

Envejecimiento, reactividad vascular adrenérgica y síntesis de óxido nítrico en anillos de aorta de rata

José E Pasos-Peniche,* Alejandra G Miranda-Díaz,** Sylvia Totsuka-Sutto,**
 Jaime Hernández-Ojeda,*** Sara Pascoe-González,** Cecilia Garibay,**
 Ernesto G Cardona-Muñoz****

RESUMEN

Introducción: El envejecimiento impacta la función endotelial y las respuestas adrenérgica y nitroérgica. Se desconoce cómo se modifican dichas interacciones con la edad. **Objetivo:** Evaluar el efecto del envejecimiento sobre la respuesta vascular adrenérgica y su relación con la síntesis de óxido nítrico (ON) endotelial. **Material y métodos:** Mediante el método de Furchtgott se montaron preparaciones aisladas de cilindros de aorta de ratas de 10-12, 20-22 y > 40 semanas de edad. Se evaluó la respuesta contracción/relajación inducida por adrenalina, acetilcolina y nitrito de potasio en presencia y ausencia mecánica o funcional de endotelio y en ausencia y presencia de L-arginina como facilitador de la síntesis de ON. Se corrieron curvas dosis-efecto acumulativas. **Resultados:** La edad disminuyó en forma progresiva la capacidad del endotelio para producir ON y la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina, incrementando la respuesta contráctil inducida por noradrenalina sin modificar la respuesta vasodilatadora inducida por nitrito de potasio. El endotelio favoreció la respuesta vasodilatadora, mientras que su ausencia mecánica o funcional potenció la respuesta contráctil. **Conclusiones:** El envejecimiento reduce la producción de ON endotelial, incrementa la respuesta contráctil a noradrenalina, disminuye la respuesta vasodilatadora a acetilcolina, y no afecta la respuesta a nitrito de potasio.

Palabras clave: Envejecimiento, reactividad vascular, óxido nítrico, disfunción endotelial.

ABSTRACT

Background: It is known that aging has an impact on endothelial function and on nitroergic and adrenergic responses; however, it is not known how these interactions are modified with age. **Aim:** To evaluate the effect of aging on the adrenergic vascular response and its relationship with endothelial Nitric Oxide synthesis.

Material and methods: Using Furchtgott's method isolated rat aortic cylinders of 10-12, 20-22 and greater than 40 weeks of age. The response (contraction/relaxation) to adrenalin, acetylcholine and potassium nitrite was evaluated in the presence or absence of functional endothelium and in the presence or absence of L-Arginine as a nitric oxide synthesis facilitator. Dose-effect cumulative curves were drawn. **Results:** There was an inverse relationship between age and the endothelial ability to produce nitric oxide and its vascular dilatory response to acetylcholine; age also increased the contractile response to noradrenalin and didn't modify the effects of potassium nitrite. The presence of endothelium favored vasodilatory response while its absence, mechanic or functional, increased the contractile response. **Conclusions:** Aging reduces endothelial nitric oxide synthesis, increases the contractile response to noradrenalin, diminishes the vasodilatory response to acetylcholine and doesn't affect the response to Potassium Nitrite.

Key words: Aging, vascular reactivity, nitric oxide, endothelial dysfunction.

* Profesor. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán.

** Profesor e Investigador. Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

*** Pasante en Servicio Social de la Carrera de Médico, Cirujano y Partero de la Universidad de Guadalajara.

**** Cardiólogo, Hospital General No. 45, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Expertos revisores recomendados:

Dr. en C. Bruno Escalante-Acosta, Profesor e Investigador. CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional Núm. 2508, San Pedro Zacatenco, 07360. Teléfono (55) 50-61-33-21 y (55) 50-61-38-00 ext. 5026. E-mail: bescan@mail.cinvestav.mx.

Dr. en C. Esperanza Martínez-Abundis, Profesor e Investigador. Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica. Belisario Domínguez Núm. 1000, Col. Independencia. Teléfono (33) 36-17-00-60 ext.31494, (33) 38-26-70-22, Fax (33)36-16-12-18. E-mail: uiec@prodigy.net.mx.

Dr. en C. Carlos Enrique Cabrera Pivaral, Profesor e Investigador, Director de Educación e Investigación en Salud de la UMAE, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social, Belisario Domínguez Núm. 1000, Col. Independencia, 36-17-00-60, Fax 36-16-12-18. E-mail: carlos.cabrera@imss.gob.mx

INTRODUCCIÓN

Los vasos sanguíneos, antes considerados simples conductos para la sangre, hoy son verdaderos órganos con procesos de autorregulación endocrina, autocrina y paracrina, donde convergen la acción de múltiples sustancias vasoactivas, tales como catecolaminas, acetilcolina, endotelinas, péptidos natriuréticos, además de factores de crecimiento y proliferación que modulan en su conjunto el tono y la resistencia vascular, el estado de trombosis o antitrombosis, la permeabilidad vascular, los procesos de proliferación y fibrosis e incluso gran variedad de pasos del proceso inflamatorio/reparativo, que en su conjunto influyen en la probabilidad para desarrollar enfermedad cardiovascular.¹ La adrenalina y la noradrenalina son aminas vasoactivas que se encuentran en cantidad significativa en sangre, la adrenalina es liberada por la médula suprarrenal y la noradrenalina por las terminaciones nerviosas, estimulando los receptores α y β -adrenérgicos. La acetilcolina estimula las células endoteliales estimulando la producción del factor de relajación endotelial (EDRF),² hoy conocido como óxido nítrico (ON), mismo que al estimular la guanilatoclasa del músculo vascular produce el monofosfato cíclico de guanidina, (GMPc) responsable directo de la relajación del músculo liso vascular.³ El ON endotelial se forma del nitrógeno de guanidina de L-arginina por acción de la sintasa del ON (ONS) endotelial, dependiente de calcio⁺⁺/calmodulina, de forma tal que la administración exógena de L-arginina estimula la producción de ON,⁴ mientras que análogos de L-arginina como L-NAME, actúan como antagonistas competitivos de la óxido nítrico sintasa (ONS) inhibiendo la producción de ON.⁵ Los principales efectos del ON son: a) potente acción vasodilatadora,^{6,7} b) mediador intercelular en la regulación de la resistencia vascular, c) distribución del flujo sanguíneo, d) regulación del aporte de oxígeno (O_2), e) participa en la regulación del balance de Na^+ y la presión arterial. El exceso de ON produce hipotensión, mientras que su inhibición vasoconstricción patológica e isquemia tisular.

El estrés oxidativo tiene gran influencia sobre la función del ON, ya que el exceso de aniones superóxido inactivan el ON al reaccionar con él y producir peroxinitrito y al inhibir la acción de la superóxido-dismutasa produce ácido nitroso (HNO_2), disminuyendo el pH del medio.⁸

El endotelio además regula el tono vascular mediante la producción de otros potentes vasodilatadores como la prostaciclina,^{9,10} los péptidos natriuréticos y el péptido semejante a EDRF, mismas que guardan equili-

brio con las sustancias vasoconstrictoras como las prostaglandinas, la angiotensina II y la endotelina I.¹¹

El estudio de la reactividad vascular permite evaluar la respuesta del endotelio y del músculo liso vascular a diferentes sustancias vasodilatadoras y vasopresoras, que actúan estimulando o inhibiendo procesos funcionales que afectan el tono vascular y cómo dicha respuesta se modifica en las diferentes etapas de la vida.¹²

El envejecimiento produce alteraciones en el fenómeno de contracción/relajación de los vasos sanguíneos con tendencia al incremento de vasoconstricción y disminución de los procesos vasodilatadores, teniendo como expresión clínica el incremento de los valores de la presión arterial en forma paralela a la edad, pudiendo deberse estos fenómenos a modificación de la reactividad vascular inducida por el envejecimiento,¹³ como el incremento demostrado de la sensibilidad vascular a la angiotensina-II.¹⁴

Para evaluar cómo se modifica la reactividad vascular con la edad, se requiere analizar el comportamiento de los principales sistemas de regulación vasoactiva, cuantificando la respuesta a diversos vasopresores y vasodilatadores que actúen en sistemas funcionales distintos, especialmente el adrenérgico (noradrenalina), el colinérgico (acetilcolina) y un sistema independiente no mediado por receptores específicos (nitrito de potasio) en las diferentes edades, además de la participación que tiene el endotelio vascular en dichas respuestas.

El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto del envejecimiento sobre la respuesta vascular adrenérgica y su relación con síntesis de óxido nítrico (ON) endotelial en cilindros aislados de aorta de rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental para evaluar la reactividad vascular utilizando cilindros aislados de aorta de rata macho de la cepa Wistar, criadas y manejadas en condiciones de bioterio (Método de Furchgott), en donde se corrieron curvas dosis-efecto acumulativas *in vitro* con noradrenalina, acetilcolina y nitrito de potasio, además de evaluar la capacidad de producción de ON en anillos *in vitro* de las mismas aortas.

Se formaron tres grupos de 20 ratas cada uno:

- Grupo 1, jóvenes de 10 -12 semanas de edad
- Grupo 2, adultas de 20 -22 semanas de edad
- Grupo 3, ancianas > 40 semanas de edad

En cada grupo se montaron los cilindros de aorta para correr las curvas dosis-efecto y evaluar la reactividad vascular. Se tomaron anillos de la misma aorta para incubación *in-vitro* y cuantificación de la producción de ON en las siguientes condiciones: a) aortas con endotelio íntegro (control), b) aortas con desendotelización mecánica e incubadas con L-NAME.

Obtención y montaje de las tiras aórticas

- Se extrajeron cilindros de 1 cm de la aorta toracoabdominal con corte a 45°, se lavaron con solución de Krebs oxigenada y estabilizada a pH entre 7.35 y 7.45 (preparada 90 minutos previos al procedimiento)
- Los extremos se anudaron con seda 6/0, un extremo se fijó al transductor de tensión y otro a la cámara de preparaciones aisladas de doble luz. El compartimiento externo se utilizó para flujo de agua a temperatura constante y el interno se llenó con solución de Krebs oxigenada con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) para el montaje de la preparación.
- Se aplicó tensión basal de 2 g con tensores mecánicos de giro. El registro se realizó con transductor de fuerza UFI-1030 (*MAC LAB/4e de AD Instruments, Bridge Amp Maclab*).
- Los cilindros se estabilizaron 60 minutos con lavados a intervalos regulares de 15 minutos. La desendotelización mecánica se realizó con papel secante.

Reactividad vascular

Se obtuvieron curvas dosis-efecto acumulativas de acetilcolina, noradrenalina y nitrito de potasio para evaluar la respuesta contráctil y/o vasodilatadora mediada o no por el endotelio, bajo las siguientes condiciones: aorta íntegra con endotelio y aorta sin endotelio e incubada con L-NAME.

Cuantificación de nitratos

Anillos de 1 mm de las mismas aortas estudiadas en fase de reactividad vascular fueron incubadas durante 60' en 1 mL de solución Krebs sola (control) y adicionada de acetilcolina 10⁻³ M. Se hicieron controles en solución de Krebs adicionada de fármaco sin tejido. Se incubaron a 37 °C durante 60'. Para la determinación de nitratos se utilizó la reacción de Greiss, basada en la diazotización entre el nitrito y la procaína; el grupo «azo» reacciona con la N-naftil etilendiamina y forma un compuesto colorido. Se co-

locaron 500 μL del sobrenadante en tubos de ensayo por duplicado y se agregó: Ácido tricloroacético al 50% (20 mL), clorhidrato de procaína 0.04% (10 mL) y dihidroclorato de N-1-naftil-etilendiamina 0.02% (10 mL), se agitó vigorosamente y reposaron durante 10 min. La cuantificación se realizó por lectura espectrofotométrica a 548 nm de longitud de onda. La curva se estandarizó a concentraciones conocidas de nitrito de potasio (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 μM). Los anillos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y luego se pesaron. Los resultados se expresaron en μM/mg de tejido seco/60'.

Análisis estadístico

Reactividad vascular

Se trazaron curvas dosis-efecto graduales en papel semilogarítmico expresadas como porcentaje del efecto máximo. En cada punto experimental se obtuvo media ± desviación estándar (DE). Se realizó análisis comparativo de la pendiente de las curvas en cada grupo, desplazamiento, asimetría y/o paralelismo, además de cuantificar el efecto.

El **pD₂** (logaritmo negativo de la dosis efectiva 50) se obtuvo en cada curva dosis-efecto para el análisis cuantitativo de la respuesta en cada grupo de edad y condición experimental. Se comparó la producción de ON de cada grupo y condición experimental. Se realizó ANOVA de una cola (anillos con y sin endotelio) y DUNNETT para comparar las condiciones experimentales contra el control (anillos con endotelio). Se consideró *p* ≤ 0.05 como significativa. Se utilizaron los programas IGOR PRO 3.0 y Prisma 2.0.

Consideraciones éticas

Se respetaron las normas internacionales de procedimientos y manejo de animales de experimentación. El estudio fue evaluado y aceptado por el Comité de Ética y de Investigación del Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

RESULTADOS

Análisis cualitativo de reactividad vascular

La figura 1 muestra la respuesta de contracción/relajación de los cilindros aórticos con endotelio íntegro en los diferentes grupos de edad con la adminis-

tracción de noradrenalina (panel superior) y de acetilcolina (panel inferior). Destaca el hecho que conforme aumenta la edad del animal, se produce desplazamiento paralelo hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta a noradrenalina, requiriendo dosis cada vez menores de esta amina simpática para obtener el nivel equivalente de respuesta al obtenido con dosis mayores en los animales más jóvenes. La respuesta a acetilcolina se caracterizó por desplazamiento paralelo y progresivo de las curvas dosis-efecto a la derecha conforme aumentó la edad, significando que se requieren dosis cada vez mayores de acetilcolina para obtener la misma magnitud de relajación a la obtenida con dosis mucho menores en los animales más jóvenes.

La afectación mecánica o farmacológica en la función endotelial, disminuyó la magnitud de la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina (*Figura 2-A*), manifestada por el corrimiento de las curvas dosis-respuesta hacia la derecha, con respecto a las obtenidas en presencia del endotelio funcional y potenció la respuesta vasopresora inducida por noradrenalina (*Figura 2-B*), demostrado con el corrimiento hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta con respecto a las obtenidas en las mismas condiciones pero en presencia del endotelio íntegro.

La respuesta vasodilatadora producida por el nitrato de potasio no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos de edad (*Figura 3*) donde se muestra la sobreposición de todas las curvas dosis-respuesta sin modificación significativa.

Llama la atención en la *figura 4* la pobre producción de ON de los anillos de aorta de las ratas de > 40 semanas, mientras que las adultas mostraron importante expresión del ON.

Análisis cuantitativo de reactividad vascular

El *cuadro I* muestra los cambios cuantitativos observados en la reactividad vascular a la noradrenalina, acetilcolina y nitrato de potasio en las aortas de los distintos grupos de edad probados. Los resultados se expresan como pD_2 , de forma tal que a mayor valor del pD_2 existe mayor potencia de la sustancia en la función probada. Cada unidad corresponde a un orden de magnitud. La lectura de la tabla en sentido vertical muestra el cambio cuantitativo producido por la edad en la reactividad vascular a cada una de las sustancias probadas, mientras que la lectura horizontal muestra los cambios observados en la reactividad vascular con supresión física o funcional del endotelio o con la adición de L-arginina como promotor en la síntesis de óxido nítrico.

Destaca el hecho que no existen cambios significativos en las respuestas a la noradrenalina ni a la acetilcolina entre las edades de jóvenes a adultas, sin embargo, existen cambios muy significativos en la reactividad vascular a noradrenalina entre las aortas de las ratas adultas y las aortas de las ratas de > 40 semanas con cambios mayores a los 2 órdenes de magnitud. La respuesta cuantitativa a acetilcolina fue muy similar, no habiéndose observado cambios significativos entre las ratas jóvenes y las

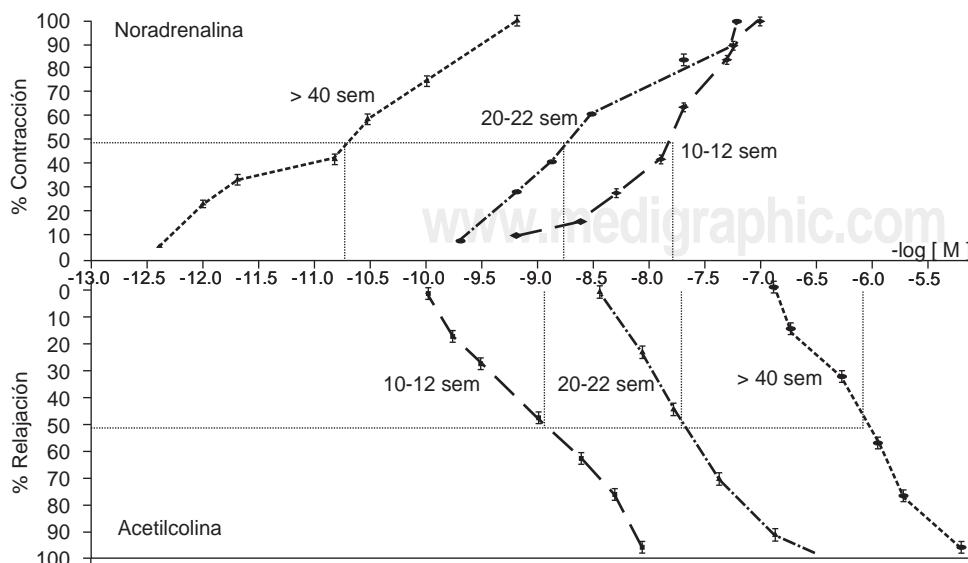


Figura 1. Reactividad vascular con la edad en arterial con endotelio íntegro. En el panel superior se observan las curvas dosis-respuesta a noradrenalina con desplazamiento progresivo hacia la izquierda conforme aumenta la edad. El panel inferior muestra las curvas dosis-respuesta a acetilcolina, destacando la disminución de la respuesta vasodilatadora conforme aumenta la edad.

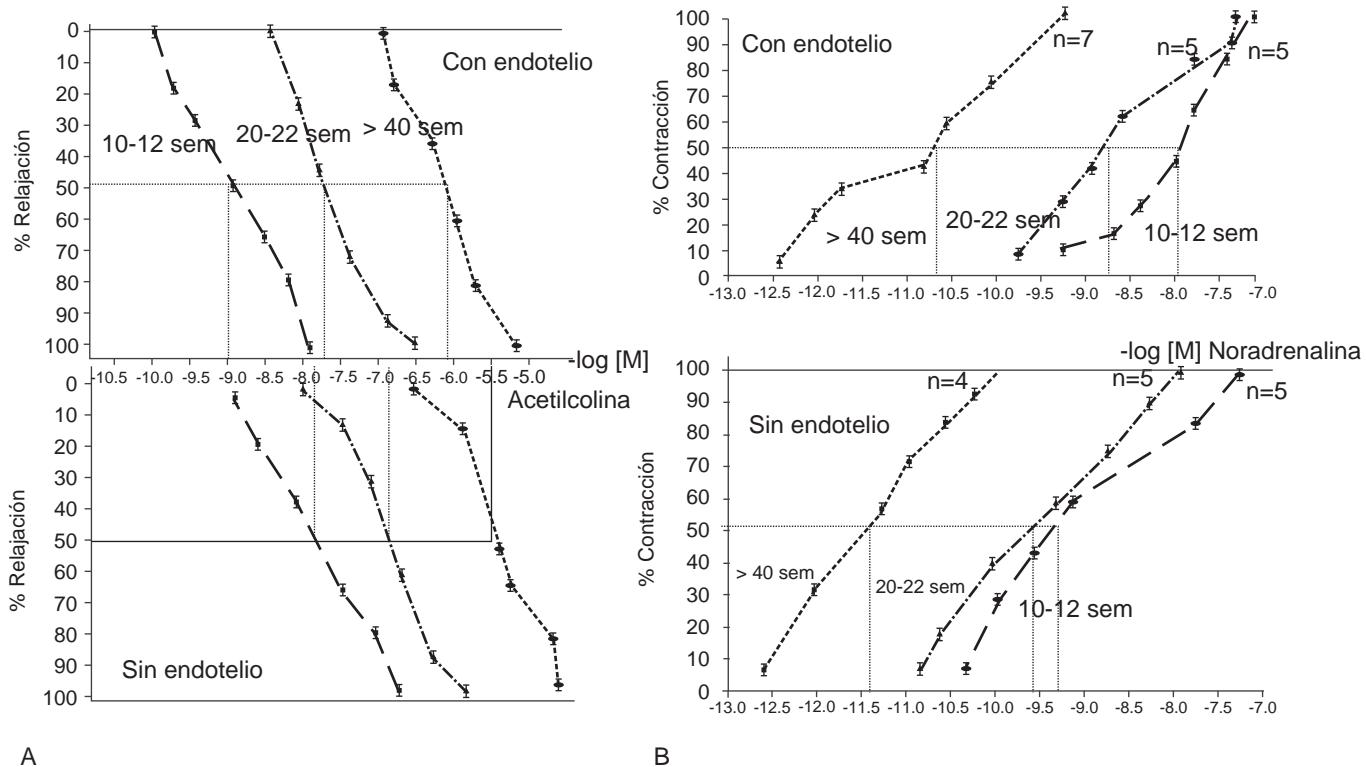


Figura 2. Reactividad vascular a acetilcolina y a noradrenalina. (A) En el panel superior se muestra la respuesta vasodilatadora a acetilcolina en las aortas con endotelio íntegro, mientras que en el panel inferior se observa el desplazamiento hacia la derecha de las curvas dosis-respuesta a acetilcolina en ausencia mecánica o funcional del endotelio. (B) En el panel superior se observa la respuesta contráctil inducida por noradrenalina en las aortas con endotelio íntegro, mientras que en el panel inferior se observa el desplazamiento hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta en ausencia mecánica o funcional del endotelio.

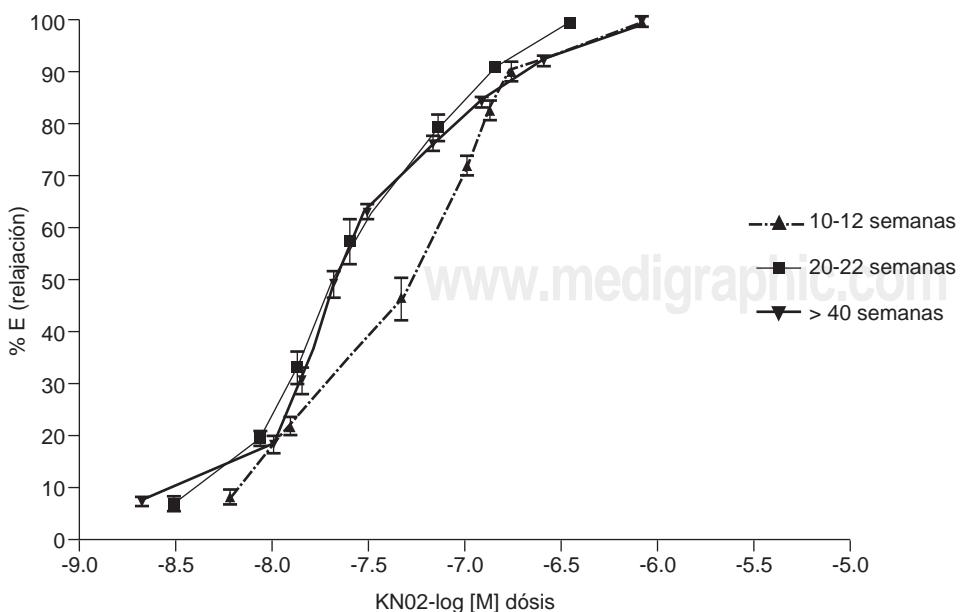


Figura 3. Efecto del nitrito de potasio sobre la relajación de las tiras de aorta en los diferentes grupos de edad. Destaca la sobreposición de las curvas.

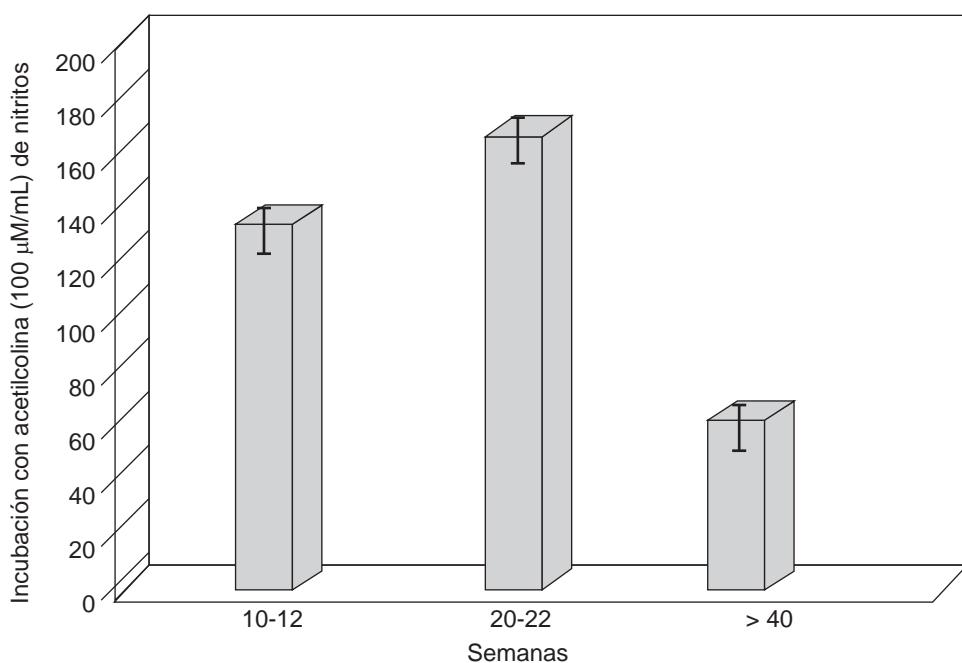


Figura 4. La producción in-vitro de óxido nítrico por los anillos de aorta de ratas de diferentes edades incubadas con acetilcolina (100 μ M). Destaca la disminución significativa en la producción de óxido nítrico de los anillos de aorta de las ratas viejas.

Cuadro I. Análisis cuantitativo de reactividad vascular por grupo de edad y condición experimental en aortas de rata.

	Edad en semanas	Valor de pD_2	
		Con endotelio	Sin endotelio L-NAME
Noradrenalina	10-12	8.7	9.3
	20-22	8.8	9.8
	> 40	11.3	11.8
Acetilcolina	10-12	8.7	7.5
	20-22	8.3	7.4
	> 40	5.9	5.7
Nitrito de potasio	10-12	7.35	7.7
	20-22	7.35	7.7
	> 40	7.6	8.05

Evaluación cuantitativa de la respuesta dosis-efecto por grupo de edad en aortas de rata (pD_2). Se muestran los cambios cuantitativos observados en la reactividad vascular a noradrenalina, acetilcolina y nitrito de potasio en las aortas de los distintos grupos de edad probados. Los resultados se expresan como pD_2 . La lectura de la tabla en sentido vertical muestra el cambio cuantitativo producido por la edad, mientras que la lectura horizontal muestra los cambios observados con la supresión física o funcional del endotelio o con la adición de L-arginina como promotor en la síntesis de óxido nítrico.

adultas y sí en forma significativa en la respuesta vasodilatadora obtenida en las aortas de las ratas adultas con respecto a las aortas de las ratas ancianas. En relación a la capacidad de relajación vascular obtenida con el nitrito de potasio, no se obser-

varon cambios significativos entre los distintos grupos de edad.

La presencia de endotelio funcional potenció la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina en todos los grupos de edad, siendo su participación menos significativa en aortas de las ratas de > 40 semanas. La ausencia mecánica o funcional del endotelio potenció la respuesta vasopresora inducida por la noradrenalina en todos los grupos de edad, siendo su participación menos significativa en las aortas de las ratas viejas. La presencia de endotelio no modificó la respuesta vasodilatadora inducida por el nitrito de potasio en ninguna de las edades probadas.

DISCUSIÓN

El incremento en edad y la ausencia del endotelio vascular disminuyó la capacidad de relajación y aumentó la capacidad de contracción. La producción *in vitro* de ON presentó máximos valores en ratas de 20-22 semanas. Los análisis cualitativo y cuantitativo demuestran que existe un paralelismo entre la alteración funcional del endotelio, la potenciación de la respuesta vascular adrenérgica y la disminución de la respuesta vasodilatadora a acetilcolina, sin relacionarse con la vasodilatación producida por el nitrito de potasio. Con la remoción mecánica del endotelio o con la administración del L-NAME se disminuyó significativamente la respuesta vasodilatadora y se magnificó la respuesta presora, sin embargo, no se

abolí completamente la respuesta vasodilatadora inducida por el endotelio, lo que puede explicarse por la presencia de endotelio funcional residual en las tiras de aorta, a pesar de la desendotelización mecánica y/o que las concentraciones de L-NAME no hayan sido las dosis inhibitorias máximas. Otra condición que pudiera explicar esta respuesta es la presencia de receptores a la acetilcolina en la membrana del músculo liso vascular con efecto relajante, así como la L-arginina sustrato de la NOS para la producción de ON y citrulina, generando así la respuesta vasodilatadora.¹⁵

Los cambios en la reactividad vascular observados con el envejecimiento deben analizarse con un enfoque multifactorial, considerando la participación de los receptores, los mecanismos de liberación de sustancias vasoactivas producidos por el endotelio, la expresión de la NOS-III que puede estar influenciada por los estímulos mecánicos ejercidos sobre la superficie endotelial o por la acción de agentes neurohumorales como la acetilcolina. En condiciones fisiológicas, el principal estímulo mecánico a que está sometido el endotelio es al estrés de rozamiento, mismo que estimula la producción de ON, mismo que difunde al músculo liso vascular subyacente, incrementando la producción del GMPc, responsable final de producir la vasodilatación dependiente del endotelio. La expresión de la NOS-III está mediada por una proteína G (acetilcolina y sustancia P) que activan la vía Ca^{++} -calmodulina por bradicinina e incluso algunos agonistas adrenérgicos pueden estimular en forma directa la expresión de la NOS-III.

La «disfunción endotelial» se traduce funcionalmente como la disminución en la disponibilidad de ON y la consecuente disminución de la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio. La disminución de ON puede estar condicionada por alteración a 4 niveles del proceso de su síntesis o degradación: a) disponibilidad reducida de L-arginina, b) defecto de receptores selectivos o de las vías de transducción, c) disminución de la actividad de NOS-III o d) destrucción o inactivación incrementada de ON y disponibilidad reducida de sustratos.¹⁶ El envejecimiento es la condición que correlaciona más fuertemente con disfunción endotelial.¹⁷ La vasodilatación producida por acetilcolina en aortas viejas se potenció más significativamente con la administración de L-arginina que en jóvenes,¹⁸ lo que pudiera interpretarse como que el joven tiene suficiente sustrato (L-arginina) y por eso no se magnifica la respuesta a acetilcolina con su adición, mientras que en la vejez posiblemente existe disminución en la cantidad o accesibilidad a este sustrato y por eso la adición del mismo

mejora en forma más significativa la disfunción endotelial presente en este grupo de edad.

La evaluación de la función endotelial es procedimiento útil para tratar de determinar el estado funcional de los lechos vasculares y por ende la salud cardiovascular, permitiendo evaluar el impacto de nuevas estrategias terapéuticas en la preservación o restauración de la misma.¹⁹ La administración de L-arginina a pacientes hipertensos produce menor vasocostricción que en sujetos sanos²⁰ sin modificar la respuesta a la acetilcolina,²¹ sugiriendo que el tono arterial del paciente con hipertensión arterial depende menos del efecto del ON, quizá por el daño del sistema. En el presente trabajo la adición de L-arginina incrementó significativamente la vasodilatación inducida por acetilcolina en las arterias de las ratas ancianas, mientras que en los pacientes hipertensos la respuesta es muy pobre,²² esta observación pudiera deberse a que la disfunción endotelial producida por el envejecimiento pudiera implicar mecanismos diferentes a los involucrados en la hipertensión arterial, siendo quizás la disminución en la disponibilidad del sustrato el mecanismo más importantemente involucrado en el envejecimiento como causal de la disminución en la producción del ON.

El presente estudio sólo permite establecer correlación entre el envejecimiento y la capacidad disminuida de los vasos arteriales para producir ON, así como la reversión parcial de dicha disfunción con la adición de L-arginina. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales para establecer si la disminución en la producción de ON es por alteración en la síntesis, aumento en la degradación o interferencia funcional por otros mecanismos.

AGRADECIMIENTOS

Fuente de Apoyo Financiero: Grant; Unidad de Investigación Cardiovascular, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Institución que aprobó el protocolo de investigación y el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ, Creager MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 1996; 27: 4.
2. Murad F, Arnold WP, Mittal CK, Braughler JM. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1979; 11: 175-204.

3. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: 822-827.
4. Getz GS, Reardon CA. Arginine/Arginase NO NO NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(2): 237-239.
5. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2-12.
6. Furchtgott RF. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *N JAMA* 1996; 276: 186-188.
7. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 771-90.
8. Furchtgott RF. *Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, and endothelium*. NY: Raven Pres 1988; 401-418.
9. Bataineh A, Raji L. Angiotensin II, nitric oxide and end-organ damage in hypertension. *Kidney Int* 1998; 68: S14-S19.
10. Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R et al. Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 2007; 25(2): 415-421.
11. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I et al. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension* 1997; 29:736-743.
12. Furchtgott RF, Bhadrakom S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropyl-aterenol, sodium nitrite and other drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1953; 108: 129-143.
13. Ahlquist RP. Development of the concept of alpha and beta adrenotropic receptors. *Ann NY Acad Sci* 1966; 549:552.
14. Gray SD. Effect of angiotensin II on neonatal lamb carotid arteries. *Experientia* 1976; 32: 350-351.
15. Ferri C, Grassi D, Grassi G. Cocoa beans, endothelial function and aging: an unexpected friendship? *J Hypertension* 2006; 24(8): 1471-1474.
16. John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertension* 2000; 18: 363-374.
17. Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch C, Schofield PM. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1796-1804.
18. Imaizumi T, Hirooka Y, Masaki H, Harada S, Momohara M, Tagawa T, Takeshita A. Effects of L-arginine on forearm vessels and responses to acetylcholine. *Hypertension* 1992; 20: 511-517.
19. Heiss C, Schroeter H, Balzer J, Kleinbongard P, Matern S, Sies H et al. Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharm* 2006; 47(2): S128-S135.
20. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87: 1468-1474.
21. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 274-279.
22. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW, Rabelink TJ. Vascular function in forearm of hypercholesterolemic patients of and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995; 346: 467-471.

Dirección para correspondencia:

Dr. en C. Ernesto Germán Cardona-Muñoz

Av. La Paz Núm. 2758, Col. Arcos Sur 44320,
Guadalajara, Jalisco, México.
Teléfono: (33) 36-30-13-55, 3630-13-59, 3630-13-62,
Fax (33) 3617-34-99,
E-mail: came_1@lycos.com