**

La función clásica de la biotina tanto en animales como en plantas es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas. Las cuales participan en diferentes rutas metabólicas de gran importancia para los seres vivos, transfiriendo un grupo carbonilo del bicarbonato a los intermediarios metabólicos (Figura 7) (Fernández-Mejía y Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011; Aguilera-Méndez *et al.*, 2013):

- acetil-CoA carboxilasa (ACC 1 y 2), la ACC1 participa en la síntesis de ácidos grasos mientras que la ACC2 participa en la oxidación de ácidos grasos;
- piruvato carboxilasa (PC), la cual participa en la ruta de la gluconeogénesis;
- propionil-CoA carboxilasa (PCC); la cual participa en el metabolismo de aminoácidos, colesterol y ácidos grasos de cadena impar
- Metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) la cual participa en el metabolismo de leucina

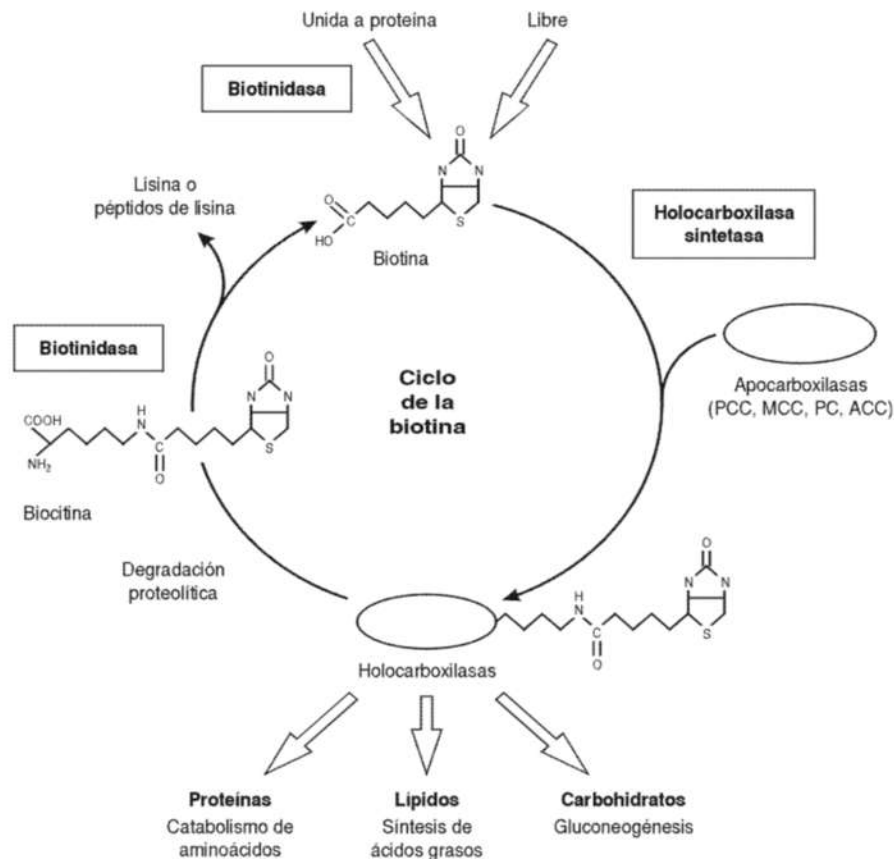


**Figura 7. Reacciones catalizadas por las carboxilasas que dependen de la biotina como cofactor.** ACC, acetil carboxilasa; PC, Piruvato carboxilasa; PCC, Propionil-CoA carboxilasa; MCC, Metilcrotonil-CoA carboxilasa (Tomada de Aguilera-Méndez *et al.*, 2013)

### 1.5.2. Ciclo de la biotina

Se conoce como "ciclo de la biotina" a su reutilización mediante la liberación de la biotina de carboxilasa después de la degradación proteolítica (Figura 8). Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, sin actividad enzimática, en el citoplasma. Al unírseles la biotina covalentemente al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina por acción de la holocarboxilasa sintetasa, se forma la proteína activa u holoenzima en una reacción de dos etapas dependiente de trifosfato de adenosina (ATP), generando monofosfato de biotinil-5'-adenosina como intermedio. En la segunda etapa, el grupo biotinilo se transfiere a apoenzimas carboxilasa formando un enlace semipeptídico con lisina, localizado dentro de la secuencia Ala-Met-Lys-Met, altamente conservada en las apocarboxilasas (Fernández-Mejía y Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011).

Posteriormente, la biotina puede ser reciclada e integrarse como grupo prostético a nuevas carboxilasas sintetizadas, o bien puede catabolizarse formando otros productos derivados y excretarse, a partir de holocarboxilasas degradadas proteolíticamente por la biotinidasa en el intestino, que escinde la biotina de la biotinil-lisina (biocitina) o pequeños péptidos que contienen biotina (Vilches y Fernández, 2005).



**Figura 8. Ciclo de la biotina.** La biotina se une a las apocarboxilasas mediante la holocarboxilasa sintetasa permitiendo así su activación y posterior acción catalítica. La proteólisis de las holocarboxilasas se lleva a cabo por acción de la biotinidasa, la biotinil-lisina (biocitina). La biotina puede ser reciclada o bien puede catabolizarse y excretarse (Tomada de Meléndez, 2000)

### 1.5.3. Funciones de la biotina a concentraciones farmacológicas

En 1960 se sugirió que la biotina podía intervenir en diversas funciones biológicas de manera independiente a su función como grupo prostético de las carboxilasas y además estas funciones no eran exclusivas de la biotina sino también de sus metabolitos (Zempleni, 2005). Actualmente se ha establecido que

además de su función clásica, la biotina modifica la expresión génica. Entre los procesos biológicos que modifica incluyen la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas y el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Vilches y Fernández, 2005).

En un estudio de microarreglos en células mononucleadas de sangre periférica humana, se encontró que la biotina aumenta la expresión de 139 genes, mientras que disminuye la de otros 131, por lo que el efecto de la biotina sobre la expresión genética es muy amplio (Wiedmann *et al.*, 2004).

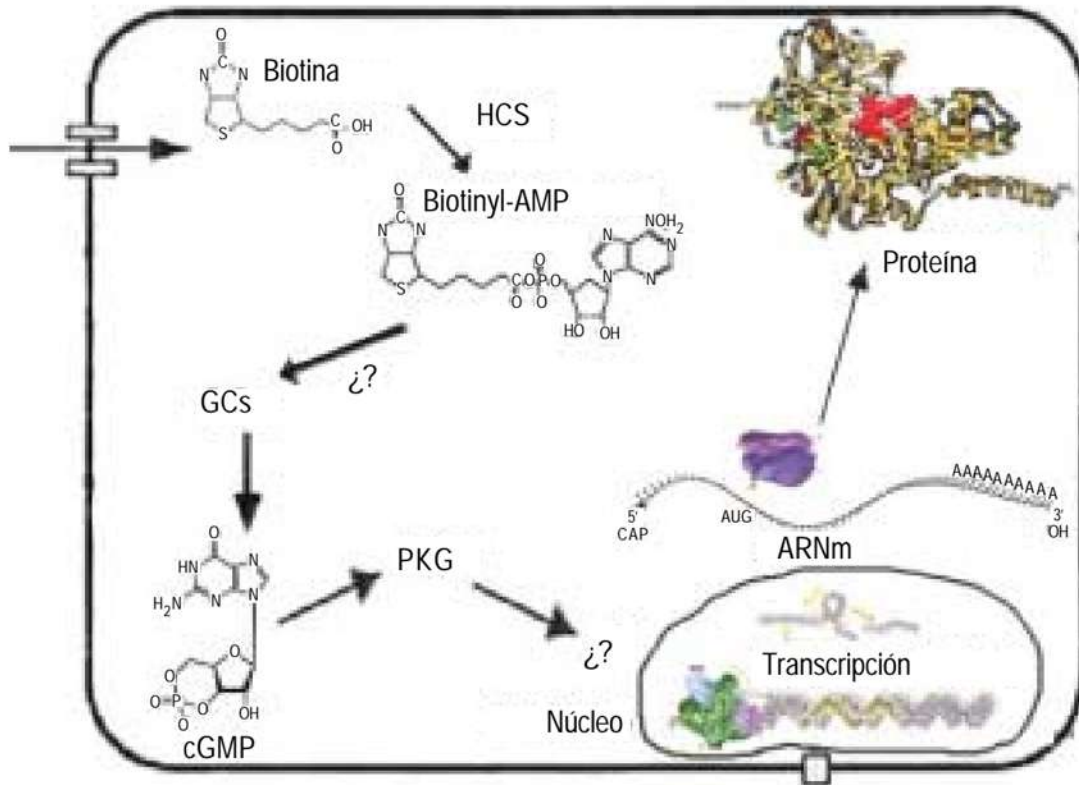
A pesar del amplio efecto de la biotina sobre la transcripción de genes y su uso actual como agente farmacológico, los mecanismos moleculares de la vitamina como modulador genético son en gran parte desconocidos. Dos mecanismos diferentes parecen estar involucrados en los efectos genéticos de la biotina (Vilches-Flores *et al.*, 2010):

1. Activación de la guanilato ciclasa soluble.
2. Biotinilación de histonas.

#### **1.5.4. Activación de la guanilato ciclasa soluble**

En 1982 Vesely observó que la adición de biotina a extractos celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble. Diversos estudios han identificado que un denominador común en el efecto de la biotina sobre la expresión genética involucra el incremento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la elevación de las concentraciones de guanosil monofosfato cíclico (cGMP) intracelular y la participación de la proteína cinasa G (PKG) (Vilches-Flores *et al.*, 2010).

Solórzano-Vargas y colaboradores propusieron que el biotinil-AMP, un intermediario de la acción catalítica de la holocarboxilasa sintetasa, por un mecanismo aún no conocido, activa la guanilato ciclasa soluble. La activación de guanilato ciclasa conduce a un aumento de la producción de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que a su vez estimula la proteína quinasa G (PKG) favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión de los genes (Figura 9) (Vilches y Fernández, 2005; Vilches-Flores *et al.*, 2010).



**Figura 9. Mecanismo de acción de la biotina a través del GMPc.** El biotilil-AMP formado por la holocarboxilasa sintetasa (HCS), aumenta la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs) por un mecanismo desconocido, incrementando los niveles de cGMP, el cual activa a la PKG que participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la expresión genética. (Imagen tomada de Vilches y Fernández, 2005)

### 1.5.5. Biotinilación de histonas

Es una reacción catalizada por la HCS, que consiste en la unión covalente de biotina a los residuos de lisina en el extremo amino terminal de las histonas H2A, H3 y H4 (se ha identificado principalmente en la heterocromatina pericentromérica y se ha asociado con el silenciamiento de genes, la condensación mitótica de la cromatina y con la respuesta celular al daño del ADN), entre las funciones relacionadas con la biotinilación de histonas está un decremento de linfocitos polimorfonucleares durante la proliferación celular (Godínez-Rubí *et al.*, 2012; Aguilera *et al.*, 2013).

## 2. ANTECEDENTES

Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios en pequeñas cantidades para el metabolismo y que las células no pueden fabricar a excepción de muy pocas, su uso farmacológico en diversas patologías se ha reportado desde hace tiempo con mucho éxito, por lo que es de gran interés el estudio de los mecanismos moleculares y nuevas funciones. Por ejemplo los retinoides para el metabolismo de la glucosa y lípidos (Rhee y Plutzky, 2012); el ácido nicotínico (Vitamina B3) se ha investigado como una terapia para el tratamiento de la aterosclerosis y aumenta los niveles de colesterol HDL y disminuye los niveles del LDL (Lee *et al.*, 2009) y la vitamina D3 mejora significativamente el metabolismo de la glucosa y que además disminuye los niveles de triglicéridos (Wehr *et al.*, 2011).

Otra vitamina del complejo B, la biotina, a la cual, Watanabe y colaboradores en 2008, reportaron un efecto hipotensor a concentraciones farmacológicas en ratas de la cepa espontáneamente hipertensas propensas a infarto (SHRSP). En dicho reporte, se administró biotina durante 8 semanas (1.2 mg/kg de peso) y esto redujo la PA sistólica, el engrosamiento de la arteria coronaria y la incidencia de ataque cardiaco. Además, se probó el efecto antihipertensivo de la biotina de 6 a 10 horas después de una sola administración intraperitoneal de dosis crecientes (0.05, 0.5 y 5 mg/kg). Por último se realizó un experimento el cual consistía en el pretratamiento con un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (el ODQ) y el pretratamiento con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME). Los resultados mostraron que el pretratamiento con ODQ abolió el efecto hipotensor, mientras que el pretratamiento con L-NAME no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la biotina. Con lo cual concluyeron que el mecanismo de la acción hipotensora de la biotina se basa en una activación de la GCs independiente de la formación de NO (Watanabe *et al.*, 2008).

Rodríguez y colaboradores en 2009, reportaron en su estudio realizado en células linfoides humanas, que la generación de NO depende de la biotina y que dicha generación está mediada por un aumento en la expresión de eNOS y nNOS.

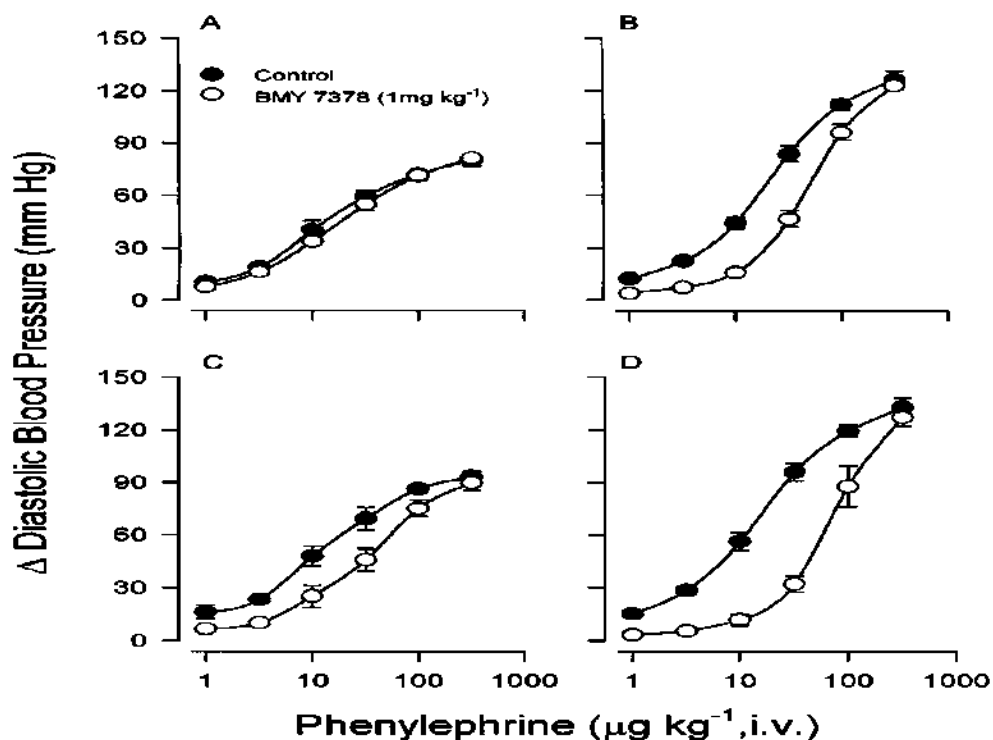
También la generación de NO dependiente de la vitamina aumentó la abundancia de cGMP (Rodríguez *et al.*, 2009).

Antecedentes de nuestro equipo de trabajo mostraron que la biotina tiene un efecto vasorrelajante en aorta de rata y parece estar mediado por la participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . Ya que al realizar una curva a dosis crecientes de fenilefrina (un agonista selectivo de los receptores  $\alpha_1$ ) se observó un efecto vasoconstrictor el cual es menor al realizar una segunda curva a fenilefrina con la previa incubación de biotina (Toledo, 2014).

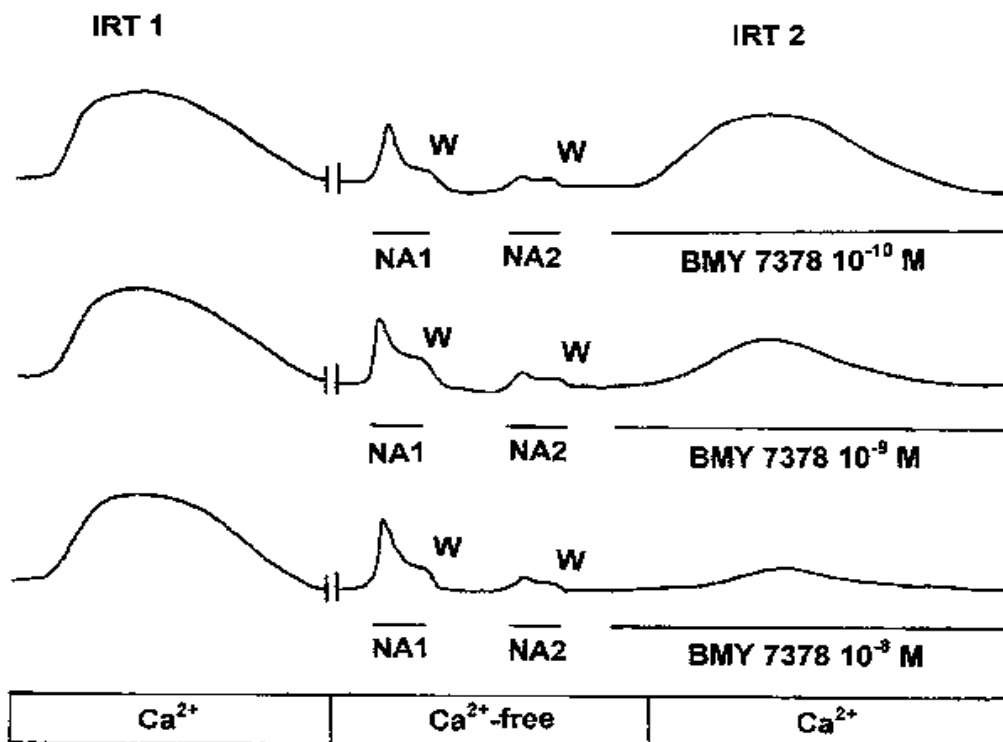
Diversos autores han observado un mayor potencial antagonico del BMY 7378 (un antagonista adrenérgico  $\alpha_{1D}$ ) en aortas de ratas hipertensas, lo que evidencia que el receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  participa en la génesis/mantenimiento de la hipertensión arterial y parecen estar presentes en la vasculatura antes de que se establezca la hipertensión (Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004; Oliver *et al.*, 2009). Por lo que se ha sugerido que hay un aumento en la población de esos receptores constitutivamente activos, ya que al desaparecer el estímulo la respuesta contráctil se mantiene y también se observó un aumento espontáneo en el tono de reposo de la aorta y la acumulación de fosfato de inositol los cuales fueron inhibidos por la presencia del BMY 7378 (Gisbert *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2002).

Para evidenciar esto, se realizaron curvas dosis-respuesta a la fenilefrina en la rata descerebrada y desmedulada, Wistar Kyoto y SHR; de 1 mes de edad y de 6 meses de edad. En todos los casos la fenilefrina produjo un aumento en la PA en el grupo control de manera dependiente de la concentración. Al realizar una segunda curva dosis-respuesta a la fenilefrina en presencia de BMY 7378 se observó que en las ratas de 1 mes de edad produjo un desplazamiento de la curva a fenilefrina hacia la derecha sólo en la rata SHR y a los 6 meses de edad se observa un desplazamiento en ambas cepas de ratas; sin embargo el efecto es más marcado en la cepa SHR (Figura 10). Para analizar la actividad constitutiva del receptor  $\alpha_{1D}$  se vaciaron los almacenes intracelulares de calcio manteniendo la aorta en una solución libre de calcio y estimulando con noradrenalina y haciendo lavados posteriores a cada estimulación hasta que no se indujo contracción. Una

vez logrado se incubó con solución fisiológica la cual contenía calcio, lo que resultó en un aumento espontáneo en el tono de reposo aún en ausencia del agonista y este aumento se vio inhibido con la presencia de *BMY 7378* (Figura 11).



**Figura 10. Incremento en la presión diastólica en respuesta a la fenilefrina en la rata descerebrada y desmedulada.** Wistar Kyoto (paneles A y B) y SHR (paneles C y D); de 1 mes de edad (paneles A y C) y de 6 meses de edad (paneles B y D) (imagenes tomada de Villalobos-Molina y García-Sáinz, 2004).



**Figura 11. Evaluación de la actividad constitutiva de los receptores  $\alpha_{1D}$ .** La modificación en el IRT obtenido en aorta después de la estimulación con noradrenalina se ve disminuida por la incubación de BMY 7378. IRT: Incremento del tono de reposo (imagen tomada de Gisbert *et al.*, 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La OMS en 2015 reportó que cada año mueren 9.4 millones de personas a causa de la hipertensión arterial y en México la ENSANUT reporta que el 25.5% de adultos mayores de 20 años padecen hipertensión arterial y solo 58.7% tienen el padecimiento controlado de forma adecuada. Lo que la convierte en un problema de salud muy importante en el mundo. Además la hipertensión es el principal factor para padecer otras enfermedades cardiovasculares.

Si bien existe una gran gama de fármacos antihipertensivos, en casi la mitad de los casos no se logra disminuir los niveles de PA a valores seguros y así evitar el daño a diferentes órganos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos o coadyuvantes que ayuden en el tratamiento de la hipertensión arterial es de gran importancia.

Se reportó que la vitamina biotina, a concentraciones farmacológicas logra disminuir los niveles de PA en ratas espontáneamente hipertensas propensas a infarto, ya sea en tratamiento crónico o agudo y que su efecto es independiente de la producción de óxido nítrico (Watanabe *et al.*, 2008). Hasta el momento es el único estudio reportado. Pero se conoce poco sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales la biotina produce su efecto hipotensor a concentraciones farmacológicas.

Con el presente trabajo se aporta nuevo conocimiento sobre el efecto hipotensor de la biotina para evaluar la posibilidad de que en un futuro se utilice a la biotina en el tratamiento de la hipertensión arterial, ya que al no tener efectos tóxicos conocidos podría ser un buen coadyuvante y así reducir las dosis de los fármacos actuales con la correspondiente disminución de sus efectos secundarios, ya que los efectos secundarios son una de las principales causas por la que los pacientes abandonan el tratamiento.

## **4. HIPÓTESIS**

La biotina disminuye la respuesta adrenérgica  $\alpha_{1D}$  vascular en la rata durante la hipertensión arterial.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Estudiar el efecto de la biotina sobre la respuesta adrenérgica  $\alpha_{1D}$  vascular durante la hipertensión arterial en la rata.

### **5.2. Objetivos particulares**

1.- Determinar el efecto de la biotina sobre la respuesta adrenérgica  $\alpha_{1D}$  en la aorta de rata en la hipertensión arterial en estudios *in vitro*.

2.- Evaluar el efecto de la biotina sobre la respuesta adrenérgica  $\alpha_{1D}$  en un modelo murino de hipertensión arterial.

3.- Analizar la participación del calcio en el efecto vasorrelajante de la biotina.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Modelo experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (12 semanas de edad,  $300 \pm 50$  gramos de peso). Se mantuvieron en jaulas a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, en un ciclo de luz oscuridad de 12 horas, con acceso *ad libitum* a alimento y agua durante todo el estudio, cumpliendo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, referente a especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Para monitorizar el estado de salud de los animales se midió el peso de los mismos cada semana, el consumo de agua y el consumo de alimento cada dos días.

### 6.2. Protocolo experimental

#### *Experimentos in vitro*

Se utilizaron ratas a las cuales una vez alcanzado el peso y la edad adecuados se les extrajo la arteria aorta torácica y se realizaron curvas a diferentes fármacos como fenilefrina ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-5.5}$  M), serotonina ( $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y cloruro de calcio ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-2.5}$  M), con y sin la previa incubación durante 30 min de BMY 7378 ( $1 \times 10^{-7.5}$  M), biotina ( $1 \times 10^{-8}$  M) y nitrendipina ( $1 \times 10^{-7}$  M), esto bajo diferentes condiciones del medio (con y sin calcio) según lo requiriera el experimento.

#### *Experimentos in vivo*

Para la realización de los estudios, las ratas se dividieron en 3 grupos experimentales: (1) Grupo control (animales no tratados). (2) Grupo L-NAME (deficiente de óxido nítrico) este fue tratado durante 15 días con clorhidrato de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) a una dosis de 75 mg/kg y el cual se administró vía oral en el agua de beber. (3) Grupo L-NAME/biotina (deficiente de óxido nítrico, tratado con biotina) el cual fue tratado con L-NAME durante 15 días y simultáneamente recibió tratamiento con biotina (2 mg/Kg, vía intraperitoneal, i.p.). A estos tiempos se reportó que la biotina produce efectos sobre el metabolismo y la expresión de genes. Una vez terminado el tratamiento, los animales fueron

sacrificados, se extrajo la aorta torácica y se realizaron curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378.

### **6.3. Extracción de la aorta de rata**

Las ratas se sedaron con pentobarbital sódico (55 mg/kg de peso; i.p.) y se realizó una laparotomía amplia donde se expuso la aorta torácica y abdominal y se extrajo para después proceder a limpiar el tejido graso. La arteria se cortó en anillos de 3 - 4 mm de longitud, a la mitad de los anillos de aorta les fue removido el endotelio (si se requería) frotando suavemente la superficie interna de los vasos con un estilete metálico de superficie rugosa.

### **6.4. Reactividad adrenérgica vascular**

Los anillos aórticos se colocaron en ganchos de nicrom y se introdujeron en cámaras para tejido aislado con 10 ml de solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11.7 mM glucosa y 0.026 mM EDTA. El tejido se mantuvo a una temperatura de 37°C, pH de 7.4 y con burbujeo constante de carbógeno ( $\text{O}_2$  al 95% con 5% de  $\text{CO}_2$ ). Cada anillo arterial se fijó del fondo de la cámara y a un transductor de tensión Grass FT03 (Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, EE.UU.), que a su vez estaba conectado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems Inc., Santa Bárbara, California, EE.UU).

Cada anillo tuvo una tensión inicial de 3 g (previamente determinada como óptima para la respuesta del tejido) y se permitió un periodo de estabilización de 30 minutos. Una vez transcurrido este periodo se estimuló 3 veces con fenilefrina a una concentración de  $1 \times 10^{-7.5}$  M, realizando 3 lavados con solución Krebs después de cada sensibilización, esto con el fin de sensibilizar al estímulo externo.

Se obtuvieron curvas concentración-respuesta graduales a la fenilefrina a concentraciones crecientes ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-5.5}$  M) iniciando con una curva control y

después una con incubación previa de 30 minutos de BMY 7378 y/o biotina a concentraciones de  $1 \times 10^{-7.5}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M, respectivamente.

## 6.5. Evaluación de la reactividad vascular a calcio

### *Calcio extracelular*

Los anillos aórticos se colocaron en ganchos de nicrom y se introdujeron en cámaras para tejido aislado con 10 ml de solución Krebs-Henseleit, cada anillo tuvo una tensión inicial de 3 g y se permitió un periodo de estabilización se estimuló 3 veces con fenilefrina a una concentración de  $1 \times 10^{-7.5}$  M realizando 3 lavados con solución Krebs después de cada sensibilización.

Después de la última sensibilización se procedió al cambio de la solución inicial por una solución Krebs-Henseleit libre de calcio y alta en potasio con la siguiente composición: 42 mM NaCl, 80 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 11.7 mM glucosa y 0.026 mM EDTA. El tejido se mantuvo a las mismas condiciones previamente descritas.

Se realizaron curvas concentración-respuesta a concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-2.5}$  M), iniciando con una curva control y después una con incubación previa durante 30 min de nitrendipina y/o biotina a concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M, respectivamente.

### *Calcio intracelular*

Los anillos aórticos se colocaron en ganchos de nicrom y se introdujeron en cámaras para tejido aislado con 10 ml de solución Krebs-Henseleit, cada anillo tuvo una tensión inicial de 3 g y se permitió un periodo de estabilización se estimuló 3 veces con fenilefrina a una concentración de  $1 \times 10^{-7.5}$  M realizando 3 lavados con solución Krebs después de cada sensibilización.

Después del último estímulo se procedió al cambio de la solución inicial por una solución Krebs-Henseleit libre de calcio y alta en potasio a la cual se le sustituyó el EDTA por EGTA 4 mM y se realizaron 6 lavados con la finalidad de quelar todo el residuo de calcio, después de los lavados se cambió la solución Krebs libre de calcio y alta en potasio con la composición inicial, cada anillo tuvo

una tensión inicial de 1.5 g después del cambio de Krebs y se permitió un periodo de estabilización de 30 min.

Un único se realizó estímulo a anillos sin endotelio de aorta de rata con un agonista (fenilefrina o serotonina) a una concentración de  $1 \times 10^{-3.5}$  M, después se realizó un segundo estímulo con y sin la previa incubación de biotina ( $1 \times 10^{-8}$  M).

## **6.6. Análisis estadístico**

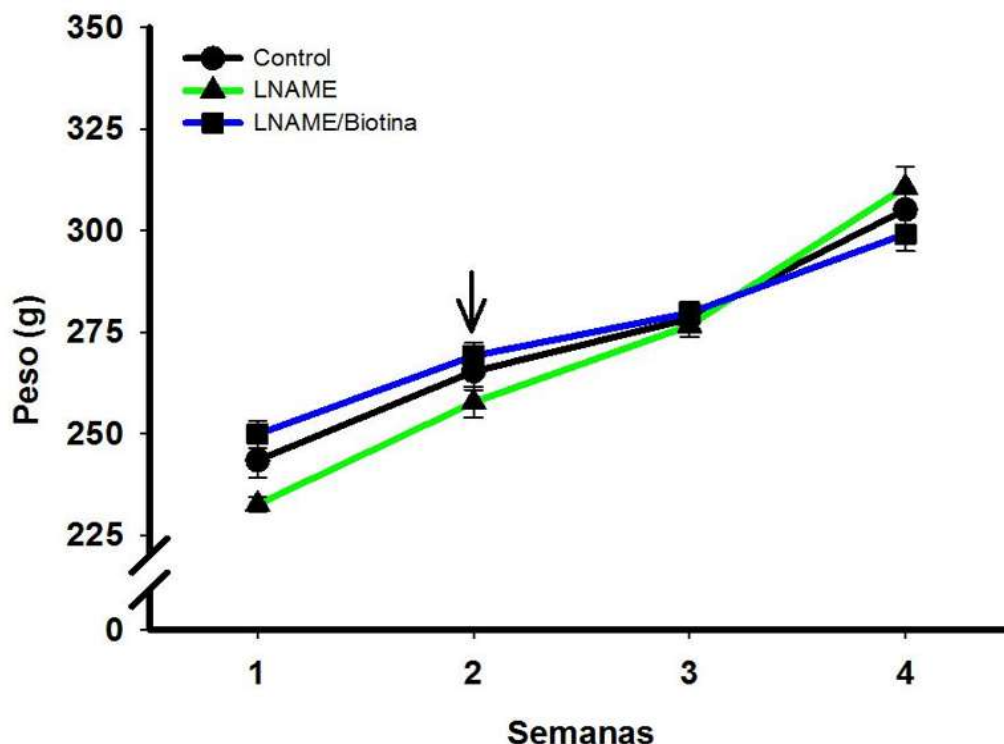
El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaPlot® 11.0. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar (EE). La significancia estadística se determinó por la prueba de ANOVA de dos vías con un análisis *post hoc* Tukey. Una  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativa.

## 7. RESULTADOS

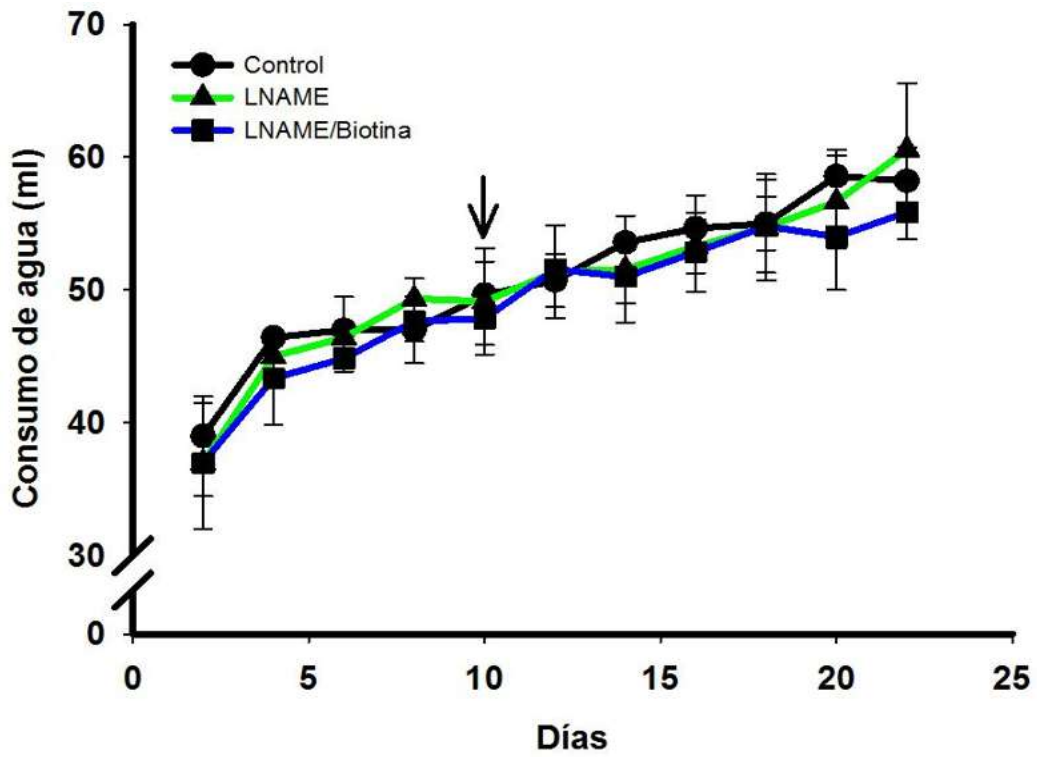
### 7.1. Registro del peso, consumo de agua y alimento de las ratas durante los diferentes tratamientos

Con el fin de corroborar el estado de salud óptimo de los animales y descartar efectos adversos debidos a los diferentes tratamientos, se registró el peso de los animales en los diferentes grupos experimentales de manera semanal (Figura 12), antes y durante el tratamiento respectivo. De igual manera cada 2 días se registró el consumo de agua (Figura 13) y alimento (Figura 14).

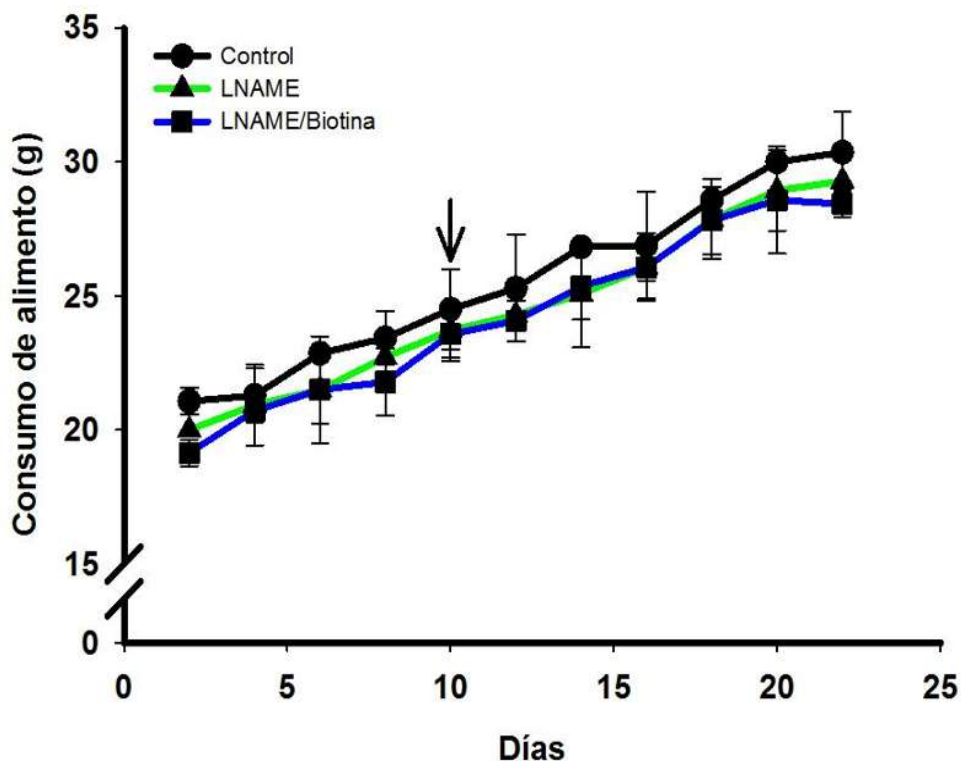
El aumento tanto de peso de las ratas, el consumo de agua y el consumo de alimento fue de forma gradual y constante, a lo largo de las semanas antes y después del tratamiento, no se observó diferencia significativa entre los grupos. Lo que estaría indicando que los diferentes tratamientos no tienen efectos adversos sobre los tres parámetros medidos.



**Figura 12. Peso de las ratas en los diferentes tratamientos.** Registro del peso de las ratas de los diferentes tratamientos durante las 4 semanas. La flecha indica el inicio de los tratamientos. Los resultados son el promedio  $\pm$  E.E. n=6 por grupo.



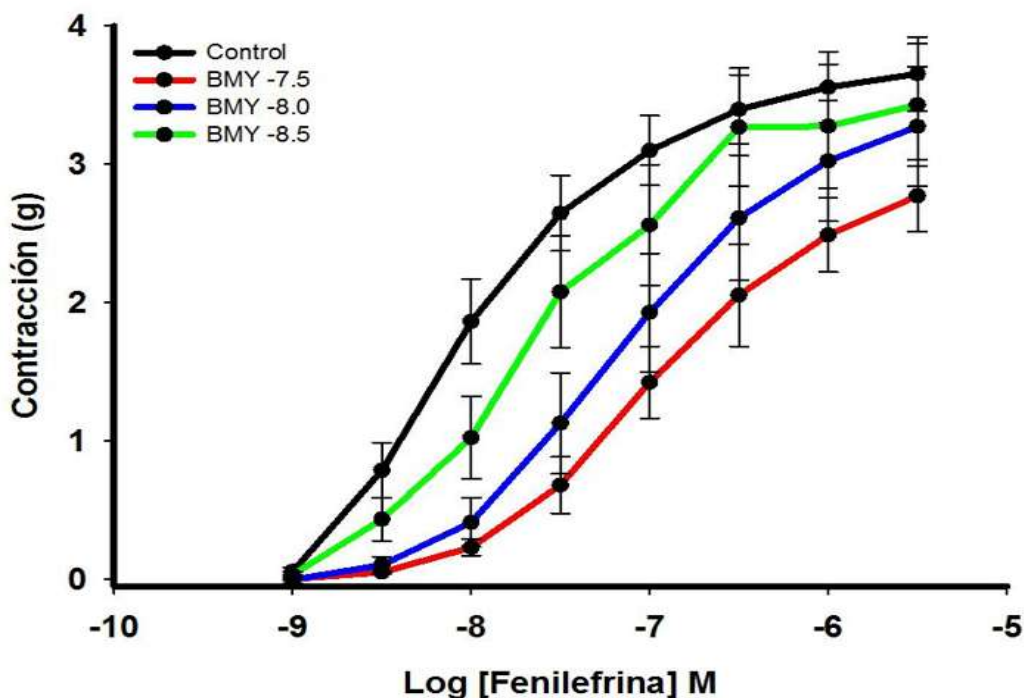
**Figura 13. Consumo de agua.** Registro del consumo de agua durante todo el tratamiento. La flecha indica el inicio de los diferentes tratamientos, los resultados son el promedio  $\pm$  E.E. n=6 por grupo.



**Figura 14. Consumo de alimento.** Registro del consumo de alimento durante todo el tratamiento, la flecha indica el inicio de los diferentes tratamientos, los resultados son el promedio  $\pm$  E.E. n=6.

## 7.2. Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata

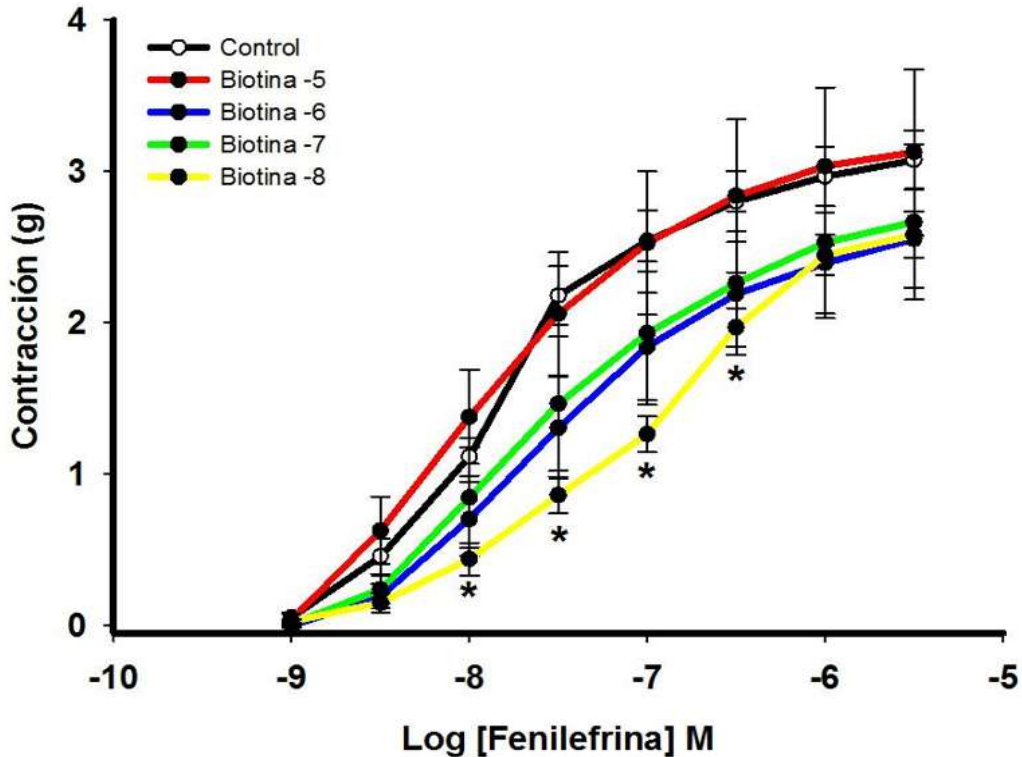
Con el fin de evaluar la participación de los receptores alfa  $\alpha_{1D}$  en la respuesta contráctil en aorta sin endotelio de rata se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina con la incubación previa de diferentes concentraciones del antagonista BMY 7378 ( $1 \times 10^{-8.5}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  y  $1 \times 10^{-7.5}$  M) (Figura 15). Se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración y que el BMY 7378 produjo un desplazamiento hacia la derecha de las curvas a fenilefrina de manera dependiente de la concentración, lo que indicó un antagonismo competitivo.



**Figura 15 Efecto del BMY 7378 sobre la respuesta a la fenilefrina en aorta sin endotelio de ratas.** Curva de concentración-respuesta a fenilefrina en aorta sin endotelio incubada previamente con diferentes concentraciones de BMY 7378. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n=6.

### 7.3. Efecto de la biotina sobre la respuesta contráctil adrenérgica en aorta de rata

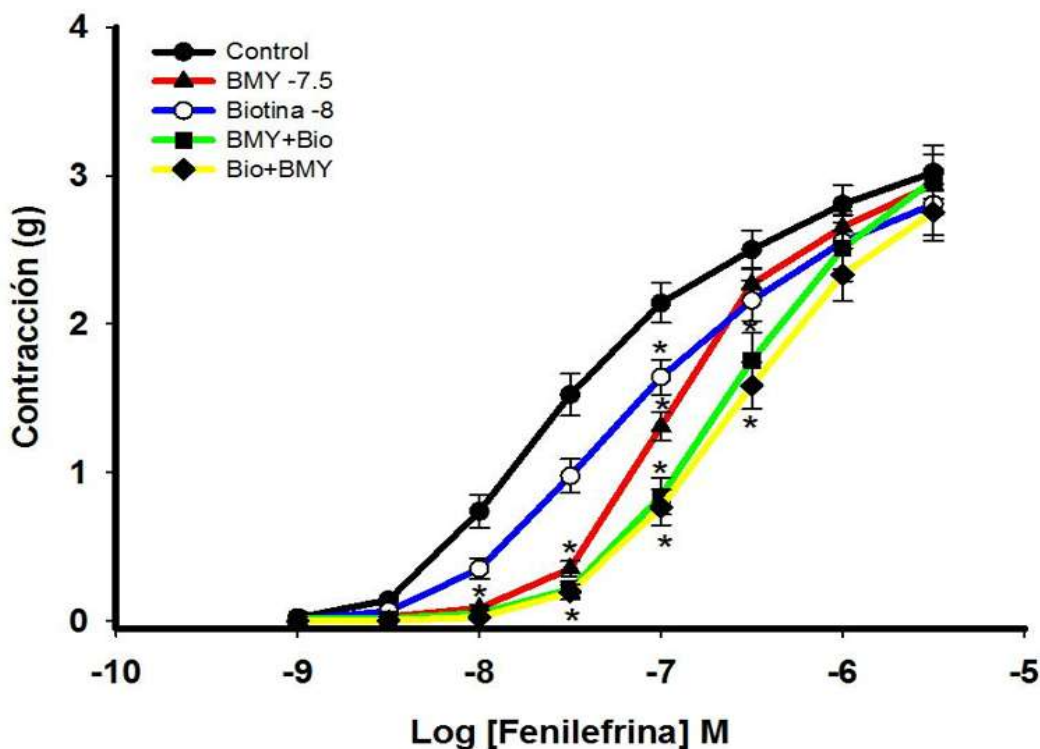
Con la finalidad de determinar la relación concentración-respuesta de la biotina sobre el efecto contráctil de la fenilefrina, los anillos se incubaron con diferentes concentraciones de biotina ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M) y se realizaron curvas a fenilefrina ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-5.5}$  M) en aorta sin endotelio de rata, con la intención de obtener una respuesta exclusiva del músculo liso. Se observó que a las concentraciones más bajas de biotina, se tuvo un mejor efecto inhibitorio de la vasoconstricción, teniendo el mejor efecto a  $1 \times 10^{-8}$  M (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de la biotina sobre la respuesta a la fenilefrina en aorta sin endotelio de ratas.** Curva de concentración-respuesta a fenilefrina en aorta sin endotelio incubada previamente con diferentes concentraciones de biotina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar \* Diferencia estadística, prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

#### 7.4. Participación de los receptores adrenérgicos $\alpha_{1D}$ en el efecto vasorrelajante de la biotina

Con la finalidad de determinar la participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  en el efecto vasorrelajante de la biotina, se realizaron curvas a concentraciones crecientes de fenilefrina con previa incubación de BMY 7378 ( $1 \times 10^{-7.5}$  M), biotina ( $1 \times 10^{-8}$  M) y la combinación de ambos. Las concentraciones utilizadas de cada uno se basaron en los resultados previos, a las cuales se observó el mejor efecto. Se observó que ambos compuestos por separado disminuyeron de manera significativa la fuerza de contracción y al incubarse de manera combinada se observó un efecto sumatorio (Figura 17), lo cual podría estar indicando que la biotina actúa sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  para ejercer su efecto vasorrelajante.



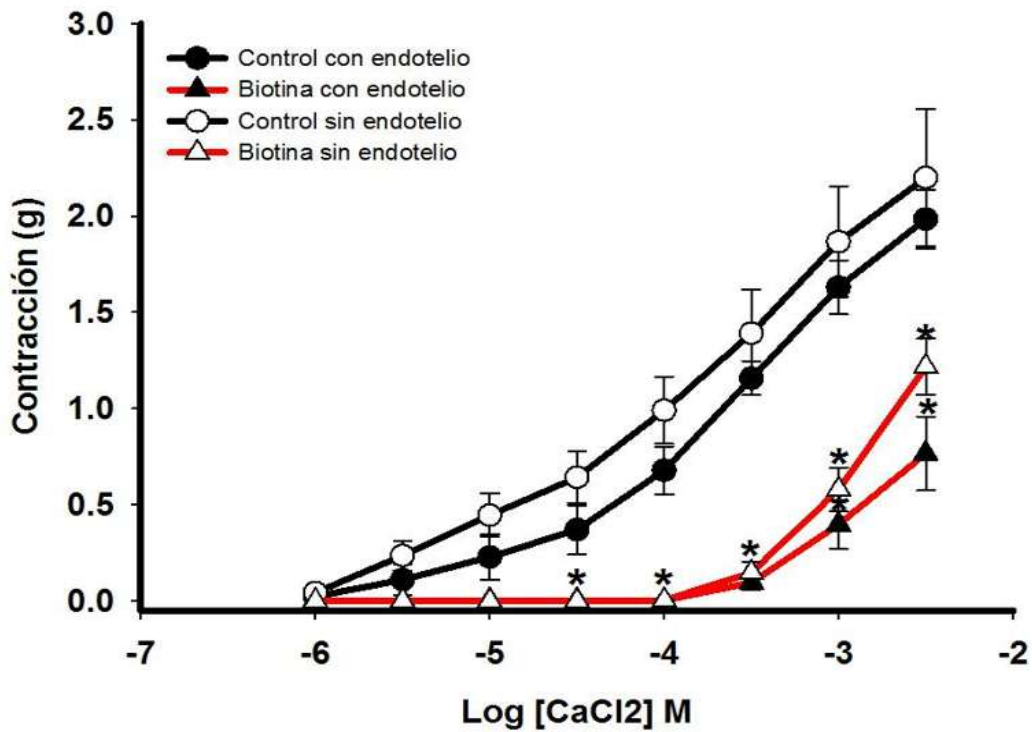
**Figura 17. Participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  en el efecto vasorrelajante de la biotina.** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina con la incubación de biotina y BMY 7378 de forma individual y combinada en anillos de aorta de ratas. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, ANOVA seguida de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control,  $n=6$ .

## 7.5. Participación del calcio extracelular e intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina

Con base en los resultados obtenidos, resultó interesante determinar el efecto de la biotina en la contracción inducida por calcio, ya que la movilización de este ion es clave para que se efectúe la vasoconstricción.

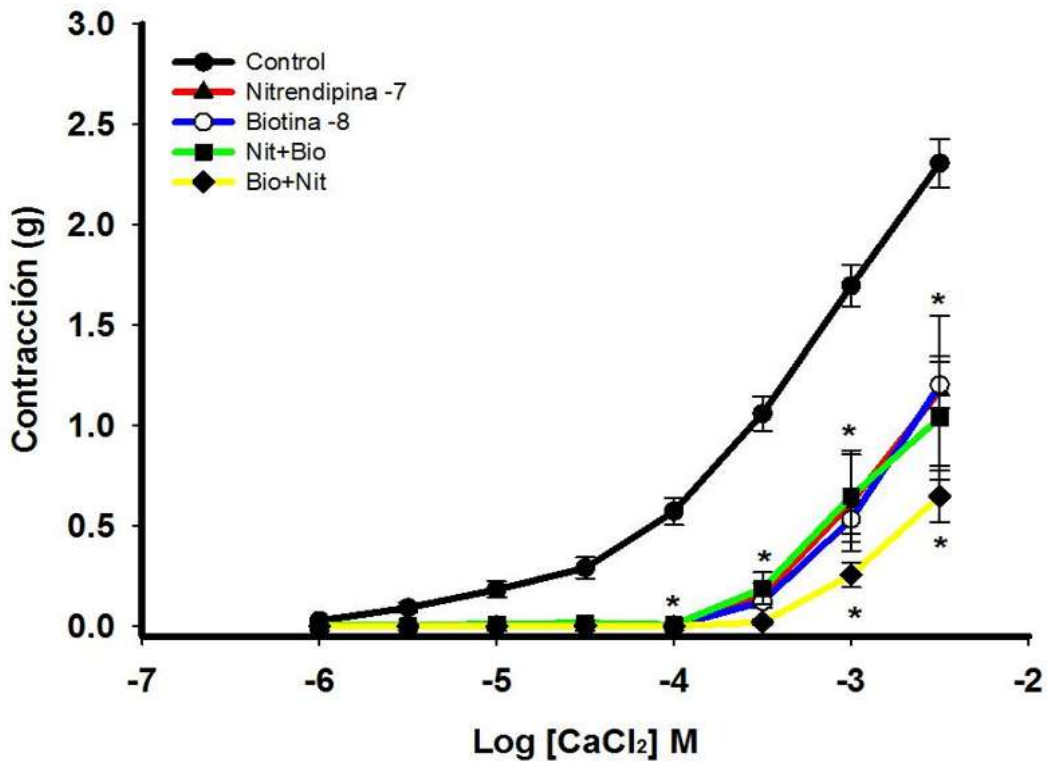
Para evaluar el efecto del calcio extracelular, se realizaron curvas concentración-respuesta a concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-2.5}$  M) en solución Krebs sin calcio y alta en potasio con y sin incubación de biotina en anillos de aorta de rata con y sin endotelio. Se observó que la biotina logró disminuir de manera significativa la fuerza de contracción y que este efecto se

presentó con y sin endotelio, lo que indicó que es independiente del endotelio (Figura 18).



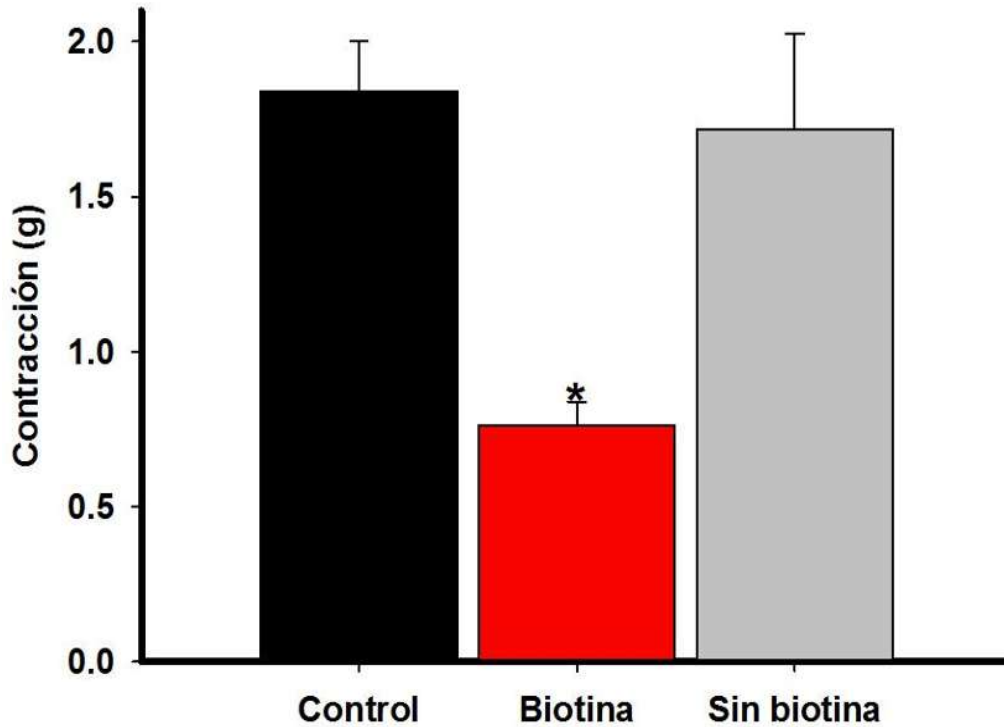
**Figura 18. Participación del calcio extracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina.** Curvas concentración-respuesta a CaCl<sub>2</sub> con la incubación de biotina en anillos de aorta de ratas. Cada punto representa el promedio ± el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

Posteriormente se realizaron curvas a CaCl<sub>2</sub> sin y con la incubación de biotina y nitrendipina ( $1 \times 10^{-7}$  M, bloqueador específico de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje) en anillos de rata sin endotelio, esto con la finalidad de dilucidar si la biotina tiene un efecto sobre estos canales. Se observó que al incubarse la combinación de ambos se obtuvo un efecto más potente que de manera individual cuando la biotina se incubó de manera previa a la nitrendipina, lo que pudiera indicar que la biotina también actúa sobre los canales de calcio tipo L para ejercer su efecto vasorrelajante (Figura 19).



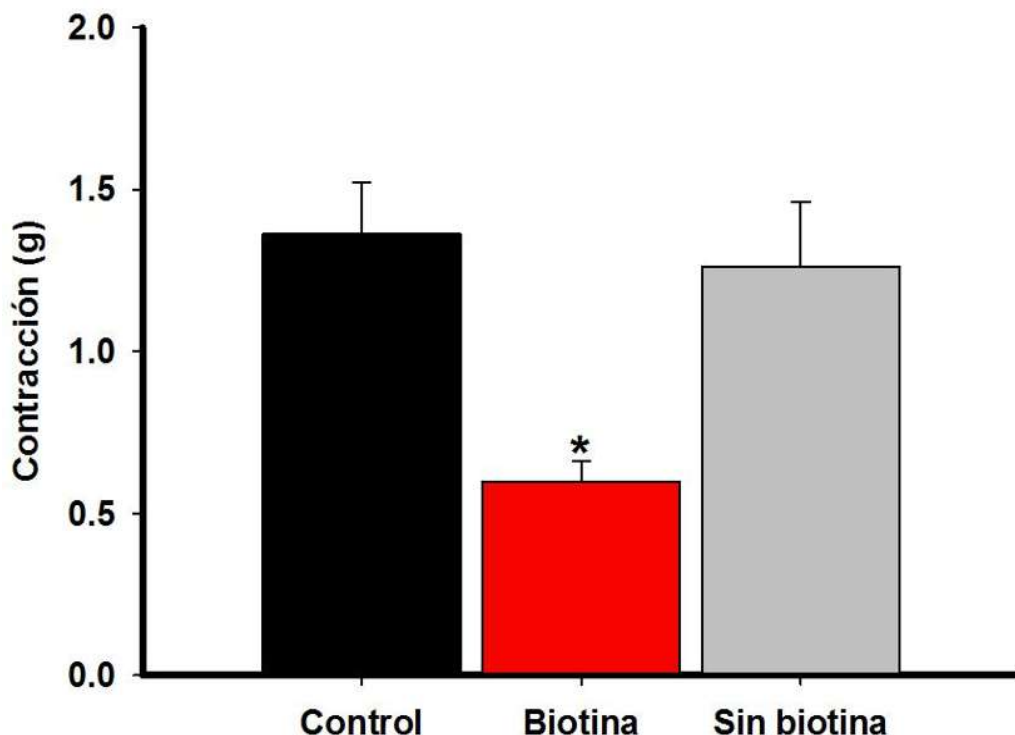
**Figura 19. Participación de los canales de calcio tipo L en el efecto vasorrelajante de la biotina.** Curva concentración-respuesta a CaCl<sub>2</sub> con la incubación de biotina, nitrendipina y la combinación de ambos en anillos de aorta de ratas sin endotelio. Cada punto representa el promedio ± el error estándar. \* Diferencia estadística, ANOVA seguida de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), n=6.

En cuanto al calcio intracelular, se realizó un estímulo vasocontráctil a fenilefrina ( $1 \times 10^{-5.5}$  M) en solución Krebs sin calcio y alta en potasio con y sin incubación previa de biotina en anillos de aorta de rata sin endotelio. Se observó que la biotina logró disminuir la respuesta contráctil a fenilefrina de manera significativa y al realizar el segundo estímulo sin la presencia de biotina se observó que la respuesta es similar al primer estímulo, con lo que descartamos que el efecto observado en presencia de biotina se deba al vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio (Figura 20).



**Figura 20. Participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en respuesta a fenilefrina.** Respuesta contráctil a fenilefrina con y sin la incubación de biotina, en anillos de aorta de ratas sin endotelio. Promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba t-Student ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

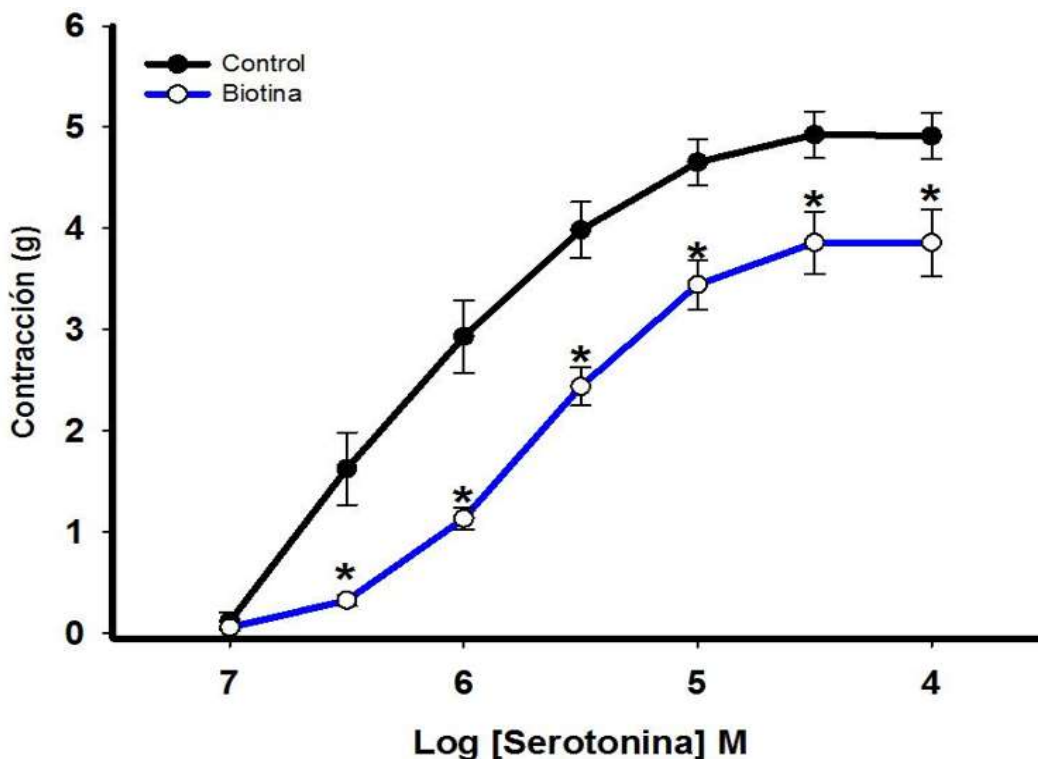
Con base en el resultado obtenido y con la finalidad de evaluar la participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en respuesta a otro vasoconstrictor como lo es la serotonina, se realizó el experimento anterior pero en este caso se utilizó serotonina. La cual al interactuar con los receptores 5-HT<sub>2</sub> (5-hidroxitriptamina) particularmente en aorta, causa vasoconstricción mediante la movilización de calcio de manera similar a la estimulación adrenérgica  $\alpha_1$ . Se observó un comportamiento similar que en el experimento anterior, ya que la biotina logró disminuir la respuesta contráctil a serotonina y al realizar un segundo estímulo sin la presencia de biotina se observó que la respuesta es similar al primer estímulo (Figura 21).



**Figura 21. Participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en respuesta a serotonina.** Respuesta contráctil a serotonina con y sin la incubación de biotina, en anillos de aorta de ratas sin endotelio. Promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba t-Student ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

## 7.6. Respuesta contráctil vascular a una curva de serotonina en presencia de biotina

Con la finalidad de evaluar si la biotina es capaz de bloquear a los canales de calcio tipo L en respuesta a otro vasoconstrictor, se realizó una curva concentración-respuesta a concentraciones crecientes de serotonina con incubación previa de biotina. Se observó que la serotonina produce una contracción dependiente de la concentración y que al incubar biotina se produce un desplazamiento hacia la derecha de la curva a serotonina de manera significativa (Figura 22).



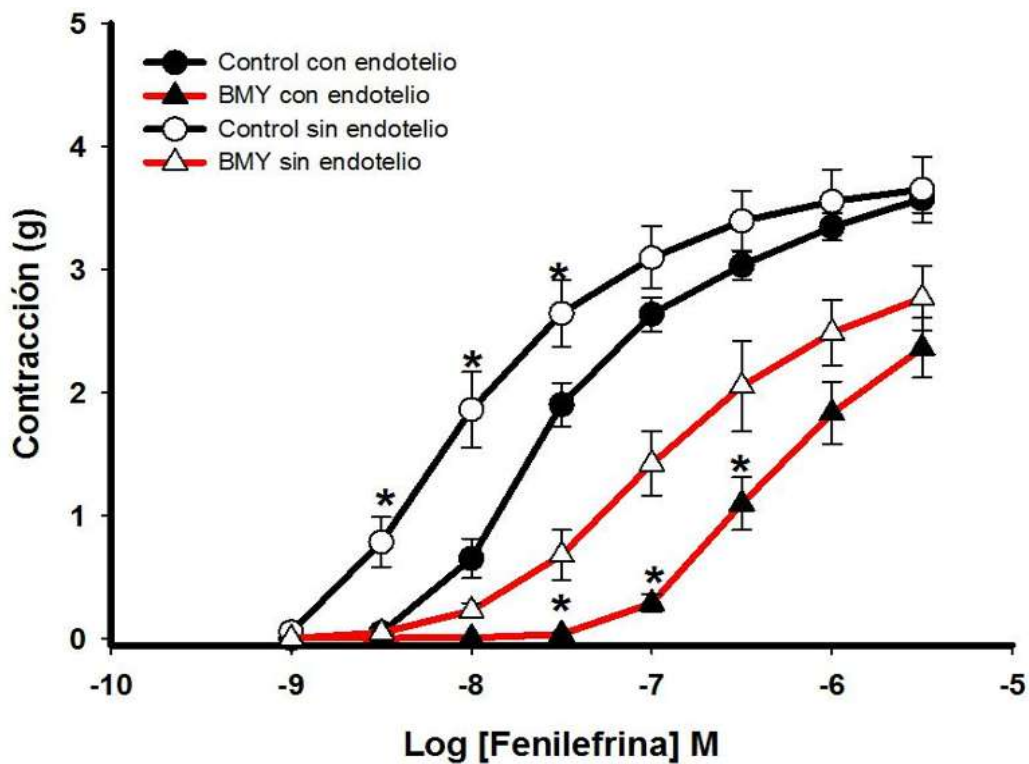
**Figura 22. Efecto de la biotina sobre la respuesta contráctil a serotonina en aorta de rata.** Curva concentración-respuesta a concentraciones crecientes de serotonina en presencia de biotina en anillos de aorta de ratas sin endotelio. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

### 7.7. Efecto del tratamiento *in vivo* de biotina y L-NAME sobre la respuesta contráctil vascular a fenilefrina

En cuanto a los experimentos *in vivo* con un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, una vez finalizado el tratamiento de L-NAME y L-NAME+biotina durante 15 días, se extrajo la aorta y se cortó en anillos y a la mitad de estos se les retiró el endotelio y se realizaron curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378, con la finalidad de dilucidar la participación de los receptores  $\alpha_{1D}$  en la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de ratas hipertensas.

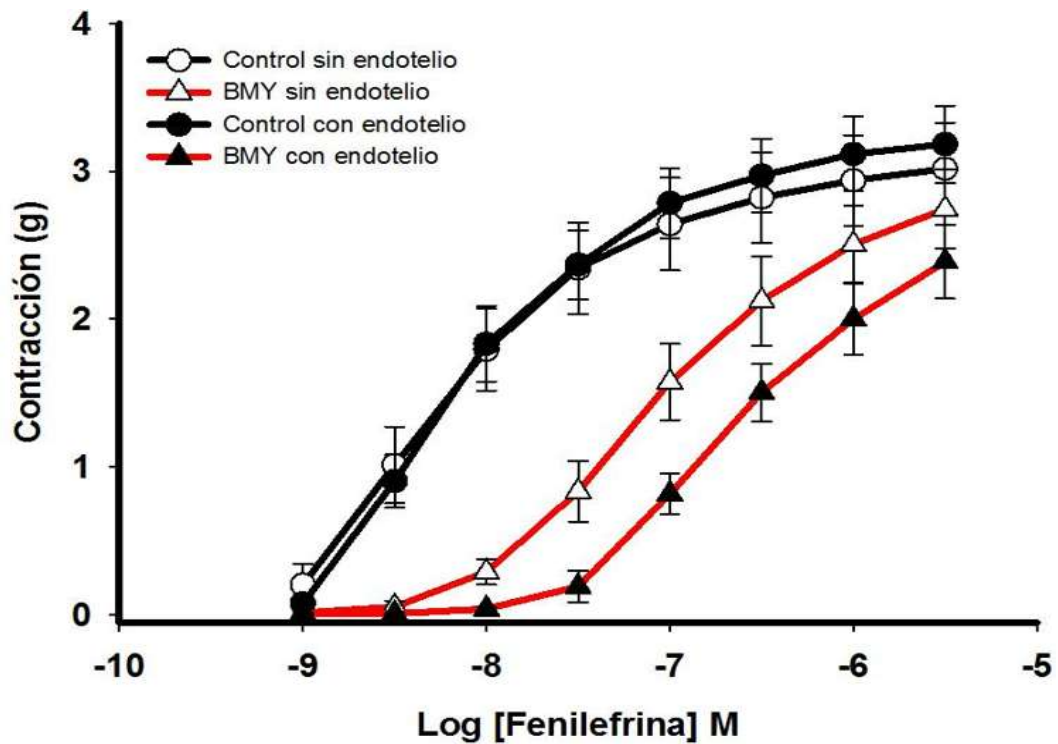
En el grupo control, se observó un aumento de la fuerza de contracción dependiente de la concentración de fenilefrina, aunque se observó una mayor respuesta en los anillos que no tienen endotelio, al realizar una segunda curva en presencia de BMY 7378 la curva se desplazó a la derecha de manera paralela, lo

que indica un antagonismo competitivo y de igual manera se observó una mayor respuesta en los anillos sin endotelio (Figura 23).



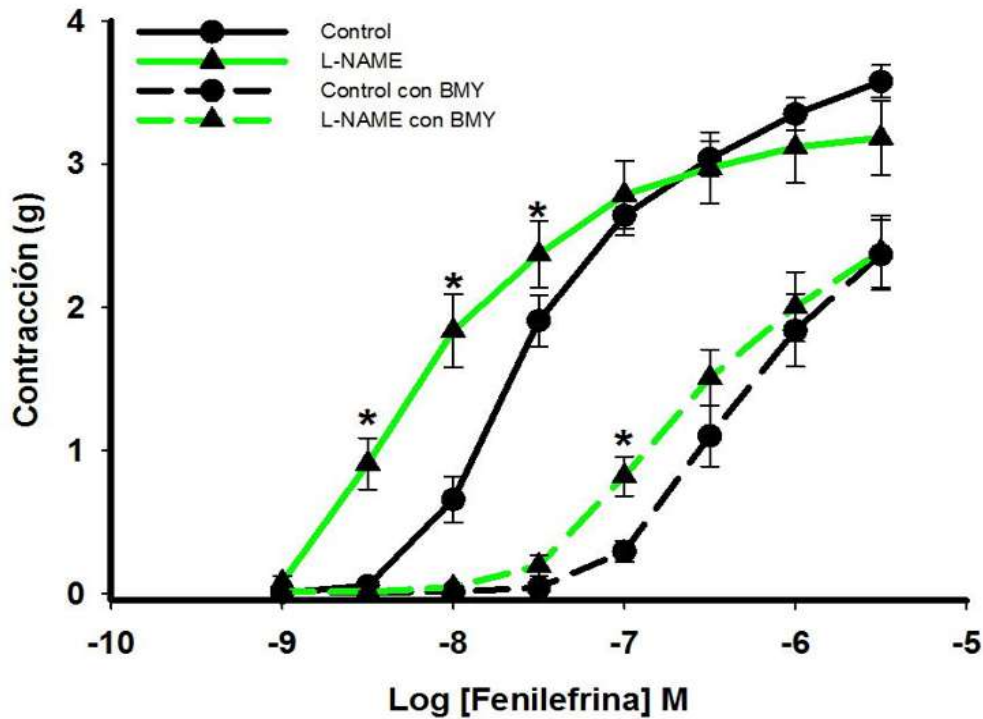
**Figura 23. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata control.** Curva concentración-respuesta a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

En el grupo que fue tratado con L-NAME por 15 días se evaluó su efecto sobre la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta aislada. Se observó que en la primera curva no hay diferencia entre las curvas a fenilefrina en los anillos de aorta con y sin endotelio. Esta observación se repitió al realizar la segunda curva en presencia de BMY 7378 (Figura 24).



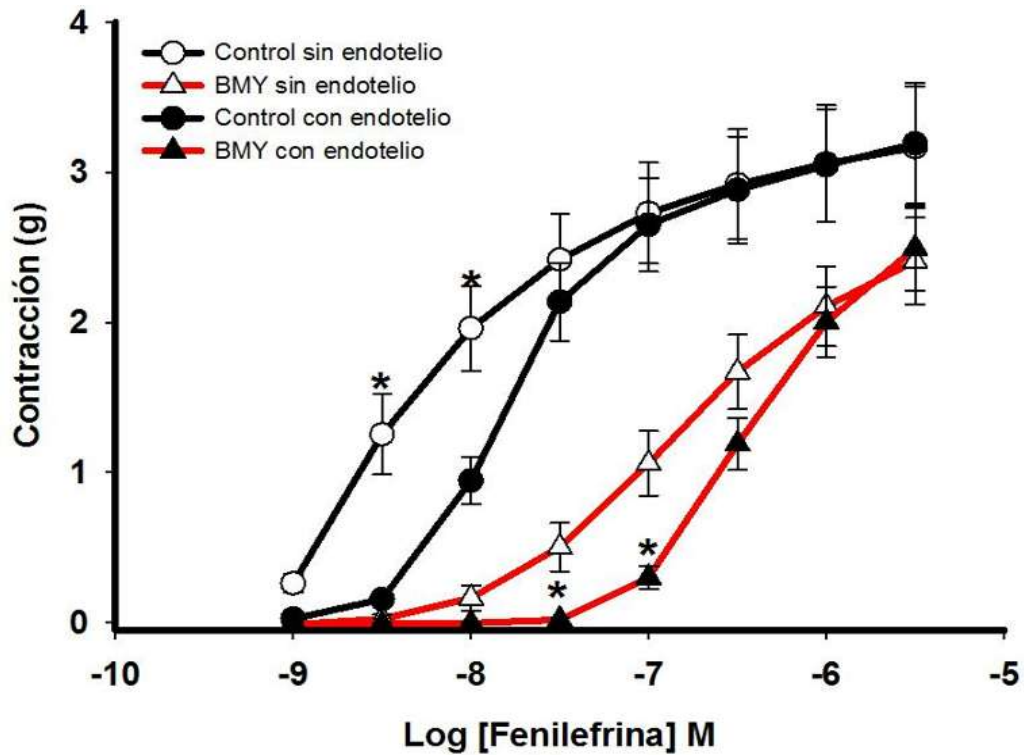
**Figura 24. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME.** Curva concentración-respuesta a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n=6.

Al comparar las curvas a fenilefrina del grupo control y del grupo tratado con L-NAME se observó, en la curva sin BMY 7378, una hipersensibilidad a la fenilefrina en el grupo L-NAME, ya que desde bajas concentraciones este grupo tiene una mayor respuesta contráctil. En la segunda curva a fenilefrina en presencia de BMY 7378, se observó un desplazamiento de forma paralela a las curvas sin el antagonista y de igual manera se observó una hipersensibilidad a fenilefrina en los anillos con endotelio de aorta de ratas tratadas con L-NAME (Figura 25).



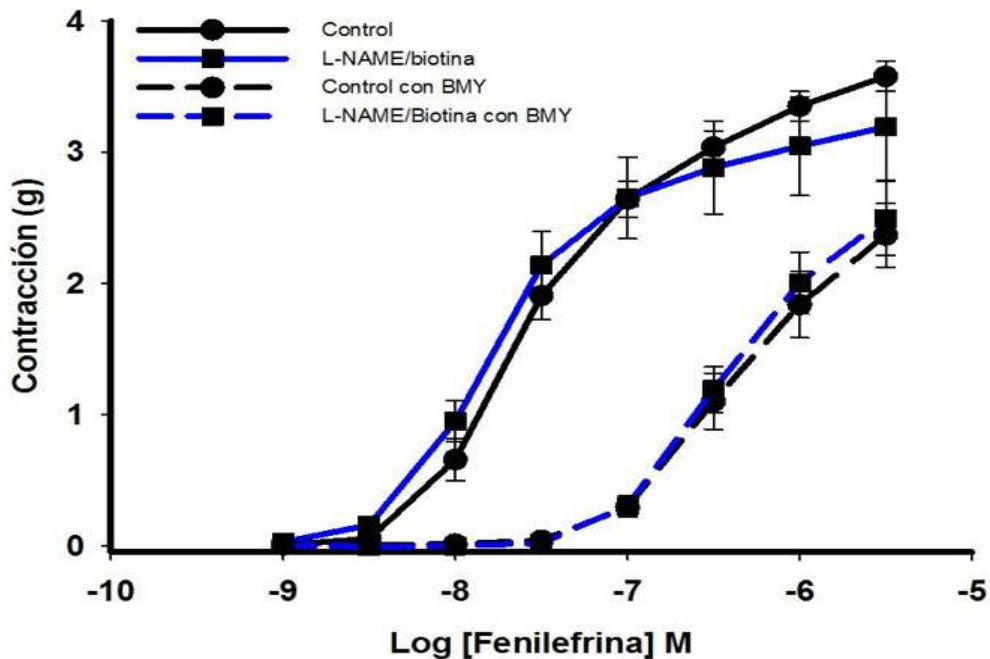
**Figura 25. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo control.** Curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378 en aorta de ratas tratadas con L-NAME y sin tratamiento. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

En cuanto al grupo que fue tratado con L-NAME y biotina simultáneamente por 15 días, se observó que en la primera curva hay una mayor sensibilidad a fenilefrina en los anillos que no tienen endotelio. Una segunda curva en presencia de BMY 7378 se realizó y se observó un desplazamiento a la derecha de manera paralela a las curvas antes de la incubación y se observó una mayor sensibilidad en los anillos sin endotelio (Figura 26).



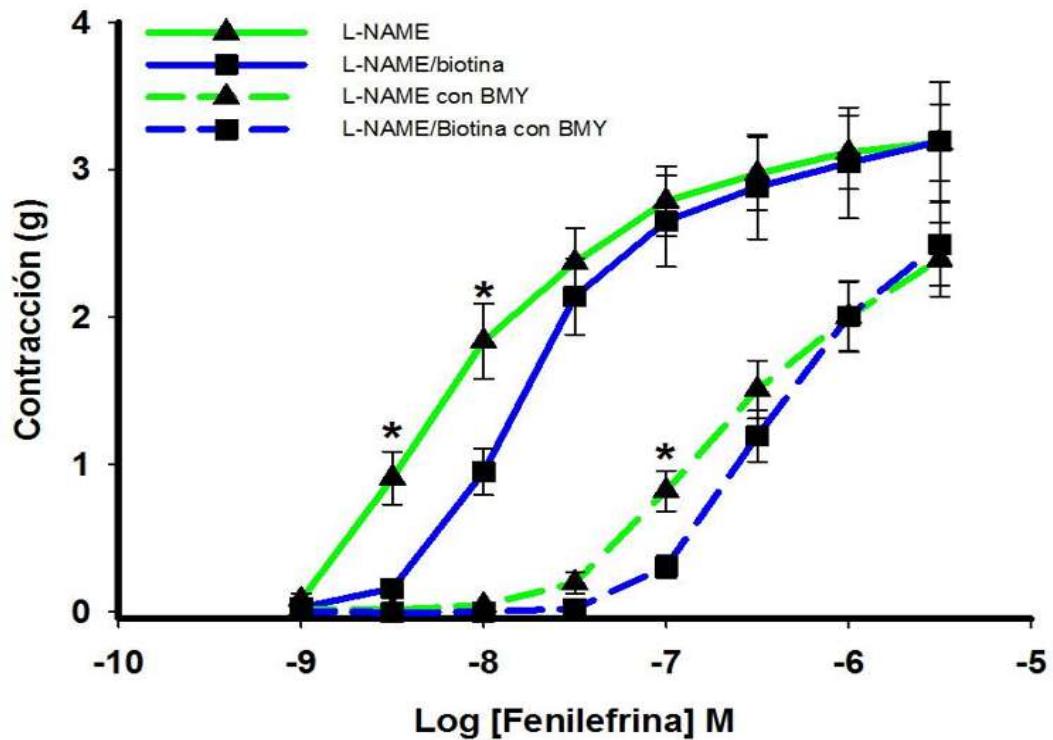
**Figura 26. Respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME y biotina.** Curva concentración-respuesta a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

Las curvas a fenilefrina en anillos con endotelio del grupo control y del grupo tratado con L-NAME y biotina se compararon y se observó que en las respectivas curvas antes y después de la incubación de BMY 7378 no hubo diferencia entre ambos grupos (Figura 27).



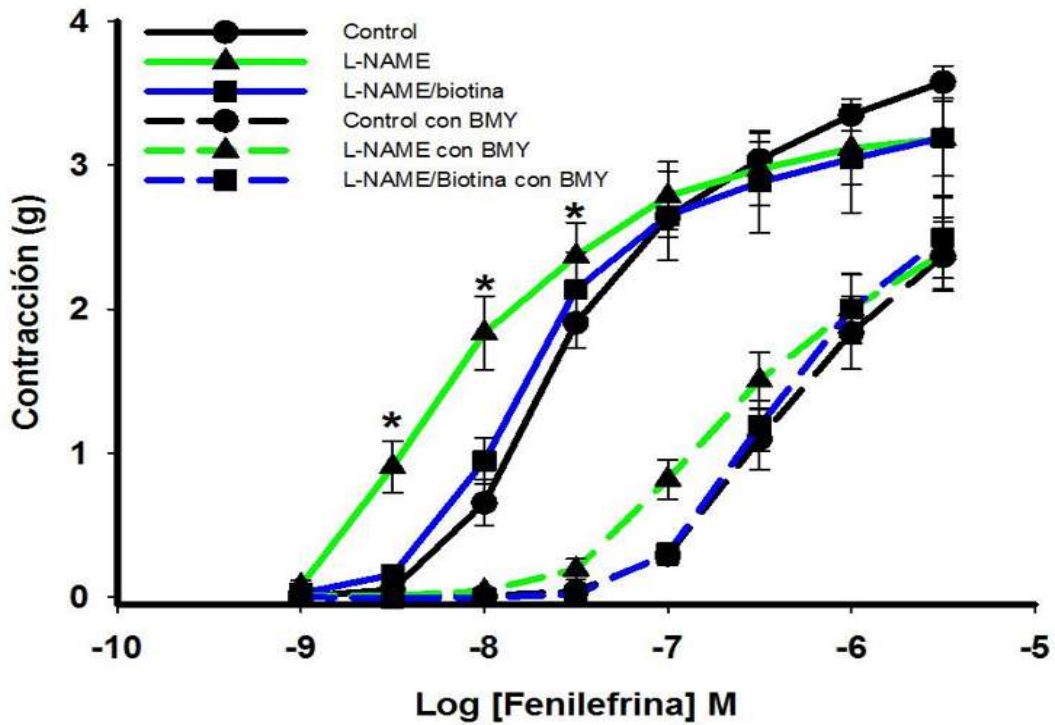
**Figura 27. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo control.** Curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378 en aorta de ratas tratadas con L-NAME y biotina y sin tratamiento. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar, n=6.

Al comparar el grupo tratado con L-NAME contra en grupo tratado con L-NAME y biotina, se observó en las curvas antes de la incubación de BMY 7378, que el grupo tratado con L-NAME y biotina no presentó la hipersensibilidad a fenilefrina que se presentó en el grupo tratado con L-NAME. Al realizar una segunda curva a fenilefrina en presencia de BMY 7378, de igual manera se observó una mayor sensibilidad a fenilefrina en el grupo L-NAME (Figura 28). Pareciera que el tratamiento con biotina previno el daño producido por el L-NAME.



**Figura 28. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta de rata tratada con L-NAME comparada contra el grupo tratado con L-NAME y biotina.** Curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378 en aorta de ratas tratadas con L-NAME y L-NAME con biotina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

Comparando el grupo control, el grupo tratado con L-NAME y L-NAME con biotina se observó que el grupo control y el grupo tratado con L-NAME y biotina tienen las mismas respuestas y el grupo tratado solo con L-NAME presenta una hipersensibilidad a fenilefrina, comparado con los otros grupos. Esta hipersensibilidad es característica del tratamiento con L-NAME.



**Figura 29. Curva concentración respuesta a fenilefrina en aorta con endotelio de rata de los tres grupos experimentales.** Curvas a fenilefrina con y sin la previa incubación de BMY 7378 en aorta con endotelio de rata. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar. \* Diferencia estadística, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

## 8. DISCUSIÓN

Al medir el peso de los animales y el consumo de agua y alimento a lo largo de los diferentes tratamientos, esto con la finalidad de evaluar el estado fisiológico de los animales, se pudo observar que no hubo diferencia entre los grupos tratados con L-NAME y el grupo tratado con L-NAME y biotina, comparados contra el grupo control en ninguno de los parámetros evaluados. Esto es importante ya que el L-NAME se administró en el agua de beber. Estas observaciones concuerdan con estudios de diversos autores, donde reportan que no existen alteraciones en el peso de los animales, ni la ingesta de agua o alimento como consecuencia de la administración crónica de L-NAME (Molnár *et al.*, 1994; Paulis *et al.*, 2008).

Al evaluar el efecto de la biotina en combinación con BMY 7378 (antagonista específico de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$ ) sobre la respuesta contráctil a fenilefrina en aorta de rata control sin endotelio, se observó que tanto la biotina como el BMY 7378 lograron disminuir la fuerza contráctil a fenilefrina y cuando se incubaron en conjunto se obtuvo un efecto sumatorio. Este efecto sumatorio podría evidenciar la participación de la respuesta adrenérgica en el efecto vasorrelajante de la biotina, específicamente la activada por el receptor  $\alpha_{1D}$  el cual se ha reportado que es el principal mediador de la contracción en el músculo liso vascular de arteria aorta. Lo anterior debido a que un efecto sinérgico se produce cuando las interacciones con un mecanismo farmacodinámico ocurren en el mismo receptor o en un sistema fisiológico determinado (Carrillo, 2012).

La activación del receptor  $\alpha_{1D}$  provoca la movilización del calcio del medio extracelular a través de la apertura de los canales de calcio tipo L en la membrana celular y del calcio intracelular mediante la apertura de los canales de calcio sensibles a  $IP_3$  presentes en el retículo endoplásmico, principal depósito intracelular de calcio. Esta movilización de calcio es clave para que se lleve a cabo la vasocontracción (Barret *et al.*, 2013; Hall, 2011). Al evaluar la participación del calcio extracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina en un medio despolarizante libre de calcio, al cual se le adicionaron concentraciones crecientes

de  $\text{CaCl}_2$ , se observó que la biotina logró disminuir de manera importante la respuesta contráctil en la aorta y que además fue independiente del endotelio, ya que al estar presente o ausente se obtuvieron resultados similares, lo que indicaría que los factores liberados por el endotelio como el NO, prostaciclina factor hiperpolarizante, etcétera, no intervienen en el efecto vasorrelajante de la biotina, lo que estaría indicando que la biotina actúa directamente sobre las células del músculo liso. Además, se comparó este efecto con un fármaco bloqueador de los canales de calcio tipo L utilizado actualmente en el tratamiento de la hipertensión arterial, la nitrendipina (Weber *et al.*, 2014); donde se observó un efecto similar de ambos fármacos cuando se incubaron de manera individual a las concentraciones utilizadas y de manera combinada se obtuvo un efecto mayor que los efectos individuales cuando la biotina se incubó primero. Por otro lado, cuando la nitrendipina se incubó antes que la biotina, pareciera que la nitrendipina interfirió con el efecto de la biotina, ya que se observó un efecto similar al de la nitrendipina por separado, lo que evidencia la participación del calcio extracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina mediante el bloqueo de los canales de calcio tipo L. En el año 2006, Zanello y Norman, ya habían reportado que una vitamina, la D3, presenta la capacidad de modular la apertura de canales de calcio tipo L, aunque su estudio fue en osteoblastos (Zanello y Norman, 2006).

Al realizar una curva a serotonina en presencia de biotina, se observó una disminución de la respuesta contráctil en la aorta de rata, al igual que cuando se realizó una curva a fenilefrina. Lo que podría evidenciar que la biotina es capaz de bloquear los canales de calcio tipo L independientemente si son activados por la ruta adrenérgica u otra. Recordemos que la serotonina es capaz de activar la movilización de calcio tanto del medio intracelular como extracelular por medio de la interacción con los receptores a serotonina, los  $5\text{-HT}_2$  (Brunton, 2012).

Al evaluar la participación del calcio intracelular en el efecto vasorrelajante de la biotina, se observó que logró disminuir la respuesta contráctil a serotonina hasta en aproximadamente un 57%, lo que pudiera estar evidenciando que la biotina es capaz de bloquear canales de calcio presentes en el retículo

endoplásmico, específicamente los sensibles a  $IP_3$ , ya que al activar la ruta serotoninérgica se obtiene la apertura de estos canales (Brunton, 2012). Aunque también pudiera estar aumentando la actividad de la trifosfatasa de adenosina de iones calcio del retículo endoplásmico, también conocida como bomba SERCA, la cual es muy importante en la recaptura del calcio (Barret *et al.*, 2013; Contreras-Leal *et al.*, 2010). Al realizar el mismo experimento pero realizando el estímulo con fenilefrina, se observó que la biotina logró disminuir la respuesta contráctil hasta en aproximadamente 62%. Esta mayor disminución de la respuesta contráctil al activar la ruta adrenérgica podría deberse a que además del efecto de la biotina sobre los canales de calcio del retículo endoplásmico o las bombas SERCA, se suma su efecto sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$ .

En cuanto a los experimentos *in vivo*, al comparar el grupo control contra el grupo tratado con L-NAME se observó una hipersensibilidad a la fenilefrina, ya que desde bajas concentraciones, el grupo L-NAME tiene una mayor respuesta que el grupo control, esto era de esperarse ya que se reportó que se produce este efecto con el tratamiento crónico de L-NAME (inhibidor de las NOS); además de remodelamiento en las paredes vasculares y disfunción endotelial, debido a la disminución de la biodisponibilidad de NO (Török, 2008; López-Mayorga, 2009). Al comparar el grupo tratado con L-NAME contra el tratado con L-NAME y biotina se observó que la biotina parece prevenir el daño producido por el L-NAME. Esto podría deberse a que la biotina pudiera estar supliendo la ausencia del NO, ya que se reportó que la biotina, al igual que el óxido nítrico, activa a la GCs independiente de la formación de NO, lo que conlleva al aumento de las concentraciones de cGMP y provoca vasorrelajación (Watanabe *et al.*, 2008). Esta observación indicaría que el NO no participa en el efecto hipotensor de la biotina, ya que aunque la concentración de NO disminuyó con el tratamiento de L-NAME el efecto vasorrelajante se observó de igual manera. Otra posible explicación pudiera deberse a que se reportó que la biotina tiene la capacidad de aumentar la expresión de las NOS endotelial y neuronal en células en cultivo (Rodríguez-Meléndez y Zemleni, 2009). Aunque así como regula la expresión de la NOS, se reportó que es capaz de regular cientos de genes, por lo que también pudiera

estar regulando la expresión de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y/o de los canales de calcio tipo L (Wiedmann *et al.*, 2004).

## **9. CONCLUSIONES**

1.- La biotina lleva a cabo su efecto vasorrelajante con la participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$  y la movilización de calcio intracelular y extracelular.

2.- La biotina previene el daño producido por el tratamiento crónico del L-NAME y el efecto vasorrelajante de la biotina es independiente del óxido nítrico.

## **10. PERSPECTIVAS**

La pretensión es conocer la participación de otros componentes de la ruta adrenérgica o la posible participación de otros compuestos secretados por el endotelio, en el efecto vasorrelajante de la biotina. Asimismo, conocer los efectos de la administración crónica de dosis farmacológicas de biotina sobre la expresión de los receptores  $\alpha_{1D}$ , canales de calcio tipo L y las NOS.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Méndez A., Serrato-Ochoa D. y Nieto-Aguilar R. 2013. La biotina: una vitamina vieja con funciones nuevas. *Biológicas* 15(1):24-30.

Ariza, A. C., Bobadilla, N. A. y Halhali, A. 2007. Acciones de endotelina 1 y angiotensina II en embarazos complicados con preeclampsia. *Revista de investigación clínica*, 59(1), 48-56.

Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. 2013. *Ganong Fisiología Médica*. 24 ed. México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Pp. 578, 587-599.

Becker, W. M. H., Kleinsmith, J., Becker, L. J. W. M., Kleinsmith, L. J. y Hardin, J. 2007. *El mundo de la célula*. 6 ed. España: Pearson. Pp 432-462.

Bosnyak, S., Welungoda, I. K., Hallberg, A., Alterman, M., Widdop, R. E. y Jones, E. S. 2010. Stimulation of angiotensin AT 2 receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 159(3), 709–716.

Brunton, L. L. 2012. *Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* 12ª. México: McGraw Hill. Pp 335-345.

Carrillo Norte, J. A. 2012. Interacciones farmacológicas y relevancia clínica. Todo comenzó con el queso. *Revista Rol de Enfermería*, 35(4), 248-258.

Chatterjee, N. S., Kumar, C. K., Ortiz, A., Rubin, S. A. y Said, H. M. 1999. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 277(4), C605-C613.

Contra, H. S., Estrada, L. R., Chávez, A. G. y Hernández, H. H. y. 2008. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21–29.

Contreras-Leal, E., Zarain-Herzberg, Á. y Santiago-García, J. 2010. Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas-Ca<sup>2+</sup> del retículo sarco (endo) plásmico. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10(2), 40-48.

Dias, R. G., Negrão, C. E. y Krieger, M. H. 2011. Óxido nítrico y sistema cardiovascular: activación celular, reactividad vascular y variante genética. *Archivos Brasileños Cardiología*, 96(1), 68-75.

Drake, R. L., Mitchell, A. W. y Vogl, W. 2005. *Gray's anatomía para estudiantes*. Brasil: Elsevier. Pp 25-26.

Dvorkin, M. A. y Cardinali, D. P. 2003. Best & Taylor. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 13 Ed. Argentina: Médica Panamericana. Pp 244-259.

Erhardt, L. 2009. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 205(1), 23-32.

Hernández M. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. Resultados ponderados*. Instituto Nacional de Salud Pública. Gobierno Federal México.

Estañol, B., Porrás-betancourt, M., Sánchez-torres, G., Infante, O. y Senties-Madrid, H. 2009. Control neural de la circulación periférica y de la presión arterial, *79(15)*, 109–116.

Favela E., Barbosa J., Medina G., Rolon M. 2008. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión Arterial en el primer nivel de atención. México: Secretaria de Salud.

Feldstein, C. y Romero, J. 2007. El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 2(2), 49–58.

Fernandez-Mejia, C. y Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L. 2011. Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), 40-48.

Förstermann, U. y Sessa, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829-837.

Freitas, E. V. D., Brandão, A. A., Pozzan, R., Magalhães, M. E., Fonseca, F., Pizzi, O. y Brandão, A. P. 2009. Importance of HDL-c for the occurrence of cardiovascular disease in the elderly. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 93(3), 231-238.

Floras, J. S. (2009). Sympathetic nervous system activation in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(5), 375-385.

Gamboa, R. 2006. Fisiología de la Hipertensión Arterial esencial. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 76-82.

García Barreto, D., Álvarez González, J., García Fernández, R., Valiente Musteliet, J. y Hernández Cañero, A. 2009. La hipertensión arterial en la tercera edad. *Revista Cubana de Medicina*, 48(2), 0-0.

Gisbert, R., Noguera, M. A., Ivorra, M. D. y D'Ocon, P. 2000. Functional evidence of a constitutively active population of  $\alpha_1D$ -adrenoceptors in rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(2), 810-817.

Gisbert, R., Ziani, K., Miquel, R., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., Anselmi, E. y D'Ocon, P. 2002. Pathological role of a constitutively active population of  $\alpha_1D$ -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 206-216.

Godínez-Rubí, M., Valle-Anaya, M. G., & Anaya-Prado, R. 2012. Vitaminas hidrosolubles y su efecto sobre la expresión génica. *Revista Latinoamericana de Cirugía*, 2(1), 40-8.

Gutiérrez-García, A. y Sánchez-Ocampo, E. M. 2016. Uso de las principales drogas inotrópicas, vasoactivas y vasodilatadoras en el perioperatorio. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 39(S1), 218-222.

Guyenet, P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(5), 335-346.

Hall, J. E. 2011. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 12 Ed: España: Elsevier Health Sciences. Pp 71-87, 91-94, 157-165, 191-210, 213-228.

Hillmeister, P. y Persson, P. B. 2012. The kallikrein–kinin system. *Acta Physiologica*, 206(4), 215-219.

Ignarro, L. J., Balestrieri, M. L. y Napoli, C. 2007. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovascular Research*, 73(2), 326-340.

Ira F.S. 2011. Fisiología Humana. 12 Ed edición. México: McGraw-Hill. Pp. 451-461, 579-583.

James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J. y Smith, S. C. 2014. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama*, 311(5), 507-520.

Jensen, B. C., O'Connell, T. D. y Simpson, P. C. 2011. Alpha-1-adrenergic receptors: Targets for agonist drugs to treat heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4): 518–528.

Kasko, M., Budaj, M. y Hulin, I. 2012. Harmful or Helpful Hypertension—Pathophysiological Basis. In *Genetics and Pathophysiology of Essential Hypertension*. InTech.

Katzung, B., Masters, S. y Trevor, A. 2013. *Farmacología Básica y Clínica*. 12 Ed. China: Mcgraw-hill Interamericana. Pp 151-165.

Kotchen, T. A., Cowley Jr, A. W. y Frohlich, E. D. 2013. Salt in health and disease—a delicate balance. *New England Journal of Medicine*, 368(13), 1229-1237.

Lee, J. M., Robson, M. D., Yu, L. M., Shirodaria, C. C., Cunnington, C., Kylintireas, I. y Durrington, P. N. 2009. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(19), 1787-1794.

Lekuona Goya, I., Arruti, A. S., Bueno, M. M. y Sánchez, J. U. 2009. Tabaco y enfermedad arterial no coronaria. Intervenciones para el abandono del hábito tabáco. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 9(4), 39D–48D.

Lopez-Mayorga, R. M. 2009. Alteraciones en la reactividad vascular de la aorta de rata, en la hipertensión ocasionada por la administración del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, el metil ester de la NG-nitro-L-arginina (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

Lyssand, J. S., DeFino, M. C., Tang, X. B., Hertz, A. L., Feller, D. B., Wacker, J. L. y Hague, C. 2008. Blood pressure is regulated by an  $\alpha$ 1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18792-18800.

Marasciulo, F. L., Montagnani, M. y Potenza, M. A. 2006. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Current Medicinal Chemistry*, 13(14), 1655-1665.

Martínez Larrarte, J. P., Reyes Pineda, Y. y Prada Hernández, D. M. 2007. Aspectos teórico-prácticos de la inflamación en las enfermedades reumáticas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 23(2), 0-0.

Meléndez, R. R. 2000. Importancia del metabolismo de la biotina. *Revista de Investigación Clínica*, 52(2), 194-199.

Mock, D. 2006. *Biotin in Modern Nutrition in Health and Disease*. 10 Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. Pp. 498-506.

Molnár, M., Sütö, T., Tóth, T. y Hertelendy, F. 1994. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170(5), 1458-1466.

Morales, G., del Valle, C., Soto, Á. y Ivanovic, D. 2013. Factores de riesgo cardiovascular en estudiantes universitarios. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 391-396.

Murali, M. R., Castells, M. C., Song, J., Dudzinski, D. M. y Hasserjian, R. P. 2011. Case 9-2011: a 37-year-old man with flushing and hypotension. *New England Journal of Medicine*, 364(12), 1155-1165.

Nikolaev, V. O., Moshkov, A., Lyon, A. R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H. y Gorelik, J. 2010.  $\beta$ 2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*, 327(5973), 1653-1657.

NOM, N. O. M. 2009. 030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. México: Diario Oficial de la Federación.

Oliver, E., Martí, D., Montó, F., Flacco, N., Moreno, L., Baretino, D. y D'Ocon, P. 2009. The impact of  $\alpha$ 1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of  $\beta$ -adrenergic vasodilatation in hypertension. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 982-990.

Organization, W. H. 2015. Burden: mortality, morbidity and risk factors: World Health Organization.

Paulis, L., Zicha, J., Kunes, J., Hojna, S., Behuliak, M., Celec, P. y Simko, F. 2008. Regression of L-NAME–Induced Hypertension: The Role of Nitric Oxide and Endothelium-Derived Constricting Factor. *Hypertension Research*, 31(4), 793-803.

Petersen, M. B. 2006. The effect of vasopressin and related compounds at V1a and V2 receptors in animal models relevant to human disease. *Basic & clinical Pharmacology & Toxicology*, 99(2), 96-103.

Piasecik, M. T., Smith, M. S., Soltis, E. E. y Perez, D. M. 1994. Identification of the mRNA for the novel alpha 1D-adrenoceptor and two other alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 46(1), 30-40.

Rhee, E. J. y Plutzky, J. 2012. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(3), 167-180.

Robles, B. H. 2001. Factores de riesgo para la hipertensión arterial. *Archivos de cardiología de México*, 71, 208-210.

Robles-Cabrera, A., Michel-Chávez, A., Callejas-Rojas, R. C., Malamud-Kessler, C., Delgado, G. y Estañol-Vidal, B. 2014. Los barorreflejos arteriales cardiovagal, cardiosimpático y vasosimpático y el control neural de la presión arterial a corto plazo. *Revista de Neurología*, 59, 508-16.

Rodriguez-Melendez, R. y Zemleni, J. 2009. Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *The Journal of Nutrition*, 139(3), 429-433.

Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P. y Schmidt, B. M. 2007. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *The Lancet*, 369(9568), 1208-1219.

Schwinn, D. A. y Afshari, N. A. 2006.  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptor Antagonists and the Iris: New Mechanistic Insights into Floppy Iris Syndrome. *Survey of Ophthalmology*, 51(5), 501–512.

Shannon, R. y Chaudhry, M. 2006. Effect of  $\alpha$ 1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *American Heart Journal*, 152(5), 842–850.

Solorzano V., Pacheco A., León-Del-Río A., 2002. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin mediated regulation of its own expression and of

biotin-depend carboxylases mRNA levels in human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(8):5325-30

Tresguerres, F. A. J., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E. E., Gil-Loyzaga, P., Lahera Juliá, V., Mora, T. F., • Romano, P. M. y Tamargo, M. j. 2005. Fisiología Humana. 3 Ed. México: McGraw-Hill. Pp 14-26, 32-34.

Toledo, L. Z. J. 2014. Estudio del efecto hipotensor de la biotina en la contracción arteria (tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Török, J. 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. Physiological Research, 57(6), 813.

Tortora, G. J. y Derrickson, B. 2006. Principios de Anatomía y Fisiología. 11 Ed. Argentina: Panamericana. Pp 750-753.

Tovar, J. L. 2008. Los estrógenos protegen del aumento de presión arterial en un modelo experimental de hipertensión en ratas hembra creado por limitación del crecimiento intrauterino. Hipertensión y Riesgo Vascular, 25(1), 41-42.

Vásquez, M. y Yasmín, L. 2016. Diseño de una guía para la elaboración de alimentos enriquecidos o fortificados con vitaminas y minerales (Tesis Doctoral). Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia, Colombia.

Vesely, D. L. (1982). Biotin enhances guanylate cyclase activity. Science, 216(4552), 1329-1330.

Vilches F. A. y Fernández M. C. 2005. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. Revista de Investigación Clínica; 57(5): 716-724.

Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A. y Fernandez-Mejia, C. 2010. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(7), 606-612.

Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz, J. A. 2004. The elusive  $\alpha$ 1D-adrenergic receptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *European Journal of Pharmacology*. 500: 113-120.

Villalobos-Molina, R. y Ibarra, M. 1996.  $\alpha$ 1-Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha$ 1D or  $\alpha$ 1A subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 298(3), 257-263.

Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. J. y Ibarra, M. 1999. Functional evidence of  $\alpha$ 1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 126(7), 1534-1536.

Vincent, J. L. 2006. Vasopressin in hypotensive and shock states. *Critical Care Clinics*. 22(2), 187-197.

Volpe, M. 2014. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International Journal of Cardiology*, 176(3), 630-639.

Wagner-Grau, P. 2010. Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 71(4):225-9

Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y. y Komai, M. 2008. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 756-763.

Weber, M. A., Schiffrin, E. L., White, W. B., Mann, S., Lindholm, L. H., Kenerson, J. G. y Cohen, D. L. 2014. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community. *The Journal of Clinical Hypertension*, 16(1), 14-26.

Wehr, E., Pieber, T. R. y Obermayer-Pietsch, B. 2011. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34(10), 757-763.

Weschenfelder M. D. y Gue M. J. 2012. Hipertensión arterial: principales factores de riesgo modificables en la estrategia salud de la familia. *Enfermería Global*, 11(26), 344-353.

Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D. y Zempleni, J. 2004. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(7), 433-439.

Zanello, L. P. y Norman, A. 2006.  $1\alpha, 25$  (OH)  $2$  vitamin D  $3$  actions on ion channels in osteoblasts. *Steroids*, 71(4), 291-297.

Zempleni J. 2005. Uptake, localization and noncarboxylase roles of biotin. *Department of Nutrition and Health Sciences*, 25,175-96.