



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**



**Sección de Estudios de Posgrado e Investigación**

***Efectos de la terapia de oxigenación hiperbárica, vitamina C y  
vitamina E sobre la expresión de los receptores AT1 y AT2 en un  
modelo de infarto agudo al miocardio sin reperfusión en rata Wistar.***

**Presenta:**

**M C y P Lourdes Nallely Acevedo Villavicencio**

**TESIS**

**Para la obtencion del titulo de:**

**Maestra en Ciencias en Farmacología**

**Director de tesis:**

**Dra. Cleva Guadalupe Villanueva López**

**Dra. María del Carmen Castillo Hernández**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental perteneciente a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación (SEPI) de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la Dirección de la D en C. María del Carmen Castillo Hernández.

*Un pájaro posado en un árbol,  
nunca tiene miedo a que la rama se rompa,  
porque su confianza no está en la rama,  
sino en sus propias alas.*

***El valor que has tenido para no desistir,  
te convierte en una persona diferente,  
tal vez hasta rara, acreedora a iniciar  
tu siguiente recorrido,  
el valor que has tenido, te convierte  
en una “anomalía”***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme dado el don de la vida, y por poner ángeles en mi camino.

A mi padre por su incansable paciencia y amor, virtudes que me han dado fortaleza para llegar hasta este punto, por ser mi ejemplo de responsabilidad, gracias por creer en mí.

A mi madre, por su ternura, cariño comprensión y palabras de aliento en el momento necesario para impulsarme hacia adelante, a pesar de los enojos que te causo, siempre estás ahí dándome tu amor, gracias por ser mi motor.

A mis hermanas, por motivarme a ser mejor cada día, por los momentos de locura que me dan tranquilidad en el alma, por estar a mi lado siempre, y por no dejarme caer dándome su amor, ternura y comprensión a pesar de nuestras colisiones de caracteres, tenerlas a mi lado me da lo que necesito para continuar.

A la gloriosa Escuela Superior de Medicina y al CONACyT por seguir respaldando mi crecimiento profesional.

A mi mentora, Dra. Carmen Castillo, por creer en mí, por enseñarme tantas cosas académicas que ayudan a mi crecimiento profesional pero sobre todo por esas lecciones de vida que siempre son necesarias.

A mis sinodales por sus consejos, guía, paciencia y aportes que enriquecieron este trabajo.

A Rodrigo Romero, por ser una parte fundamental para la realización de esta tesis, por tu confianza, tu apoyo, tu paciencia, por todas tus enseñanzas y por tanto cariño.

A mis queridos amigos Diego Lezama, Verence Merlín, Claudia Ramírez y Massiel Ávila, por todo su apoyo y cariño, por los momentos de desahogo, risas, intercambios intelectuales y demás locuras que hicieron más llevaderos estos 2 años de maestría, espero esto sea solo el inicio.

A Daniel León, 10 años de amistad se dicen fácil, el apoyo y cariño recibidos son invaluable para mí, sabes que más que mi amigo, eres mi hermano.

## INDICE

Índice de tablas y figuras .....	2
Abreviaturas.....	3
Resumen .....	4
Abstract .....	5
1.Introducción .....	6
1.1 Epidemiología .....	6
1.2 Infarto Agudo al Miocardio.....	7
1.3 Angiotensina .....	13
1.3.1 Receptor AT1 .....	16
1.3.2 Receptor AT2 .....	17
1.4 Oxigenación hiperbárica .....	20
1.4.1 Antecedentes de cámara de OHB .....	20
1.4.2 Efectos de la OHB .....	20
1.4.3 Bases fisiológicas de la OHB	
1.4.3.1 Intercambio de gaseoso.....	24
1.4.3.2 Requerimiento de oxígeno tisular .....	25
1.5 Vitaminas antioxidantes .....	28
1.5.1 Vitamina C .....	28
1.5.2 Vitamina E .....	31
1.5.3 Uso de las vitaminas C y E .....	34
2.Justificación .....	36
3.Planteamiento del problema .....	37
4.Hipótesis .....	38
5.Objetivo general.....	39
6.Objetivos particulares .....	40
7.Ubicación temporal y espacial .....	41
8.Análisis estadístico .....	41
9.Metodología .....	41
8.1 Integración de grupos.....	43
10.Western Blot .....	45
9.1 Procedimiento .....	46
9.2 Electroforesis .....	47
9.3 Transferencia .....	47
9.4 Bloqueo e incubación con anticuerpo .....	48
9.5 Revelado .....	48
9.6 Detección .....	49
10. Resultados .....	50
11. Discusión.....	52
12. Conclusiones.....	55
13. Anexo.....	56
12. Bibliografía.....	58
14. Carta de CICUAL .....	66

## Índice de tablas y figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Fig. 1.- Principales causas de mortalidad mundial .....	6
Fig. 2.- Principales causas de mortalidad nacional .....	7
Fig. 3.- Estructura de la angiotensina .....	14
Fig. 4.- Sistema renina angiotensina .....	15
Fig. 5.- Regulación de los receptores AT1 y sus efectos .....	19
Fig. 6.- Efecto de la OHB en la expresión del receptor AT1 .....	27
Fig. 7.- Estructura química de la vitamina C .....	28
Fig. 8.- Oxidación de endiol a dicetona .....	29
Fig. 9.- Mecanismo de acción del $\alpha$ -tocoferol .....	34
Fig. 10.-Reestablecimiento del $\alpha$ -tocoferoxilo a $\alpha$ -tocoferol .....	35
Fig. 11.- Cámara hiperbárica experimental .....	45
Fig. 12.- Efecto de los tratamientos sobre la expresión del receptor AT1 .....	51
Fig. 13.- Efecto de los tratamientos sobre la expresión del receptor AT2 .....	52
Tabla 1.- Conformación de los grupos experimentales .....	44

## **Abreviaturas**

OMS: Organización Mundial de la Salud

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

IAM: Infarto Agudo al Miocardio

PMN: Polimorfonucleares

MQ: Macrofagos

DAI: Desfibrilación automática implantable

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ON: Óxido nítrico

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina

PKC: Protein cinasa C

IP3 : Inositol trifosfato

DAG: Diacil glicerol

OHB: Oxigenación hiperbárica

ATA: Atmosferas totales absolutas

ROS: Especies reactivas de oxígeno

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

TBP: Proteína de unión de tocoferol

## Resumen

En las últimas décadas se ha presentado una elevada incidencia y aumento exponencial de la morbimortalidad en México y a nivel mundial a causa del infarto agudo al miocardio, por lo tanto es necesaria la implementación de nuevas terapéuticas que ofrezcan beneficios para los pacientes que cursan con esta patología, el uso de la oxigenación hiperbárica (OHB) es un tratamiento que ha tomado auge en los últimos años de igual manera que el uso de vitaminas antioxidantes como lo son la Vitamina C y E, sin embargo aún se encuentran en estudio los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo su efecto benéfico, pues no han sido del todo esclarecidos, por lo que en este estudio se busca analizar si el uso concomitante de dichas terapias produce una regulación a la baja sobre la expresión de receptores AT1 y aumenta la expresión de receptores AT2, con la finalidad de mejorar la función cardíaca y potencialmente limitando las secuelas postinfarto. **Objetivo:** Evaluar el efecto de 3 sesiones de terapia de OHB y la administración concomitante de vitaminas C y E en la expresión de los receptores AT1 y AT2 en el corazón con IAM. **Material y Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar macho, exponiéndose a 3 sesiones de OHB y administración concomitantes de vitaminas C y E, posteriormente se analizó el corazón con la técnica de Western Blot. Los **resultados:** obtenidos sugieren que tras la administración de 3 sesiones de OHB y Vitaminas C y E disminuyen de forma importante la expresión de los receptores AT1 y al mismo tiempo aumenta drásticamente la expresión de receptores AT2, con lo que se puede deducir que este tratamiento coadyuvante es benéfico para los pacientes con IAM.

## **Abstract**

In recent decades it has been presented a high incidence and an exponential increase in morbidity and mortality in Mexico and globally because of acute myocardial infarction, at the both it is necessary to implement new therapeutics that benefits to patients that present this pathology, the use of hyperbaric oxygenation therapy (HBO) is a treatment that has flourished in recent years even as the use of antioxidant vitamins such as vitamin C and E, although still continue to study the mechanisms that provide these benefits because they have not been fully clarified, so this study seeks to examine whether the concomitant use of these therapies results in downregulation of the expression of AT1 receptors and increases in the expression of AT2 receptors, in order to improve heart function and potentially limiting infarction sequelae. **Objective:** To evaluate the effect of 3 sessions of HBO therapy and concomitant administration of vitamins C and E in the expression of AT1 and AT2 receptors in the heart with AMI. **Material and Methods:** Wistar rats were used and exposed to 3 sessions of HBO and concomitant administration of vitamins C and E, then the heart was analyzed. with the technique of Western blotting The obtained **results:** suggest that after administration of 3 sessions of HBO and Vitamins C and E the expression of AT1 receptors significantly reduce while the expression of AT2 receptor dramatically increases, so we can inferred that this adjuvant treatment is beneficial for patients with AMI.

# 1. INTRODUCCION

## Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte a nivel mundial, contribuyendo al 13.2% de la mortalidad. (WHO, 2014)

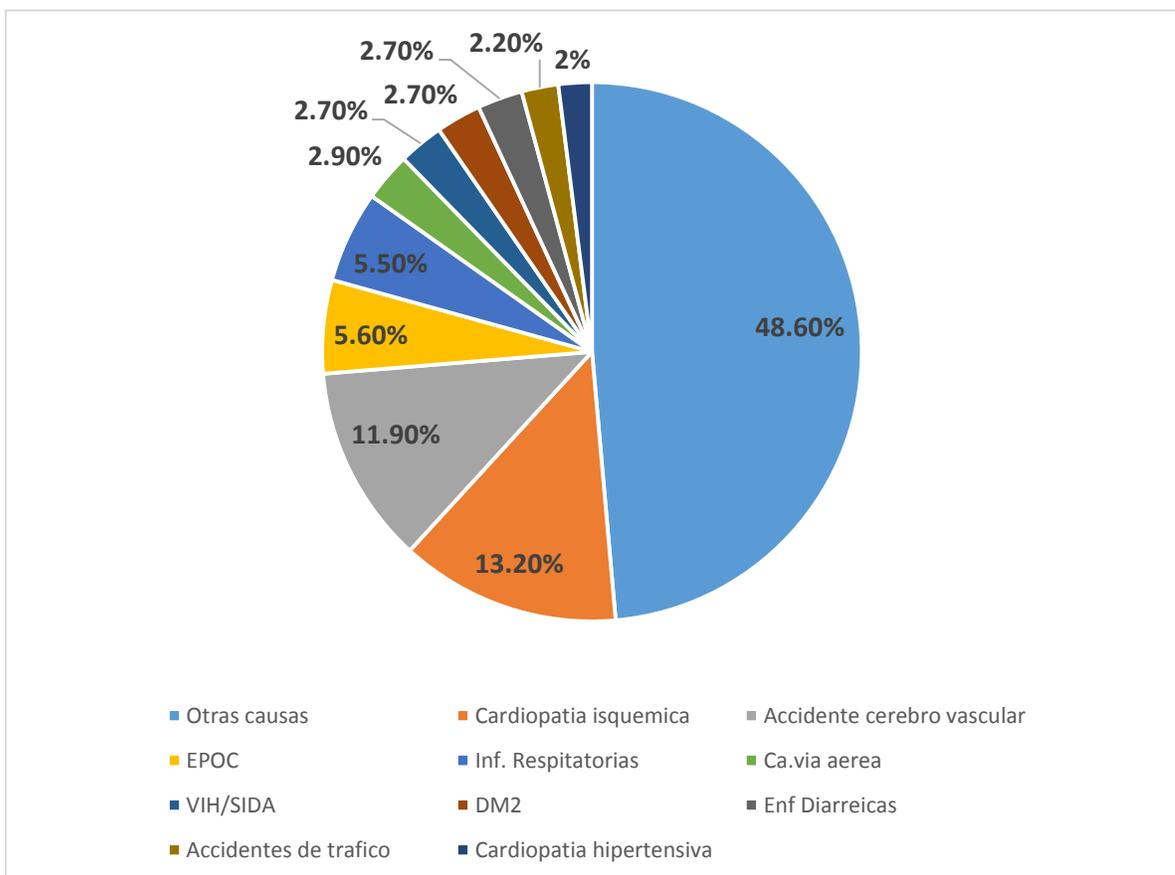


Fig. 1. OMS 2012, Principales causas de mortalidad a nivel mundial

México sufre importantes cambios epidemiológico en la actualidad. El INEGI en el año 2012 ha reportado que las enfermedades cardiovasculares son, en su conjunto, la primera causa de muerte en nuestro país con un total de 113 240 muertes.

De ellas, la cardiopatía isquémica ocupa un lugar preponderante, con el 18.50% del total nacional y de este el 88.58% (77284) fueron secundarias a cardiopatía isquémica en las cuales su prevalencia se extiende a todas las regiones y estratos sociales de la población.

(INEGI, 2012)

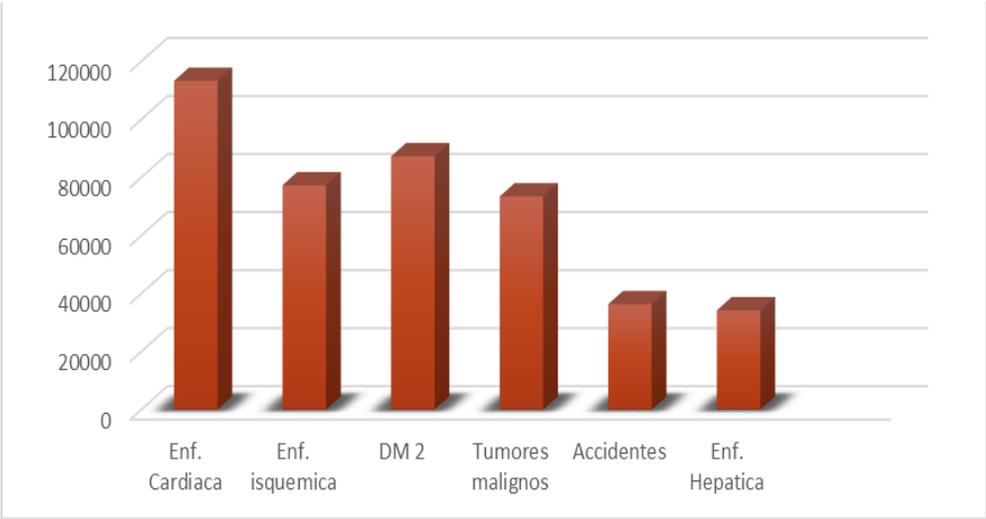


Fig. 2 INEGI 2012, Principales causas de mortalidad de los Estados Unidos Mexicanos.

### 1.3 Infarto Agudo al Miocardio

El infarto agudo al miocardio (IAM) se define como el desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno del músculo cardíaco. Pueden presentarse anomalías de uno o

ambos factores en un solo paciente. Las causas de isquemia del miocardio están dadas por los siguientes factores:

- Disminución del aporte de oxígeno al miocardio
  - Obstrucción de las coronarias
  - Obstrucción fija
  - Aterosclerosis
- Causas diversas
  - Espasmo arterial
  - Hipotensión general
  - Anemia grave
- Incremento de las necesidades de oxígeno del miocardio
  - Inotropía miocárdica elevada
  - Hipertrofia miocárdica
  - Taquicardia

Además, existen factores predisponentes que hacen que el organismo sea vulnerable para presentar un IAM, estos factores se dividen en criterios mayores y menores, entre los criterios mayores se encuentran: (Tintinalli JE, Ruiz E 2013)

- Hipercolesterolemia
- Hipertensión arterial
- Diabetes Mellitus
- Tabaquismo

Otros criterios que podemos tomar como menores son:

- Sexo masculino
- Obesidad
- Síndrome Metabólico
- Sedentarismo
- Estrés
- Alcoholismo

A nivel clínico es necesario considerar estos factores predisponentes de forma integral ya que al ser identificados de forma temprana, podemos brindar a los pacientes un manejo global que permita reducir la morbimortalidad del IAM. (Tintinalli JE, Ruiz E 2013; Bialostozky 2001; Sinz 2011)

Una vez establecido el infarto, ocurren una enorme cantidad de procesos fisiológicos a nivel del miocardio, los cuales dependerán de la arteria ocluida y por ende de la extensión del infarto pudiéndose describir diferentes áreas cardiacas con diferente calidad del miocardio por lo que podemos encontrar tejido (Sinz 2011; Serna 2010):

- Normal (tanto en su estructura como función)
- Isquémico
- Aturdido
- Hibernante
- Con necrosis/fibrosis

Así mismo es necesario considerar la extensión del infarto la cual estará determinada por el calibre del vaso ocluido, el grado de circulación colateral y del número de episodios angina inestable con los que haya cursado el paciente. (Bialostozky 2001)

Por lo tanto se puede describir que el miocardio aturdido se presenta como consecuencia de la interrupción del flujo coronario, con carácter transitorio, agudo, severo y de corta duración. El flujo al restaurarse, total o casi totalmente, forja una discrepancia: la inmediata restauración del flujo y la tardía recuperación de la función ventricular.

La disfunción ventricular en el miocardio aturdido se presenta a pesar de la ausencia de tejido con daño irreversible y de la restauración normal o casi normal del flujo coronario. Puede persistir por horas, días, semanas (4-6 ó +). El miocardio aturdido se presenta en las siguientes circunstancias:

- Postinfarto del miocardio con reperfusión temprana (trombólisis y/o angioplastía).
- Después de complicada y prolongada sesión de intervencionismo con isquemias prolongadas (principalmente si existe previo daño miocárdico).
- Postcirugía.
- Angina inestable.
- Isquemia inducida por el ejercicio.
- Trasplante cardíaco.

Por otro lado al miocardio hibernante, que es el área afectada en la cual se intenta enfocar este estudio, podemos definirlo como miocardio viable postisquémico en donde el flujo coronario es insuficiente para apoyar la función contráctil, pero es adecuado para mantener la estructura e integridad celular. Se establece un equilibrio vital y se compensa la reducción de la perfusión en razón de la disminución de la función. Este relativo equilibrio puede mantenerse por períodos prolongados (semanas/meses/años) en ausencia de isquemia.

La hipoperfusión crónica se debe principalmente al gasto bajo. Se ha demostrado que el miocardio hibernante se tiende a deteriorar con el transcurso del tiempo por lo que es necesario, implementar mecanismos que puedan frenar los cambios ultraestructurales producto de la hipoperfusión crónica para impedir la pérdida de los elementos contráctiles y la consecuente destrucción de los organelos del miocito.(Bialostozky 2001; Liu & Mason 2001; Serna 2010)

Por lo tanto cuando se desarrolla miocárdio hibernante es necesario determinar las posibilidades de recuperación de la función regional. En la zona con contractilidad miocárdica anormal puede existir una mezcla de fibrosis y/o cicatriz con miocitos viables, los cuales si se someten a un ambiente adecuado, pueden ser nuevamente funcionales, logrando así una mejoría en la función cardíaca y en la sobrevida del paciente postinfartado. (Serna 2010; A. Carbonell San Román, Segura de la Cal 2013)

En la fase aguda de un infarto de miocardio se produce una respuesta inflamatoria local y generalizada, con acumulación de polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (MQ) en el lugar de la lesión miocárdica y una alteración de los reactantes de fase aguda plasmática (leucocitos, proteína C, citocinas, etc.). La intensidad de la respuesta inflamatoria viene determinada no sólo por la extensión del infarto y la respuesta inmunológica individual, sino también por la presencia de reperfusión y/o terapéutica trombolítica. (Sanjuán et al. 1997)

Actualmente el estándar de oro para el tratamiento del IAM es la trombólisis y/o la angioplastia coronaria transluminal percutánea con stent. Sin embargo, cuando se sobrepasa la ventana terapéutica, estas alternativas dejan de ser útiles puesto que sobreviene la cardiopatía isquémica con falla ventricular de grado variable. En esas circunstancias, se puede proponer una cirugía de revascularización miocárdica para intentar salvar los territorios isquémicos y limitar al máximo el daño miocárdico por necrosis, siempre y cuando los pacientes sea candidato a su realización. (Hertz 2013)

Por lo general, el área necrótica es reemplazada por una cicatriz, en donde participan los fibroblastos, la cual capaz de generar arritmias letales recurrentes que requieren del uso de dispositivos de desfibrilación automática implantable (DAI) o de resincronizadores, por lo que sigue siendo necesario implementar nuevas terapias o terapias adyuvantes para mejorar la sobrevida de los pacientes. (A. Carbonell San Román, Segura de la Cal 2013)

## 1. 4 Angiotensina

La historia del descubrimiento del sistema renina - angiotensina se inició en 1898 con los estudios realizados por Tigerstedt y Bergman, quienes reportaron el efecto presor de extractos renales, sustancia que nombraron *renina* en relación a su origen. En 1934, Harry Goldblatt indujo hipertensión experimental en perros por ligadura de la arteria renal, concluyendo que el modelo era viable para el estudio de dicha patología. Alrededor de 1936, se estudió la fisiopatología de la hipertensión de forma simultánea por dos grupos de investigadores independientes uno de ellos adscrito a la Escuela de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, y el otro en los Laboratorios Eli Lilly, en Indianápolis, ambos equipos usaron la técnica de Goldblatt para producir hipertensión experimental, y se demostró la secreción renal de un agente presor similar a la renina. En los años siguientes, los dos equipos describieron la presencia de un nuevo compuesto en la sangre de la vena renal de los riñones isquémicos. Este agente fue extraído a partir de sangre con 70 % de acetona y tuvo un efecto presor corto. La conclusión final fue que la renina actúa enzimáticamente en una proteína del plasma para producir la nueva sustancia. En Buenos Aires, se llamaba hipertensina; en los Estados Unidos, angiotonina, posteriormente en 1958, Eduardo Braun Menéndez de Argentina e Irving H. Page de Estados Unidos acordaron nombrarlo angiotensina. (Basso & Terragno 2001)



como la secreción de citocinas y la proliferación celular. (Diem T. DINH, Albert G. FRAUMAN, Colin I. JOHNSTON 2001)

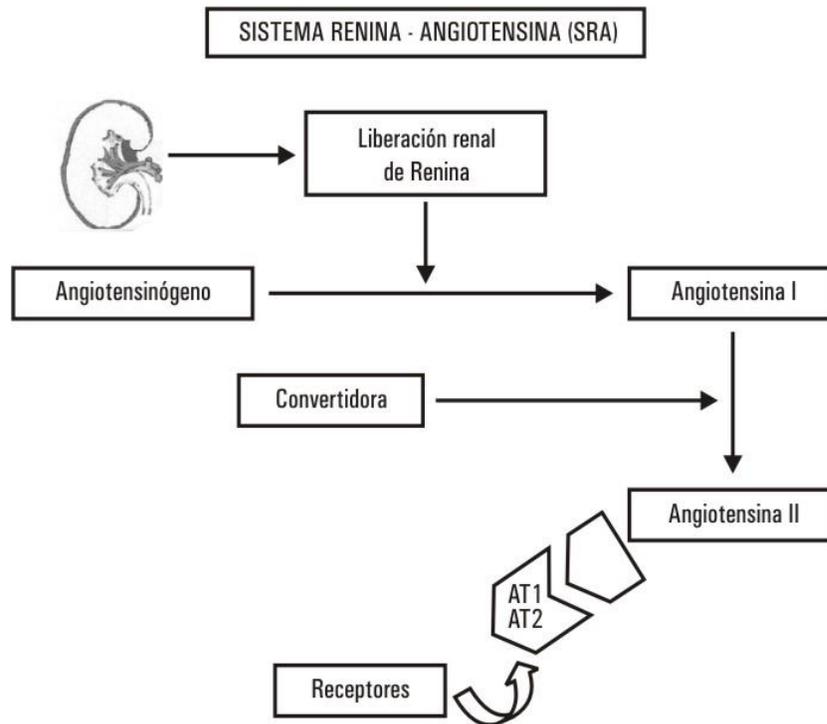


Fig 4. Sistema Renina angiotensina.

En la actualidad se ha descrito la participación de la Ang II en múltiples procesos fisiológicos, los cuales son regulados principalmente por dos subtipos principales de receptores: el receptor AT1 y el receptor AT2 (Filipeanu et al. 2001) y se han descrito además la posibilidad de la existencia de receptores AT3 y AT4 los cuales aún continúan bajo investigación para su caracterización por lo que nos enfocaremos a la descripción de los receptores AT1 y AT2. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores

con siete dominios transmembranales y comparten aproximadamente el 30% de su secuencia de aminoácidos (Kaschina 2003)

#### **1.4.1 Receptor AT1**

En los humanos, el receptor AT1 es codificado por un solo gen ubicado en el brazo q, banda 22 del cromosoma 3, mientras que en los ratones se conocen 2 genes localizados en los cromosomas 17 y 2 que dan origen a dos formas del receptor AT1 conocidas como receptor AT1a y receptor AT1b respectivamente, con más de 95% de similitud en su secuencia de aminoácidos.

La distribución del receptor AT1 ha sido estudiada extensamente, reconociéndose en la actualidad en la mayoría de los tejidos en humanos, primates y roedores, siendo además el tipo predominante en los adultos. (Filipeanu et al. 2001) Se caracteriza por acoplarse a proteínas G $\alpha$ q/11 (aunque también se puede acoplar a G $\alpha$ i/0, G $\alpha$ 12/13). Esto le permite activar fosfolipasas como la A, la D, y la C. Esta última genera inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), una molécula que activa a la proteína cinasa C (PKC) que fosforila diferentes proteínas que participan en acciones tales como: la contracción de músculo liso y la secreción de aldosterona, así como el crecimiento y la proliferación celular. (Kaschina 2003)

De esta forma el receptor AT1 es el encargado de mediar la mayoría de las acciones conocidas de la Ang II como son la vasoconstricción con el secundario incremento de la

presión arterial y la estimulación de la proliferación celular, lo cual tendrá como resultado producción de fibroblastos, fibrosis, para posterior mente llevar al paciente a cursar con hipertrofia cardiaca, condición que potencialmente puede ser mortal. (Touyz & Schiffrin 2000) Otra característica del receptor AT1 es que al unir Ang II se produce una fosforilación importante de sus residuos de serina en el extremo carboxilo terminal, lo cual conlleva al reclutamiento de un grupo de proteínas denominadas arrestinas, permitiendo la endocitosis del complejo Ang II-receptor AT1 dentro de vesículas recubiertas con clatrina y la desensibilización del sistema. Una vez que el receptor AT1 es internalizado, puede ser degradado o desfosforilado y reciclado hacia la superficie celular, cabe aclarar que lo anterior no sucede con el receptor AT2 (Thomas & Qian 2003; Kaschina 2003; KH 1997)

#### **1.4.2 Receptor AT2**

El gen que codifica al receptor AT2 se encuentra en el cromosoma X, tanto en humanos cómo en ratones. (Diem T. DINH, Albert G. FRAUMAN, Colin I. JOHNSTON 2001) El Receptor AT2 se expresa de manera predominante durante la etapa fetal, disminuyendo su expresión de manera considerable al momento del nacimiento, aunque se sigue detectando en niveles bajos en varios tejidos, por ejemplo: nervioso, cardíaco, y renal. (Touyz & Schiffrin 2000) Cabe mencionar que en la etapa adulta los niveles de expresión de este receptor se incrementan bajo condiciones de estrés o de daño tisular. (Kaschina 2003)

Las vías de señalización del receptor AT2 no se conocen del todo, sin embargo existe evidencia que apoya el acoplamiento del receptor AT2 a proteínas G inhibitoras (Gai/2 Gai/3) lo cual provoca la activación de fosfatasa tanto de serina-treonina como la PP2A, así como de tirosina como la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. Este acoplamiento provoca la desfosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del receptor AT1 con Gαq (AT1 -Gαq), siendo éste un mecanismo por la cual el receptor AT2, antagoniza las acciones del receptor AT1. (Touyz & Schiffrin 2000)

Los efectos fisiológicos del receptor AT2 son contrarios a los del receptor AT1, es decir participa en la vasodilatación y en la inhibición de la proliferación celular, además interviene en el desarrollo fetal y en la diferenciación tisular. (Touyz & Schiffrin 2000; Pérez-díaz et al. 2006)

### **Sistema renina angiotensina e IAM**

Existen antecedentes que reportan que una vez que se produce el daño al miocardio por infarto se desencadenan un gran número de fenómenos para su adaptación, uno de los mecanismos que se activan por la vía del receptor AT1 es la remodelación cardiaca caracterizada por alteraciones en la matriz extracelular, los principales colaboradores para estos cambios estructurales son los fibroblastos, los cuales poseen proteínas estructurales como fibronectina y colágeno I y III, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP's) y factores de crecimiento secundarios que actúan de forma autocrina/paracrina para promover el proceso de remodelación. (Paradis et al. 2000)

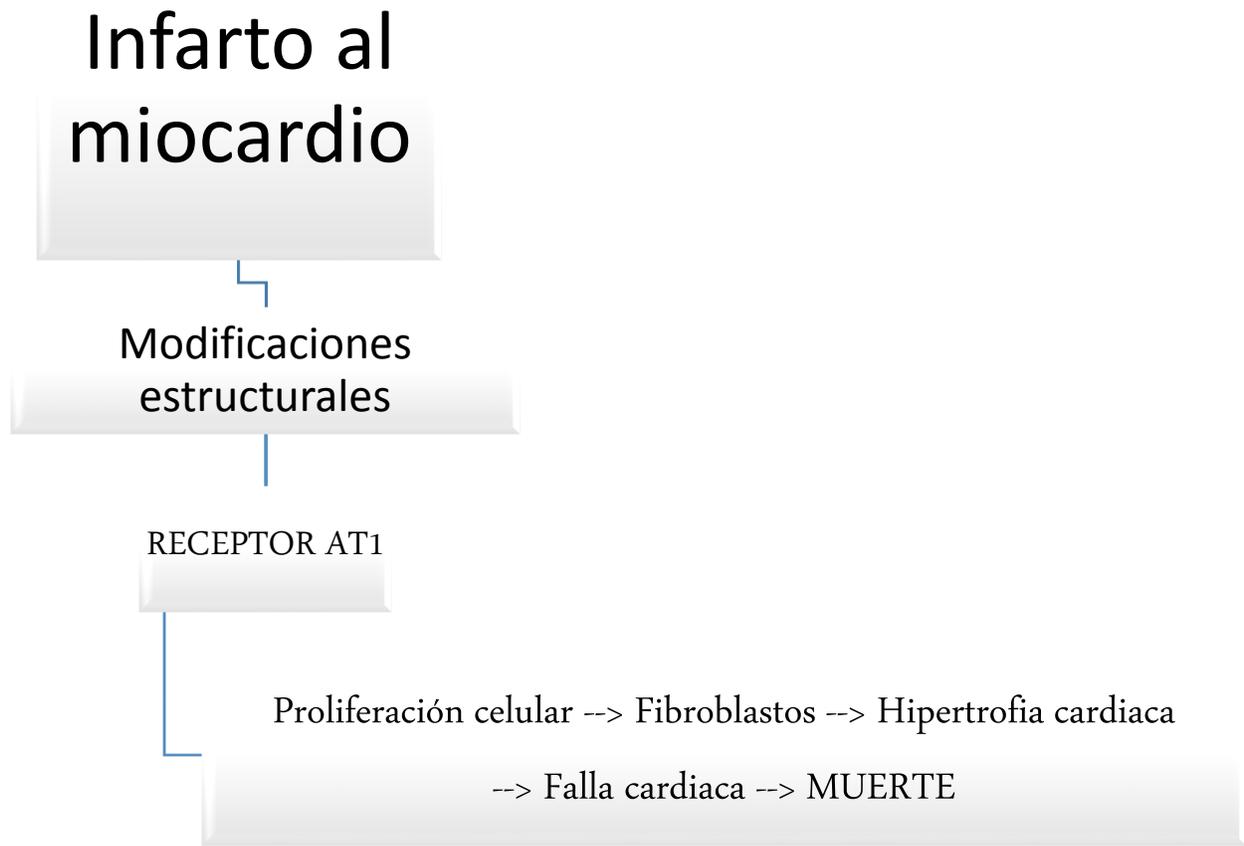


Fig. 8. Regulación del receptor AT1 y sus efectos.

## **1.5 Oxigenación hiperbárica**

### **1.5.1 Antecedentes de la cámara hiperbárica**

La terapia con oxigenación hiperbárica (OHB) fue descrita por primera vez en 1662 por el médico, fisiólogo Henshaw, quien sugería, que el aumento de la presión del aire podría aliviar algunas lesiones agudas. (Tandara & Mustoe 2004)

En la actualidad la Undersea and Hyperbaric Medical Society la define como el tratamiento basado en mantener al paciente en un ambiente con O<sub>2</sub> al 100% de forma continua dentro de una cámara presurizada por encima de 1 atmósfera total absoluta (ATA) (760mmHg).

### **1.5.2 Efectos del oxígeno hiperbárico**

La OHB consiste en que el paciente respire oxígeno puro en el interior de una cámara a mayor presión que la atmosférica.(Subbotina 2006) Existen dos efectos principales de la oxigenación hiperbárica:

#### **1.5.2.1 Efectos mecánicos de la presión:**

La presión es la suma de las fuerzas que actúan uniformemente sobre la superficie de un objeto. El cuerpo humano comúnmente está sometido a 1 ATA de presión que es aproximadamente igual a la que hay a nivel del mar. En la OHB se utilizan presiones relativamente bajas que superan la presión atmosférica hasta 3 veces, en comparación

con el buceo en profundidad donde el cuerpo humano es sometido a presiones superiores de hasta 20 atmósferas. Cada sesión de tratamiento en cámara hiperbárica tiene cuatro fases:

*Fase de compresión:* Como el paciente respira durante la compresión la presión de gas (aire, mezclas, oxígeno) en los pulmones se equilibra con la presión externa, no existe problema con el intestino porque éste tiene las paredes blandas que se adaptan a la presión, el volumen de gas en el intestino durante la compresión disminuye sin causar molestia. Diferente de lo que ocurre en los senos paranasales y en el oído medio, los cuales pueden presentar ciertos problemas, pues dichos órganos tienen las paredes rígidas, por lo tanto no se colapsan con el aumento de la presión exterior, es por ello que si el paciente que es sometido a una sesión de OHB no es manejado adecuadamente, los cambios de presión durante la fase de compresión, en el oído medio se pueden producir hemorragias y trasudación de la linfa hacia su interior por rotura de la membrana timpánica. (Subbotina 2006; Fernandes 2009; Klemmeti et al. 2005)

Durante la compresión el ingreso de gas (oxígeno, aire o mezclas) al organismo ocurre a través de las vías aéreas y posteriormente pasa al alveolo pulmonar, produciéndose en este nivel el intercambio gaseoso con la sangre, el cual pasa a través del surfactante pulmonar a los capilares alveolares, a las venas pulmonares, al corazón y posteriormente a la circulación general hacia todos los tejidos, desplazándose desde el lugar de menor

presión por difusión hasta que se produzca el equilibrio de presiones de dicho gas en el ambiente con la presión de este gas en los tejidos. (Rodríguez 2010)

*Fase de isopresión:* Durante esta fase no hay cambios de la presión de gas en el organismo, pero hay cambios en la composición gaseosa tanto los gases intestinales como de los producidos en los tejidos por microorganismos anaerobios causantes de la gangrena gaseosa, mecanismos imperceptibles por el paciente sometido a la OHB. (Subbotina 2006; Fernandes 2009)

Fase de descompresión: En esta fase ocurre lo inverso a la compresión, la presión parcial de los gases se hace menor afuera del organismo que en el transcurso de la descompresión. El organismo está desaturándose de los gases porque el gas disuelto en los tejidos pasa a la sangre para ser expulsado con la respiración, siempre desplazándose de donde hay mayor presión parcial de gases hacia donde hay menor presión parcial. Si la descompresión se hace demasiado rápido sin dar tiempo a su expulsión, el gas disuelto puede pasar directamente a la fase gaseosa en la sangre y en los tejidos formando burbujas. La formación de burbujas de un gas inerte es la base de la aparición de la enfermedad por descompresión y que ocurre en ocasiones en el buceo o en trabajos en recintos a presión. Los efectos mecánicos de la descompresión son desfavorables para el oído medio, como en la compresión, puede producirse barotrauma del oído si el paciente no compensa los cambios de la presión con algunas maniobras como tragos en seco, bostezos, maniobra de Valsalva, etc. Existe un efecto desfavorable sobre los oídos por abrirse la trompa de Eustaquio con una diferencia de 35 mmHg entre el oído medio y el ambiente. Es probable que también se pueda producir barotrauma de los senos

paranasales y de los pulmones produciendo neumotórax, si el paciente por alguna razón retiene la respiración durante la descompresión o tiene burbujas en los pulmones, en un sitio donde los vasos tengan menor resistencia, estos pueden romperse con los cambios de volumen y producir daños importantes. (Subbotina 2006; Klemmeti et al. 2005)

*Fase de post presurización:* Después de la sesión de OHB en los tejidos se queda la mayor cantidad de oxígeno, de una sesión a otra el tiempo de lavado del exceso de oxígeno de los tejidos se reduce drásticamente después de las primeras exposiciones, este tiempo es de casi cuatro horas y se ha descrito que a partir de la séptima sesión el tiempo de lavado del exceso de oxígeno se reduce a media hora.

El aire que respiramos es una mezcla de gases a nivel del mar contiene 20.84% de oxígeno, 78.09% de nitrógeno, 0.93% de argón, 0.03% de anhídrido carbónico, vapor de agua y pequeñas cantidades de neón, helio, kriptón, hidrógeno, xenón, ozono y radón. Según la ley de Dalton a la misma temperatura la presión total de una mezcla gaseosa es igual a la suma de las presiones parciales que ejercerán sus componentes si cada uno de ellos ocupará individualmente el volumen total de la mezcla. Durante el tratamiento con la cámara hiperbárica en los protocolos de OHB habitualmente se respira oxígeno puro. (Subbotina 2006; Fernandes 2009)

### **1.5.3 Bases fisiológicas de la oxigenación hiperbárica**

El efecto de la OHB está basado en las leyes de los gases y en los efectos fisiológicos y bioquímicos de la hiperoxia.

- Ley de Henry: Establece que la presión de un gas disuelto en un líquido es igual a la presión parcial de ese gas sobre la superficie de dicho líquido.
- Ley de Dalton Establece que en una mezcla de gases la suma de las presiones parciales de los gases en dicha mezcla equivale a la presión total de dicho gas.
- Ley de Boyle: Establece que un gas a temperatura constante, el volumen de dicho gas es inversamente proporcional a la presión ejercida sobre ese gas. (Subbotina 2006; Smith 2011)

#### **1.5.3.1 intercambio de gases entre la sangre y los tejidos**

El transporte común del oxígeno es vía hemoglobina, cuando los glóbulos rojos llegan a los capilares de los tejidos encuentran un tejido con menor presión parcial de oxígeno entonces liberan este gas, así, el contenido de dióxido de carbono es más alto en los tejidos que en la sangre, por eso el dióxido de carbono se difunde de los tejidos a la sangre y el oxígeno a la inversa, de la sangre a los tejidos. En condiciones hiperbáricas la presión parcial de oxígeno en sangre es mucho mayor que respirando aire en condiciones normales, la mayoría de los protocolos de los tratamientos utilizan de 2 a 3ATA's con lo que la presión de oxígeno en sangre arterial llega a 1200 a 2000 mmHg. La presión de oxígeno más alta lo hace difundir a mayor distancia y en mayor cantidad en los tejidos, si normalmente las presiones subcutáneas del oxígeno son de 30 a 50 mmHg respirando

oxígeno puro a 1ATA, estos valores suben a 90-150 mmHg a 2 ATA's son de 200-300 mmHg y puede superar estos valores cuando se respira oxígeno puro a 3 ATA's. (Subbotina 2006; Barata 2011; Dunker & Bache 2008; Duffy et al. 2004)

### **1.5.3.2 Requerimientos de oxígeno en los tejidos**

Para el funcionamiento normal de la cadena respiratoria en los tejidos se requiere la presencia constante de oxígeno molecular. Aproximadamente un 90% de oxígeno se utiliza la fosforilación oxidativa con formación de moléculas de ATP un 9% se gasta en remover el hidrógeno en los procesos de oxidación de aminoácidos y un 1% se incorpora en las moléculas durante la oxidación de las aminas biógenas y las hormonas. (Boveris & Chance 1973; Stephen 2009)

### **1.5.3.3 Reducción de la frecuencia cardíaca bajo la oxigenación hiperbárica**

La hiperoxia normobárica disminuye la frecuencia cardíaca en humanos y en animales. La hiperoxia hiperbárica también produce este efecto que se considera como parte del aumento del tono parasimpático. Una disminución de la frecuencia cardíaca Entre 10 y 15% es un indicador favorable de la influencia de la OHB, el aumento del pulso indica un efecto negativo de esta terapia. Este criterio es utilizado por especialistas en oxigenoterapia hiperbárica en Rusia para evaluar la coherencia del protocolo y del tratamiento en cada paciente individualmente.

También los informes sobre los efectos de la oxigenación hiperbárica sobre la presión arterial están variando y en algunos casos son contradictorios. La oxigenación hiperbárica que aumenta, (Al-Waili 2006; Bergo & Tysseboth 1992; Demchenko 2005) disminuye

(Nagatomo 2010) o permanece sin cambios en la presión arterial (Demchenko 2005; Bergo et al. 1988) esto es probablemente debido a diferentes protocolos utilizados por ejemplo la duración del tratamiento las diferentes especies utilizadas como sujetos experimentales las diferentes condiciones subyacentes por ejemplo sujetos sanos con diabetes e hipertensión y el estado de conciencia y anestesia.

De este modo se ha realizado investigación del efecto de la OHB en diferentes órganos y en diferentes patologías, por lo tanto ya se ha descrito ampliamente los principales usos de esta terapia, entre ellos se encuentran: (Al-Waili et al. 2006; Camporesi 1996; Benson et al. 2003)

- Intoxicación por monóxido de carbono
- Enfermedad descompresiva de los buzos
- Embolismo gaseoso
- Gangrena gaseosa
- Infecciones necrotizantes progresivas
- Absceso intracraneal
- Daño tisular por radiación
- Síndrome compartimental
- Enfermedades autoinmunes
- ***Efectos cardiovasculares***
  - ***Infarto agudo al miocardio***
  - Modifica Reactividad vascular
  - Reducción de la frecuencia cardiaca
- Estimula la neoangiogénesis
- Modula la producción de óxido nítrico.

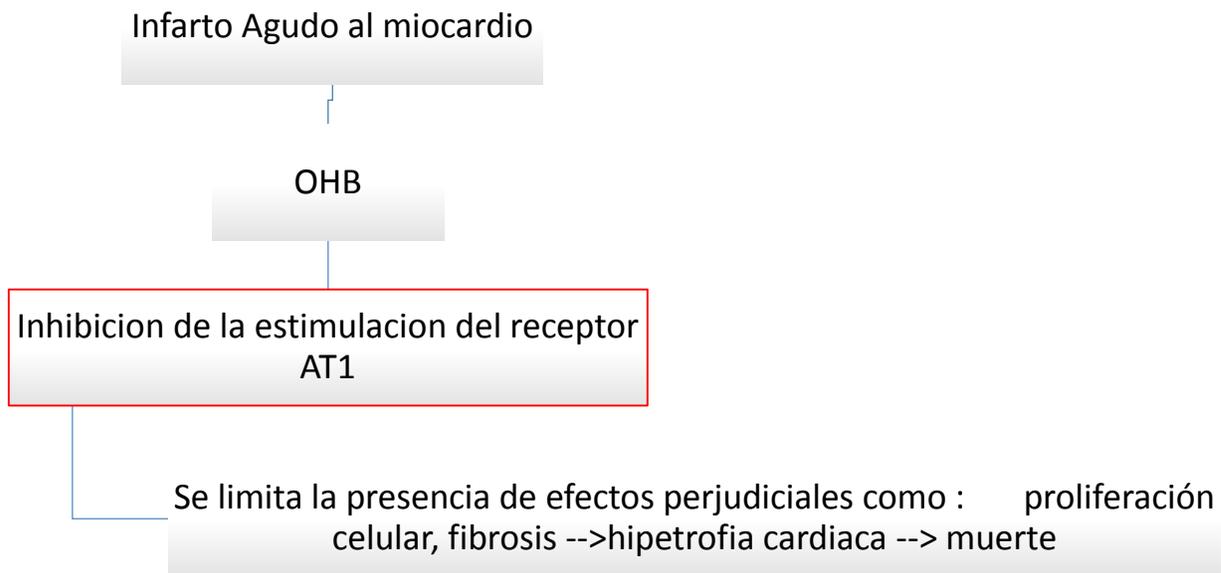


Fig 6. Efectos de la OHB y sus potenciales efectos benéficos en el IAM

Estudios experimentales indican que la OHB es capaz de estimular la angiogénesis y potenciar los efectos del implante de células madre, particularmente mejorando la contractilidad cardíaca, aunque los mecanismos de acción no han sido del todo dilucidados. (Camporesi 1996)

Ya existen reportes los siguientes beneficios del uso clínico de la terapia con OHB en el IAM: Disminución del área de infarto miocárdico, disminución de las concentraciones séricas de enzimas, y mejoría de los parámetros hemodinámicos. (Davidson et al. 1973; McNulty et al. 2005; Camporesi 1996)

## 1.6 Vitaminas antioxidantes

### 1.6.1 Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico está relacionado con los azúcares de 6 carbonos por tener una estructura química semejante, por lo que es bien tolerada al administrarse por vía oral y es conocido como el antioxidante hidrofílico por excelencia. (Fig 8) (FAO & WHO 1998)

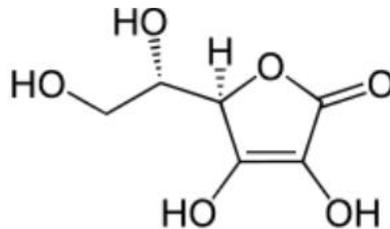


Fig 7. Estructura química de la vitamina C

Los efectos promotores de la salud de la vitamina C se pueden atribuir a sus funciones biológicas al actuar como cofactor en múltiples reacciones principalmente en la síntesis de colágeno, presenta además, efectos benéficos en pacientes tratados con quimioterapia, se usa como coadyuvante en tratamiento del cáncer así como en sepsis y enfermedades neurodegenerativas (FAO & WHO 1998; Serra & Cafaro 2007)

Es requerida por una gran cantidad de funciones biológicas, los humanos y algunos primates hemos perdido la capacidad de sintetizarla, por lo que es una vitamina esencial que debe consumirse en la dieta, la OMS recomienda una ingesta diaria de 45 miligramos por día. (Serra & Cafaro 2007)

Los efectos antioxidantes que presenta esta vitamina se explican de la siguiente forma: Contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. La estructura endiol motiva sus cualidades antioxidantes, ya que los endioles pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas, Por eso, los endioles con grupos carbonilo vecinos se llaman también reductonas (fig 9). (Serra & Cafaro 2007; Shite et al. 2001)

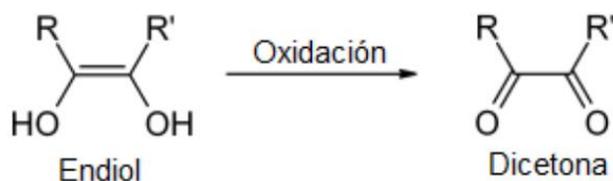


Fig.8 Oxidación de endiol a dicetona, reacción que explica la actividad antioxidante de la vitamina C

Por otro lado se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas ampliamente como producto de las vías metabólicas, tal como la cadena de transporte de electrones, o por intermediarios de las mismas, como la xantina oxidasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa, etc., las cuales inician la reacción de radicales a través de la obtención de átomos de hidrógeno a partir de enlaces C-H formando así los radicales de lípidos.

Los lípidos son a menudo los principales objetivos de la oxidación, porque muchas de las enzimas que producen ROS se encuentran en las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Los radicales reaccionan con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo que, si no neutralizados por el  $\alpha$ -tocoferol de la membrana celular, podrán participar en la reacción de propagación radical. Los lípidos peroxidados son químicamente inestables y, cuando no se reduce por la glutatión reductasa a ácidos hidroxilipídicos, constituyen una fuente de productos dañinos incluyendo 2-alquenes, epóxidos, y malondialdehído, potencialmente dañinos, ya que se encuentran involucrados en el desarrollo y la progresión de enfermedades crónicas que cursan con componentes inflamatorios. (FAO & WHO 1998; Traber & Stevens 2011)

Por lo tanto podemos concluir que el estrés oxidativo juega un papel clave en la génesis y progresión de las enfermedades cardíacas, especialmente en el infarto agudo al miocardio y que, como consecuencia, la vitamina C puede tener un importante papel terapéutico.

Existen reportes en los cuales se concluye en primer lugar, que los radicales libres derivados de lípidos aumentan en pacientes con insuficiencia cardíaca incluso en la ausencia de infarto agudo al miocardio subyacente, aunque la magnitud del estrés oxidativo fue mayor en aquellos pacientes con una etiología isquémica. En segundo lugar, estos radicales libres derivados de lípidos se reducen significativamente por la vitamina C, tanto de forma aguda cuando administra por vía intravenosa y crónicamente con la terapia

oral. En tercer lugar, los neutrófilos de pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva tienen una capacidad mejorada de generar  $O_2^-$  a través del sistema enzimático de la NADPH oxidasa. Y por último, se encontró que la vitamina C no tiene efecto sobre la capacidad de los neutrófilos para generar aniones superóxido administrándose de forma aguda, pero durante su administración a largo plazo hubo una disminución marcada. Por lo que se concluye que administrar vitamina C a los pacientes con patologías cardiovasculares incluidos los de origen isquémico supone una opción terapéutica coadyuvante. (Ellis et al. 2000)

### **1.6.2 Vitamina E**

Con el nombre de Vitamina E existen varios compuestos, denominados Tocoferoles, que los podemos encontrar como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, y delta-tocoferol, siendo el primero el más activo como vitamina y el usado en terapéutica (así como sus ésteres con acetato y succinato), y el último el más activo como antioxidante. (Do et al. 2015; Ganini & Mason 2014)

El término d- $\alpha$ -tocoferol hace referencia a la vitamina E natural, que es dextrorrotatoria, y el término dl- $\alpha$ -tocoferol hace referencia a la mezcla de isómeros preparado sintéticamente. La vitamina E es una vitamina liposoluble, cuyo papel principal es prevenir la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. La vitamina E reacciona con los radicales libres de oxígeno, que son los causantes del daño oxidativo de las grasas de las

membranas celulares, evitando la formación de otros radicales libres en el proceso. (Ganini & Mason 2014)

Localizada en la parte lipídica de las membranas biológicas protege los fosfolípidos de las mismas del ataque de los radicales libres. La vitamina E secuestra los radicales libres reduciéndolos a metabolitos menos activos. Forma parte de un conjunto de factores del sistema de defensa antioxidante celular, sistema que incluye enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa, etc y otros factores no enzimáticos como el ácido úrico o el glutatión.

Muchos de estos factores son, además dependientes de otros nutrientes esenciales como el selenio, el cinc o el cobre. Por lo tanto, la función antioxidante de la vitamina E puede ser afectada por el estado nutricional con respecto a uno o varios nutrientes. Esto se pone de manifiesto en algunas enfermedades debidas a deficiencias graves (p.ej. miopatías o desordenes vasculares) en las que la vitamina E puede ser intercambiada por selenio. (Do et al. 2015)

La función antioxidante de la vitamina E y los factores que forman parte del sistema antioxidante pueden ser fundamentales para proteger a los organismos frente a condiciones relacionadas con el estrés oxidativo como la artritis, el cáncer, las cataratas, la diabetes, etc. Además está implicada en la función inmunológica, la transmisión intracelular de señales, la regulación de la expresión de los genes y otros procesos metabólicos.

Así, el  $\alpha$ -tocoferol inhibe la actividad de la PKC, una enzima que modula la proliferación celular y la diferenciación en las células lisas musculares. También está presente en las células epiteliales que tapizan la superficie interna de los vasos sanguíneos lo que reduce la adhesión de algunos de los componentes de la sangre.

Adicionalmente, aumenta la expresión de dos enzimas que inhiben la síntesis del ácido araquidónico, lo que se traduce en un aumento de la liberación de prostaciclina del endotelio, con el subsiguiente efecto antiagregante plaquetario y vasodilatador. (Traber 2007)

La absorción de la vitamina E es muy variable oscilando entre el 20 y 70%. La vitamina E absorbida es capturada por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) e introducida en la circulación linfática. Seguidamente, pasa al hígado donde una parte se incorpora a las HDLs.

Una vez en la circulación sanguínea, la vitamina E de las VLDLs y HDLs puede penetrar en las células mediante un mecanismo que implica una lipoproteína lipasa, un receptor situado en la membrana celular y una proteína transportadora TBP (Tocopherol-Binding-Protein) que facilita el transporte intracelular de la vitamina. En las células no adiposas, el tocoferol se localiza casi exclusivamente en las membranas celulares, mientras que en los adipocitos se encuentra en la fase lipídica. (Ganini & Mason 2014) En presencia de un radical libre ROO, el tocoferol cede un hidrógeno pasando a ser un radicala-tocoferoxil,

que pasa a tocoferilquinona biológicamente inactiva. Esta es finalmente reducida a tocoferilhidroquinona, la cual es excretada en la bilis en forma de conjugado glucurónico. Debido a su carácter lipófilo, la eliminación urinaria en condiciones normales es prácticamente nula.

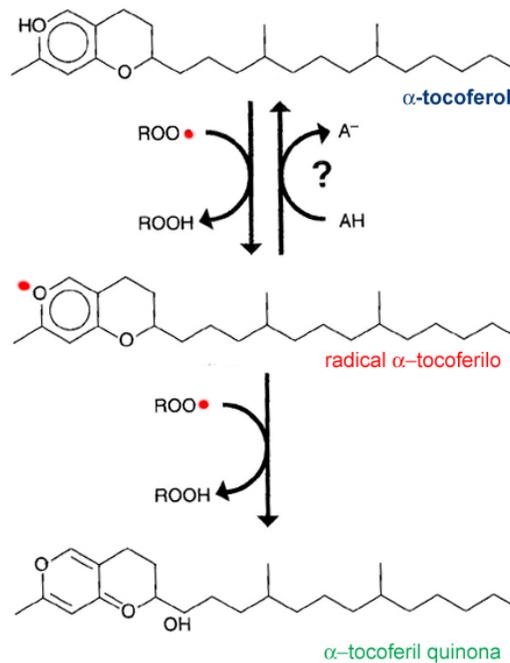


Fig. 9 Mecanismo de acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol

### 1.6.3 Uso de vitamina C y E

Los efectos de la vitamina C y la vitamina E como antioxidantes y su acción cooperativa contra la oxidación de los lípidos en solución, membranas, y en lipoproteínas se han estudiado y revisado ampliamente. Ambos actúan como potentes y probablemente los más importantes antioxidantes, hidrófilos y lipófilos respectivamente y además de que cada uno funciona en su propio sitio de acción forma individual, actúan sinérgicamente

pues la vitamina c recicla vitamina E oxidada para su reutilización por parte de las células..  
(Niki et al. 1995)

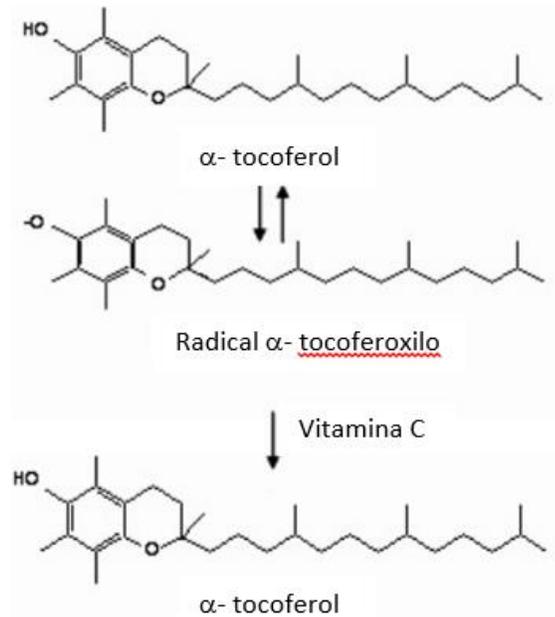


Fig. 10 Reestablecimiento del a-tocoferoxilo a a-tocoferol con la vitamina C como intermediario

Se ha demostrado que los radicales libres contribuyen al daño del miocardio isquémico y afectan la propiedad eléctrica de las membranas celulares principalmente afectada el sistema de conducción eléctrica ventricular, situación que es posible valorar al realizar electrocardiograma, el cual se modifica benéficamente en pacientes que recibieron tratamiento con ambas vitaminas disminuyendo por lo tanto arritmias y taquiarritmias potencialmente mortales. (Chamiec et al. 1996; Shite et al. 2001)

## **2. JUSTIFICACION**

Dada la elevada incidencia y aumento exponencial de la morbimortalidad en México a causa de infarto agudo al miocardio, es necesaria la implementación de nuevos tratamientos que ofrezcan una opción terapéutica para los pacientes que cursan con esta patología, el uso de la oxigenación hiperbárica es un tratamiento que ha tomado auge en los últimos años de igual manera que el uso de vitaminas antioxidantes como lo son la Vitamina C y E, por lo que, en este modelo se busca analizar si el uso concomitante de dichas terapias modifica la expresión de receptores AT1 y AT2 para potencialmente, mejorar la función cardíaca y limitar las secuelas postinfarto.

### **3. Planteamiento del Problema**

¿Modificará la terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitaminas C y E la expresión de los receptores de angotensina AT1 y AT2 contribuyendo a la recuperación del corazón postinfartado?

#### **4. Hipótesis**

La terapia postinfarto de oxigenación hiperbárica asociada al tratamiento con vitamina E y C produce disminución en la expresión de receptores AT1 y un aumento de los receptores AT2 en el tejido cardiaco contribuyendo a su preservación y recuperación, limitando como consecuencia, las secuelas potencialmente mortales del IAM.

## **5. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la terapia de oxigenación hiperbárica y la administración concomitante de vitaminas C y E en la expresión de los receptores AT1 y AT2 en el corazón con IAM en ratas Wistar.

## 5.1 Objetivos específicos

- ❖ Determinar los efectos de la terapia de oxigenación hiperbárica en el corazón con IAM.
- ❖ Determinar los efectos de la terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitamina C y E en el corazón con IAM.
- ❖ Determinar la modificación de la expresión de los receptores AT1 con terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitamina C y E en el corazón con IAM.
- ❖ Determinar la modificación de la expresión de los receptores AT2 con terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitamina C y en el corazón con IAM.

## **6. Ubicación temporal y espacial**

El estudio se realizó en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina hiperbárica experimental.

## **7. Análisis estadístico**

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó utilizando la prueba de ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Considerando una  $P < 0.05$  como significativa.

## **8. METODOLOGIA**

Se utilizarán ratas machos de la cepa Wistar, de un peso 300 +/- 50 g provenientes del bioterio central del Hospital Centro Médico Siglo XXI, las cuales se mantuvieron en jaulas a temperatura ambiente, expuestas a un ciclo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad y alimentadas con nutricubos para roedores de laboratorio.

Todos los animales se utilizarán apegados a las normas éticas establecidas por la Escuela Superior de Medicina del IPN y cumplen con los requerimientos que en la materia determinan la **NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**, SAGARPA, y la **GUIA PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**, National Research Council.

Para realizar el modelo de infarto, se utilizará la técnica de oclusión de la arteria descendente anterior proximal. Se anestesia previamente a la rata con Xilazina a una dosis de 8 mg/Kg y Ketamina 100 mg/Kg de peso, una vez anestesiada, se realiza tricotomía de toráx y bajo condiciones de asepsia y antisepsia, se coloca en posición supina en la tabla quirúrgica, se realiza intubación orotraqueal con catéter 16G conectado a un ventilador para roedores *Harvard Rodent Ventilator 683* a una frecuencia de 60 ventilaciones por minuto para proporcionar apoyo ventilatorio durante la cirugía con insuflaciones de 2.5 a 3ml de aire ambiental, posteriormente, se localiza el cuarto espacio intercostal y sobre este, se realiza una incisión en piel, para después realizar disección tipo roma hasta llegar a los músculos intercostales, en los cuales se realiza miotomía permitiendo así tener acceso a la cavidad intratorácica aproximadamente en el origen la arteria aorta, se localiza la orejuela izquierda, se separa sutilmente, permitiendo así la visualización de la arteria descendente anterior (ADA) la cual irriga la cara anterior del ventrículo izquierdo. Se realiza pericardiotomía anterior total, se localiza nuevamente la ADA y se liga con sutura nylon 5-0 con un punto simple profundo, se corrobora la hemostasia cardiaca y se procede al cierre de la cavidad torácica con sutura nylon 4-0 corroborando hemostasia y cerciorándonos del mantenimiento de una presión negativa intratorácica evitando neumotórax a tensión, se realiza nuevamente afrontamiento de músculos pectorales afrontándolos con punto simple con Nylon 4-0 y por último se afronta la piel, una vez finalizado el acto quirúrgico, se coloca a la rata en un área con calor artificial y se vigila de forma estrecha para detectar oportunamente alteraciones postquirúrgicas, tras un periodo de entre 10-20 minutos es extubada para posteriormente administrar analgesia con buprenorfina a una dosis de 0.2 mg/kg vía subcutánea, dosis que será

repetida diariamente para mantener a los animales bajo condiciones de analgesia posquirúrgica adecuada.

## 8.1 INTEGRACION DE GRUPOS

Se formarán 10 grupos de estudio conformados por una n= 5 ratas seleccionadas al azar cada uno describiéndose a continuación:

Con terapia de oxigenación hiperbárica	Sin terapia de oxigenación hiperbárica
Sana	Sana
Infarto Agudo al Miocardio	Infarto Agudo al Miocardio
IAM + Vitamina C y E	IAM + Vitamina C y E
Sham	Sham

Tabla 1. Integración de grupos

Las ratas que serán tratadas con la terapia antioxidante serán dosificadas con acetato de D-alfa-Tocoferol (Vitamina E- gdlcaps a 25mg/Kg/d) vía oral y ácido ascórbico a dosis de 20 mg/kg/d vía oral administrando la primera dosis 24 horas después de la cirugía. Y continuando la dosificación por 3 días consecutivos simultáneos a la exposición a OHB para los grupos correspondientes.

Los animales que serán expuestos a la OHB será a dos atmosferas de presión por una hora, en una cámara para uso experimental con una sesión por día por 3 días con las

siguientes especificaciones, la presurización se lleva a cabo en un periodo de 15 minutos, una hora de isopresión a 2 ATA, después de terminada la hora de exposición, la despresurización se realiza en los siguientes 15 minutos, después de este periodo los animales son sacarán de la cámara y serán colocados en su respectiva jaula, una vez terminadas las 3 sesiones correspondientes, se procederá al sacrificio de las ratas por la vía de decapitación con previa anestesia con pentobarbital sódico a una dosis de 60mg/kg vía intraperitoneal, y se realizará toracotomía total para obtener el corazón integro, y se conservara en REVCO a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para después analizar las modificaciones tisulares con técnica de western blot.



Fig. 11 Cámara hiperbárica experimental

El manejo de los cadáveres y desechos derivados (RPBI) se realiza de acuerdo a la **NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental- Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos, -Clasificación y especificaciones de manejo:** Los residuos patológicos, humanos, o de animales ( que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4° C, en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

## **9. Western Blot**

Los corazones obtenidos fueron homogenizados con un homogenizador (TISSUE TEAROR, de BIOSPEC PRODUCTS, inc USA), en 1 ml de TRIS – HCl 0.1 M a pH 7.4 que contenía inhibidores de preteasas mini complit a una velocidad de 15 000 rpm durante 4 min a 4°C. Una vez homogenizados dichas muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm por 20 min a 4°C, con el sobrenadante se formaron alícuotas de 100 µl y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la determinación de proteínas se utilizó el método colorimétrico de Lowry el cual en un medio ligeramente alcalino, se une a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción.

El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. (Lowry et al. 1951)

### **9.1 Procedimiento**

Se realiza una curva de calibración usando una alícuota de albumina sérica bobina de 0.5 mg /1ml, y realizando diluciones para obtener concentraciones de proteínas 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína, con un volumen de 200  $\mu\text{l}$ , al mismo tiempo se realizaron diluciones 1:100 de las muestras a determinar.

Una vez realizadas las diluciones correspondientes se realizaron las soluciones C y D, a partir de la solución A y B y de FOLIN 2N (ver más adelante) protegiéndolas de la luz y colocándolas a 4°C hasta su utilización. A cada una de las diluciones se le colocó 1 ml de solución C, dejando reposar 10 min a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación con la solución C se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de solución D, dejando reposar 30 min a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se colocaron en celdillas para leer en el espectrofotómetro (JENway 6300 spectrophotometer) a 750 nm en luz visible. Con los datos obtenidos se creó una curva de regresión lineal con EXCEL

de Microsoft Office y por extrapolación se determinó la concentración real de proteínas por micro litro en cada una de las muestras.

## **9.2 Electroforesis**

Para realizar la electroforesis se ajustó a 15  $\mu$ l la cantidad de proteína extrapolada y el buffer de carga, se hirvieron a 100°C durante 10 minutos colocando inmediatamente a 4°C. Las muestras fueron colocadas en los pocillos de geles de acrilamida al 10 % cargando una cantidad constante de proteína (70 $\mu$ g proteína) de cada muestra y 4  $\mu$ l de un marcador de peso molecular (fermentas PageRuler prestained protein) en una cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X. La electroforesis fue realizada a 105 mv durante 120 minutos con una fuente de poder BioRad PowerPac 200.

## **9.3 Transeferencia**

Antes de que termine la electroforesis se realiza el buffer de transferencia y se colocan en el papel filtro y se mantiene a 4°C hasta su utilización, se toma la membrana PVDF y se coloca en metanol puro para su activación manteniéndolo a 4°C hasta su utilización. 5 minutos antes de que termine la corrida, las membranas de PVDF se colocan en el buffer de transferencia para retirar el exceso de metanol. Una vez que termino el tiempo de corrida, se retiran los vidrios dejando el gel, se retira el exceso de buffer del papel filtro y se colocan en la cámara de transferencia (BioRad TransBlot SD SemiDry transfer cell), se colocan en el siguiente orden:

1. Papel filtro
2. Membrana de PVDF
3. Gel que se le realizo la electroforesis
4. Papel filtro

Y permanecen durante 75 minutos a un voltaje constante de 90 mV.

#### **9.4 Bloqueo e incubación con anticuerpo**

Al término de la transferencia las membranas de PVDF fueron bloqueadas con leche baja en grasas (Svelty) al 5% suspendida en solución TBS Tween durante 2 hrs. Una vez terminado el proceso de bloqueo se agregó el anticuerpo policlonal para AT<sub>1</sub> Antibody (C-18) goat polyclonal IgG de Santa Cruz realizando una dilución 1:800 incubando toda la noche en agitación leve continua a 4°C. Terminado este tiempo se realizan 3 lavados de las membranas de PVDF con TBST en agitación gentil durante 10 minutos cada uno. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario (rabbit – antigoat de IgG (H+L) HRP conjugate, invitrogen), a una dilución 1:10 000 durante 2 hrs. Y finalmente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST.

#### **9.5 Revelado**

Las membranas se incubaron con el sustrato quimioluminiscente usando luminol (western Blotting Luminol Reagent (sc – 2040) de Santa Cruz biotechnology) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente fueron colocadas en la cámara de amplificación durante 15 min en contacto directo con película sensible a luz (Amersham hyperfilm ECL de GE healthcare limited). A continuación se sumergieron las películas en

revelador (Kodak profesional d-19) durante 30 segundos y en fijador, se dejó secar y se rotuló adecuadamente para su futura lectura y análisis.

## **9.6 Detección**

La intensidad de las bandas se midió escaneando las bandas con un escáner (scanjet G3110 de HP), y la densitometría se realizó empleando un software de análisis de imágenes (Quantity One 1 – D Imagen Análisis Software; BioRad), realizando el análisis densitométrico normalizado con GAP DH de las mismas muestras.

## 10. Resultados

La administración de vitaminas antioxidantes C y E de forma concomitante con la terapia de oxigenación hiperbárica en el modelo de infarto al miocardio, tras analizar el tejido infartado, produce una disminución importante en la expresión del receptor AT1. En la figura 14 observamos como la monoterapia con OHB en un corazón infartado disminuye drásticamente la expresión del receptor AT1, efecto que se potencia con la administración concomitante de vitaminas C y E, además podemos observar como la monoterapia con OHB, pudiera estar generando un efecto positivo ante esta patología sin embargo, no con la misma eficacia que la terapia conjunta.

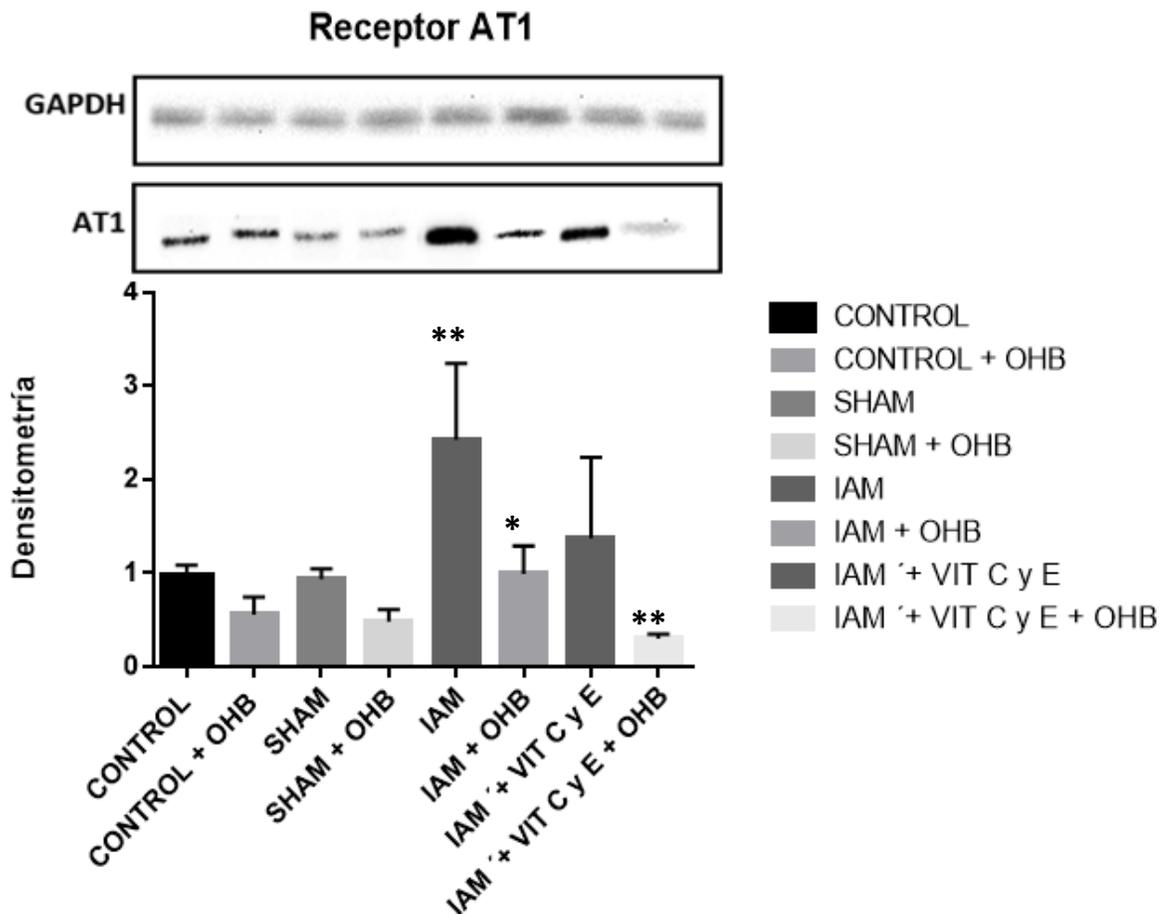


Fig 12. Efecto de los tratamientos por grupo sobre la expresión del receptor AT1.

La administración de vitaminas antioxidantes C y E de forma concomitante con la terapia de oxigenación hiperbárica en el modelo de infarto al miocardio, tras analizar el tejido infartado, produce un aumento importante en la expresión del receptor AT2. En la figura 15 observamos como la monoterapia con OHB en un corazón infartado aumenta de forma importante la expresión del recetor AT2, efecto que puede ser equivalente al de la administración de las vitaminas C y E de forma aislada, sin embargo este efecto cardioprotector se ve potenciado con la administración conjunta de ambas terapias, demostrándose un efecto sinérgico importante.

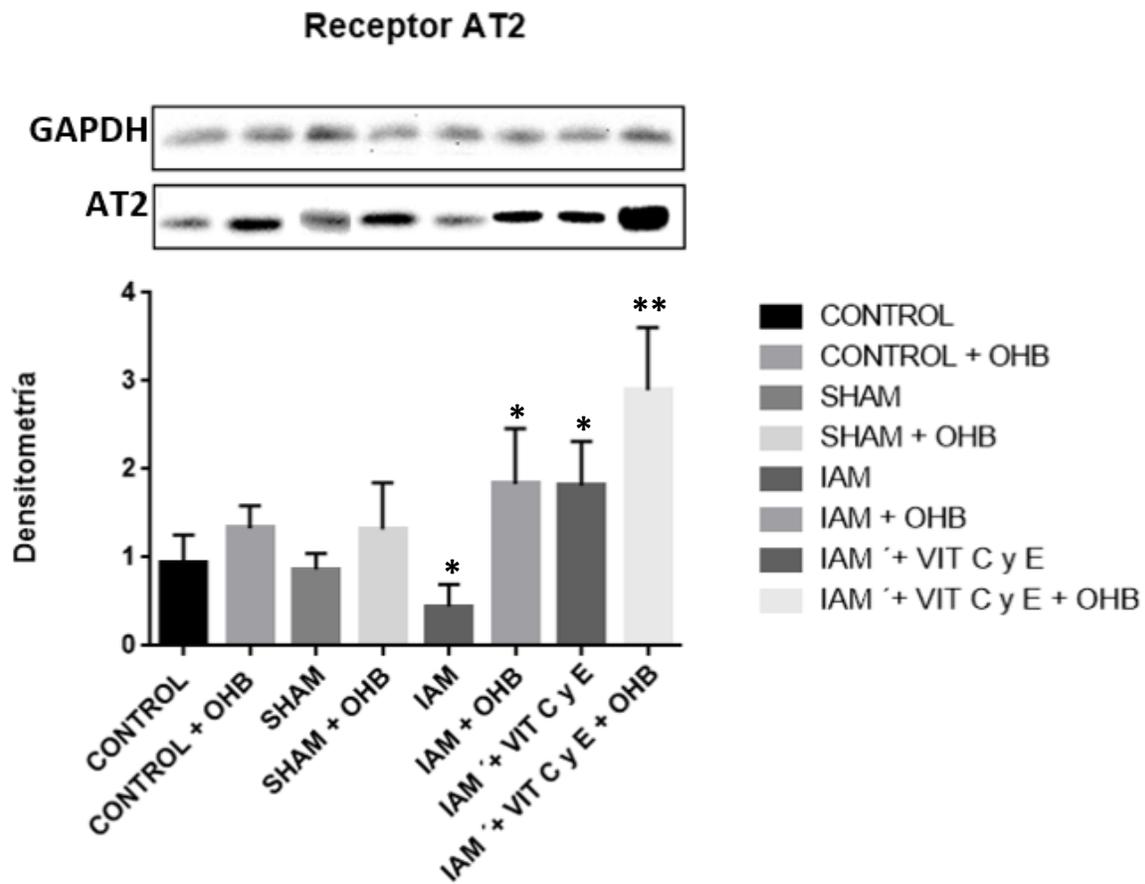


Fig 13. Efecto de los tratamientos por grupo sobre la expresión del receptor AT2

## 11. Discusión

Las estadísticas indican que en las últimas décadas las enfermedades cardiovasculares han ido en aumento de una forma tan importante que en la actualidad ocupan el primer lugar de morbilidad a nivel mundial, (OMS 2012, INEGI 2012) y aunque existen guías clínicas para el manejo agudo y crónico de los pacientes con IAM (Sinz 2011) se requiere continuar innovando en la investigación de opciones terapéuticas adyuvantes que mejoren la calidad de vida de los pacientes con esta patología.

La terapia con OHB ha comenzado a ser estudiada debido a que, en los pocos reportes que existen se han encontrado efectos benéficos en un gran número de patologías, sin embargo, hasta el momento es muy poca la bibliografía en lo que respecta a las patologías cardiovasculares, de ahí la importancia del presente trabajo, en este caso, al evaluar la modificación de la expresión de los receptores AT1y AT2, los cuales tienen una gran importancia en las enfermedades cardiovasculares, (Diem T. DINH, Albert G. FRAUMAN, Colin I. JOHNSTON 2001) también podemos dilucidar cuales son las vías que puede estarse silenciando o estimulando tras las sesiones de OHB y la administración de vitamina C y E.

Nuestros resultados indican que la OHB modifica de forma significativa la expresión tanto de los receptores AT1 como de los AT2, por lo que ofreciéndose como monoterapia ofrece una viable opción terapéutica para los pacientes que han cursado con un IAM; y esto

coincide con investigaciones que se han realizado con miembros y colaboradores de nuestro equipo de trabajo en líneas de investigación paralelas a este trabajo.

Como aspecto interesante podemos señalar que de manera conjunta se han administrado vitamina C y E, vitaminas antioxidantes por excelencia, que en modelos experimentales de infarto han sido utilizadas para reducir el área del infarto, disminución de arritmias cardíacas post infarto, y estabilizar las ROS (Shite et al. 2001; Traber & Stevens 2011; Nam et al. 2003) en el proceso de necrosis del tejido cardíaco, permitiendo limitar las secuelas que caracterizan a la historia natural de esta enfermedad, aspectos que consideramos importantes y aunado a una reducción en la zona de infarto podemos observar en nuestros resultados que los receptores a angiotensina AT1 no se ven estadísticamente modificados por la administración de monoterapia con vitaminas C y E, sin embargo los receptores AT2 si presentan diferencias significativas, con lo que puede justificarse su efecto benéfico en los pacientes que cursan con esta patología.

De forma interesante, este estudio nos permitió darnos cuenta que al aplicar ambas terapias existe una sinergia entre sus efectos benéficos, disminuyendo de forma importante los efectos perjudiciales del receptor AT1 y aumentando los efectos cardioprotectores del receptor AT2, además de ser una terapia viable y accesible para cualquier paciente, aspecto que no ha sido descrito en la literatura.

Al haber encontrado todos estos efectos, se requiere continuar investigando para continuar aportando conocimiento que valide el uso de la cámara hiperbárica de forma concomitante con las vitaminas C y E.

## CONCLUSIONES

Tras los análisis realizados podemos sugerir que:

- ✓ La terapia de oxigenación hiperbárica actúa disminuyendo la expresión de los receptores AT1 y aumentando la expresión de los receptores AT2 en el corazón con IAM.
- ✓ La monoterapia con Oxigenación hiperbárica produce una disminución significativa en la expresión de los receptores AT1 en el corazón con IAM, efecto que no se aprecia con la monoterapia con Vitaminas C y E.
- ✓ La terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitamina C y E produce un efecto sinérgico en la regulación de los receptores AT1 en el corazón con IAM.
- ✓ Se encontró que la expresión de los receptores AT2 aumentan de forma importante con la terapia de oxigenación hiperbárica asociada a la administración de vitamina C y E en el corazón con IAM mostrando un efecto sinérgico.
- ✓ La administración en monoterapia de oxigenación hiperbárica o vitaminas C y E aumenta la expresión de los receptores AT2.

## ANEXO

### LISTA DE SOLUCIONES

#### Solución de Lowry

- Solución A:
  - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%,  $\text{NaOH}$  0,1 M
- Solución B:
  - $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%, tartrato sódico-potásico al 2%
- Solución C:
  - Se colocan 49 ml de solución A y 1 ml de solución B para un volumen final de 50 ml, se realizaron los ajustes para obtener un volumen acorde al número de muestras a medir en cada ocasión.
- Solución D
  - A partir de FOLIN 2 N se realiza una dilución al 50% con agua para obtener FOLIN 1 N.

### SOLUCIONES ELECTROFORESIS

#### Buffer de corrida, solución stock 10X (1000ml):

- Tris HCl 30 gr
- Glicina 144 gr
- SDS 10 gr
- Agua aforar a 1000 ml.

## SOLUCIONES TRASFERENCIA

Buffer de transferencia, solución stock 10 X (1000ml):

- Tris – HCl 30 gr
- Glicina 144 gr
- Agua aforar a 1000ml

Buffer de transferencia 1X (200 ml)

- Solución stock de buffer de transferencia 10X 20 ml
- Agua miliQ 140 ml
- Metanol o alcohol metílico 40 ml

SOLUCION TBS 10 X. (1000ml)

- Trizma – Base o triz HCl 15.76 gr
- NaCl 89 g
- Disolver en un volumen menor y posteriormente ajustar pH con HCl o NaOH hasta 7.4, posteriormente aforar a 1000 ml.

SOLUCION TBS – tween 1 X(1000 ml)

- • TBS 100 ml
- • Agua miliQ 900 ml
- • Tween 20 1 ml

## 12. Bibliografía

1. A. Carbonell San Román, Segura de la Cal JLZG. Silent myocardial ischaemia and other forms of chronic coronary artery disease. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2013;11(36):2179–230.
2. Abraham WT, Aggarwal S, Prabhu SD, Cecere R, Pamboukian S V, Bank AJ, et al. Ambulatory extra-aortic counterpulsation in patients with moderate to severe chronic heart failure. *JACC Heart Fail*. 2014;2(5):526–33.
3. Al-Waili NS. Influences of hyperbaric oxygen on blood pressure, heart rate and blood glucose levels in patients with diabetes mellitus and hypertension. *Arch Med Res*. 2006;37:991–7.
4. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, Abdullah MS, Finkelstein M, Merrow M, et al. Influences of hyperbaric oxygen on blood pressure, heart rate and blood glucose levels in patients with diabetes mellitus and hypertension. *Arch Med Res [Internet]*. 2006;37(8):991–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045116>
5. Barata P. Hyperbaric oxygen effects on sport injuries. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2011;3(2):111–21.
6. Basso N, Terragno NA. Historical Perspective. 2001;5:363–9.
7. Benson RM, Minter LM, Osborne B a., Granowitz E V. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol [Internet]*. 2003;134(1):57–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2249.2003.02248.x>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1808843&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Bergo G, Tysseboth I. Cerebral blood flow distribution during exposure to 5 barr oxygen in awake rats. *Undersea Biomed Res*. 1992;19(5):339–54.
9. Bergo G, Risberg J, Tysseboth I. effects of 5 bar oxygen on cardiac output and organ blood flow in conscious rats. *Undersea Biomed Res*. 1988;15:457–70.
10. Berne, O. Levy A. *Fisiología*. 11th ed. Barcelona: El Sevier; 2011. 303- 350 p.
11. Bialostozky D. Viabilidad miocárdica. Miocardio aturdido e hibernante. Utilidad de la centellografía miocárdica. 2001;71(1):25–31.

12. Boveris A, Chance B. the mitochondrial generation of hidrogen peroxide. General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem J.*, 1973;134:707–16.
13. Braunwald B. *Tratado de Cardiología*. 9th ed. Barcelona: El Sevier; 2013. 1375-1379, 1514-1532 p.
14. Campbell D. Critical view of prorenin and prorenin receptor research. *Hypertension*. 2008;21:1259.1264.
15. Camporesi E. Hyperbaric oxygentherapy: a commitee report. *Undersea Hyperb Med Soc*. 1996;
16. Capacity A. *Antioxidant Capacity and*. 2007. p. 1950–63.
17. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 2):155–63.
18. Chamiec T, Herbaczynska-Cedro K, Ceremuzynski L. Effects of antioxidant vitamins C and E on signal-averaged electrocardiogram in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol [Internet]*. 1996;77(4):237–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8607400>
19. Davidson RM, Ramo BW, Wallace a G, Whalen RE, Starmer CF. Blood-gas and hemodynamic responses to oxygen in acute myocardial infarction. *Circulation [Internet]*. 1973;47(4):704–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4696792>
20. de la Rosa YH, Moreno-Martínez FL, de Armas Castro MA. ¿Realmente existe un miocardio aturdido o hibernado? *Cardiocre [Internet]*. 2011;46(4):167–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1889898X1100082X>
21. De Mello WC. Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure. *Regul Pept [Internet]*. Elsevier B.V.; 2011;166(1-3):9–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S01670115110003885>
22. De Mello WC, Frohlich ED. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. *Peptides [Internet]*. Elsevier Inc.; 2011;32(8):1774–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729730>
23. Demchenko I. Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cerebrblood flow metab*. 2005;25:1288–300.
24. Diem T, DINH, Albert G, FRAUMAN, Colin I, JOHNSTON MEF. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci*. 2001;100(5):481–92.
25. Do TDT, Cozzolino D, Muhlhausler B, Box A, Able AJ. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. *Food Chem [Internet]*. Elsevier Ltd;

2015;187:65–74. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615005749>

26. Duffy, Kirby, Rudlof. Critical role of the vascular endothelial cell in health and disease: A review article. *J Vet emergency Crit care*. 2004;14:84–99.
27. Dunker D, Bache I. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev*. 2008;88:1009–86.
28. Ellis GR, Anderson R a, Lang D, Blackman DJ, Morris RH, Morris-Thurgood J, et al. Neutrophil superoxide anion--generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(5):1474–82.
29. Escobar, Elizabeth; Rodriguez-Reyna, Tatiana S.; Arrieta, Oscar; Sotelo J. Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Current Vasc Pharmacol*. 2004;2:385, 399.
30. FAO, WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition Second edition. World Health Organ [Internet]. 1998;1–20. Available from: [www.who.org](http://www.who.org)
31. Fernandes T. Medicina hiperbárica. *Acta Med Port*. 2009;22:324–34.
32. Filipeanu CM, Brailoiu E, Kok JW, Henning RH, De Zeeuw D, Nelemans SA. Intracellular angiotensin II elicits Ca<sup>2+</sup> increases in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2001;420(1):9–18. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299901010044>
33. Fuller CJ, May M a, Martin KJ. The effect of vitamin E and vitamin C supplementation on LDL oxidizability and neutrophil respiratory burst in young smokers. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2000;19(3):361–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872898>
34. Ganini D, Mason RP. Absence of an effect of vitamin E on protein and lipid radical formation during lipoperoxidation of LDL by lipoxygenase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier; 2014;76C:61–8. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914003487>
35. Godman C a, Joshi R, Giardina C, Perdrizet G, Hightower LE. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010;1197:178–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536847>
36. Heller R, Unbehau a, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*. 2001;276(1):40–7.

37. HERBACZYŃSKA-CEDRO K. Supplementarion with vitamins C and E suppresses leukocytes oxigen free radical production in patients with myocardial infarctation. *Eur Heart J*. 1995;16(8):1044–9.
38. Hertz M. Introduction to the 2012 annual reports: New leadership, same vision. *J Hear Lung Transpl*. 2013;32(2):1045–95.
39. Ishii Y. Hyperbaric oxygen as an adjunvant for athletes. *Sport Med*. 2005;9:739–46.
40. James P, Scott B, Allen M. Hyperbaric oxygen therapy in sports injuries. *Physiotherapy*. 1983;79:571–2.
41. Jiménez-corona A, López-ridaura R, González-villalpando C. Incidence of myocardial infarction in low-income urban residents of Mexico City. 2009;51(6):458–64.
42. Kamal-Eldin a, Appelqvist L a. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 1996;31(7):671–701.
43. Kaneko JJ. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. USA; 2008. 695-730. p.
44. Kaschina. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* [Internet]. 2003;12(2):70, 88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797627>
45. KH Y. Regulation of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol* [Internet]. 1997;273:503, 509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9277532>
46. Klemmeti E, Rico V, Mojon P. Short duration hyperbaric oxygen treatment effects blood flow in rats, pilot observations. *Lab Anim*. 2005;39:116–21.
47. Kromhout D. n–3 Fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *New Engl J ...* [Internet]. 2010;2015–26. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1003603>
48. Li W, Li Z, Chen Y, Li S, Lv Y, Zhou W, et al. Autoantibodies Targeting AT1 Receptor from Patients with Acute Coronary Syndrome Upregulate Proinflammatory Cytokines Expression in Endothelial Cells Involving NF-  $\kappa$  B Pathway. *J Immunol Res* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/342693/>
49. Liu PP, Mason JW. *Clinical Cardiology: New Frontiers*. *Hear Dis*. 2001;1076–82.
50. Lowry OH, J.Rosebrough, L. FA, J RR. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.

51. M. ORB. Angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 are down-regulated by angiotensin II through AT1 receptor by different mechanisms. *Endocrinology* [Internet]. 1997;138(2):723, 733. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003008>
52. Matsumori A, Sasayama S. The role of inflammatory mediators in the failing heart: immunomodulation of cytokines in experimental models of heart failure. *Hear Fail Rev* [Internet]. 2001;6(2):129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309531>
53. McCormick JG, Houle TT, Saltzman H a, Whaley RC, Roy RC. Treatment of acute stroke with hyperbaric oxygen: time window for efficacy. *Undersea Hyperb Med* [Internet]. 2011;38(5):321–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013759>
54. McNulty PH, King N, Scott S, Hartman G, McCann J, Kozak M, et al. Effects of supplemental oxygen administration on coronary blood flow in patients undergoing cardiac catheterization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1057–62.
55. Morrison D, Hughes J, Della Gatta PA, Mason S, Lamon S, Russell AP, et al. Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier; 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584915010813>
56. Nagatomo F. Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. *Clin exp hypertense*. 2010;32:193–7.
57. Nam CM, Oh KW, Lee KH, Jee SH, Cho SY, Shim WH, et al. Vitamin C intake and risk of ischemic heart disease in a population with a high prevalence of smoking. *J Am Coll Nutr*. 2003;22(0731-5724 (Print)):372–8.
58. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:1119S – 1124S.
59. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and 13-carotene13. *Am J Clin nutr*. 1995;62:1322–6.
60. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(2):931–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15433&tool=pmcentrez&render type=abstract>
61. Pérez-díaz I, Hiriart M, Olivares-reyes JA, Robles-díaz G. R Eceptores Para La a Ngiotensina Ii D Iferentes a Los C Lásicos R Eceptores M Embranales At 1 Y At 2 : C Aracterísticas Y Su P Apel En El F Uncionamiento C Elular \*. 2006;25(2):55–60.

62. Pitkin A, Pitkin A, Hawksley Davies N, Hawksley Davies N. Hyperbaric oxygen therapy. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2001;1(5):150–6.
63. Postura DDE. I Nfarto a Gudo.
64. Rodrigo R, Hasson D, Prieto JC, Dussaillant G, Ramos C, León L, et al. The effectiveness of antioxidant vitamins C and E in reducing myocardial infarct size in patients subjected to percutaneous coronary angioplasty (PREVEC Trial): study protocol for a pilot randomized double-blind controlled trial. *Trials* [Internet]. 2014;15:192. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4050098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Rodríguez C. Fundamento científico de la oxigenoterapia hiperbárica en el tratamiento del pie diabético infectado grave en medicina basada en evidencias. *Med interna México*. 2010;26:374.
66. Rosenkranz S. TGF- $\beta$ 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):423–32.
67. Rothfuss A, Speit G. Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2002;508(1-2):157–65.
68. Rouviere H., V. D. Anatomía humana. 11th ed. 2005. 129, 181 p.
69. Sanjuán R, Blasco M, Muñoz J. Respuesta inflamatoria en el infarto agudo de miocardio. Valores predictivos. *Rev Esp Cardiol*. 1997;50(8):561–6.
70. Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E, Roberts RL, et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2003;22(24):6471–82.
71. Serna DF de la. Disfunción cardiaca de origen isquémico : Miocardio. *Insufic Card crónica*. 2010;339–58.
72. Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico : desde la química hasta su crucial función protectora en ojo Ascorbic acid : from chemistry to its crucial Resumen. *Acta Bioquim Clin Latinoamericana*. 2007;41(4):525–32.
73. Shah AM, Vallance P, Harrison D. NO in the cardiovascular system. *CardiovascRes*. 1999;43(Ang II):507–8.
74. Shite J, Qin F, Mao W, Kawai H, Stevens SY, Liang CS. Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(6):1734–40.

75. Sinz E. Soporte Vital Cardiovascular Avanzado. American Heart Association; 2011.
76. Smith G. Therapeutic applications of oxygen at two atmospheres pressure. *Am Coll chest physicians*. 2011;15–23.
77. Staples JR, Clement DB, Taunton JE, McKenzie DC. Effects of hyperbaric oxygen on a human model of injury. *Am J Sports Med* [Internet]. 1999;27(5):600–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496576>
78. Stephen R. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J appl physiol*. 2009;116:995–8.
79. Subbotina N. Cámara hiperbárica. 1ra ed. Buenos Aires; 2006. 17-27 p.
80. Tandara A, Mustoe T. Oxygen in wound healing - more than a nutrient. *World J Surg*. 2004;28(3):294–300.
81. Thomas WG, Qian H. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(3):130–6.
82. Tintinalli JE, Ruiz E KR. *Medicina de Urgencias*. American College of Emergency Physicians. 7th ed. España: Mc GrawHill; 2013. 396-433 p.
83. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2000;52(4):639–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121512>
84. Traber MG. Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:347–62.
85. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;51(5):1000–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>
86. Traber MG, Stevens JF. Vitamin C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(5):1000–13.
87. van den Blink B, van der Kleij a J, Versteeg HH, Peppelenbosch MP. Immunomodulatory effect of oxygen and pressure. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* [Internet]. 2002;132(1):193–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062209>
88. von Kitzing E, Jonas P, Sakmann B. Immune function in hyperbaric environments, diving, and decompression. *Research in Veterinary Science*. 1994. p. 364–7.
89. Wijesinghe. Routine use of oxygen in the treatment of myocardial infarction: Systematic. *Heart*. 2009;95:198–202.

90. [www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587](http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587).
91. [www.who.int/med](http://www.who.int/med)

