

Determinación de los niveles plasmáticos de óxido nítrico en animales de experimentación, por influencia de la altura

Determination of plasma levels of nitric oxide in experimental animals, under the influence of height

Gilda Auristela Elizabeth Ruíz Gómez¹, Diana Esmeralda Andamayo Flores², Diana Esmeralda Castillo Andamayo³, Miguel Ángel Ruiz Pachas¹, Venancio Santiago Navarro Rodríguez¹

¹Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana Los Andes. Huancayo, Perú

²Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Privada de Huancayo. Huancayo, Perú

³Centro de Investigación de Medicina Tradicional. Lima, Perú.

Dirección para correspondencia: Gilda Auristela Ruíz Gómez. Loreto 569. Huancayo, Perú.
E mail: gilda_ruiz@yahoo.es

Recibido para publicación en 11/08/10

Aceptado en 12/12/10

RESUMEN

En los lugares que presentan bajas temperaturas y menor presión de oxígeno, se ocasiona el mal de altura que se manifiesta en personas y animales causándoles hipoxia. Estudios de varios investigadores sugieren que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de la hipertensión pulmonar inducida por la hipoxia. El presente trabajo de investigación, se realizó con la finalidad de determinar la influencia de la altura en los niveles plasmáticos, de óxido nítrico utilizando como animales de experimentación los pollos, mediante la cuantificación de sus metabolitos estables: nitrito y nitratos, utilizando el método de Greiss. Se utilizaron 300 pollos; 150 trasladados al distrito de Pucará a 3,362 m.s.n.m. y 150 criados a nivel del mar. Se demostró que los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos sometidos a la altura, varían significativamente en comparación con los pollos que permanecen a nivel del mar. Se demostró también que los pollos cuando son trasladados a la altura presentan variaciones significativas en sus niveles plasmáticos de óxido nítrico. Los pollos de 8 días de edad presentaron variaciones notorias en sus niveles plasmáticos de óxido nítrico elevándose los niveles al primer día disminuyendo al segundo, elevándose significativamente el tercer día y disminuyendo al cuarto y quinto día. La altura influye significativamente en los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos.

Palabras Clave: Óxido nítrico, Niveles plasmáticos, Mal de altura

ABSTRACT

In places with lower temperatures and lower oxygen pressure, altitude sickness is present, it manifests itself in humans and animals causing hypoxia. Studies of several researchers suggest that oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. This research work was carried out in order to determine the influence of the height in the plasma levels of nitric oxide using chickens as experimental animals, by quantifying its stable metabolites: nitrite and nitrate, using the Greiss method. We show here that plasma levels of nitric oxide in chickens subjected to height, vary significantly compared with the chickens that stayed at sea level. We also demonstrated that when the chickens are transferred to a high altitude, significant variation in plasma levels of nitric oxide is produced. 300 chickens were used, 150 transferred to Pucará district to 3,362 and 150 m reared at sea level. The chickens of 8 days of age showed notable variations in plasma levels of nitric oxide rising to the first day and declining the second, rising significantly on the third day and decreasing the fourth and fifth day. The height significantly influences the plasma levels of nitric oxide in chickens.

Key Words: nitric oxide, plasma levels, altitude sickness

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (NO) es un gas que administrado por vía inhalatoria, tiene importancia clínica por su efecto vasodilatador pulmonar selectivo, una disminución en la

liberación del NO puede determinar un mecanismo de vasoconstricción pulmonar hipoxia (VPH).¹

Cuando se presenta este cuadro, la sangre es dirigida en el pulmón a las zonas mejor ventiladas, para optimizar la oxigenación de la sangre, durante su paso a través de la circulación pulmonar. La inhalación del NO, produce una abolición de la VPH, por lo tanto existe una evidencia que el NO es un regulador de la circulación pulmonar.¹

El óxido nítrico debe ser considerado el nitro vasodilatador endógeno, acción que mimetizan los compuestos utilizados por la clínica por más de 100 años. En el tejido vascular existe una utilización continua de L-arginina que aumenta la producción de óxido nítrico, al mismo tiempo que tiene un papel fundamental en la regulación de la presión arterial.²

El óxido nítrico es secretado no sólo por las células endoteliales, sino también por las plaquetas, macrófagos y numerosas neuronas cerebrales específicas.²

El NO es un gas tóxico poderoso por su estructura de radical libre, cuya molécula está constituida por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno, posee un electrón libre lo que le confiere una enorme reactividad química, es extremadamente lábil, por lo que su vida media está entre 5 y 15 segundos. Por su naturaleza gaseosa tiene una gran capacidad de difusión a través de membranas celulares. Una vez que el NO realiza su papel fisiológico, es degradado espontáneamente en presencia de oxígeno y agua a nitritos y nitratos.³

En humanos, el papel del NO en el mantenimiento del tono vascular está bien establecido gracias al uso de análogos de L-Arginina. Los vasos sanguíneos se encuentran en un estado constante de dilatación activa mediada por NO. Las células endoteliales liberan continuamente pequeñas cantidades de NO que producen un nivel basal de relajación del músculo liso vascular. El NO es un autorregulador del flujo sanguíneo; regula el flujo sanguíneo en el cerebro, corazón, pulmón, tracto gastrointestinal y riñones. Ajusta de forma automática el flujo sanguíneo en respuesta a cambios locales en algunas regiones del sistema vascular. Algunos de estos factores físicos a los que las células endoteliales responden con un aumento de la producción de NO son: isquemia, estrés por fricción o cizallamiento, e incremento del flujo sanguíneo a través del vaso. Factores localmente liberados por el tejido adyacente, como bradiquinina o acetilcolina, también pueden inducir la liberación de NO en algunos vasos pero no en otros. La liberación de NO en el sistema vascular también está controlada por el sistema nervioso autónomo.⁴

En grandes cantidades, el NO mata cualquier tipo de célula, inhibe el crecimiento de muchos patógenos incluyendo bacterias, hongos y parásitos, en especial patógenos intracelulares; posee además, un papel

importante en el sistema inmunológico y en la inflamación.⁵

La causa exacta del mal de altura es desconocida, los investigadores han planteado varias teorías e hipótesis. Recientemente Cynthia Beall *et al.* en un estudio publicado en el Journal Nature of science "Pulmonary Nitric Oxide in mountain Dwellers" han encontrado altos niveles de óxido nítrico en pulmones de dos poblaciones de las alturas de Bolivia y el Tibet.⁶

Además otros investigadores reportan que existen mecanismos de adaptación a la altura y concluyen que la adaptación a esta, estimula la producción del óxido nítrico y esos efectos potencialmente pueden destacar los efectos benéficos de las adaptaciones dependientes del NO.⁷

El presente trabajo de investigación, se realizó con la finalidad de determinar la influencia de la altura, sobre el óxido nítrico en los niveles plasmáticos, utilizando pollos broilers como animales de experimentación, mediante la cuantificación de sus metabolitos estables: nitrito y nitratos, utilizando el método de Greiss,⁸ cuyos resultados nos permitirán emplear esta relación con fines terapéuticos, en humanos y animales de países andinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio es una investigación experimental y longitudinal; en el que se utilizaron 300 pollos broilers de 1 día de edad sin diferenciar sexo. Los animales fueron separados al azar en dos grupos de 150 cada uno:

Grupo A: trasladado a Pucará (Junín, Perú) a 3,362 m.s.n.m.

Grupo B: criados a nivel del mar en Lima, Perú.

Los pollos de ambos grupos fueron mantenidos con alimento balanceado y agua a voluntad y un régimen de luz de 10 horas diarias, respetando las normas éticas internacionales con relación al uso de animales de experimentación.

Población: Constituida por 300 pollos broilers.

Para la medición de los niveles plasmáticos de óxido nítrico, la muestra se determinó a partir del número de pollos broilers que se requerían, para el cumplimiento del protocolo de medición de óxido nítrico, por el método de Greiss,⁸ conformada por 150 pollos en cada grupo que se subdividieron en grupos de 8 incluyendo las repeticiones.

Criterios.

Inclusión: se incluyeron pollos broilers, criados y manejados en condiciones de bioterio.

Exclusión: se excluyeron del estudio pollos que manifestaron algún síntoma de estrés medioambiental o cuando se presentaron incidentes en la toma de muestras.

Procedimiento. Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción axilar, diariamente durante

los ocho días que duró el experimento, tomando al azahar 10 animales por día, teniendo en cuenta los factores de inclusión. Las muestras de sangre fueron depositadas en tubos heparinizados, estabilizándolas reposando en hielo por 10 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos a 3500 r.p.m. obteniéndose el plasma y procesándolo inmediatamente después de obtenido.

Para la determinación de los niveles plasmáticos de NO se utilizó el método de Greiss, cuyo fundamento se basa en una reacción de diazotización, descrita por primera vez por Greiss en 1879. A través de los años esta técnica ha sufrido varias modificaciones. El reactivo de Greiss usa sulfanilamida y dicloruro de N-1 Nalfietilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Esta técnica detecta nitritos y nitratos los cuales son los dos principales productos estables del NO⁸.

Método de Greiss: La muestra problema se alcalinizó con NaOH y luego se desproteinizó con ZnSO₄.

El desproteinizado se trató con el reactivo de Greiss A y B para la formación del cromoforo magenta. Se llevó a lectura en espectrofotómetro UV a 540 nm. Una alícuota del desproteinizado se trató con Zn metálico para la reducción de nitritos a nitratos, adicionándose el reactivo de Greiss A y B, llevando a lectura igual al anterior⁸.

RESULTADOS

Los niveles plasmáticos de NO del grupo A durante los ocho días de muestreo sufrieron variaciones notorias. De valores iniciales promedio de 0,634±0,40 µmol/L, mostraron un incremento de 2,625±1,96 µmol/L al cuarto día y un descenso de hasta 0,712 ±0,73 µmol/L, al final del experimento. En el grupo B la elevación del NO fue ascendiendo diariamente.

Tabla 1. Efecto de la altura en los niveles plasmáticos de Oxido Nítrico

Grupos	Concentración plasmática de oxido nítrico (µmol/L)							
	Tiempo (días)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Lima (control) 154 m.s.n.m	0,842	1,531	1,987	2,241	2,838	2,886	3,113	3,006
Pucará (experimento) 3,362 m.s.n.m.	0,634	1,071	0,615	2,625	2,106	1,675	0,891	0,712

Fuente: Elaboración propia

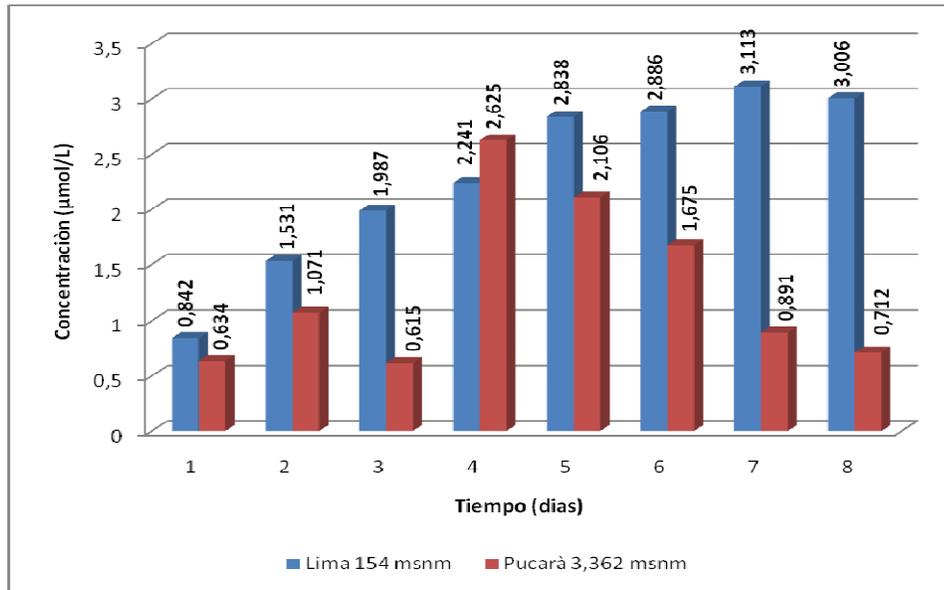


Gráfico 1. Variación de la concentración de niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos criados a nivel del mar y en altura, en un periodo de 8 días.

DISCUSIÓN

Los pollos trasladados a la altura (3,362 m.s.n.m.) presentan variaciones notorias de sus niveles plasmáticos de NO verificados por la cuantificación de sus metabolitos estables: nitritos y nitratos, lo que concuerda con Bhat y Block⁹ que afirman que la hipoxia y el frío de las grandes altitudes producen un cuadro patogénico similar con vasoconstricción pulmonar y trastornos circulatorios debido a que los requerimientos tisulares de oxígeno exceden al aporte disponible ambiental. Los pollos criados a nivel del mar elevan progresivamente sus niveles plasmáticos de NO, lo que concuerdan con Angulo *et al.*¹⁰ que reportan que los pollos aumentan significativamente sus niveles plasmáticos de NO hasta pasado el mes de edad para luego estabilizarse en un valor mucho mayor que otras especies.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la altura influye significativamente en los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos broilers, y se puede evidenciar que los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos trasladados a la altura, varían en forma oscilante, y los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos que permanecen a nivel del mar, elevan progresivamente los niveles plasmáticos.

REFERENCIAS

1. Anggard E. Oxido nítrico mediador, asesino y medicamento a la vez. *The Lancet (Brit.)*. 1994; 343:1-199.
2. Pérez R, Andrés. El papel del oxido nítrico en la hemodinámica hemostasia e inflamación. *Rev. Cubana, Estomatol.* 1997 jul.-dic.; 34(2): 84-86.
3. Flores J. *Farmacología Humana*. 4^a Ed. España. Ed. Masson S.A. 2003.
4. Gonzales V. Influencia de la diabetes experimental sobre la reactividad de las arterias basilar, carótida y renal de conejo a la Endotelina-1. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia-España.2005.
5. Peña, T., Ayón, M., Cueva, S. Hipertrofia cardiaca en pollos de carne tratados con l-arginina sometidos a hipoxia: *Rev. Inv. Vet. (Perú)*. 2001; 1:442-445.
6. Beall C., Laskowski D., Kingman S., Soria R., Villena M., Vargas E. Pulmonary Nitric Oxide in mountain Dwellers. *Journal Nature of Science*. [Revista en internet] 2001. [Acceso Setiembre 2009]. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6862/abs/414411a0.html>
7. Martín, J. Oxido Nítrico: su importancia biológica. 1996; 1 (9) [Epub ahead of print]
8. Gallardo J. Oxido Nítrico: Método de Greiss. Laboratorio de Toxicología. Protocolos y Técnicas de Laboratorio. Mexico D.F., Mexico. 1999.

9. Bhat, G., Block, E. The effect of hypoxia on phospholipid metabolism in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J. of Physiol.* [Revista en internet] 1992. [Acceso 10 de Setiembre 2009]; 262 (5): [L606/L613]. Disponible en: <http://ajplung.physiology.org/cgi/content/abstract/262/5/L606>
10. Angulo H, P., Espinoza J, Fernández V, Díaz D. Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne ¿un hallazgo trascendental?. *Rev. Vet. (Perú)*. 2004; 20(2): 3-5.