

UNIVERSIDAD DE COLIMA |

FACULTAD DE MEDICINA

CENTRO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

TITULO: CAPTACIÓN DE GLUCOSA CEREBRAL POST-
ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES CAROTÍDEOS CON
CIANURO DE SODIO EN RATAS: PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO
NÍTRICO

AUTOR: M en C. José Luis Cadenas Freixas

ASESORES: Dr. Sergio Adrián Montero Cruz.

Biol. Elena Rocés de Álvarez-Buylla

TESIS

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN FISIOLOGÍA

Colima, Col., Junio de 2007

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A la Universidad de Colima, y en especial al Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas (CUIB) por abrirme las puertas para poder realizar mis estudios de postgrado.

De manera muy especial a mis asesores y directores de Tesis: la **Biól. Elena Roces de Álvarez Buylla** y el **Dr. Sergio Adrián Montero Cruz**, por aceptarme como alumno, y compartir conmigo sus experiencias académicas y científicas que contribuyeron de manera significativa a mi formación.

A los Doctores: Irene Díaz Reval, Jesús Lara Chávez, Caridad A. Leal Cortés, Ricardo Navarro Polanco, y Xóchitl A. R. Trujillo Trujillo, por la cuidadosa revisión de esta tesis, sus sugerencias enriquecieron mi trabajo.

A la M. en C. Mónica Lemus Vidal por su amistad y apoyo técnico durante el desarrollo experimental.

A todos los maestros del CUIB por trasmitirme de manera desinteresada sus enseñanzas y experiencias.

A la Dra. Caridad A. Leal Cortés por su apoyo en las determinaciones de los nitritos realizado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, etapa importante en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de doctorado Betty y Rafael por su amistad y por trasmitirme sus conocimientos, experiencias y comentarios que me facilitaron mi trabajo y mi vida personal.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me apoyaron durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco a la *Universidad de Colima* la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, así como al *Fondo Ramón Álvarez-Buylla* y al CUIB por haberme permitido continuar con la línea de investigación del Dr. Ramón Álvarez-Buylla

DEDICATORIA

Al Dr. Ramón Álvarez-Buylla por transmitirme a través de la Biól. Elena Roces de Álvarez-Buylla y el Dr. Sergio A. Montero Cruz sus conocimientos y experiencias.

A mis Padres, mi esposa y mis hijos por el apoyo constante.

SÍNTESIS

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa liposoluble, que en el sistema nervioso central (SNC) actúa como un neurotransmisor. El NO participa en la homeostasis de la glucosa incrementando los niveles de glucosa en el plasma por glucogenolisis hepática secundaria a la secreción de arginina-vasopresina (AVP). El NO disminuye la función quimiosensora del cuerpo carotídeo e influye sobre las vías de la quimiotransducción hipóxica. En el presente trabajo se exploró el papel del NO en la retención de glucosa cerebral después de la estimulación de los receptores carotídeos (RSCC) con cianuro de sodio (NaCN-5 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Las ratas (250-300g) se anestesiaron con pentobarbital y se mantuvieron con respiración artificial a una temperatura de 25°C. La cuantificación de nitritos se utilizó como un índice de la concentración de NO en la sangre y en el tejido. Se utilizaron los siguientes protocolos: **a)** control 1, condiciones experimentales; **b)** control 2, perfusión de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa -5 $\mu\text{L}/30\text{ s}$) en la cisterna magna (CM); **c)** control 3, estimulación RSCC simultáneamente con la perfusión de LCRa; **d)** perfusión de un donador del NO (nitroprusiato de sodio) (NPS - 300 $\mu\text{g}/5\ \mu\text{L}$ de LCRa) en la CM; **e)** estimulación RSCC simultáneamente con NPS en la CM; **f)** perfusión de un inhibidor del NO (L-NAME, 250 $\mu\text{g}/5\ \mu\text{L}$ de LCRa) en la CM; **g)** estimulación RSCC en forma simultánea con L-NAME en la CM. Los resultados obtenidos indican que la infusión de NPS simultáneamente con la estimulación RSCC no alteró la retención de glucosa cerebral, mientras que la perfusión de NPS solo, aumentó tanto la retención de glucosa cerebral como los niveles de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipofisiario. Por el contrario, el L-NAME simultáneamente con la estimulación RSCC aumentó la captación de glucosa cerebral y bajó los niveles de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipofisiario. Estos resultados sugieren que el NO participa en los reflejos glucémicos evocados por el NaCN

ÍNDICE

Contenido
ABREVIATURAS
RESUMEN
ABSTRACT
INTRODUCCIÓN
ANTECEDENTES
Participación de los receptores seno-cuerpo Carotídeos (RSCC) en la homeostasis de la glucosa.
Óxido nítrico (NO).
Síntesis del óxido nítrico.
El óxido nítrico como neurotransmisor.
Efectos del NO en el cuerpo carotídeo y la Quimiorrecepción.
Óxido nítrico y homeostasis de la glucosa.
PLANTEAMIENTO y JUSTIFICACIÓN
HIPOTESIS DE TRABAJO
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS ESPECÍFICOS
METODOLOGÍA
Animales y técnicas quirúrgicas generales.
Estimulación de los RSCC y obtención de sangre.
Infusión de los fármacos en la cisterna magna (CM).
Técnicas analíticas: determinación de glucosa.
Determinación de nitritos para valorar el óxido nítrico (NO).
Protocolo experimental.
Análisis estadístico.

RESULTADOS

Experimentos control.

Estimulación de los RSCC simultáneamente con la inyección de Nitroprusiato de Sodio (NPS) en la CM.

Estimulación de los RSCC simultáneamente con la inyección de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) en la CM.

DISCUSIÓN

Estimulación de los RSCC en el seno carotídeo circulatoriamente aislado e infusión de LCRa en la CM.

Estimulación de los RSCC con NaCN en el seno carotídeo circulatoriamente aislado, simultáneamente con la infusión de NPS en la CM.

Estimulación de los RSCC en el seno carotídeo circulatoriamente aislado e infusión de L-NAME en la CM.

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

Contenido
Figura 1.- A) Diagrama que resume el mecanismo de la acción del NO en el sistema nervioso y en el músculo liso vascular. B) Diagrama que resume el efecto neuroprotector y neurotóxico del NO. C) Diagrama que resume la neurotoxicidad del NO durante la isquemia-reperfusión.
Figura 2.- Micrografía del CC que muestra fibras nerviosas positivas a la sintetasa del NO (NOS) dispersas en todo el órgano.
Figura 3.- Inmunotinción para fibras positivas a la sintetasa de NO (NOS).
Figura 4.- Estimulación eléctrica del nervio del seno carotídeo durante la hipoxia.
Figura 5.- Efecto excitador del L-NAME (50 μ M) sobre la actividad quimiosensora del cuerpo carotídeo.
Figura 6.- Efectos excitatorios de inyecciones (dosis crecientes) de un donador de NO durante la normoxia.
Figura 7.- Hiperglucemia después de la inyección ICV de L-NAME.
Figura 8.- Esquema que muestra el procedimiento quirúrgico general.
Figura 9.- Esquema del dispositivo para la infusión de LCRa en la CM más la inyección de NaCN en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC).
Figura 10.- Diagrama que representa el dispositivo para diseccionar el fragmento cerebral que contiene la región hipotálamo-hipófisis.
Figura 11.- Control 1: Concentración de glucosa en la sangre arterial (Art) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.
Figura 12.- Concentración de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario en los grupos controles.
Figura 13.- Control 2: Concentración de glucosa en las sangres arterial (Art) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.

Figura 14.- Control 3: Concentración de glucosa en las sangres arterial (Art) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.	52
Figura 15.- Estimulación de los RSCC con NaCN en el SC más NPS; concentraciones de glucosas arterial (Art.) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.	54
Figura 16.- Comparación de las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipófisis entre los grupos control 3 y experimental NPS más NaCN.	55
Figura 17.- Inyección de NPS en la cisterna magna, simultáneamente con la inyección de sol.sal en el SC aislado; concentraciones de glucosa arterial (Art.) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.	56
Figura 18.- Comparación de las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipófisis entre los grupos experimentales NPS más sol.sal y NPS más NaCN.	57
Figura 19.- Estimulación de los RSCC con NaCN en el SC más L-NAME; concentraciones de glucosa arterial (Art.) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.	59
Figura 20.- Comparación de las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipófisis entre los grupos Control 3 y experimental L-NAME más NaCN.	60
Figura 21.- Inyección de sol.sal en el SC más L-NAME; concentraciones de glucosas arterial (Art.) y venosa (Ven) y diferencias arterio-venosas.	61
Figura 22.- Comparación de las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipófisis entre los grupos experimentales L-NAME más sol.sal y L-NAME más NaCN.	62
Figura 23.- Comparación de las retenciones de glucosa cerebral entre los grupos NPS más NaCN y L-NAME más NaCN.	63

Figura 24.- Comparación de las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipófisis entre los grupos experimentales NPS más NaCN y L-NAME más NaCN.	64
Tabla 1. Protocolo para la determinación de nitritos por la técnica de Griess.	44
Tabla 2.- Retenciones de glucosa por el cerebro según los protocolos.	49
Tabla 3.- Concentraciones de nitritos en el plasma venoso según los protocolos.	49
Tabla 4.- Concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario según los protocolos.	49

ABREVIATURAS

ACC: Arteria carótida común

ACE: Arteria carótida externa

ACh: Acetilcolina

ACI: Arteria carótida interna

AL: Arteria lingual

AMPA: Alfa-amino-3 hidroxil-5-metil-
isoxazol-4 ácido propiónico

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

AMPK: Proteincinasa activada por
adenosin monofosfato

Art: Arterial

ATP: Adenosin trifosfato

A-V: Diferencia arterio-venosa de glucosa

AVP: Arginina-vasopresina.

BH₄: Tetrahidrobiopterina

Ca²⁺: Calcio

CC: Cuerpo carotídeo

CM: Cisterna magna

DA: Dopamina

D-NAME: Nitro-D-arginina metil éster

EDRF: Factor endotelial de la relajación
vascular

EDTA: Ácido etilendiamin tetraacético.

ERC: Estimulación de los receptores
carotídeos

FAD: Flavín-adenín-dinucleótido

FMN: Flavín mononucleótido

GC: Guanilato ciclasa

•

GLUT: Transportador de glucosa

GMPc: Guanosil monofosfato cíclico.

GTP: Trifosfato de guanosina

H₃PO₄: Ácido fosfórico

HClO₄: Ácido perclórico.

i.p.: Intraperitoneal

ICV: Intracerebroventricular

K⁺: Potasio

K_{Ca}: Canales de potasio dependientes de calcio

K₂CO₃: Carbonato de potasio.

L-Arg: L-arginina

L-Citr: L-citrulina

LCRa: Líquido cefalorraquídeo artificial

L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster

μM: Micromolar

min: Minuto/s

Na⁺: Sodio

NaCN: Cianuro de sodio

NADPH: Dinucleótido de nicotín-adenín-fosfato reducido

NANC: No adrenérgico-no colinérgico

NaNO₂: Nitrato de sodio.

NED: Dicloruro N-1-naftil-etilendiamida.

NG: Nitroglicerina

NH₄Cl.: Cloruro de amonio.

nM: Nanomolar

NMDA: N-metil-D-aspartato

- **NO:** Óxido nítrico.
- NO₂:** Dióxido de nitrógeno.
- NO₂⁻:** Nitrito.
- NO₃⁻:** Nitrato.
- NO₃:** Trióxido de nitrógeno.
- NOC-9:** 6-(2-hidroxi-1-metil-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina.
- NOS:** Sintetasa del óxido nítrico.
 - eNOS:** Sintetasa del NO endotelial.
 - iNOS:** Sintetasa del NO inducible.
 - nNOS:** Sintetasa de NO neuronal.
- NPS:** Nitroprusiato de sodio
- NSC:** Nervio del seno carotídeo
- NTS:** Núcleo del tracto solitario
- ONOO⁻:** peroxinitritos
- PBS:** Solución buffer de fosfatos
- PCO₂:** Presión parcial de bióxido de carbono
- PK:** Proteincinasa
- PKA:** Proteincinasa A
- PKC:** Proteincinasa C
- PO₂:** Presión parcial de oxígeno
- RCC:** Receptores del cuerpo carotídeo
- RSCC:** Receptores del seno-cuerpo carotídeo
- seg:** segundos
- SNAP:** S-nitroso-N-acetilpenicilamina
- SNC:** Sistema nervioso central
- sol. sal:** Solución salina
- Ven:** Venosa

-

INTRODUCCIÓN

La glucosa es el sustrato energético más importante del sistema nervioso central (SNC) (Sokoloff, 1984), bajo condiciones normales, es responsable del 98% del metabolismo oxidativo cerebral (Ruderman y Goodman, 1980). Aunque el cerebro humano representa aproximadamente el 2% del peso corporal total, consume alrededor del 20% del gasto basal energético del organismo, tanto de glucosa como de O_2 (por cada gramo de tejido consume 0.3 a 0.8 μmol de glucosa y 1.6 a 5 μmol de O_2). En realidad, el cerebro consume mayor cantidad de glucosa que la que puede ser oxidada hasta CO_2 y agua, indicando que el proceso glucolítico anaeróbico excede al proceso oxidativo en un 20% aproximadamente (Sokoloff, 1984). En circunstancias especiales, como en la cetosis y en el ayuno prolongado, el sistema nervioso utiliza otras fuentes de energía como los cuerpos cetónicos, el L-lactato y el L-piruvato (Sokoloff, 1984). En ausencia de glucosa, durante la hipoglucemia severa, como la hipoglucemia insulínica, la función cerebral se deteriora llegando hasta la pérdida de la conciencia, con aumento del catabolismo de aminoácidos y componentes estructurales neuronales, liberación de neurotoxinas y muerte (Kety, Polis, Nadler, y Schmidt, 1948). Aunque el aporte de O_2 es también importante para mantener la homeostasis cerebral, durante la hipoxia severa tienen lugar mecanismos compensadores como la glucólisis anaeróbica. Es decir, la glucosa constituye el verdadero factor limitante en la energética de la vida celular, y por lo tanto, el hígado en su función de almacenamiento de glucosa (Nijima, 1986), es un órgano “respiratorio” esencial para el suministro de este sustrato al SNC (Álvarez-Buylla, 1997). Como los almacenes de glucógeno en el cerebro son pequeños (3-4 mol/g) y sólo cubren los requerimientos energéticos encefálicos durante pocos minutos (Siesjo, 1978; Sokoloff, 1984), existe un estrecho acoplamiento entre el suministro sistémico de glucosa y el metabolismo energético de las neuronas y glías (Sokoloff, 1991), por lo que los cambios en la utilización de glucosa constituyen un índice de la actividad neuronal.

- Como el metabolismo neuronal es glucosa-dependiente pero insulina-independiente (Lautala y Martin, 1981; Porte, Baskin, Schwartz, 2005) es lógico pensar que el cerebro posee mecanismos intrínsecos para regular la disponibilidad de los sustratos energéticos en forma paralela con las variaciones de su actividad funcional (Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla, 1994; Magistretti y Pellerin, 1999).

La barrera hematoencefálica constituye un factor limitante en el transporte de la glucosa hacia el cerebro, y condiciona el paso de los sustratos energéticos de forma selectiva (Lund-Andersen, 1979), pero los mecanismos y los factores que regulan este transporte no se conocen con precisión (Fray, Forsyth, Boutelle y Fillenz, 1996). Álvarez-Buylla postula la participación del SNC en la homeostasis de la glucosa, e involucra a los receptores del seno-cuerpo carotídeo (RSCC) como sensores especializados no sólo a la falta de O₂, sino también a la falta de glucosa en la sangre que irriga al cerebro (Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla, 1975; Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1988; Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla, 1994). Las señales procedentes de los receptores carotídeos llegan por el nervio glosofaríngeo al núcleo del tracto solitario (NTS) (Finley y Katz, 1992), y desde ahí, las vías noradrenérgicas constituyen las entradas al núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, a la eminencia media y a la hipófisis (Cunningham y Sawchenko, 1988). El NPV, estructura primordial en el control autónomo del cerebro, recibe múltiples aferencias que proyectan a distintas áreas dentro y fuera del hipotálamo, incluyendo regiones cerebrales que participan en la regulación simpática y en la regulación glucémica (Kc, Haxhiu, Tolentino-Silva, Wu, Trouth y Mack, 2002). El aumento resultante en las señales de los cuerpos carotídeos hacia el NTS, en respuesta a los cambios en las concentraciones de glucosa, promueve respuestas reflejas en los sistemas respiratorio, circulatorio, renal y endocrino. Se ha postulado que dicho aumento en las señales se debe a la liberación de transmisores de las células del glomus en los cuerpos carotídeos; como la acetilcolina (ACh), el adenosin trifosfato (ATP), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA), que a su vez se encuentran bajo la acción de moduladores como la adenosina y el óxido nítrico (NO).

- La identificación del NO en el NTS (Atkinson, Batten, Corbett, Sinfield y Deuchars, 2003), podría determinar los blancos precisos de las vías aferentes y su participación en los procesos homeostáticos de la glucosa (Tabata, Kurosawa, Kikuchi, Hida, Ogawa, Okabe, Tun, Hattori y Shirato, 2001). Numerosos estudios *in vitro* indican que el NO interviene en los reflejos del cuerpo carotídeo (CC) como un modulador en la neurotransmisión y en la descarga quimiosensora, (Wang, Stensaas, Dinger y Fidone, 1995; Buerk y Lahiri, 2000; Iturriaga, Mosqueira y Villanueva, 2000), pero hasta la fecha no se ha descrito su participación en los cambios glucémicos que se observan después de la estimulación anóxica del CC (Bolanos y Almeida, 1999).

En esta tesis se analiza la participación del NO en las vías del reflejo quimiorreceptor con hiperglucemia y retención de glucosa por el cerebro, después de la estimulación con cianuro de sodio (NaCN), es decir, después de inducir una anoxia-histotóxica en el CC circulatoriamente aislado.

-

ANTECEDENTES

Desde los estudios clásicos de Claudio Bernard, se sabe que el cerebro interviene en la homeostasis de la glucosa (Bernard, 1857). Los trabajos de Houssay y Magenta (1924) y Houssay y Biasotti (1931) plantean que la hipófisis es la glándula que interviene en este proceso, demostrando la acción diabetogénica de los extractos pituitarios y la hipersensibilidad a la insulina de los animales hipofisoprivos. La hipofisectomía motiva una atrofia adrenocortical con reducción significativa del contenido de adrenalina en la sangre venosa adrenal (Wurtman, Casper, Pohorecky y Bartter, 1968), e hipoglucemia (Houssay, 1951). La participación del SNC en la homeostasis de la glucosa fue establecida de manera inequívoca en los experimentos de Álvarez-Buylla y Carrasco-Zanini (1960) y Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla (1975), en los que se inducen reflejos condicionados hipoglucemiantes en perros y ratas. Se sugiere entonces, que el sistema nervioso juega un papel esencial para dirigir la respuesta endógena compensadora (sistemas glucorregulatorios) provocada por la hipoglucemia insulínica o hipoxemia que involucra al sistema simpático-adrenal (Cryer, 1983). La hipoglucemia, por tanto, inicia mecanismos nerviosos que aumentan la producción de glucosa, y por el contrario, la hiperglucemia, activa mecanismos que la inhiben (Rohner-Jeanrenaud, Bobbioni, Ionescu, Sauter y Jeanrenaud, 1983; Álvarez-Buylla, 1997). Como las reservas de glucosa y glucógeno en el cerebro son bajas, la sangre debe suministrar en forma continua las cantidades apropiadas de este sustrato al SNC de acuerdo a sus demandas (Siesjo, 1978; Hertz y Paulson, 1983), pero los mecanismos homeostáticos que aseguran un aporte adecuado de glucosa al cerebro no se conocen, aunque se sabe que difieren de los utilizados por otros tejidos (Hasselbach, Knudsen, Videbaek, Pinborg, Schmidt, Holm y Paulson, 1999). Es probable que existan sistemas reguladores “exclusivos” que garanticen el suministro apropiado de la glucosa al SNC (Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla, 1994).

- Aunque los sistemas involucrados en la regulación de la glucosa en el SNC son hasta ahora especulativos (Obici, Zhang, Karkanias y Rossetti, 2002; Levin, Routh, Kang, Sanders y Dunn-Meynell, 2004), se sabe que el sistema nervioso puede modificar la concentración de glucosa en la sangre por distintas vías. a) Las catecolaminas secretadas por la médula adrenal participan de manera importante en la regulación del aporte de glucosa por el hígado; en efecto, tanto la adrenalina como la noradrenalina modulan el metabolismo hepático de glucosa con la influencia de otras hormonas y de la inervación de la médula adrenal (Seydoux, Brunsmann, Jeanrenaud y Girardier, 1979; Cryer, 1983). b) La existencia de neuronas glucosensibles en el hipotálamo y en el NTS (Kadekaro, Timo-Laria, y Vincentini, 1980; Levin, 2001; Levin y col., 2004) juega, también, un papel en la glucogenolisis hepática (Frohman, 1983), y en general, en la homeostasis de la glucosa (Levin y col., 2004); aunque las consideraciones anatómicas de estos núcleos cerebrales y sus complicadas conexiones, dentro y fuera del hipotálamo, no explican fácilmente su significado fisiológico en la regulación de la captación de glucosa por el cerebro. c) La presencia de la insulina y de receptores a la insulina en el cerebro (Masters, Shemer, Judkins, Clarke, LeRoith y Raizada, 1987; Okamoto y Accili, 2003) ha despertado muchas dudas acerca de su lugar de síntesis y de su significado fisiológico (Oomura, 1983; Obici y col, 2002). d) En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado que la arginina-vasopresina (AVP) en el NTS modula la respuesta hiperglucemiante por la estimulación senocarotídea (Montero, 1998; Montero, Yarkov y Álvarez –Buylla, 2000; Yarkov, Montero, Lemus, Roces de Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 2001). De la misma manera, se registra un aumento en los niveles de AVP en el plasma después de perfundir el seno carotídeo con sangre desprovista de O₂ (Share y Levy, 1966), así como después de la oclusión de ambas carótidas (Harris, 1979). La AVP estimula, también, la glucogenolisis hepática (Hems, Rodríguez y Whitton, 1978; Keppens y De Wulf, 1979) incrementando el consumo de glucosa por el cerebro ante un estímulo anóxico.

-

Participación de los receptores seno-cuerpo carotídeos (RSCC) en la homeostasis de la glucosa.

Los CC localizados en la bifurcación de la carótida primitiva, contienen los quimiorreceptores arteriales más importantes para detectar los cambios en los niveles de O₂, CO₂, pH, osmolaridad, temperatura y glucosa en la sangre que irriga el cerebro. Los CC están inervados por el nervio del seno carotídeo (NSC), formado por fibras sensoras aferentes del nervio glossofaríngeo. Los CC reciben, también, inervación simpática procedente del ganglio cervical superior (Kameda, 2006). Los CC están formados por dos tipos de células: las células tipo I o glómicas, que son las propiamente quimiorreceptoras, contienen vesículas con neurotransmisores (ACh, DA, etc) y neuropéptidos (encefalina, neuropéptido Y, etc); y las células tipo II o sustentaculares cuya función es de soporte. De acuerdo con la hipótesis de la quimiorrecepción, las células del *glomus* del cuerpo carotídeo son los sitios primarios donde se lleva a cabo la transducción del estímulo hipóxico. En respuesta a la hipoxia, las células del *glomus* liberan uno o más transmisores excitatorios como ACh y ATP que a su vez incrementan la frecuencia de las descargas en las terminales nerviosas de las neuronas del ganglio petroso (González, Rocher y Zapata, 2003). En los últimos años, distintos investigadores sugieren que los RSCC participan en la homeostasis de la glucosa (Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1988; Koyama, Coker, Stone, Brooks Lacy, Jabbour, Williams y Wasserman, 2000; López-Barneo, 2003). Como se ha mencionado, estos receptores, localizados estratégicamente en la iniciación del árbol arterial cerebral, informan al SNC de las variables más importantes para su metabolismo (Álvarez-Buylla, 1954; Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla, 1975, 1988; Gallego, Eyzaguirre y Monti-Bloch., 1979; Eyzaguirre y Zapata, 1984; Alcayaga, Iturriaga y Zapata, 1988, Pardal y López-Barneo, 2002; López-Barneo, 2003). La disminución en la descarga barorreceptora, por oclusión carotídea (reflejo de Hering), o la estimulación quimiorreceptora con pequeñas dosis de NaCN, (bloqueador del transporte de electrones en la cadena respiratoria), aumentan los niveles de glucosa arterial incrementando paralelamente la captación de glucosa por el encéfalo (Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1988). Álvarez-Buylla y Roces de Álvarez-Buylla (1994) demuestran que los cambios en la concentración de glucosa en la sangre

- que irriga al seno carotídeo aislado *in vivo* influyen sobre la cantidad de glucosa que retiene el cerebro. La estimulación quimiorreceptora desencadena un reflejo hiperglucémico de corta latencia por aumento de la glucogenolisis hepática (Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1988; Álvarez-Buylla y col., 1997). El análisis de las diferencias arterio-venosas de glucosa hepática indica que la estimulación de los quimiorreceptores senocarotídeos con NaCN, produce un aumento inmediato de la salida de glucosa del hígado, que desaparece después de la hipofisectomía, adrenalectomía o neurohipofisectomía (Álvarez-Buylla y col., 1997).

La estimulación de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo por el NaCN provoca anoxia citotóxica en las células del *glomus* carotídeo, es decir simula un efecto hipóxico que conlleva a una disminución en la corriente saliente rectificadora de K^+ , despolarizándose la membrana de las células del CC. Esta despolarización activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, incrementando el Ca^{2+} intracelular, catión que desencadena toda la cascada de eventos para liberar el transmisor como la ACh. A su vez, la acción del transmisor produce una excitación subsecuente de las fibras del nervio del seno carotídeo que envían la información aferente (Acker, 1994) a través del nervio glossofaríngeo al NTS (Finley y Katz, 1992) donde terminan los axones vasopresinérgicos de las neuronas hipotalámicas (Swanson y Kuypers, 1980). Es decir la hipófisis participa de manera importante en los efectos producidos por estos receptores periféricos (asociados con el nervio glossofaríngeo) y conectados al nervio vago (Ricardo y Koh, 1978). Se sabe que las terminales aferentes de los RSCC están en la parte dorsal del NTS (Chen, Weber y Yates, 1994), y por evidencias de microscopía electrónica, se demuestra la existencia de conexiones sinápticas desde los aferentes centrales de los RSCC hasta las neuronas de segundo orden en el NTS, y desde allí a diversas regiones del SNC (Ciriello, Hrycshyn y Calaresu, 1981; Nosaka, Murase, Murata e Inui, 1995). La identificación de moduladores, como podría ser el NO, en estas neuronas de segundo orden y en terminales del NTS (Atkinson y col., 2003) determinaría los blancos precisos de las vías aferentes en este núcleo, así como su participación en los procesos homeostáticos (Tabata y col., 2001).

•

En las vías efectoras de los reflejos anteriormente descritos, participan la neurohipófisis y la médula adrenal (Álvarez-Buylla y col., 1997), pero no se sabe aún cuál es el factor efector responsable del reflejo hiperglucémico después de la estimulación de los RSCC con NaCN. Experimentos con inyecciones de líquido cefalorraquídeo (LCR), obtenido de perros post-estimulación RSCC, en ratas normales, sugieren que la estimulación de estos receptores induce la secreción de una neurosecreción o sustancia importante para la regulación de la glucosa cerebral (Álvarez-Buylla, Huberman, Montero, Lemus, Valles y Roces de Álvarez-Buylla, 2003), que se piensa podría ser el NO, motivo de estudio en esta tesis.

Óxido nítrico (NO)

Durante mucho tiempo se consideró al NO como un producto secundario a reacciones químicas no biológicas, hasta que en los años 80s se demostró que el NO también es producido por los seres vivos, e influye en gran número de funciones biológicas. En 1998, R.F. Furchgott, L.J. Ignarro y F. Murad recibieron el premio Nobel de medicina por sus investigaciones sobre la participación del NO como molécula señalizadora en el sistema cardiovascular (Bian y Murad, 2003). La noticia fue sorprendente, pues nunca se pensó que una molécula gaseosa formada por tan sólo dos átomos (nitrógeno y oxígeno), con PM de 30 daltones y una vida media de 1 a 30 seg pudiera tener alguna función en el cuerpo humano. La mayoría de los compuestos que resultan de los procesos bioquímicos, como hormonas, anticuerpos, etc., son generalmente estructuras de cientos o miles de átomos, y con una vida media más larga.

Por sus características físicas, el NO es un gas inestable, potencialmente tóxico en el medio externo. Sin embargo, en su función de molécula mensajera, esta sustancia desempeña un papel regulador importante entre las distintas células y tejidos del organismo. El NO es un vasodilatador que incrementa el flujo sanguíneo manteniendo la presión arterial en función de las necesidades del organismo (Bian y Murad, 2003).

Desde el siglo XIX se reconoció el efecto benéfico de un donador de NO como es la nitroglicerina (NG) cuando se presenta una disminución del flujo coronario (angina de pecho) por su efecto vasodilatador (Brunton, 1867; Murrel, 1879)

- Transcurrió más de un siglo para lograr evidencias experimentales que demostraran que la vasodilatación se debe a la generación del NO. A partir del desdoblamiento de la molécula de NG se promueve la síntesis de GMPc para desencadenar la relajación vascular por medio de eventos intracelulares interrelacionados (Furchgott, 1984). Este mismo autor demostró la existencia de un factor de naturaleza química desconocida de origen endotelial, que produce la relajación del músculo liso vascular ante la administración de acetilcolina (ACh). A esta sustancia se le denominó, en aquel entonces, "factor endotelial de la relajación vascular" (Endothelium-Derived Relaxing Factor; EDRF). En experimentos con una preparación de músculo liso aislado, el burbujeo con NO provoca una marcada relajación del músculo precontraído a través de la enzima guanilatociclasa (Gruetter, Barry, McNamara, Gruetter, Kadowitz y Ignaro, 1979). Estudios posteriores demuestran que los donadores de NO (nitroglicerina, nitroprusiato de sodio), y otros nitritos orgánicos ejercen su efecto vasodilatador mediante la activación de la guanilatociclasa y la producción de GMPc (Arnold, Mittal, Katsuki y Murad, 1977; Furchgott, 1984). Ignarro, Lipton, Edwards, Baricos, Hyman, Kadowitz y Gruetter (1981) y Agvald, Adding, Artlich, Person, y Gustafsson (2002) sugieren que el NO es en realidad el EDRF. Los efectos producidos por el EDRF y el NO sobre el músculo liso, son semejantes. Hechos que fueron confirmados años más tarde (Ignarro, Byrns y Wood, 1988; Moncada, Palmer y Higgs 1991; Palmer, Ashton y Moncada, 1988).

Biosíntesis del óxido nítrico

El NO se sintetiza al activarse la enzima óxido nítrico sintetasa (en inglés "nitric oxide synthetase" ó "**NOS**") que cataliza la conversión de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-Citr) y NO. Para la síntesis del NO se requieren dos pasos sucesivos: 1) hidroxilación del nitrógeno del grupo amidina de la L-Arg para producir N-hidroxil-L-arginina con la participación del dinucleótido de nicotín-adenín-fosfato reducido (NADPH) y O₂; este producto intermediario es oxidado en el segundo paso; 2) oxidación por la NOS para formar L-Citr y NO. La NOS requiere cofactores como NADPH, flavín-adenín-dinucleótido (FAD), flavín-mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH₄) y calcio (Ca²⁺).

-

En las células de los mamíferos se encuentran tres isoformas principales de la NOS, NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) que son constitutivas, y la NOS inducible (iNOS), que están codificadas por tres genes distintos. Tanto la nNOS como la eNOS son dependientes de una Ca-calmodulina y se encuentran en el tejido nervioso y en el endotelio vascular respectivamente. La iNOS no depende de Ca-calmodulina y se encuentra en muchos tejidos del organismo.

En condiciones fisiológicas *in vitro* e *in vivo*, cuando el radical superóxido (O_2^-) no se encuentra en la sangre ni en el medio de cultivo, o está en concentraciones bajas, el NO reacciona con el O_2 para formar nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), razón por la cual, la relación nitritos/nitratos (NO_2^-/NO_3^-) es un índice confiable de la producción de NO. El NO en concentraciones elevadas puede reaccionar espontáneamente con el radical superóxido (O_2^-) para formar peroxinitritos ($ONOO^-$), altamente reactivos, que puede ser protonados (H^+) y convertirse en ácido nitroso (ONOOH) en forma espontánea y reversible. En estas condiciones, se inhiben los sistemas enzimáticos que participan en la respiración mitocondrial para producir una prolongada vasoconstricción en el cerebro (Shibata, Araki, Hamada, Sasaki, Shimazu y Fukuuchi, 1996) o en otros órganos, como el hígado y el corazón, sometidos a traumas de isquemia/reperfusión durante las operaciones de transplantes (Zou y Bachschmid, 1999; Rodríguez-Reynoso, Leal, Portilla, Olivares y Muñiz, 2001). Es posible que dichos compuestos tengan una acción inhibitoria sobre el efecto vasodilatador del NO, y participen durante la normoxia en el efecto excitatorio del donador del NO sobre la quimiorrecepción del CC. La unión de la Ach a un receptor muscarínico en la membrana de la célula endotelial activa la NOS por un mecanismo indirecto. Tanto el NO sintetizado en cualquier célula, como el que se genera a partir de un donador, actúa sobre la célula blanco activando a la enzima guanilatociclasa (GC) soluble; en el SNC, esta enzima presenta una distribución diferencial, siendo relativamente abundante en el NTS, núcleos estríado y accumbens, sustancia negra, neocorteza y cerebelo, bulbo olfatorio y algunas zonas del tronco encefálico. Por tanto los elementos neurales que producen el NO y la guanilatociclasa soluble deben encontrarse en estrecha relación.

- La GC aumenta la concentración intracelular de GMPc a partir de GTP, y a su vez, este segundo mensajero intracelular, provoca la apertura de canales de K⁺ hiperpolarizando la fibra muscular lisa y estimulando una bomba de Ca²⁺ en la membrana, que disminuye el contenido intracelular de este ión. Tanto el NO producido en las células, como el administrado a partir de un donador, utilizan como mecanismo de acción en la célula blanco, la activación de la GC soluble. El NO también puede ejercer efecto directo sobre los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (K_{Ca}) en la célula muscular (Butler, Flitney y Williams, 1995) (**Figura 1**).

Hasta aquí hemos visto que el NO actúa como un mensajero intercelular entre la célula endotelial y el músculo liso vascular. Experimentos subsecuentes demuestran que el aparato bioquímico para la síntesis del NO está presente, también, en las neuronas (Fernández, Abudara y Morales, 1999), estableciendo que el NO se comporta como un neurotransmisor o neuromodulador, tanto en el SNC, como en el periférico. En el sistema nervioso periférico se demuestra por primera vez la participación del NO en la neurotransmisión, estimulando las fibras nerviosas que inervan al músculo liso (Gillespie, Liu y Martin, 1989) para producir la relajación muscular, que no podía ser explicada por efecto de la NA o ACh, es decir, neurotransmisión "no-adrenérgica no-colinérgica" (NANC). La confirmación de la hipótesis de que el NO es un neurotransmisor NANC se obtiene cuando, por medio de los inhibidores de la síntesis del NO, se logra bloquear la relajación del músculo ano-coccígeo inducida por la estimulación eléctrica del plexo mientérico, que constituye una acción NANC por excelencia (Li y Rand, 1989; Gibson, Mirzazadeh, Hobbs y Moore, 1990).

-

El óxido nítrico como neurotransmisor

Se considera a una sustancia como neurotransmisora cuando cumple con los siguientes criterios:

a) La maquinaria biosintética de dicha sustancia debe estar presente en la presinapsis, y debe liberarse ante la estimulación nerviosa presináptica.

b) La administración exógena de esta sustancia debe provocar una respuesta semejante a la que causa la estimulación nerviosa presináptica, y puede modificarse por fármacos agonistas o antagonistas.

c) En estas sinapsis, o en su cercanía, deben encontrarse mecanismos que determinen el cese de la acción de dicha sustancia neurotransmisora sobre la postsinapsis (Vincent, 1995).

Aunque el NO solo cumple con los criterios “a” y “b”, se establece que es un neurotransmisor atípico o neuromodulador que actúa tanto en el SNC como en el periférico. El NO puede ser sintetizado en elementos del sistema nervioso, y las moléculas receptoras del NO, como la enzima guanilatociclasa soluble, se localizan en neuronas y en efectores como son las células musculares o glandulares. En efecto, desde que en 1977 se describió que el NO activaba una guanilatociclasa cerebral, se tuvo la noción de que la transmisión nitrinérgica constituye una forma particular de neurotransmisión, donde no opera ni la metabolización ni la recaptación, sino que el neurotransmisor se agota a medida que difunde y se combina con distintos sustratos (Arnold y col., 1977; Miki, Kawabe y Kuryama, 1977; Vincent, 1995). Posteriormente, en cultivos de neuronas de cerebelo, se demostró que los aminoácidos excitatorios, como el glutamato, son capaces de aumentar los niveles de GMPc a partir de un factor con propiedades similares al EDRF (Garthwaite, Charles y Chess-Williams, 1988). La NADPH y la propia NOS se encuentran también, en grupos neuronales del SNC, sugiriendo que la síntesis del NO puede tener lugar en el sistema nervioso, aunque su función no ha sido bien establecida.

- A diferencia de un transmisor típico, el NO por ser una molécula gaseosa liposoluble, reactiva y difusible, no se almacena en las vesículas sinápticas por lo que tiene que ser producido *de novo* ante su requerimiento funcional. El NO tampoco se libera por exocitosis, como ocurre con un transmisor típico y su liberación no tiene lugar exclusivamente en las terminales sinápticas (Wiklund, Cellek, Leone, Iversen, Gustafsson, Brundin, Furst, Flock y Moncada, 1997). La presencia de NOS en el cuerpo neuronal y en las dendritas, hace que el NO pueda ser sintetizado en estos elementos y pueda difundir libremente, actuando en cualquiera de las células cercanas a las neuronas nitrinérgicas y con los receptores adecuados. Una vez sintetizado, el NO difunde por gradiente de concentración hacia las células blanco, para combinarse con sus receptores biológicos como es la enzima GC soluble. El mecanismo de la producción del NO en el cerebro ocurre a través de la liberación del glutamato de la terminal presináptica, el cual actúa en el elemento postsináptico produciendo la entrada de Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} intracelular activa la NOS por un mecanismo calmodulina-dependiente de este catión, sintetizándose NO en el elemento postsináptico. La NOS puede difundir espacialmente para encontrar otros elementos neuronales (terminales presinápticas y elementos postsinápticos). El NO producido por la liberación del glutamato, puede actuar sobre los elementos mencionados, siempre y cuando contengan la enzima GC soluble (Koesling, Russwurm, Mergia, Mullershausen y Friebe, 2004). En principio, la difusibilidad del NO determinará que sus efectos no estén restringidos al sitio de la síntesis, aunque debe ser capaz de actuar sobre todas las estructuras existentes en la esfera hipotética que tenga como centro su sitio de síntesis (Bolanos y Almeida, 1999) (**Figura 1A**). Para saber si en un determinado sistema la transmisión es nitrinérgica, se deberá tener en cuenta las evidencias experimentales, en lugar de insistir en el cumplimiento riguroso de un conjunto de criterios determinados *a priori* y que excluyen nuevos mecanismos y/o sustancias del proceso de neurotransmisión (Vincent, 1995; Rand y Li, 1995). Por los experimentos descritos se piensa que el NO puede actuar como neuromodulador y como neurotransmisor.

- Durante los estados de hipoxia-isquemia cerebral, el NO tiene efectos neuroprotector y neurotóxico. La activación de la nNOS por isquemia lleva a la muerte neuronal por la producción del NO en la neurona; por el contrario, la activación de la eNOS es neuroprotectora ya que se produce NO en el endotelio vascular iniciando una vasodilatación con incremento del flujo cerebral en la región isquémica. Además, la activación de la iNOS en los astrocitos, después de la hipoxia, produce un aumento en el NO ocasionando tanto el efecto neurotóxico (Mishra, Mishra, Ashraf y Delivoria-Papadoupoulos, 2006), como el neuroprotector (Cidad, García-Nogales y Almeida, 2001; Lin, Raab-Graham, Jan y Jan, 2004). Neurotóxico debido a que interfiere en el metabolismo energético neuronal y neuroprotector porque actúa a nivel vascular (**Figuras 1B y 1C**).

La disminución de oxígeno en las neuronas durante la hipoxia reduce la producción de ATP mitocondrial, e inhibe el bombeo de Ca^{2+} al retículo endoplásmico, aumentando así la concentración de Ca^{2+} intracelular, para activarse la nNOS y el NO en cantidades mínimas, aunque este procedimiento depende de O_2 . Durante la reoxigenación (o reperusión) se incrementa el aporte de O_2 y la producción del NO, excediendo la capacidad de la mitocondria de reducir el oxígeno hasta agua al inhibir los complejos 3 y 4. El NO con O_2 produce el anión superóxido (O_2^-) que reacciona con el propio NO para formar peroxinitritos (ONOO^-), inhibidores irreversibles de la función mitocondrial y moduladores de la señalización en el receptor, activada por Ca^{2+} (Elliot, 1996). Los peroxinitritos son compuestos pro-oxidantes que dañan a las proteínas, a los lípidos y al DNA, y provocan la muerte neuronal (**Figura 1C**) (Bolanos y Almeida, 1999).

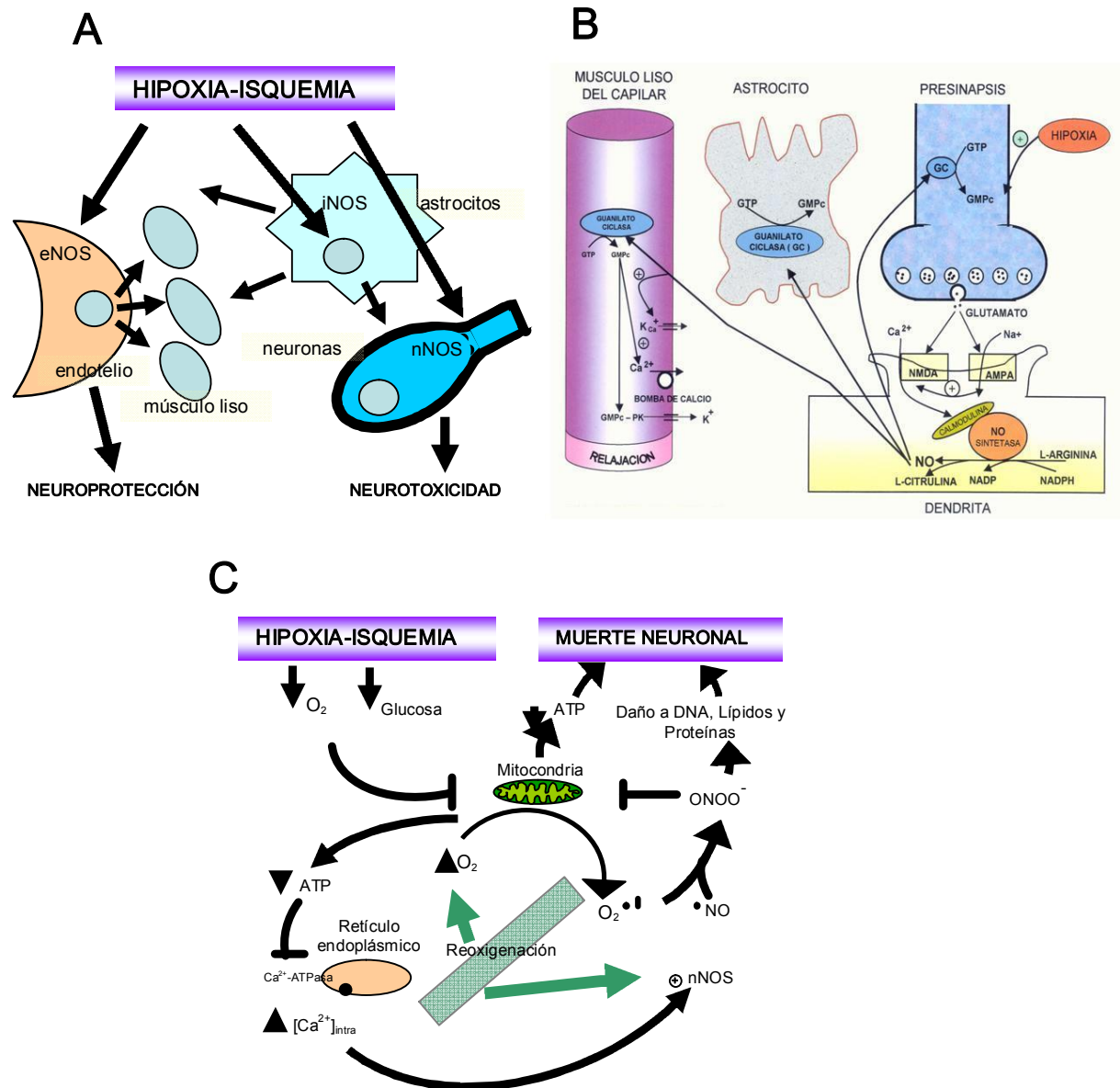


Fig. 1. A) Efectos neuroprotector y neurotóxico producidos por el NO durante la hipoxia-isquemia en el endotelio vascular y en las neuronas. B) Mecanismo de la acción del NO en el sistema nervioso y en el músculo liso vascular. C) Neurotoxicidad del NO durante la isquemia/reperfusión. (Modificado de Bolanos y Almeida 1999).

•

Efectos del NO en el cuerpo carotídeo y en la quimiorrecepción.

Numerosos estudios indican que el NO participa en los reflejos del cuerpo carotídeo (Wang y col., 1995; Buerk y Lahiri, 2000; Iturriaga y col., 2000) como un regulador en la neurotransmisión y en la descarga quimiosensora, y algunos autores plantean que el NO interviene en la homeostasis de la glucosa (Tong, Wang y Cheng, 1997). Se propone que el NO se produce dentro del CC como un modulador inhibitorio de la quimiorrecepción hipóxica (Prabhakar, Kumar, Chang, Agani y Haxhiu, 1993; Chugh, Katayama, Mokashi, Debout, Ray y Lahiri, 1994; Wang, Stensaas, Bredt, Dinger y Fidone, 1995; Trzebski, Sato, Susuki y Sato, 1995), y en estudios inmunocitoquímicos se demuestra una extensa red de fibras NOS positivas en el CC con dos poblaciones anatómica y fisiológicamente distintas: inervación de la vasculatura y la del propio CC (Grimes, Lahiri, Stone, Mokashi y Chug 1994; Wang y col., 1994) (**Figuras 2 y 3**).

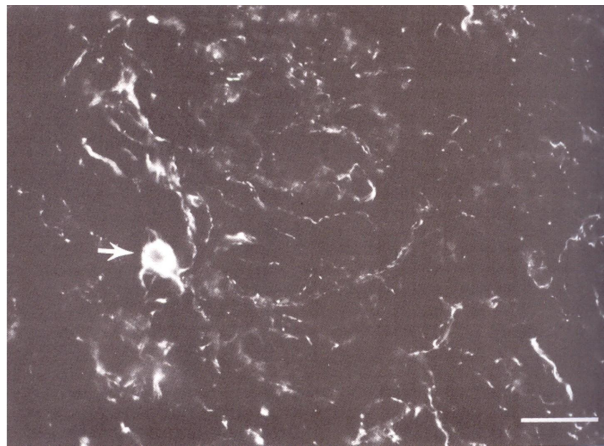


Fig. 2. Micrografía del CC que muestra fibras nerviosas positivas a NOS distribuidas en todo el órgano. Algunos de los ganglios (flecha) también presentan positividad a la NOS. Amplificación 50 µm. (Modificado de Grimes y col., 1994).

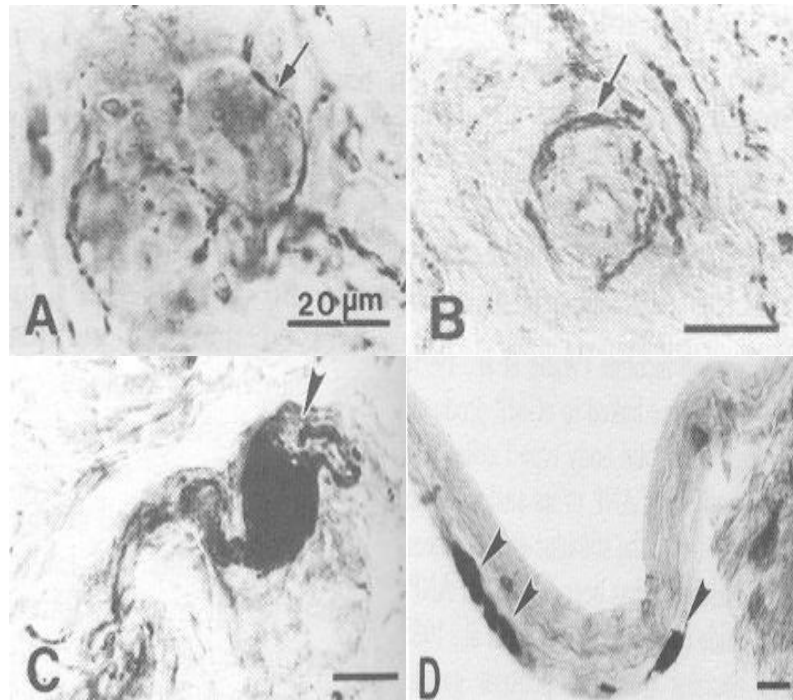


Fig. 3. Inmunotinción para fibras positivas a la sintetasa de NO (NOS). A) Fibras NOS positivas que penetran al parénquima celular del lóbulo (flecha); B) las fibras NOS positivas se encuentran también rodeando los vasos sanguíneos del CC (flecha); C) neuronas NOS positivas en la periferia del CC (punta de flecha); D) neuronas NOS positivas a los largo del seno carotídeo (puntas de flechas). (Tomado de Wang y col., 1994).

El NO tiene la virtud de competir con el O_2 para enlazarse a grupos hemo produciendo respuestas que semejan a los cambios en la pO_2 . El CC, como estructura quimiosensora de los niveles de oxígeno en la sangre que va a irrigar el SNC, es el órgano ideal para probar las vías NOS-NO tanto por su extensa vasculatura como por su inervación. Experimentos diseñados para mostrar el papel del NO en la inhibición de la respuesta quimiosensora demuestran que durante la estimulación eléctrica del nervio del seno carotídeo (NSC) en un medio bajo en O_2 disminuye la respuesta hipóxica, sin embargo, cuando se perfunde con un antagonista de NO, como es el N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) se revierte la respuesta a la anoxia aun en presencia del estímulo al NSC (Wang y col., 1994) (**Figura 4**)

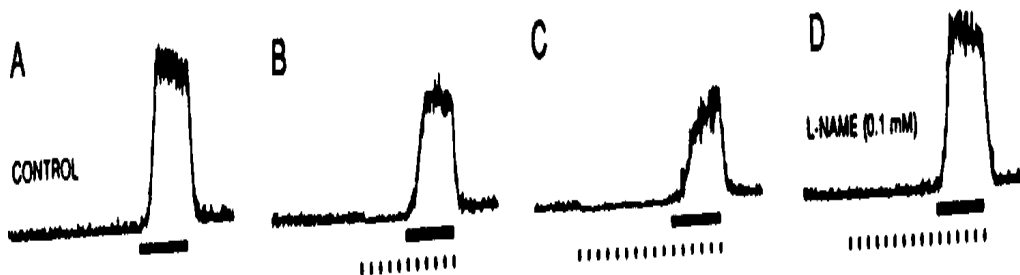


Fig. 4. Estimulación eléctrica del nervio del seno carotídeo (NSC) (5 V, 1 ms, 20 Hz) durante la hipoxia (barra negra). A, control; B y C, inhibición de la respuesta a la hipoxia por la estimulación del NSC; D, se revierte la inhibición en presencia de L-NAME (0.1 mM). (Tomado de Wang y col., 1994).

De la misma forma, la perfusión con L-NAME en una preparación del CC aislado incrementa la actividad quimiosensora en el NSC (Katayama, Chug, Mokashi, Ray, Bebout, y Lahiri, 1994) (Figura 5).

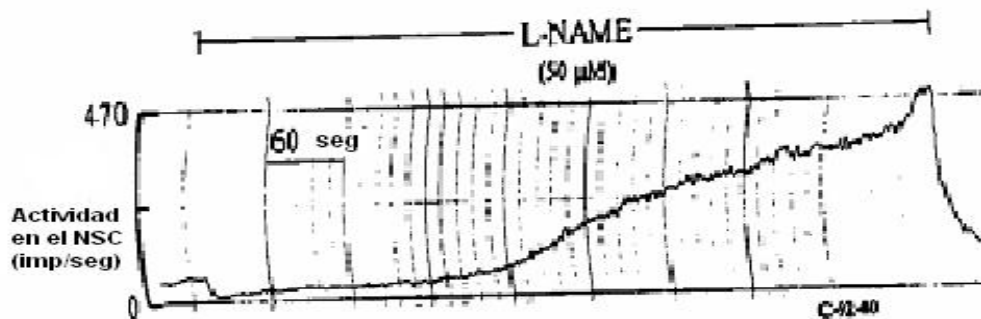


Fig. 5. Efecto excitador del L-NAME (50 μ M) sobre la actividad quimiosensora del cuerpo carotídeo. Se observa un incremento en la actividad del nervio durante la infusión del inhibidor de la NOS. (Modificado de Katayama y col., 1994).

- Los experimentos anteriores sugieren que la actividad quimiorreceptora basal se modula tanto por la inervación de la vasculatura del propio órgano como por la inervación de las células tipo I del CC. En el CC perfundido, tanto la administración de L-Arg, como de NO, o donadores de NO como la NG y el NPS, reducen la amplitud de las respuestas quimiosensoras a la hipoxia (Wang y col., 1995). Por el contrario, un inhibidor de la NOS, como es el L-NAME, aumenta la descarga quimiosensora basal del CC e incrementa la respuesta hipóxica del CC *in situ* (Iturriaga, Alcayaga y Rey, 1998) e *in vitro* (Wang y col., 1994). Los estudios de Iturriaga, Villanueva y Mosqueira (2000) demuestran que los donadores del NO como el 6-(2-hidroxi-1-metil-nitrosodiazirino)-N-metil-1-hexanamina (NOC-9) y S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) aumentan las descargas basales del CC, y reducen la excitación producida por el NaCN. En preparaciones perfundidas de CC, los donadores del NO aumentan la frecuencia basal de la descarga quimiosensora (Chugh y col., 1994; Wang y col., 1995) (**Figura 6**). El NO puede inhibir el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la mitocondria

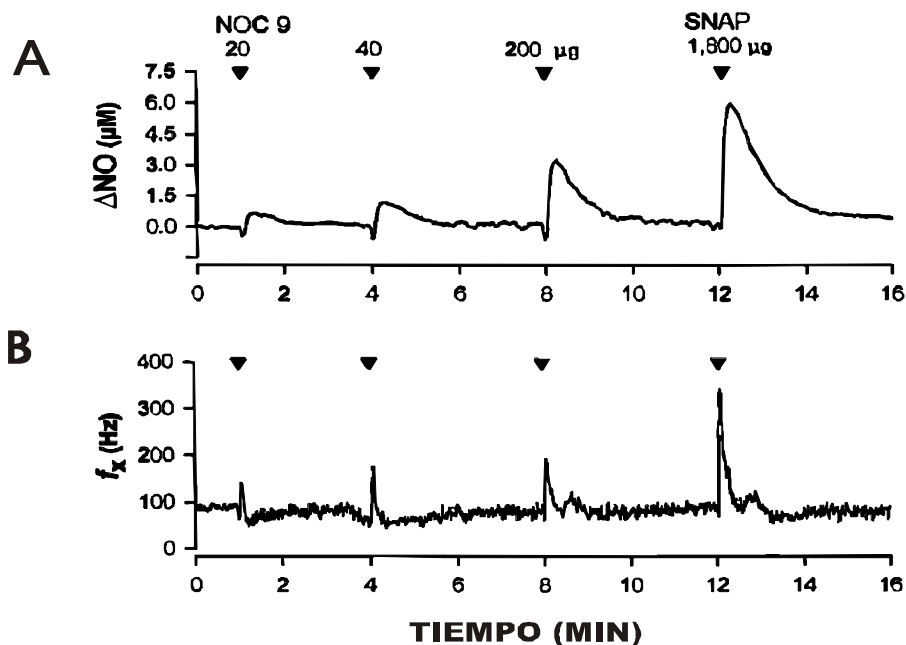


Fig. 6. Efectos excitatorios de 3 inyecciones (dosis crecientes) de donadores de NO (NOC- 9 y SNAP) durante la normoxia. A) niveles de NO; B) frecuencia de descarga en el nervio del seno carotídeo. (Modificado de Iturriaga y col., 2000).

- (Cassina y Radi, 1996; Brown, 1999), condiciones que llevan a un aumento en la descarga quimiosensora (Mulligan, Lahiri, y Storey, 1981; Buerk, Iturriaga, y Lahiri, 1994).

El óxido nítrico y la homeostasis de la glucosa

Estudios inmunocitoquímicos demuestran la presencia de la NOS en el músculo esquelético y la liberación de NO antes de la contracción muscular, inducida por la estimulación eléctrica, con la captación de glucosa posterior a la contracción (Kobzik, Reid, Bredt, y Stamler, 1994; Kobzik, Stringer, Balligand, Reid y Stamler, 1995). Con estos antecedentes se propone que el NO es el mediador del transporte de glucosa, en el músculo esquelético estimulado por el ejercicio, por medio de un mecanismo independiente de la insulina, (Roberts y col., 1997). La administración exógena del NO a partir de un donador, estimula el transporte de glucosa en el músculo esquelético aislado, aumentando los transportadores de glucosa GLUT4 y GLUT8 en la superficie celular (Etgen y col., 1997; Young, Radda y Leighton, 1997). En estas condiciones, la inhibición de la NOS bloquea el transporte de glucosa durante el ejercicio/contracción. Más aun, la incubación del músculo esquelético con un inhibidor de la NOS disminuye el transporte de la glucosa, efecto que se revierte con la insulina o el ejercicio. Sin embargo, el papel potencial del NO para modular el transporte de glucosa en SNC se desconoce (Balon y Nadler, 1994).

Si se asume que el NO participa en el transporte de glucosa en el músculo esquelético (Balon y Nadler, 1997; Etgen, Fryburg y Gibbs 1997; Roberts, Barnard, Scheck y Balon, 1997), se podría pensar que este neuromodulador también interviene en la homeostasis de la glucosa a nivel del SNC y en particular del NTS. La presencia del NO en el NTS y en distintas áreas del SNC apoyaría esta idea, pero no se ha descrito su participación sobre estos efectos después de la estimulación anóxica del CC (Bolanos y Almeida, 1999). Distintos autores postulan que en el SNC el NO juega un papel importante como modulador del metabolismo energético controlando la secreción y acción de la insulina por vías nitrinérgicas dependientes de la NOS (Shankar, Zhu, Ladd, Henry, Shen y Baron, 1998).

- Se ha mostrado que la infusión intracerebroventricular (ICV) de un inhibidor de la NOS (L-NAME) eleva significativamente los niveles de glucosa en el plasma en comparación con los grupos controles (Shankar y col., 1998) (Figura 7).

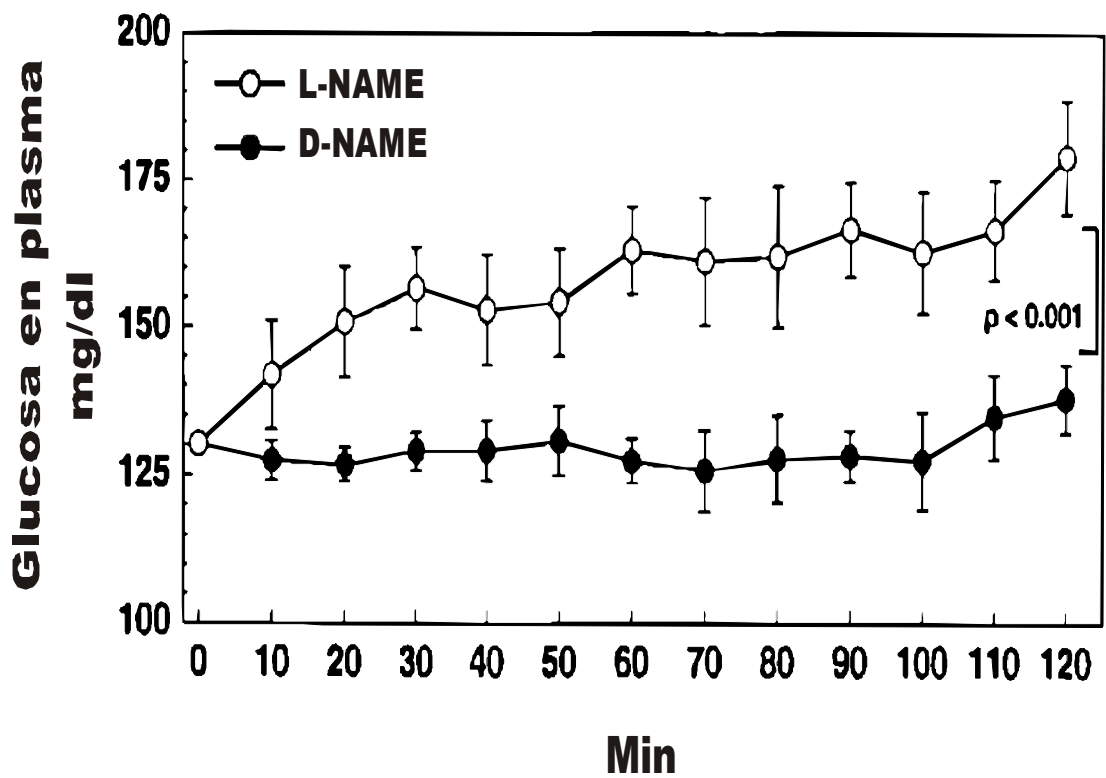


Fig. 7. Hiperglucemia después de la inyección ICV de L-NAME (círculos blancos). Como control se inyectó D-NAME (isómero inerte) (círculos negros). (Modificado de Shankar y col., 1998).

- En cultivos de tejido nervioso, los astrocitos activados por lipopolisacáridos incrementan el consumo de glucosa de manera NO-dependiente. Esta sobrerregulación del consumo de glucosa podría estar relacionada con la protección celular en contra del efecto tóxico del NO, y estaría ligada tanto a la vía glucolítica como a la de los pentosafosfatos. La producción de lactato, en la vía glucolítica, desaparece por un pretratamiento con L-NAME al inhibir la producción del NO (Almeida, Ciudad, Delgado-Esteban, Fernández, García-Nogales y Bolanos, 2005); sin embargo, la glucogenolisis no participa en el suministro de glucosa para ser utilizada en los efectos antes citados (Almeida, Ciudad y Bolanos, 2002). Es probable que el NO induzca la expresión del transportador GLUT1 en los astrocitos, y aumente el número de GLUT1, GLUT 3 y GLUT4 (Duelli, Maurer, Staudt, Heiland, Duembgen y Kuschinsky, 2000; Ciudad, García-Nogales y Almeida, 2001; Higaki, Hirshman, Fujii y Goodyear, 2001; Ciudad, Almeida y Bolanos, 2004) en las neuronas. Es importante señalar aquí que algunos autores no encuentran un paralelismo entre el metabolismo energético del cerebro de la rata y los niveles de NO (Takahashi, Cook, Jehle, Kennedy y Sokoloff, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes demuestran que los modelos convencionales para el manejo de la glucosa por el cerebro no explican su retención y transporte (Bingham, Hopkins, Smith, Pernet, Hallett, Reed, Marsden y Amiel, 2002). Utilizando técnicas de microdiálisis, que permiten medir la concentración de glucosa en el espacio extracelular del cerebro, algunos autores consideran que los astrocitos (glías) podrían ser el lugar inicial de la captación de glucosa del plasma, antes de pasar a las neuronas, lo que representaría un almacén de glucógeno para el SNC (Forsyth, 1996).

La glucosa y el O₂ son las fuentes imprescindibles de energía para el SNC. El descenso en los niveles de glucosa plasmática desencadena una respuesta neuroendocrina compleja que previene o corrige la hipoglucemia para preservar la función cerebral (Martin, Lloyd, y Cowan, 1994). Como la retención de glucosa por el cerebro es independiente de las acciones descritas para la insulina (Baskin, Figlewicz,

- Woods, Porte y Dorsa, 1987; Duelli y cols., 2000), es importante conocer donde y cómo se detectan los niveles de glucosa a nivel central.

Los estudios de Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla (1988) proponen un nuevo papel de los RSCC como detectores multimodales de glucosa y pO_2 , que participan, por tanto en la homeostasis cerebral. Los quimiorreceptores, tónicamente activos bajo condiciones normales de glucosa, aumentan su actividad después de un estímulo hipóxico en el seno carotídeo, observándose una respuesta hiperglucemiante y un incremento del consumo de glucosa por el cerebro en las especies estudiadas (ratas y perros). En contraste, en los animales con cuerpos carotídeos denervados, la anoxia no produce cambios significativos en la captación de la glucosa cerebral (Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1988; Montero, 1993). La estimulación de los RSCC con NaCN produce un aumento inmediato del aporte de glucosa por el hígado, efecto que desaparece después de la hipofisectomía o de la neurohipofisectomía en las ratas (Álvarez-Buylla y col., 1997). Resultados posteriores indican que la estimulación RSCC induce la secreción de un péptido en el líquido cefalorraquídeo importante para la regulación de la glucosa cerebral (Álvarez-Buylla y col., 2003). En este estudio se analizará la participación del NO como un posible mediador-efector en el reflejo hiperglucémico con aumento en la retención de glucosa por el cerebro después de la estimulación anóxica de los RSCC.

Los estudios de Tong y col. (1997); Li, Hu, Selvakumar, Russell III, Cushman, Holman y Young, 2004, plantean que el NO participa en la homeostasis de la glucosa *in vitro*; los inhibidores de la NOS inducen una marcada resistencia a la insulina disminuyendo la captación de glucosa, pero no se han estudiado sus efectos *in vivo*. En el músculo esquelético el NO tiene un efecto similar al de la insulina estimulando el transporte de glucosa y su oxidación ulterior (Kahn, Acharya, Bhattachary, Acharya, Mazumder, Bauman y Sinha, 2000; Kumura, Kosaka, Siga, Yoshimine, Hayakawa, (1994). Hay evidencias que indican que el NO en el SNC estimula a las neuronas vasopresinérgicas (Rivier, 2003); en efecto, la aplicación de NPS en el área ventral del tercer ventrículo, eleva los niveles de AVP plasmáticos por la excitación de mecanismos

- neurales involucrados en la liberación de neurosecreciones y elevando la glucogenolisis hepática (Yamaguchi y Hama, 2003).

La NG reduce la respuesta quimiosensora durante la hipoxia (Wang y col., 1994), y el NO aumenta la retención de glucosa encefálica (Cadenas, Montero, Álvarez- Buylla y Álvarez- Buylla, 2006; Montero, Cadenas, Lemus, Álvarez- Buylla y Álvarez- Buylla 2006).

El efecto observado con la NG se revierte cuando la estimulación quimiorreceptora se acompaña de un inhibidor de la NOS. Se sugiere, entonces, que la inhibición de la NOS con L-NAME aumenta el metabolismo de la glucosa, con la consiguiente utilización de glucosa en estados de hipovolemia (Kadekaro, Terrell, Liu, Gestl, Bui y Summy-Long, 1998). El NO es capaz de estimular el transporte de glucosa a través de la expresión y traslocación de GLUT1, GLUT3 y GLUT4 por mecanismos independientes de las vías insulínicas (Higaki y col., 2001; Almeida y col., 2002; Tanaka, Nakatani, Morioka, Urakawa, Maruyama, Kitagawa, Katsuki, Araki.Sasaki, Hori, Gabazza, Yano, Wada, Nobori, Sumida, Adachi, 2003), y en estados de glucopenia por isquemia cerebral, el NO tiene un efecto neuroprotector (Cidad y col., 2001; Lin y col., 2004).

El poder identificar la presencia del NO en las vías involucradas en el reflejo hiperglucémico con retención de glucosa por el cerebro, contribuirá a incrementar nuestro conocimiento de cómo el SNC regula sus almacenes energéticos, y podrá tener importantes aplicaciones en el tratamiento de algunas enfermedades que ocurren con alteración en la homeostasis de la glucosa y en algunos trastornos cardiovasculares. También nos ayudará a esclarecer problemas de hipoxia cerebral. El NO es una sustancia biológica regulatoria que se comporta como un mensajero intracelular y actúa como un mediador específico de varios trastornos neurológicos secundarios a la isquemia/hipoxia (Rodrigo, Fernández, Alonso, Serrano, Fernández-Vizarra, Martínez-Murillo, Bentura y Martínez, 2005).

• **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El óxido nítrico (NO) participa como mediador efector en la respuesta hiperglucemiante con retención de glucosa por el cerebro, después de la estimulación de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo con cianuro de sodio en ratas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en ratas, la participación del NO en las vías involucradas en el reflejo hiperglucémico con retención de glucosa por el cerebro en respuesta a la estimulación de los RSCC con NaCN, analizando los efectos del nitroprusiato de sodio (NPS) (donador de NO), y del N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (inhibidor de la enzima NO sintetasa).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar la participación del NO sobre las glucemias arterial y venosa, así como en la retención de glucosa por el cerebro después de la estimulación de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo con NaCN.

2) Evaluar la participación del NO sobre las glucemias arterial y venosa, así como la retención de glucosa por el cerebro después de la administración de un donador de NO (nitroprusiato de sodio), sin y con la estimulación de los RSCC con NaCN.

3) Evaluar el efecto de un inhibidor del NO (L-NAME), sobre las glucemias arterial y venosa, así como la retención de glucosa por el cerebro, sin y con estimulación de los RSCC con NaCN.

-

METODOLOGÍA

Animales y técnicas quirúrgicas.

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho, de 250 a 300 g de peso corporal, en ayuno previo de 12 horas. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (3 mg/100 g, Anestesal, Pfizer en sol, sal.), por vía intraperitoneal (i.p.). El nivel de anestesia se mantuvo constante durante todo el experimento, por goteo i.p. continuo del anestésico diluido en sol.sal. (0.063 mg/min). La profundidad de la anestesia se controló periódicamente examinando los reflejos de parpadeo y flexor plantar ante un estímulo doloroso. Las ratas se mantuvieron con respiración artificial utilizando un respirador Palmer conectado a una cánula endotraqueal (intubación por vía bucal), con frecuencia de 40 respiraciones/min y presión positiva hasta evitar los movimientos respiratorios espontáneos de la rata. La temperatura corporal se controló a 37 °C por medio de una lámpara.

La rata se colocó sobre la mesa de operaciones (Álvarez-Buylla, Quintanar-Stephano, Quintanar-Stephano y Álvarez-Buylla, 1991) en decúbito dorsal. Se realizó incisión por la línea media en la cara ventral del cuello, desde 2 mm de la base del maxilar hasta el extremo cefálico del esternón. Se disecó la vena yugular externa derecha en un tramo de 1 cm, y con ayuda de ganchillos de vidrio, se cateterizó con un tubo de silastic (Dow Corning 602-155) hasta el seno venoso yugular (Álvarez-Buylla y Bencosme, 1981). Para cateterizar la arteria femoral, se incidió la región inguinal en sentido transversal al pliegue, hasta el tercio superior, en la cara interna y media del muslo derecho hasta visualizar el paquete vásculo-nervioso; la arteria femoral se disecó y canuló hasta la aorta abdominal con un tubo de polietileno (PE-10 Clay Adams) (Álvarez-Buylla y Bencosme, 1981). Las cateterizaciones de los vasos se realizaron con cánulas previamente heparinizadas sin interrumpir su circulación normal (Álvarez-Buylla y Bencosme, 1981). Al final de cada experimento se verificó la posición correcta de los catéteres.

- En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se demostró que tanto la anestesia como la respiración artificial y los procedimientos quirúrgicos generales, no motivan cambios significativos en los niveles de PO_2 , PCO_2 y pH en la sangre arterial (Montero, 1998; Montero, Mendoza, Valles, Lemus, Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 2006).

Estimulación de los RSCC y obtención de sangre.

Para estimular los RSCC con NaCN, el seno carotídeo izquierdo se aisló temporalmente de la circulación cefálica y general, utilizando la técnica de Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla (1988) (**Figura 8**). Esta técnica consiste en lo siguiente: disección roma en la parte ventral del cuello con separación de los músculos esternohioideo, homohioideo y esternomastoideo hasta llegar a la carótida primitiva derecha, la cual se disecó en un tramo de 2-3 cm partiendo de la bifurcación carotídea en dirección caudal; disección de las arterias carótida externa, interna y lingual izquierdas sin interrumpir la circulación en dichos vasos. La arteria carótida externa izquierda se cateterizó a través de la arteria lingual con un catéter de polietileno (Clay Adams PE-50) por donde se succionó la sangre que baña al SC durante el tiempo de la inyección del NaCN. Tanto la carótida externa (por encima de la arteria lingual) como la carótida interna izquierda (cerca del foramen yugular) se ocluyeron temporalmente (20 seg) durante las inyecciones de NaCN para evitar su paso a la circulación cefálica y/o circulación general. Este tiempo de oclusión no produce isquemia cerebral, (Wu, Fujihara, Yao, Qi, Li, Shimoji y Baba, 2003). Las arterias faríngea y occipital izquierdas se ligaron permanentemente. La arteria carótida primitiva izquierda se cateterizó con un tubo de polietileno (Clay Adams PE-10). La estimulación de los RSCC se realizó por inyección lenta de 5 μ g/100 g de NaCN en 0.1 mL de sol.sal. a través de una aguja del No 27 para evitar la estimulación barorreceptora (Álvarez-Buylla, 1954).

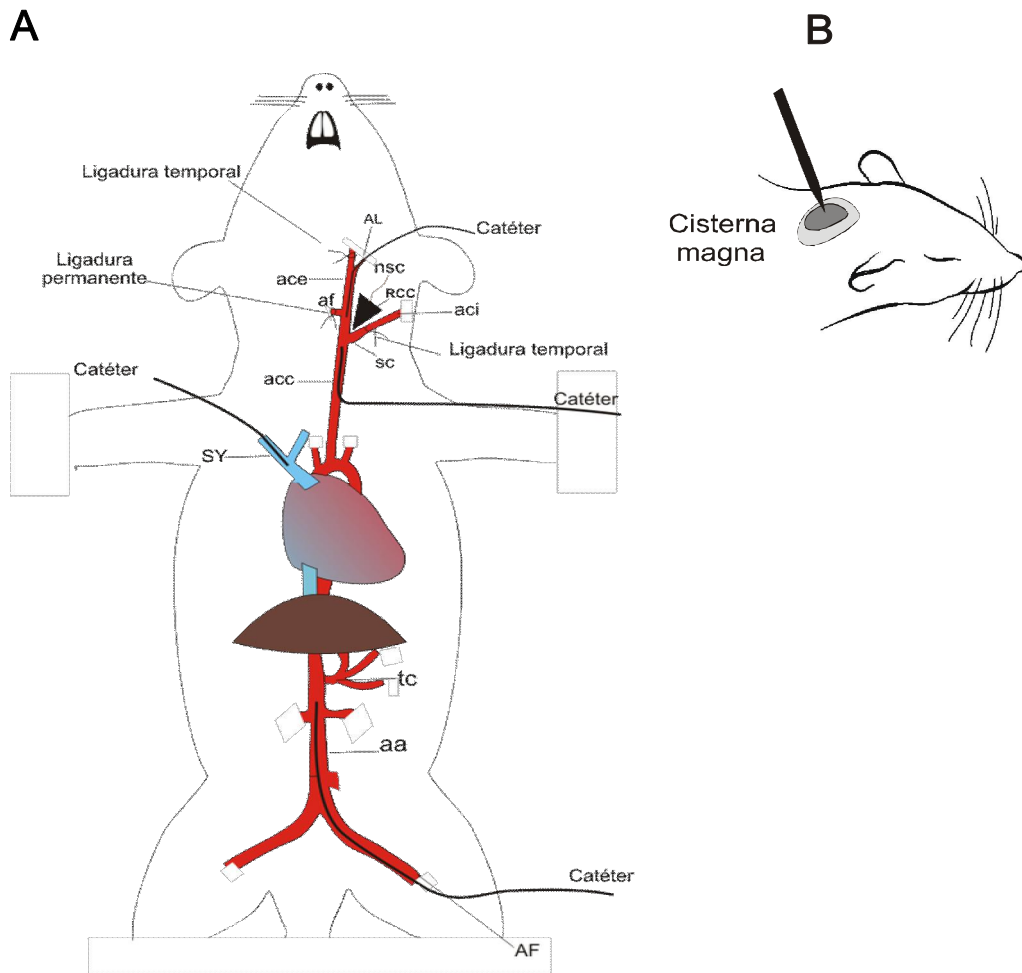


Fig. 8. A) esquema que muestra el procedimiento quirúrgico para aislar circulatoriamente el seno carotídeo izquierdo y la canulación de los vasos para la obtención de sangre. **B)** procedimiento quirúrgico para la infusión de los fármacos en la cisterna magna. aa, aorta abdominal; acc, arteria carótida común; ace, arteria carótida externa; aci, arteria carótida interna; af, arteria femoral; al, arteria lingual; nsc, nervio del seno carotídeo; RCC, receptores del cuerpo carotídeo; sc, seno carotídeo; sy, seno yugular; tc, tronco celiaco.

(Modificado de Montero y col., 2000)

-

En todas las ratas se midieron en cada tiempo, las concentraciones de glucosa arterial y venosa, y los niveles de nitritos en la sangre y en el tejido (4 muestras). Las muestras se colectaron de animales individuales, es decir, sacrificando la rata después de la obtención de cada grupo de muestras ($t = 0$, $t = 8$ min y $t = 16$ min), considerando $t = 0$ el momento del inicio de la inyección de los fármacos.

En el caso de las determinaciones de las concentraciones de glucosa en el plasma, se tomaron 0.1 mL de sangre arterial y 0.1 mL de sangre yugular de los catéteres citados. Para la determinación de nitritos en el plasma se tomó 1 mL de la sangre yugular succionando lentamente para evitar hemólisis, y poder separar el plasma libre de hemoglobina, ya que los nitritos del plasma difunden rápidamente hacia los eritrocitos, alterando su cuantificación (Kelm, Preik-Steinhoff, Preik y Trauer, 1999).

Infusión de los fármacos en la cisterna magna (CM)

Las cisternas en el SNC son cavidades subaracnoideas formadas por la separación entre las membranas piamadre y las aracnoides; la más importante es la CM que está situada entre la parte antero-inferior del cerebelo y la superficie dorsal del bulbo. En la CM se encuentra la comunicación del LCR con el cuarto ventrículo por el agujero de Magendie, y desde el cuarto ventrículo a todas las cavidades intracerebrales. Las inyecciones de los fármacos estudiados se realizaron en la CM con la técnica descrita por Hudson, Hughes, Bold-Fletcher y Vaden (1994), que se describe a continuación. La rata se anestesió e intubó siguiendo las técnicas descritas en la primera parte de la metodología; se colocó en una plataforma que permitió flexionar su cabeza entre 80° y 90° . Se realizó una incisión en la línea media de la piel, desde el nivel caudal de las órbitas hasta el nivel de las escápulas, separando los músculos trapecio, romboides y caudal auricular en la parte dorsal media del cuello. Se liberó la inserción del músculo trapecio en su parte profunda con el hueso occipital para exponer el área atlanto-occipital, atravesando la membrana atlanto-occipital con una aguja "de mariposa" calibre 23, guiada por un micromanipulador hasta llegar a la CM. Las inyecciones de las sustancias empleadas, L-NAME y NPS diluidos en LCRa, se hicieron por medio de una bomba de infusión continua (Baby Bee, BAS), a una velocidad de $5 \mu\text{L}/30$ seg (**Figuras 9A y B**).

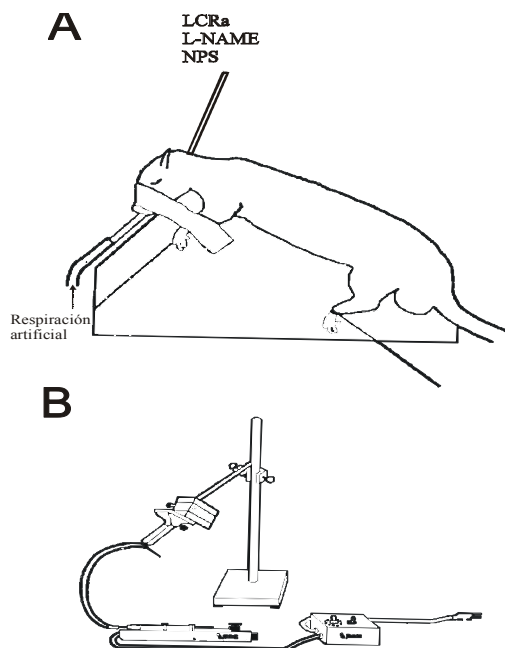


Fig. 9. Esquemas del dispositivo utilizado para realizar las inyecciones intracisternales. **A)** plataforma de soporte. La flexión de la cabeza es crítica para ampliar el ángulo de la articulación atlanto-occipital. **B)** micromanipulador y bomba de inyección para la introducción de la aguja e infusión de fármacos en la CM. LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; L-NAME, L- nitro arginina metil éster; NPS, nitroprusiato de sodio. (Modificado de Hudson y col., 1994).

Técnicas analíticas.

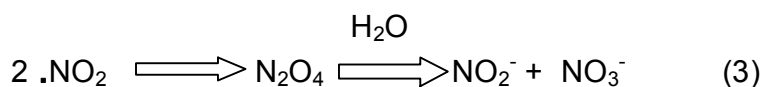
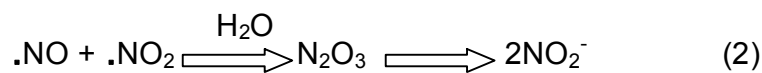
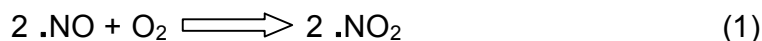
- **Determinación de glucosa.**

La concentración de glucosa en el plasma se midió por el método de la glucosa-oxidasa en mg/dL (Autoanalizador Beckman), en muestras de 10 μ L de plasma. Se determinó la concentración de glucosa a partir de la depleción de O_2 en una solución de glucosa-oxidasa saturada con O_2 . El consumo de O_2 es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Kadish, Little y Sternberg, 1968). El nivel de la retención de glucosa por el cerebro se determinó por las diferencias arterio-venosas de glucosa, comparando la concentración de glucosa en la arteria femoral con la concentración de glucosa venosa en el seno venoso yugular.

- **Determinación de nitritos.**

- **Método de Griess.**

Uno de los medios para investigar la formación de NO en muestras biológicas es la determinación de nitritos (NO_2^-). En condiciones fisiológicas *in vitro e in vivo*, cuando el radical superóxido (O_2^-) no existe o está en concentraciones bajas, el NO reacciona con el O_2 para formar nitritos (NO_2^-). Estos catabolitos (nitritos) de la degradación del NO, no sufren modificaciones posteriores, es decir, son estables y su determinación por espectrofotometría es un índice confiable de la producción de NO en una gran variedad de líquidos y tejidos biológicos (plasma, suero, orina, sistema nervioso, etc.) (Green, Wagner, Glogowski, Skipper, Wishnok y Tannenbaum, 1982; Granger, Traintor, Boockvar y Hibbs, 1995). En el humano y otros mamíferos, como la rata, los nitritos circulantes representan fielmente los valores del NO endotelial (Kelm, 1999; Heinzen y Pollack, 2002). El principio de este método se muestra en las siguientes ecuaciones (Hevel y Marletta, 1994).



La técnica de Griess se basa en la reacción de diazotización entre el reactivo de Griess [sulfanilamida y dicloruro de N-1- nafiletilediamina (NED) en condiciones ácidas (ácido fosfórico)] y los nitritos previamente reducidos por una nitrato reductasa (obtenida en la bacteria *Pseudomonas oleovorans*) (Rodríguez-Reynoso y col., 2001). En esta reacción se obtiene un compuesto de color magenta, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de nitritos. La sensibilidad del método varía y su límite de detección es de 2.5 μM (125 pM) de nitrito (en agua desionizada ultrapura). La sulfanilamida y el NED compiten por los nitritos en la reacción de Griess, de tal forma que la mayor sensibilidad se obtiene cuando estos dos reactivos se añaden de manera secuencial (Fiddler, 1977).

- En el caso de la determinación de nitritos, la sangre se centrifugó durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada a 3000 rpm (Beckman T-J 6). Con objeto de desnaturalizar las proteínas del plasma, a 400 μL de plasma se agregaron 400 μL de ácido perclórico al 20% frío. Se agitó en vórtex durante 30 seg y se centrifugó a 3000 rpm en centrífuga refrigerada durante 10 min. El sobrenadante se neutralizó con K_2CO_3 (3 M) y 5 μL de naranja de metilo al 0.05% como indicador; simultáneamente, se agitó suavemente en el vórtex hasta el cambio de color a amarillo claro (pH 7.4). La muestra así preparada se conservó en el ultracongelador a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

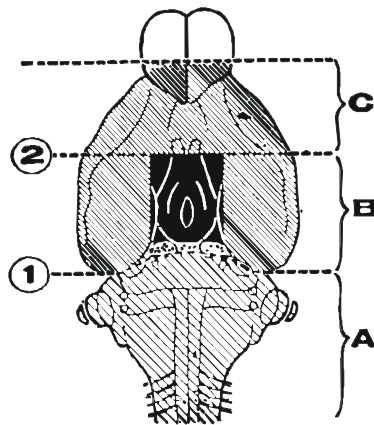


Fig. 10. Diagrama que representa la disección del fragmento que contiene la región hipotálamo-hipófisis (entre las líneas 1 y 2), utilizada para la determinación de nitritos en el tejido cerebral (Modificado de Glowinski e Iversen, 1966).

Para realizar las determinaciones de nitritos en el tejido, se extrajo el cerebro completo en el menor tiempo posible, se montó en una matriz especial para rata donde se realizaron dos cortes coronales con objeto de obtener un bloque (similar en todos los experimentos) que incluyera la región hipotálamo-hipófisis (**Figura 10**). Este fragmento de tejido nervioso se lavó con PBS o sol.sal. 0.9% para eliminar los restos de sangre y se secó el exceso de líquido con gasa estéril. A 200 mg del tejido así preparado, se le agregó 1 mL de PBS para proceder a su homogenización (Glas-Col).

- La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm (Sorvall Instr. RC5C) durante 15 minutos, el sobrenadante se neutralizó con K_2CO_3 (3 M) y 5 μ L de naranja de metilo al 0.05% como indicador; agitando suavemente en el vórtex hasta el cambio de color a amarillo claro (pH 7.4). Se congeló a $-70^\circ C$ hasta su análisis para cuantificar nitritos por el método de Griess.

La técnica de Griess, propiamente dicha, se corrió en las muestras experimentales, en forma simultánea con una curva estándar. Para preparar la curva estándar se diluyó el $NaNO_2$ (100 μ M) con agua bidestilada hasta completar 280 μ l (volumen de la muestra experimental) y el reactivo de Griess (280 μ L); de tal manera que todas las muestras experimentales pudieran ser leídas en el rango de la curva. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 550 nm.

Las muestras experimentales se manejaron de acuerdo a lo descrito en la Tabla No. 1. Para la determinación de nitritos en cada muestra se realizó primero la reducción de nitratos, incubando la muestra con nitrato reductasa en presencia de una solución b-NADPH 25 μ M, EDTA 10 mM durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando NH_4Cl 30% y NaOH 5% (p/v) con objeto de precipitar la enzima.

El reactivo de Griess se preparó mezclando las siguientes soluciones:

Solución **A**; dicloruro de N-1- nafiletilediamina 0.1% (NED), disuelto en agua bidestilada.

Solución **B**; sulfanilamida al 1% disuelto en ácido fosfórico (H_3PO_4) 5 % en agua bidestilada.

La mezcla permanece estable durante 12 horas a $4^\circ C$.

Una vez obtenida la curva de referencia con los estándares de nitritos, se graficó el valor promedio de la absorbancia de cada concentración del estándar contra la concentración de nitrito problema. La absorbancia de las muestras se leyó sobre la curva estándar para dar la concentración de nitritos.

Tabla 1. Protocolo para la determinación de nitritos por la técnica de Griess.

	BR	S1	S2	S3.7	P1	Pn
1) Muestra o estándar	-				200µl	
1') Agua	280µl				√	
2) Nitrato Reductasa (5µl = 50mU) en PBS	-				20µl	
3) NADPH 25µM, EDTA 10mM	-				20µl	
4) Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.	-				√	
5) Glutámico Deshidrogenasa (5µl =100 mU)	-				20µl	
6) NH ₄ CL 100mM	-				20µl	
7) α-cetoglutarico 4mM	-				20µl	
8) Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.	-				√	
9) Ácido 5-sulfosalicílico al 6%	-				60µl	
10) Agitar cada 5 min. durante 30 min.	-				√	
11) Centrifugar a 10,000 rpm/15 min.	-				√	
12) Alícuota de sobrenadante	-				200µl	
13) NH ₄ Cl al 30%	-				50µl	
14) NaOH al 5%	-				30	
15) Reactivo de Griess	280µl				280µl	
16) Incubar a temperatura ambiente durante 20 min protegido de luz.	√				√	
17) Desarrollo del color magenta.						
18) Leer D.O. a 550 nm en 40 min (Spectronic 21 D, con filtro 520-550 mm)	√				√	

BR, agua con reactivo de Griess; S, muestras estándar de la 1 a la 7; Pn, número de muestras experimentales; D.O., densidad óptica en el espectrofotómetro.

Sustancias utilizadas.

- **Pentobarbital sódico** (Anestosal, Pfizer), 3 mg/100 g.
- **Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa)** (NaCl 145 mM, KCL 2.7 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM, ascorbato 2mM, NaH₂PO₄ 2mM, pH 7.3-7.4 (J.T. Baker y Hycel). El LCRa se preparó cada 48 horas y se conservó en refrigeración.
- **Solución salina al 0.9 % (sol.sal.)** (Pisa), 0.1 mL..

- **Cianuro de sodio** (NaCN, Sigma), 5 µg/100 g en 0.1 mL de sol.sal. (Álvarez-Buylla y col., 1988).
- **N-nitro-L-arginina metil éster** (L-NAME, Sigma), 250 µg en 5µL de LCRa (Kadekaro y col., 1998; Sugimoto, Yamada, Yoshikawa y Horisaka, 1997).
- **Nitroprusiato de Sodio** (NPS, Sigma) 300 µg en 5 µL de LCRa (Iturriaga y col., 2000).

Las dosis utilizadas produjeron efectos óptimos en estudios previos por los autores señalados.

Reactivos de la técnica de Griess

- **Nitrito de Sodio** (NaNO₂, Sigma)
- **Cloruro de Amonio** (NH₄Cl, Sigma)
- **Hidróxido de Sodio** (NaOH.,Sigma)
- **α-Cetoglutarato** (Sigma)
- **Ácido 5- sulfosalicílico** (Sigma)
- **Nitrato reductasa** (Sigma)
- **Glutámico deshidrogenasa** (Sigma)
- **Ácido fosfórico** (H₃PO₄ Sigma)
- **Dicloruro de N-1- Nafiletilediamina** (NED, Sigma),
- **Ácido perclórico** (HClO₄, Sigma)

Protocolo experimental

Se realizaron los siguientes experimentos:

- a) Control 1; determinación de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno venoso yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en las sangres venosa y arterial en ratas normales, bajo las condiciones experimentales de anestesia, respiración artificial, temperatura y cateterización inicial a t = 0 min, t =8 min (n = 3) y t =16 min (n = 3).

- **b)** Control 2; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión continua de LCRa (5 μ L/30 seg) en la CM, simultáneamente con la inyección de sol.sal. (0.1 mL) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 min (n = 3) y t = 16 min (n = 3).

- **c)** Control 3; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión continua de LCRa (5 μ L/30 seg) en la CM con estimulación simultánea de los RSCC con NaCN (5 μ /100g en 0.1 mL sol.sal.) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 (n = 3) y t = 16 min (n = 3).

- **d)** Experimental 1; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión continua de NPS (300 μ g en 5 μ L de LCRa/30 seg) en la CM, simultáneamente con la inyección de sol.sal. (0.1 mL) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 min (n = 3) y t = 16 min (n = 3).

- **e)** Experimental 2; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión continua de NPS (300 μ g en 5 μ L de LCRa/30 seg) en la CM, simultáneamente con la estimulación de los RSCC con NaCN (5 μ /100g en 0.1 mL sol.sal.) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 min (n = 3) y t = 16 min (n = 3).

- - f) Experimental 3; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión L-NAME (250 µg en 5µL de LCRa/30 seg) en la CM, simultáneamente con la inyección de sol.sal. (0.1 mL) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 min (n = 3) y t = 16 min (n = 3).
 - g) Experimental 4; determinación de la concentración de nitritos en el plasma de la sangre venosa del seno yugular y del tejido nervioso (hipotálamo-hipófisis), y determinación de los niveles de glucosa en la sangre venosa y arterial en ratas normales después de la infusión L-NAME (250 µg en 5µL de LCRa/30 seg) en la CM, simultáneamente con la estimulación de los RSCC con NaCN (5 µg/100 g en 0.1 mL de sol.sal.) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado a (t = 0) (n = 3), t = 8 min (n = 3) y t = 16 min (n = 3).

Análisis estadístico.

Las comparaciones estadísticas de los promedios entre los datos experimentales y los basales se realizaron utilizando la prueba de *t* de Student en muestras no pareadas, modificada por Cochran y Cox (1962). La comparación entre grupos se realizó con análisis de varianza, ANOVA. El nivel de la significancia se fijó a $*p < 0.05$ en ambas pruebas como se indica en cada figura de resultados. Para facilitar la comparación directa entre los grupos experimentales 2 y 4, los datos se expresaron en porcentaje de su propia basal. . En el resto de los experimentos, los valores de las gráficas se expresaron como valores absolutos de las medias aritméticas; las líneas verticales representan los valores del error estándar.

RESULTADOS

Experimentos control:

- 1) Condiciones experimentales.
- 2) Infusión de LCRa en la CM con sol.sal. en el seno carotídeo.
- 3) Infusión de LCRa en la CM con estimulación de los RSCC.

En el grupo control 1, con ratas sometidas únicamente a las condiciones experimentales de anestesia, temperatura, respiración artificial, y cateterizaciones iniciales, sin estimular los RSCC ni inyectar en la CM, no se encontraron cambios significativos en las glucemias arteriales y venosas encefálicas, ni en la retención de glucosa cerebral (Figura 11, Tabla 2). Tampoco se produjeron cambios significativos en las concentraciones de nitritos en el plasma ni en el tejido hipotálamo-hipofisiario cuando se compararon el control 1 y el control 3 (Figuras 14, Tablas 3 y 4).

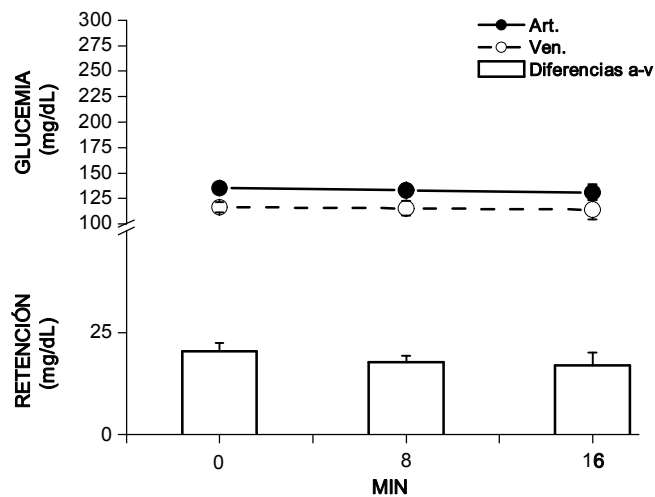


Fig. 11. Control 1. Concentración de glucosa en las sangres arterial (Art) y venosa (Ven) (gráf. superior), y diferencias arterio venosas (a-v) de glucosa cerebral bajo condiciones experimentales (gráf. inferior). Los valores son medias aritméticas \pm E.S., (*t* de Student, $p < 0.05$)

	LCRa + sol.sal. mg/dL (n=6)	LCRa + NaCN mg/dL (n=6)	NPS + sol.sal. mg/dL (n=6)	NPS + NaCN mg/dL (n=6)	L-NAME + sol.sal. mg/dL (n=6)	L-NAME + NaCN mg/dL (n=6)
0	16.6±2.0	19.0±2.2	27.9±3.1	27.1±2.0	23.2±2.0	17.7±2.0
8	14.5±2.4	37.4±3.3*	49.2±5.1*	36.7±2.3	23.4±3.0	43.2±2.0*
16	14.6±3.4	33.5±4.2	46.0±5.4	40.0±4.9	28.0±9.2	46.8±9.2*

TABLA 2.- Retención de glucosa por el cerebro en ratas normales anestesiadas según los protocolos experimentales.

LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; L-NAME, N-nitro-L-arginina metil éster; NaCN, cianuro de sodio; NPS, nitroprusiato de sodio; sol.sal., solución salina. Entre paréntesis, número de animales por experimento. Los valores son medias aritméticas ± error estándar, * $p < 0.05$ (*t* de Student).

TABLA 3.- Concentración de nitritos en el plasma venoso en ratas normales anestesiadas según los protocolos experimentales.

Tiempo min.	LCRa + sol.sal. nmol/mL (n=6)	LCRa + NaCN nmol/mL (n=6)	NPS + sol.sal. nmol/mL (n=6)	NPS + NaCN nmol/mL (n=6)	L-NAME + sol.sal. nmol/mL (n=6)	L-NAME + NaCN nmol/mL (n=6)
0	4.2±0.4	4.2±0.4	4.2±0.4	4.2±0.4	4.2±0.4	4.2±0.4
8	5.2±0.6	6.9±1.8*	4.0±0.6	14.3±1.9*	2.3±0.1*	2.3±0.3*
16	6.1±1.1	3.7±0.8	5.4±0.7	5.3±0.9	2.5±0.6	2.1±0.3*

LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; L-NAME, N-nitro-L-arginina metil éster; NaCN, cianuro de sodio; NPS, nitroprusiato de sodio; sol.sal., solución salina. Entre paréntesis, número de animales por experimento. Los valores son medias aritméticas ± error estándar, * $p < 0.05$ (*t* de Student).

TABLA 4.- Concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario en ratas normales anestesiadas según los protocolos experimentales.

Tiempo min	LCRa + sol.sal. nmol/g (n=6)	LCRa + NaCN nmol/g (n=6)	NPS + sol.sal. nmol/g (n=6)	NPS + NaCN nmol/g (n=6)	L-NAME + sol.sal. nmol/g (n=6)	L-NAME + NaCN nmol/g (n=6)
	0	126.5±3.1	126.5±3.1	126.5±3.1	126.5±3.1	126.5±3.1
8	134.4±9.3	136.4±5.6	88.5±5.8	198.0±22.8*	31.0±3.2*	39.0±3.7*
16	146.8±3.4	141.5±10.1	77.8±9.4	213.3±14.9*	33.7±2.1*	44.4±5.7*

LCRa, líquido cefalorraquídeo artificial; L-NAME, N-nitro-L-arginina metil éster; NaCN, cianuro de sodio; NPS, nitroprusiato de sodio; sol.sal., solución salina. Entre paréntesis, número de animales por experimento. Los valores son medias aritméticas ± error estándar, * $p < 0.05$ (*t* de Student).

En el grupo control 2, cuando se infundió LCRa (5 μ L en 30 seg) en la CM, simultáneamente con la inyección de sol.sal. (0.1 mL) en el SC circulatoriamente aislado, no se encontraron cambios significativos en las concentraciones de glucosa arterial y venosa encefálicas, ni en la retención de glucosa cerebral (diferencias arterio-venosas). La concentración de glucosa en la sangre arterial fue de 133.1 ± 4.5 mg/dL a $t = 0$ min antes de la infusión de LCRa en la CM, y de 133.6 ± 8.3 mg/dL a $t = 16$ min después de la infusión del LCRa en la CM. La concentración de glucosa en la sangre venosa fue de 116.5 ± 5.3 mg/dL a $t = 0$ min y de 119.2 ± 10.8 mg/dL a $t = 16$ min (**Figura 12**). La captación de glucosa por el cerebro fue de 16.6 ± 2.0 mg/dL a $t = 0$ min, y 14.6 ± 3.4 mg/dL a $t = 16$ min (**Figura 12 y Tabla 2**). En estas mismas ratas, la infusión de LCRa en la CM sin estimulación de los RSCC produjo un pequeño aumento (no significativo, $p = 0.19$, *t* de Student) en la concentración de los nitritos en el plasma desde 4.2 ± 0.4 nmol/mL en $t = 0$ min hasta 6.1 ± 1.1 nmol/mL en $t = 16$ min (**Figura 14**). Con relación a la concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario también se observó un aumento pequeño (no significativo, $p = 0.27$, *t* de Student) desde 126.5 ± 3.0 nmol/g en $t = 0$ min hasta 146.8 ± 3.4 nmol/g a $t = 6$ min (**Figura 14**).

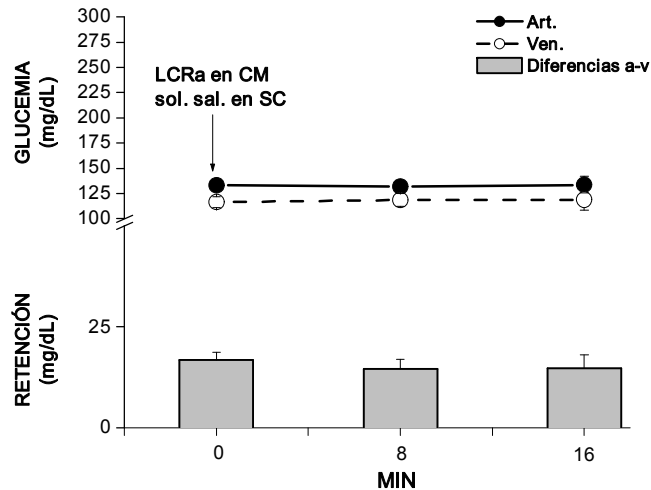


Fig.12. Infusión de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) en la cisterna magna (CM) en forma simultánea con la inyección de solución salina (sol.sal.) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC); gráf.superior, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven); gráf. inferior, diferencias arterio-venosas (a-v) de glucosa cerebral. Los valores son medias aritméticas \pm E.S., ($p < 0.05$, t de Student).

En el grupo control 3, la estimulación de los RSCC con NaCN (5 μ g/100g en 0.1mL de sol.sal.) inyectado en el SC circulatoriamente aislado en ratas normales anestesiadas, produjo incrementos significativos en las glucemias arterial y venosa encefálicas así como en la captación de glucosa por el cerebro ($p = 0.0001$ en $t = 8$ min) (**Figura 13**). El aumento en la concentración de glucosa fue mayor en la sangre arterial que en la venosa (**Figura 13 y Tabla 2**). La concentración de glucosa en la sangre arterial aumentó de 147.0 ± 3.6 mg/dL en $t = 0$ min a 261.7 ± 20.2 mg/dL en $t = 16$ min después de la inyección de NaCN ($p = 0.01$, t de Student), mientras que en la sangre venosa el aumento de la concentración de glucosa fue de 126.0 ± 3.5 mg/dL en $t = 0$ min y de 202.5 ± 6.8 mg/dL en $t = 16$ min después de la inyección de NaCN ($p = 0.006$, t de Student) (**Figura 14**). La retención de glucosa en estas ratas se elevó significativamente desde 19.0 ± 2.2 mg/dL hasta 37.4 ± 3.3 en $t = 8$ min ($p = 0.0009$, t de Student).

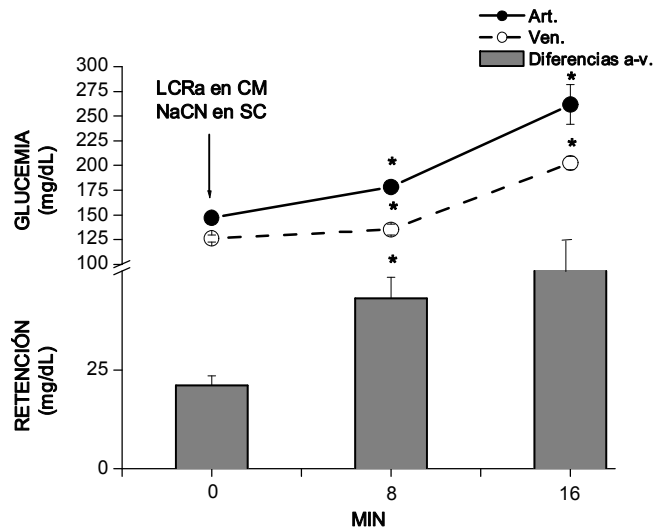
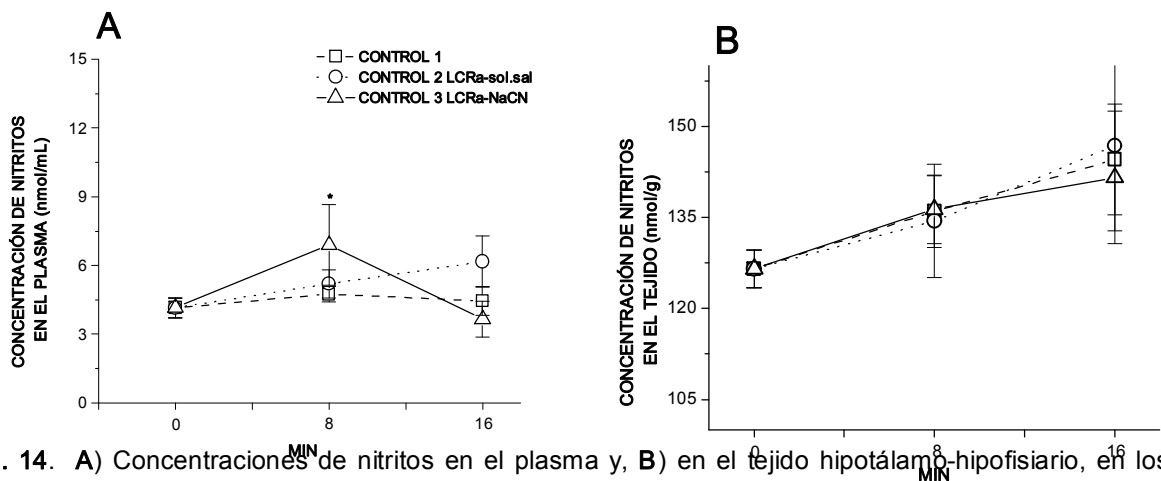


Fig. 13. Infusión de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) en la cisterna magna (CM) en forma simultánea con la inyección de cianuro de sodio (NaCN) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC). A, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven). B, diferencias arterio-venosas (a-v) de glucosa cerebral. Los valores son medias aritméticas \pm E.S., (* $p < 0.05$, *t* de Student).

En estas mismas ratas, la estimulación de los RSCC produjo aumentos significativos de los nitritos en el plasma, obteniéndose los siguientes valores: 4.2 ± 0.4 nmol/mL a $t = 0$ min, 6.9 ± 1.8 nmol/mL a $t = 8$ min $p = 0.003$ y 3.7 ± 0.8 nmol/mL a $t = 16$ min en el plasma venoso; en el tejido hipotálamo-hipofisiario los valores de nitritos fueron: 126.5 ± 3.1 nmol/g a $t = 0$ min, 136.4 ± 5.6 nmol/g a $t = 8$ min y 141.5 ± 10.1 nmol/g a $t = 16$ min (Figura 14).



Estimulación de los RSCC simultáneamente con la inyección de nitroprusiato de sodio (NPS) en la CM.

Cuando se infundió el donador de NO (NPS) (300 μg en 5 μL de LCRa) en la CM solo, es decir, sin estimular los RSCC con NaCN, se observó que el donador por sí solo produjo un aumento significativo en la glucemia arterial a los t = 8 min ($p = 0.00000003$) y a los t = 16 min postinfusión ($p = 0.009$, *t* de Student), mientras que en la glucemia venosa se observó un aumento significativo en t = 8 min ($p = 0.000003$, *t* de Student) y en t = 16 min ($p = 0.0007$, *t* de Student) después de la infusión (**Figura 15**). Del mismo modo, la retención de glucosa cerebral aumentó significativamente desde t = 0 min, 27.9 ± 3.1 mg/dL hasta 49.2 ± 5.1 mg/dL en t = 8 min postinfusión ($p = 0.00001$, *t* de Student) (**Figura 15 y Tabla 2**). En estas mismas ratas, el NPS no modificó la concentración de nitritos en el plasma, sólo se presentó un pequeño aumento (no significativo, $p = 0.36$) desde $4.10.4$ nmol/mL en t = 0 min a $5.4.0.7$ nmol/mL en t = 16 min después del NPS (**Figura 17, Tabla 3**).

- Con relación a la concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario, tampoco se obtuvieron cambios significativos (**Figura 17, Tabla 4**).

La estimulación de los RSCC con NaCN, simultáneamente con la infusión de NPS (300 µg en 5µL de LCRa) en la CM produjo un aumento significativo en las glucemias arterial ($p = 0.0000003$ a $t = 8$ min y de $p = 0.00001$ a $t = 16$ min) y venosa ($p = 0.001$ a $t = 8$ min y de $p = 0.00002$ a $t = 16$ min, t de Student). La concentración de glucosa en la sangre arterial aumentó de 139.0 ± 7.7 mg/dL en $t = 0$ min a 199.5 ± 5.8 mg/dL en $t = 8$ min después de las inyecciones de NaCN en el SC circulatoriamente aislado más la administración del NPS; en la sangre venosa el aumento de la concentración de la glucosa fue de 113.0 ± 9.4 mg/dL en $t = 0$ min a 158.25 ± 1.8 mg/dL en $t = 8$ min después de las inyecciones ($p < 0.05$,) (Figura 15A). Sin embargo, en la retención de la glucosa cerebral se observó un pequeño aumento no significativo ($p = 0.1$ y $p = 0.07$, a $t = 8$ min y $t = 16$ min respectivamente). Los valores en la retención de glucosa por el cerebro se incrementaron desde 26.0 ± 1.7 mg/dL en $t = 0$ min hasta 38.5 ± 8.1 mg/dL en $t = 16$ min (Figura 16 y Tabla 2). Estos resultados indican que el NPS bloquea el efecto de la estimulación de los RSCC sobre la retención de glucosa por el cerebro en ratas. En estos experimentos la estimulación de los RSCC produjo también un aumento significativo, tanto en la concentración de nitritos en el plasma como en el tejido. En el plasma, los nitritos se elevaron desde 4.2 ± 0.4 nmol/mL en $t = 0$ min hasta 14.3 ± 1.9 nmol/mL en $t = 8$ min. Para su comparación, en la Figura 17 presentamos estos resultados con los obtenidos en el grupo control 3, cuando se estimularon los RSCC, sólo en presencia de LCRa en CM ($p = 0.03$ a $t = 8$ min y $p = 0.9$ a $t = 16$ min, ANOVA). Con relación a la concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario los valores obtenidos fueron de 126.5 ± 3.1 nmol/g en $t = 0$ min hasta 198.0 ± 22.8 nmol/g en el $t = 8$ min y 213.3 ± 14.9 nmol/g en el $t = 16$ min, apreciándose cambios significativos con respecto al comportamiento del grupo control 3 ($p = 0.03$ a $t = 8$ min y $p = 0.04$ a $t = 16$ min, ANOVA) (Figura 17).

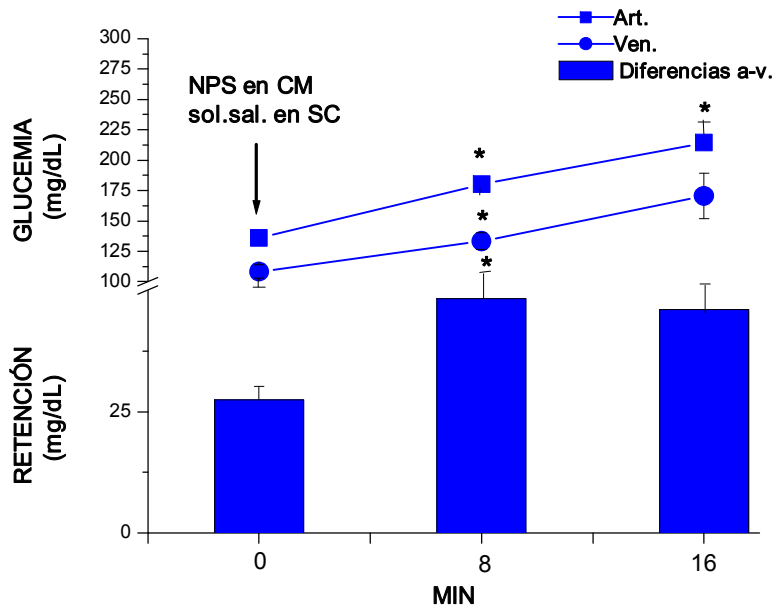


Fig. 15. Nitroprusiato de sodio (NPS) en la cisterna magna (CM) simultáneamente con la inyección de solución salina (sol.sal) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC). Gráf. Superior, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven); gráf. Inferior, diferencias arterio-venosas (a-v) de glucosa cerebral después de la inyección de solución salina (sol.sal) en el SC más NPS en la CM. Los valores son medias aritméticas \pm E.S ($p < 0.05$, *t* de Student).. Los valores reales de p . se encuentran en la parte correspondiente del texto.

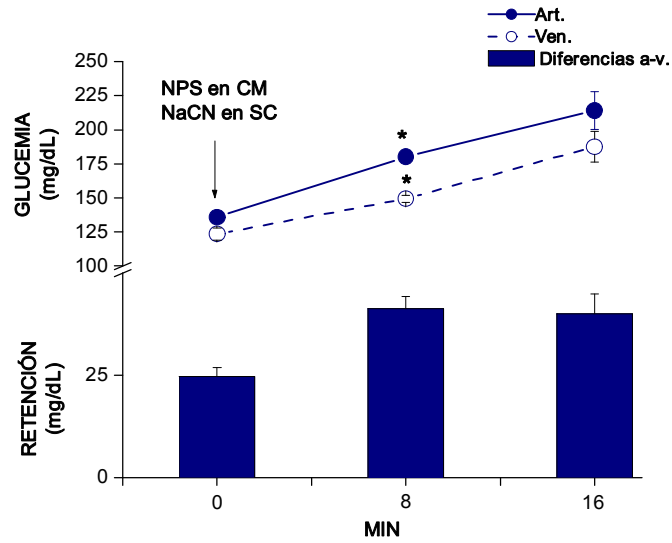


Fig.16. Estimulación de los RSCC con cianuro de sodio (NaCN) en el SC en forma simultánea con la infusión de nitroprusiato de sodio (NPS) en la cisterna magna (CM). Gráf superior, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven); gráf inferior, diferencias arterio-venosa (a-v) de glucosa cerebral. Los valores son medias aritméticas \pm E.S., ($p < 0.05$, t de Student). Los valores reales de p . se encuentran en la parte correspondiente del texto.

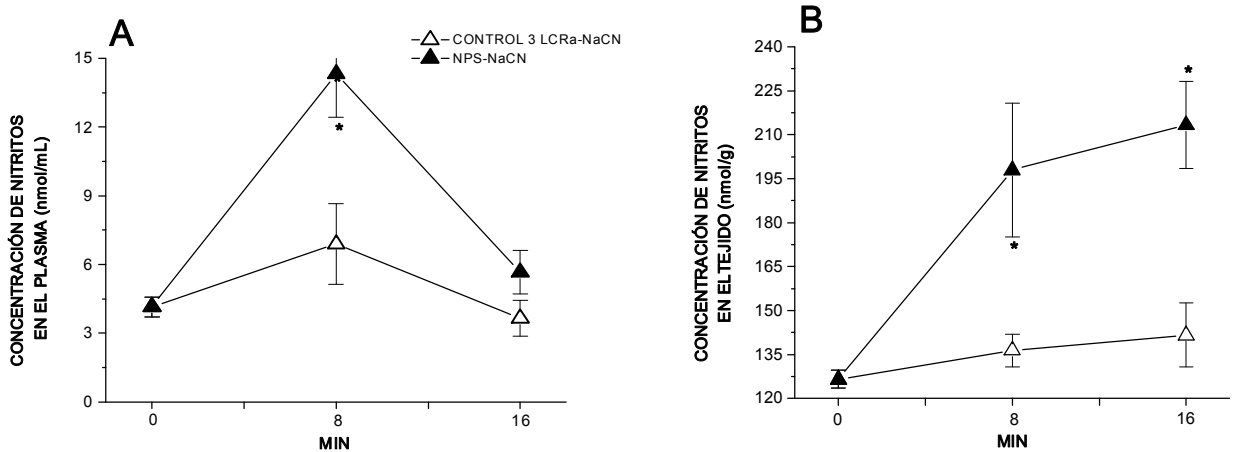


Fig. 17. A) Concentraciones de nitritos en el plasma venoso, y B) en el tejido hipotálamo-hipófisis después de

- la estimulación de los RSCC con cianuro de sodio (NaCN) (5 $\mu\text{g}/100\text{g}$), simultáneamente con la infusión de nitroprusiato de sodio (NPS) en la CM. Para su comparación el grupo control 3. Los valores son medias aritméticas \pm E.S., * $p < 0.05$, ANOVA. Los valores reales de p . se encuentran en el texto.

La comparación de los dos grupos con infusión de NPS en la CM, con y sin estimulación de los RSCC, nos permitió ver diferencias significativas sólo en el grupo que recibió la estimulación de los RSCC, tanto en las concentraciones de los nitritos en el plasma ($p = 0.02$ a $t = 8$ min), como en el tejido hipotálamo-hipofisiario ($p = 0.01$ a $t = 8$ min y a $t = 16$ min) (Figura 18A y B).

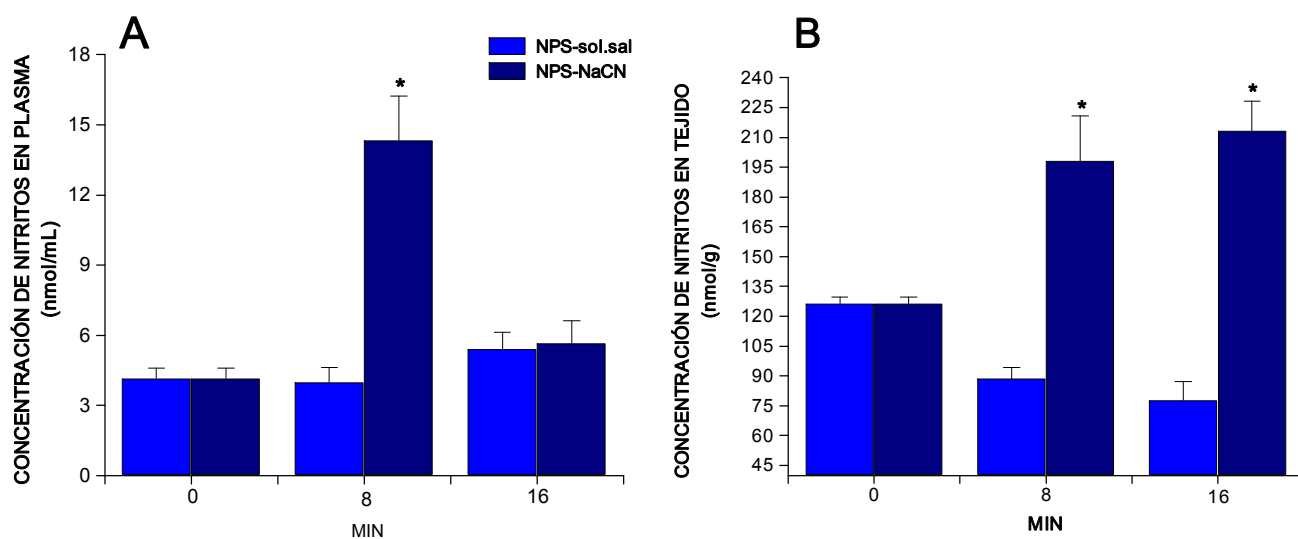


Fig. 18. Comparación entre los resultados obtenidos con NPS + sol.sal y NPS + NaCN. (A) Concentraciones de los nitritos en el plasma venoso y, (B) en el tejido hipotálamo-hipofisiario después de estimular los RSCC con cianuro de sodio (NaCN) (5 $\mu\text{g}/100$ g) en presencia de un donador de NO (NPS) en la cisterna magna (CM). Para su comparación se muestran los resultados obtenidos en las ratas sin estimulación de los RSCC. Los valores son medias aritméticas \pm E.S., * $p < 0.05$, ANOVA. Los valores reales de p . se encuentran en la parte correspondiente del texto.

•

Estimulación de los RSCC simultáneamente con la inyección de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) en la CM.

Cuando se infundió el inhibidor de NO (L-NAME) (250 μ g/ en 5 μ L de LCRa) en la CM sin estimular los RSCC, no se observaron cambios significativos en las glucemias arterial y venosa, ni en la retención de glucosa cerebral (Figura 19, Tabla 2). En estas mismas ratas, la concentración de nitritos en el plasma mostró una disminución significativa ($p = 0.02$ a $t = 8$ min y $p = 0.06$ a $t = 16$ min, t de Student). Los niveles de nitritos descendieron significativamente desde 4.2 ± 0.4 nmol/mL en $t = 0$ min hasta 2.3 ± 0.1 nmol/mL en $t = 8$ min ($p = 0.02$ t de Student) después de la infusión de L-NAME en CM (Figura 21A, Tabla 3). Los niveles de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario descendieron desde 126.5 ± 3.1 nmol/g en $t = 0$ min hasta 31.0 ± 3.2 nmol/g en $t = 8$ min ($p = 0.0000007$) y hasta 33.7 ± 2.1 a $t = 16$ min ($p = p = 0.000001$, t de Student) (Figura 21B, Tablas 4).

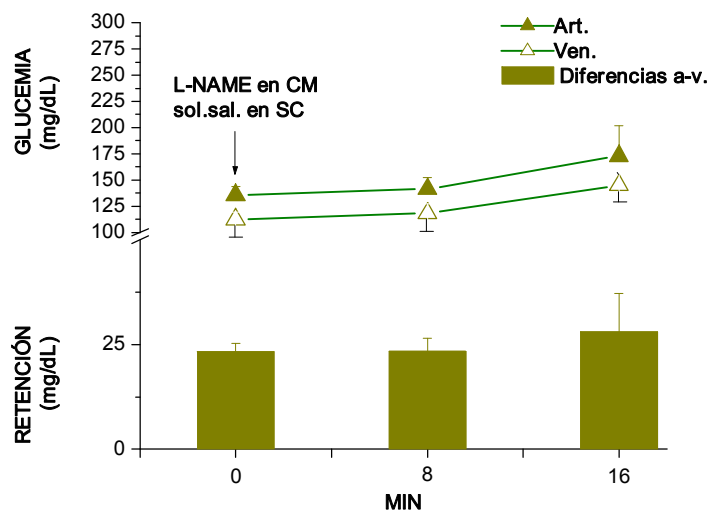


Fig. 19. Infusión de L-NAME en la cisterna magna (CM) simultáneamente con la inyección de sol.sal. en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC). Gráf. superior, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven); gráf. inferior, diferencias arterio-venosas (a-v) de glucosa cerebral. Los valores son medias aritmética \pm E.S. (t de Student) Los valores reales de p aparecen en el lugar correspondiente del texto.

- La estimulación de los RSCC simultáneamente con la infusión de L-NAME (250 en 5 μ L de LCRa) en la CM produjo un aumento significativo en la glucemia arterial a t = 8 min ($p = 0.00004$) y a t = 16 min ($p = 0.006$ *t* de Student). La concentración de glucosa en la sangre arterial aumentó de 150.2 ± 2.0 mg/dL en t = 0 min a 181.9 ± 3.6 mg/dL en t = 8 min después de la inyección de NaCN en el SC circulatoriamente aislado. En la sangre venosa, el aumento en la concentración de la glucosa fue de 132.8 ± 6.1 mg/dL en t = 0 min a 142.1 ± 2.4 mg/dL en t = 8 min después de la inyección ($p = 0.2$) (**Figura 20**). También se observó un aumento significativo en la retención de glucosa cerebral desde 17.4 ± 1.7 mg/dL en t = 0 min hasta 39.8 ± 2.7 mg/dL en t = 8 min ($p = 0.000003$, *t* de Student) y de 46.8 ± 9.1 mg/dL en t = 16 min ($p = 0.0005$, *t* de Student) (**Figura 20**). Estos resultados indican que el L-NAME aumenta el efecto de la estimulación de los RSCC sobre la retención de la glucosa por cerebro en ratas. En estos experimentos la estimulación de los RSCC produjo una disminución significativa en la concentración de nitritos en el plasma cuando se compararon con el grupo control 3 ($p = 0.003$ a t = 8 min, ANOVA). Los valores de nitritos descendieron desde 4.2 ± 0.4 nmol/mL en t = 0 min hasta 2.3 ± 0.3 nmol/mL en t = 8 min y 2.1 ± 0.3 nmol/mL en t = 16 min (**Figura 21A, Tabla 3**). La concentración de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisario disminuyó significativamente cuando se compararon con el grupo control 3 ($p = 0.000004$, a t = 8 min y $p = 0.00005$, a t = 16 min, ANOVA). Los valores de nitritos descendieron desde 126.5 ± 3.7 nmol/g en t = 0 min hasta 39.0 ± 3.7 en t = 8 min y 44.4 ± 5.7 nmol/g en t = 16 min (**Figura 21B, Tabla 4**).

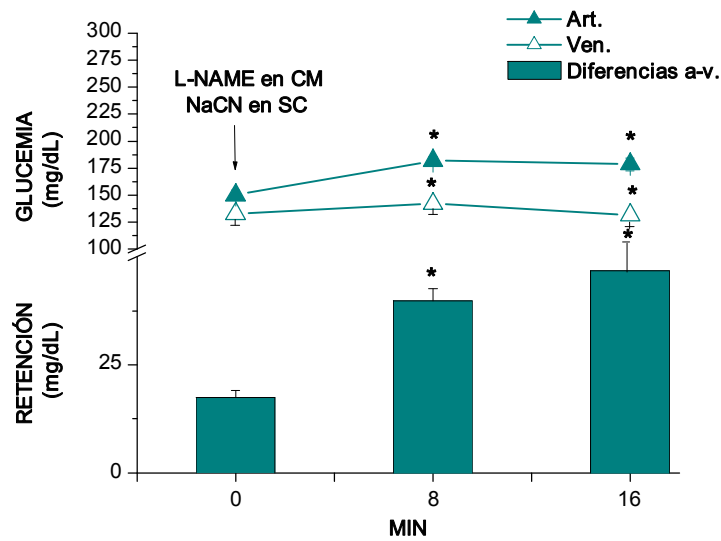
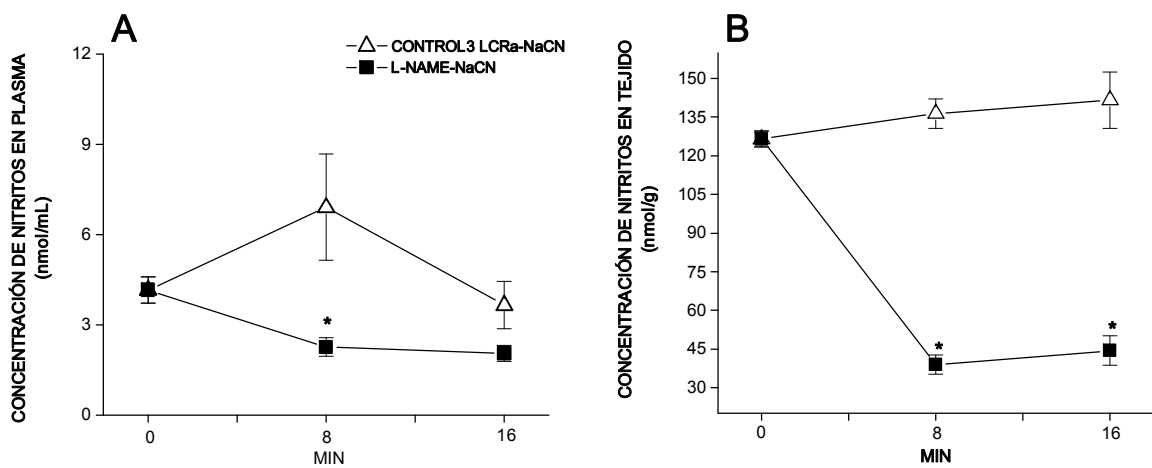


Fig. 20. Estimulación de los RSCC con cianuro de sodio (NaCN) en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC) en forma simultánea con la infusión de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) en la cisterna magna (CM). Gráf. superior, glucemias arterial (Art) y venosa (Ven); gráf. inferior, diferencias arterio-venosas (a-v) de glucosa cerebral. Los valores son medias aritméticas ± E.S., * $p < 0.05$, t de Student. Los valores reales de p se encuentran en la parte correspondiente del texto.



•

Fig. 21. **A)** Concentraciones de nitritos en el plasma, y **B)** en el tejido hipotálamo-hipofisiario después de la estimulación de los RSCC con NaCN en el seno carotídeo circulatoriamente aislado (SC), simultáneamente con la infusión de un inhibidor del NO (L-NAME). Para su comparación se presentan los valores del grupo control 3. Los valores son medias aritméticas \pm E.S. $*p < 0.05$, ANOVA. Los valores reales de p aparecen en el lugar correspondiente del texto.

Al comparar los dos grupos con infusión de L-NAME en la CM, con y sin estimulación de los RSCC, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los nitritos, tanto en el plasma, como en el tejido hipotálamo-hipofisiario (**Figura 22A y B**). En ambos grupos se observó una disminución de la concentración de nitritos en los $t = 8$ min y $t = 16$ min con respecto a los correspondientes valores basales.

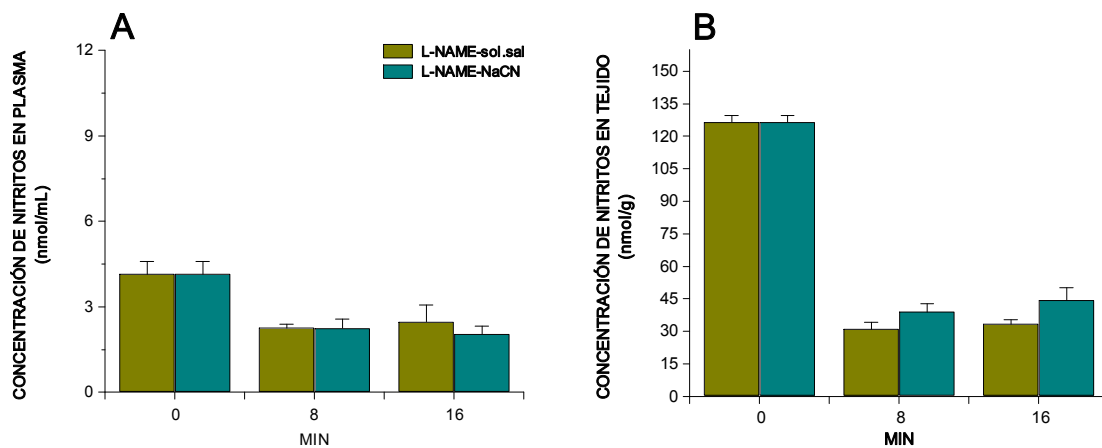


Fig. 22. Concentraciones de nitritos en el plasma venoso (**A**) y en el tejido hipotálamo-hipofisiario (**B**) después de la infusión de L-NAME+NaCN en CM. Para su comparación, se muestran los resultados obtenidos después de la infusión de L-NAME en la CM sin la estimulación con NaCN. CM, cisterna magna; NaCN, cianuro de sodio; L-NAME, N-nitro-L-arginina metil éster. Los valores son medias aritméticas \pm E.S. $p > 0.05$, ANOVA. Los valores reales de p aparecen en el lugar correspondiente del texto.

- Al comparar las retenciones de glucosa cerebral (convirtiendo los datos en porcentajes de sus respectivas basales), entre los grupos NPS + NaCN, L-NAME+NaCN y LCRa+NaCN se observó un aumento significativo solo en el grupo de L-NAME + NaCN a t = 8 min ($p = 0.049$, ANOVA) y a t = 16 min ($p = 0.016$, ANOVA) con respecto al grupo control 3. El grupo que recibió el NPS disminuyó la retención de glucosa por el cerebro de manera significativa solo en el t = 8 min ($p = 0.01$ a t = 8 min, ANOVA) en comparación con el grupo control 3 (**Figura 23**).

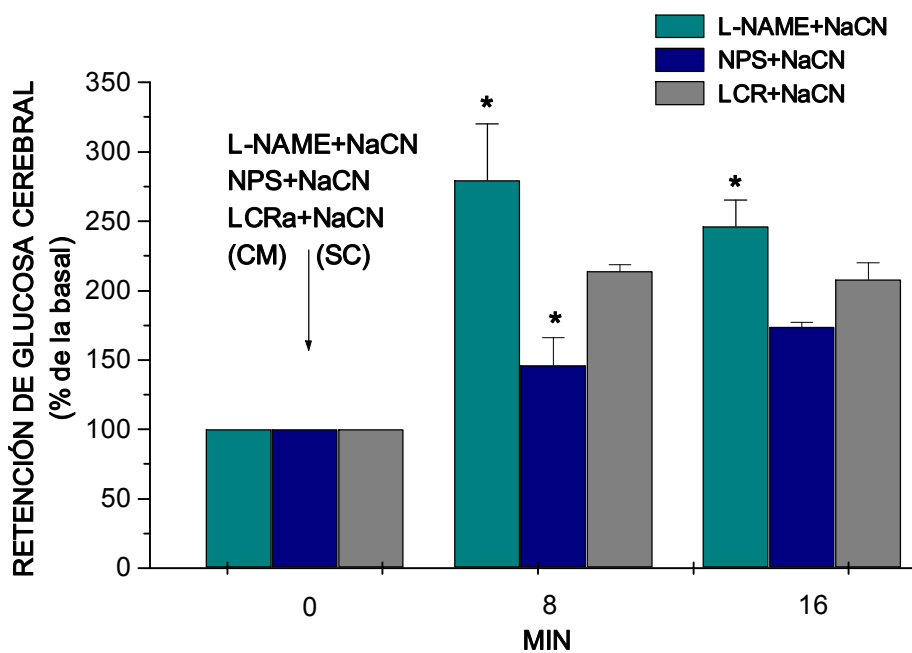


Fig. 23. Comparación de las retenciones de glucosa cerebral entre el grupo LCRa+NaCN con los grupos L-NAME+NaCN y NPS+NaCN. NaCN, cianuro de sodio; SC, seno carotídeo circulatoriamente aislado. Para su comparación, los valores se expresaron en porcentajes con respecto a su basal (t = 0 min) \pm ES. La comparación entre los grupos se hizo por ANOVA, $*p < 0.05$. Los valores reales de p aparecen en el lugar correspondiente del texto.

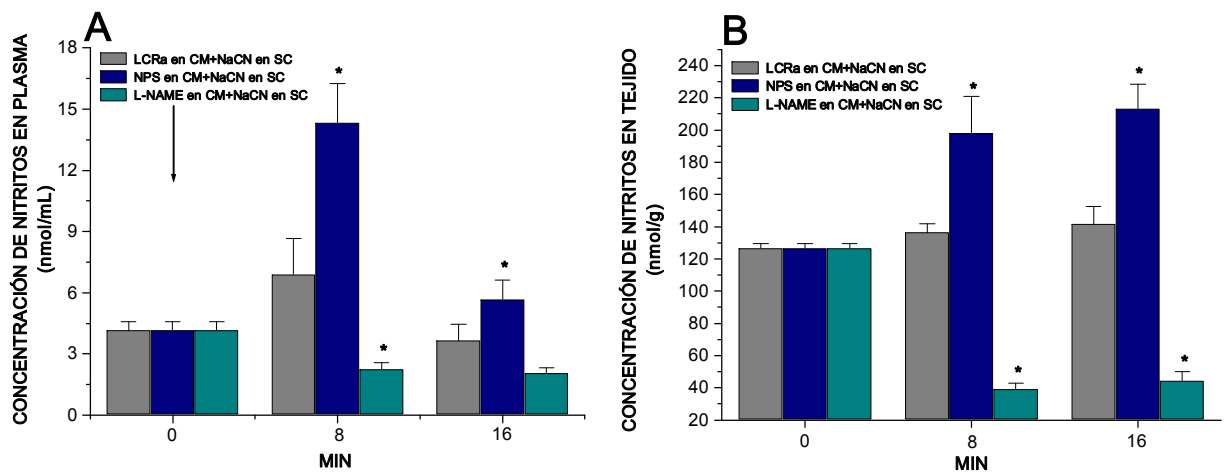


Fig. 24. Comparación entre las concentraciones de nitritos en el plasma venoso (**A**), y en el tejido hipotálamo-hipofisiario (**B**) entre los grupos LCRa + NaCN; NPS + NaCN y L-NAME + NaCN. CM, cisterna magna; NaCN, cianuro de sodio; SC, seno carotídeo circulatoriamente aislado. Los valores se presentan en promedios \pm E.S., * $p < 0.05$, ANOVA. Los valores reales de p aparecen en el lugar correspondiente del texto.

Quando se compararon los valores obtenidos en las concentraciones de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario ante la estimulación de los RSCC, entre los grupos que recibieron LCRa (control 3), un donador (NPS) o un inhibidor del NO (L-NAME) en la CM, se encontró una disminución significativa en las concentraciones de nitritos tanto en el plasma ($p = 0.03$ a $t = 8$ min, ANOVA) como en el tejido ($p = 0.00004$ a $t = 8$ min y $p = 0.0005$ a $t = 16$ min, ANOVA) en las ratas con L-NAME con respecto al control 3. En cambio, en las ratas con NPS se encontró un aumento significativo en las concentraciones de nitritos tanto en el plasma ($p = 0.02$ a $t = 8$ min, ANOVA) como en el tejido ($p = 0.03$ a $t = 8$ min y $p = 0.04$ a $t = 16$ min, ANOVA) con respecto al control 3 (**Figura 24A y B**).

• DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron los efectos de la estimulación de los receptores seno-cuerpo carotídeo (RSCC) en la homeostasis de la glucosa en ratas anestesiadas, analizando la participación del NO, como posible neurotransmisor, en el reflejo de la retención de glucosa por el SNC en respuesta a la inyección de NaCN en el seno carotídeo temporalmente aislado de la circulación general (SC). En forma paralela, se determinaron: concentraciones de glucosa en la sangre, diferencias a-v de glucosa cerebral (retención de glucosa por el cerebro), niveles de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipofisiario.

De acuerdo con los resultados del grupo control 1, en el que las ratas se mantuvieron sólo en las condiciones experimentales de anestesia, respiración artificial, temperatura y cateterización inicial, no se observaron cambios significativos en las variables estudiadas; los niveles de glucosa y de nitritos permanecieron estables durante el tiempo de medición ($t = 8$ min y $t = 16$ min). En el grupo control 2, cuando las ratas recibieron sólo una infusión de LCRa en la CM sin estimular los RSCC, tampoco se observaron cambios significativos en las variables antes citadas. Por el contrario, en las ratas del grupo control 3, cuando se practicó la estimulación de los RSCC con NaCN, simultáneamente con una infusión de LCRa en la CM, se observó un aumento significativo tanto en la concentración de la glucosa arterial, como en la retención de glucosa por el cerebro. Los niveles de los nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipofisiario también mostraron un aumento significativo con respecto a su basal, aunque en el tejido el incremento no fue significativo. Estos resultados confirmaron la participación de los RSCC en la homeostasis de la glucosa (Álvarez-Buylla y Álvarez-Buylla, 1990; Montero, 1993; Montero y col., 2000; Cadenas, 2003).

Los efectos del NaCN en el SC se deben atribuir a la estimulación de los quimiorreceptores del CC (Eyzaguirre y Zapata, 1984) ya que la dosis utilizada de NaCN no estimula a los barorreceptores (Álvarez-Buylla, 1954). El NaCN indujo una anoxia histotóxica en las células tipo 1 o glómicas del CC, simulando un efecto hipóxico

- De acuerdo a lo reportado en la literatura, este efecto conlleva a una disminución en la corriente saliente rectificadora de K^+ , despolarizando la membrana de las células del CC, y esta despolarización consecuentemente activó los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Stea y Nurse, 1991), con aumento del Ca^{2+} intracelular (Sato, Ikeda, Yoshizaki y Koyano, 1991), induciendo la liberación de ACh por exocitosis y la consiguiente excitación de las fibras del nervio del seno carotídeo (Acker, 1994). Se han identificado varios neurotransmisores en las células del glomus que se liberan en respuesta a la hipoxia, pero los principales son la ACh como trasmisor excitador y la DA como inhibidor (Bairam y Lajeunesse, 2003); desconocemos el papel que juegan dichas sustancias en la transmisión sensorial (Prabhakar, 2000). La información aferente, procedente de los receptores arteriales, viaja por el nervio del seno carotídeo hasta el NTS (Chen y col., 1994), que constituye el sitio del SNC encargado de recibir las aferencias quimiorreceptoras arteriales, así como otras aferencias viscerales ([Suzuki](#), [Nishina](#), [Nakamura](#), [Maruyama](#)., 2004). Las neuronas de este núcleo participan en la generación de señales para obtener reflejos glucémicos, cardiovasculares, respiratorios, etc., como resultado de la activación de los aferentes periféricos antes citados (Jordan y Spyer, 1986). Los CC son órganos sensores que detectan cambios, principalmente en los niveles de oxígeno en la sangre arterial que los irriga, sin embargo, los trabajos de de Álvarez-Buylla y col. (1975; 1988, 1997 y 1994) demostraron que los RSCC también son sensibles a los cambios en la glucosa local, y responden al estímulo hipóxico o hipoglucémico con un reflejo de hiperglucemia de corta latencia. Más recientemente, los trabajos de Pardal y López-Barneo (2002) mostraron en preparaciones del CC *in vitro*, que la disminución en la concentración de glucosa del baño produce una activación simpática, dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular y simultánea a la inhibición de los canales de K^+ .

La importancia de estudiar los cuerpos carotídeos (considerados por Prabhakar y col. en 1994 como un cerebro en miniatura) radica en su localización específica a la entrada de la circulación cerebral; los convierte en sensores estratégicos a los cambios energéticos esenciales para la respiración cerebral (Álvarez-Buylla y col., 1997).

- Por este motivo, es importante mantener las concentraciones de los sustratos energéticos dentro de límites adecuados y estrechos ya que constituyen la base de funciones cerebrales fundamentales, como la memoria y el aprendizaje (Hoyer, 2003; Salinas y Gold, 2005).

En los últimos años, se sugiere que el NO puede participar, también, como un transmisor excitatorio o un modulador químico en el CC. El NO interviene en la desregulación del Ca^{2+} citosólico en neuronas cerebelares durante una falta combinada de glucosa/oxígeno (Mei, Chi, Trump y Eccles, 1996), y como era de esperar, la enzima NOS se encuentra en forma abundante en el SNC. La nNOS, localizada en las fibras sensoras del ganglio petroso, actúa como un inhibidor tónico en la quimiorrecepción hipóxica (Prabhakar, Pieramici, PremKumar, Kumar y Kalaria, 1996). Sin embargo, a pesar de la importancia de los mecanismos centrales (NTS) y periféricos (cuerpos carotídeos), responsables de la regulación neuroendocrina, cardiovascular, respiratoria, etc. (Yamaguchi y Hama 2003), éstos no están bien estudiados. La relación NO/O_2 puede jugar un papel fisiológico crucial en la sensibilidad al oxígeno, como lo han sugerido trabajos anteriores, que demuestran un papel importante del NO en la homeostasis de la glucosa en ratas (Tong y col., 1997). Particularmente, la nNOS es muy abundante en las terminales del sistema hipotálamo-neurohipofisiario, en la neurohipófisis, en el NTS y en otras estructuras del SNC. Las concentraciones basales del NO, y por lo tanto, sus efectos biológicos son difíciles de determinar con precisión, dada la alta velocidad de formación, descomposición y difusión. En efecto, en condiciones de normoxia la vida media del NO es de 30 seg y su distancia de difusión radial de 540 μm (Kelm y Schrader, 1988). Las concentraciones utilizadas en experimentos *in vitro* varían considerablemente de las que pueden encontrarse *in vivo*, incluyendo los CC (Kelm, 1999; Schulz, Kelm y Heusch, 2004). En el plasma las concentraciones encontradas por otros autores varían desde 7.0 hasta 19.0 nmol/mL, mientras que en los tejidos periféricos las concentraciones varían desde 0.5 nmol/g hasta 50 nmol/g (Brown, 1999; Kelm, 1999; Portilla, 2005). En nuestros resultados los rangos de la concentración de nitritos en el plasma en condiciones basales variaron desde 3.1 hasta 5.5 nmol/mL, mientras que en el tejido nervioso variaron desde 119 hasta 133 nmol/g.

- La especificidad del NO estaría dada, entonces, por los receptores localizados en distintos elementos neurales incluidos en su espacio de difusión (Fernández y cols., 1999). Las comparaciones del NO tanto en el plasma como en el tejido hipotálamo-hipofisiario, se hicieron en valores absolutos, observándose claras diferencias ante los tratamientos aplicados (NPS y L-NAME). La estimulación de los RSCC con NaCN (control 3), por sí sola, elevó significativamente los niveles de nitritos en el plasma 8 min después de la aplicación del estímulo anóxico, y la comparación con los otros dos grupos controles dio diferencias significativas. Aunque los niveles de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisiario no se elevaron significativamente cuando se compararon con su basal o con los otros grupos controles. Es probable que la duración del estímulo anóxico, y el corto tiempo de muestreo para detectar la expresión de las NOS (Kelm y Schrader, 1988), sea la causa de que las concentraciones de nitritos en el tejido hipotálamo-hipofisis después de la inyección de LCRa en CM y de la estimulación de los RSCC con NaCN, no fueran significativas. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por Iturriaga y col. (2000) y otros (Tuzgen, Tanriover, Uzan, Tureci, Tanriverdi, Gumustas, y Kuday, 2003), que observan un incremento de nitritos sólo en el inicio de la hipoxia y que pueden caer durante los 5 min después de la hipoxia cerebral, como se observó en este trabajo. Es posible que este aumento de los nitritos en el plasma del grupo control 3, sea indicativo de la activación de la iNOS en las ratas anestesiadas después de la estimulación de los RSCC. Se sabe que ante la hipoxia central y/o periférica en las ratas, se estimula la expresión de genes de la nNOS, incrementándose consecuentemente la producción de NO en las neuronas periféricas y centrales (Prabhakar y col., 1996; Shibata y col., 1996). Estudios más recientes (Hai-lei y Hai-feng, 2005) apoyan estos últimos resultados, al encontrar que la activación de la iNOS y nNOS contribuye a la hipoxia intermitente para prevenir el daño por isquemia/reperfusión, es decir se produce un aumento en los nitritos en el tejido cerebral durante la isquemia.

- **Estimulación de los RSCC con NaCN en el seno carotídeo circulatoriamente aislado, simultáneamente con la infusión de NPS en la CM**

Los niveles de glucosa en la sangre periférica y central, se controlan, en parte, dentro del propio SNC, integrando la información que se inicia en los receptores periféricos (Álvarez-Buylla 1988, Frohman, 1983; Nijima, 1986). No se conoce aún qué mediador participa en la captación de glucosa por el cerebro. En la bibliografía consultada se encuentran divergencias en cuanto al papel que juega la insulina en la captación cerebral de glucosa, pero todos los autores coinciden en señalar que la insulina no interviene en la captación de glucosa por la astrogía (la fuente más importante de glucosa en el cerebro) (LeMay Gehua, Zelenok, y D'Alcey, 1998; Hasselbalch y col., 1999; Seaquist, Damberg, Tkac y Gruetter, 2001; Tanaka, Nakatani, Morioka, Urakawa, Maruyama, Kitagawa, Katsuki, Araki, Sasaki, Hori, Gabazza, Yano, Wada, Nobori, Sumida, Adachi, 2003; Porte y col., 2005). Álvarez-Buylla y col. (2003) encuentran un aumento en la captación de glucosa por el cerebro en ratas y perros después de perfundir la CM con el LCR proveniente de perros post-estimulación del CC con NaCN y, proponen la existencia de una sustancia activa en el LCR, que participa en el metabolismo cerebral. Con estos antecedentes nos planteamos la posibilidad de que el NO pudiera estar involucrado en el aumento de la captación de glucosa por el cerebro después de la estimulación RSCC con NaCN. Un donador de NO como es la nitroglicerina (NG) infundido en la CM de ratas no estimuladas con NaCN, produce un aumento significativo en la captación de glucosa por cerebro, semejante al que se presenta en las ratas con estimulación de los RSCC con NaCN sin infusión de NG en la CM (Cadenas y col., 2006, Montero y col, 2006). Los resultados anteriores fueron confirmados en este trabajo cuando el NPS infundido en la CM de ratas anestesiadas sin estimulación de los RSCC, produjo un aumento en la captación de glucosa cerebral sin cambios significativos en los niveles de nitritos en el plasma ni en el tejido hipotálamo-hipofisiario, probablemente debido a que los experimentos se realizaron durante la normoxia, y a que el tiempo de muestreo fue corto para la expresión de la iNOS, fundamentalmente. Chapman y Wideman (2006) tampoco encuentran incrementos de los nitritos después de la inyección intravenosa de NPS.

- En otros trabajos se encuentra un incremento de vasopresina en plasma después de una inyección ICV de un donador de NO (Yamaguchi y Hama, 2003), que eleva los niveles sistémicos de glucosa por glucogenolisis hepática (Hems y col., 1978); estos hechos podrían explicar, en parte, los resultados sobre el aumento de la glucemia y de la captación de glucosa por el cerebro obtenidos aquí. El incremento en la retención de glucosa por el cerebro por efecto del NPS en la CM se puede explicar, también, por el incremento en la traslocación e inducción de transportadores a la glucosa en el propio cerebro producidos por el NO. Trabajos recientes indican que el NO interviene en las vías metabólicas, que participan en la captación de glucosa y en la translocación de los GLUT, por medio de la proteincinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) (Li y col., 2004). Los derivados de la adenina como el adenosín monofosfato (AMP) son compuestos clave en los procesos de captación y traspaso de energía y por lo tanto en la regulación del metabolismo celular. En efecto, se sabe que en el músculo cardíaco, la AMPK participa en el transporte de glucosa con la interacción de las vías nitrinérgicas activando la NOS (Rutter, Da Silva Xavier y Leclerc, 2003). Sin embargo, la forma en que la NOS modula la captación de glucosa y la translocación de los GLUT es incierta. El estudio del papel del AMPK en relación con el SNC, y su capacidad para detectar cambios en los niveles de glucosa, apenas está en sus inicios; en algunos núcleos hipotalámicos como el paraventricular y el arcuato, se ha visto cierta analogía con el músculo cardíaco, pero la interacción de las astroglias vecinas hace que el problema sea mas complejo. Será necesario estudiar los cambios en la actividad de la AMPK en respuesta a la variación en los niveles de glucosa en el SNC, y relacionarlos con sus blancos moleculares. EL NO aumenta la glucólisis en el SNC, y con ello la necesidad de captar glucosa a través de los transportadores. Además, se sugiere que el NO tiene un efecto semejante al de la insulina, porque aumenta el número de transportadores a la glucosa (GLUT3, que no se encuentran en condiciones normales y de GLUT1, constitutivos en astrocitos), estimulando el transporte de glucosa tanto en el cerebro (Cidad y col., 2001; Almeida y col., 2002) como en el músculo (Higaki y col., 2001; Balon y Nadler, 1997; Young y col, 1997).

- Se explicaría así el incremento en la retención de glucosa por cerebro observado en nuestros experimentos después de la infusión del donador de NO, con el consiguiente efecto neuroprotector en condiciones de hipoglucemia por isquemia cerebral (Bolanos y Almeida, 1999; Ciudad, Garcia-Nogales, Almeida y Bolanos, 2001; Almeida y col., 2002). Como el NO induce la excitación quimiosensora durante la normoxia (Iturriaga y col., 2000), puede ser importante para la regulación fisiológica del metabolismo energético. En la mitocondria se producen cantidades significativas de NO para regular su propia respiración (Giulivi, 1998), pero no hay evidencias definitivas que muestren que el NO regule la respiración mitocondrial (Brown, 1999; Ghafourifar y Cadenas, 2005). Otro mecanismo posible para explicar el efecto del NO sobre el aumento en la retención de glucosa por el cerebro podría ser el EDRF, que causaría un aumento en el flujo sanguíneo cerebral y por consiguiente, retención de glucosa (Bolanos y Almeida, 1999; Mandala, Heppner, Bonev y Nelson, 2007). Sin embargo, este mecanismo no es tan claro en el cerebro como en el músculo esquelético (Higaki y col., 2001). Es posible que durante la normoxia, la infusión de NPS en CM, sin la estimulación de los RSCC, produzca hipoxia con retención compensadora de glucosa por el cerebro en forma semejante a lo observado por Iturriaga y cols. (2000), que encuentran una excitación quimiosensora durante la normoxia después de administrar NPS en el CC. En trabajos anteriores se observa que el NPS ICV produce una rápida y marcada elevación de AVP en el plasma (Yamaguchi y Hama, 2003), hormona que puede operar como neurotransmisor, o como liberador de neurotransmisores activando vías de señales intracelulares, que activarían las funciones neuronales y el consumo de glucosa (Kuriyama y Ohkuma, 1995), es decir la retención de glucosa por cerebro. Sería interesante, en futuros experimentos, estudiar el paralelismo ente NPS, secreción de AVP y retención de glucosa por el cerebro.

Los donadores de NO participan, también, en la formación de peroxinitritos, posibles mediadores en los efectos del NO sobre la retención de glucosa en el cerebro. Algunos autores muestran que los peroxinitritos participan en la vasoconstricción cerebral prolongada (Elliott, Lacey, Chilian y Brezezinska, 1998) y cardiaca (Zou y Bachschmid, 1999) en experimentos de reperfusión con hipoxia-reoxigenación.

- Durante la reperfusión se incrementa el aporte de O_2 y la producción de NO, excediendo la capacidad de la mitocondria para reducir el O_2 hasta agua, produciéndose el anión superóxido (O_2^-) que reacciona con el NO para formar peroxinitritos ($ONOO^-$). Estos radicales libres son pro-oxidantes, inhibidores irreversibles de la función mitocondrial que dañan a las proteínas, los lípidos y el DNA, y llevan a la muerte neuronal (Bolanos y Almeida, 1999). Es posible que los $ONOO^-$, actuando como vasoconstrictores, se opongan al efecto vasodilatador del NO y participen en el efecto excitatorio del donador de NO sobre la quimiorrecepción del CC en la normoxia. El efecto vasoconstrictor sólo tiene lugar en altas concentraciones de $ONOO^-$, mientras que la vasodilatación ocurre a bajas concentraciones. En el primer caso, los niveles altos de $ONOO^-$ producen inhibición de los complejos enzimáticos I, II y IV de la mitocondria, dañando la membrana mitocondrial, con despolarización y liberación de Ca^{2+} (Cassina y Radi, 1996; Brown, 1999; Ghafourifar y Cadenas, 2005). El NO inhibe la respiración mitocondrial a diferentes niveles reduciendo el consumo de O_2 . Otros mecanismos como la nitrosilación, la oxidación de tioles de las proteínas, y la remoción de hierro de los núcleos hierro-sulfuro pueden también explicar los efectos del NO sobre la cadena respiratoria (Brown, 1999; Ghafourifar y Cadenas, 2005). Es posible que las concentraciones de NO liberado por los donadores del NO en estos experimentos (NPS, 300 μ g en 5 μ L de LCRa) puedan alterar la cadena del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de las células del cerebro en forma semejante a lo descrito por Iturriaga y col. (2000) en las células del glomus utilizando la misma dosis de NPS. Todas estas observaciones hablan del papel crucial que tiene el NO sobre la quimiorrecepción hipóxica.

Por el contrario, las ratas con estimulación de los RSCC acompañadas con la infusión de NPS en la CM, no produjeron efectos significativos sobre los niveles de glucemia arterial y venosa, ni en la retención de glucosa cerebral. Sin embargo, como era de esperarse, las concentraciones de nitritos en el plasma y en el tejido hipotálamo-hipofisario se elevaron significativamente (**Figura 17, Tablas 3 y 4**), lo que sugiere que el efecto del NO antagonizó el efecto anóxico sobre la captación de glucosa por el cerebro.

- En efecto, en presencia de hipoxia, los donadores de NO hacen que no se detecte la falta de O₂, ya que el O₂ del NO se utiliza como energético en la cadena respiratoria (Brown, 1999). La producción del NO se eleva en respuesta a la administración del donador clásico del NO (L-arginina) y disminuye en presencia de un inhibidor de la NOS, determinado mediante la técnica de Griess (Heinzen y Pollack, 2002). Los estudios hechos en el CC proponen que el NO endógeno es un inhibidor tónico de la quimiorrecepción a la hipoxia (Wang y col., 1995). La administración de donadores de NO como la NG y el NPS en el CC *in vitro* reduce la respuesta quimiosensora a la hipoxia, corroborando que el NO actúa como un inhibidor, primordialmente durante la hipoxia. El NO induce un efecto diferenciado sobre la descarga quimiosensorial carotídea, dependiendo de los niveles de oxígeno. Durante la hipoxia inhibe la descarga, y durante la normoxia la aumenta (Iturriaga y col., 2000). La hipoxia genera concentraciones locales elevadas de NO, que sugieren, la existencia de un mecanismo contrarregulador durante los estados de isquemia (Bolanos y Almeida 1999; Agvald y col., 2002).

El efecto inhibitorio del NO sobre la quimiorrecepción del CC es secundario a un cambio del tono vascular por incremento en la presión del oxígeno tisular que reduce la descarga basal en los receptores carotídeos (Lahiri y Buerk, 1998). Aunque no está claro cuáles son los mecanismos que intervienen para que la vasodilatación inhiba el incremento de la frecuencia de las descargas durante la perfusión del CC con un medio hipóxico, es posible que el efecto vasodilatador del NO entre en juego a través de la activación de la guanilato ciclasa, relajando el músculo liso vascular (Wang y Col., 1995; Lahiri y Buerk., 1998). En los estados hipóxicos, en las fibras nitrinérgicas se incrementan tanto la producción de NO, como de GMPc (Hunter y col, 2003), con un probable aumento de los requerimientos de glucosa (Onufriev, Gulyaeva, Terenina, Tolstenkov y Gustafsson, 2005; Quian, Williams, Karounos y Ozcan, 2005; Jobgen, Fried, Fu, Meininger, y Wu, 2006).

- **Estimulación de los RSCC en el seno carotídeo circulatoriamente aislado e infusión de L-NAME en la CM**

Con objeto de bloquear la actividad del NO, y su posible participación en el reflejo hiperglucemiante con retención de glucosa por el cerebro, en las últimas series experimentales perfundimos en la CM un inhibidor de la enzima NO sintetasa (L-NAME) antes y después de la estimulación de los RSCC con NaCN. En las ratas, a las que se perfundió con L-NAME sin estimular los RSCC, no se observaron cambios significativos en los parámetros estudiados en el metabolismo de la glucosa (**Figura 19**). El L-NAME, al ser un bloqueador de la NOS, inhibió los efectos del NO sobre los niveles de glucosa en SNC. Sin embargo, el L-NAME produjo una disminución significativa de los niveles de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario, corroborando el efecto inhibitorio del L-NAME, probablemente sobre las isoformas nNOS e iNOS (**Figuras 21A y B, Tablas 3 y 4**).

La infusión de L-NAME en la CM acompañada de una anoxia histotóxica en el SC incrementó significativamente la retención de glucosa por el cerebro, así como los niveles de glucemia arterial y venosa (**Figura 20**). Los niveles de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario disminuyeron significativamente, corroborando el efecto inhibitorio del L-NAME sobre la NOS (**Figura 21A y B, Tablas 3 y 4**). Al inhibir la producción de NO con L-NAME se bloquea el efecto inhibitorio del NO sobre la actividad neuronal, predominando el efecto excitatorio del NaCN. La actividad neuronal, por sí misma, con aumento del metabolismo, provocaría un aumento de la captación de glucosa por el cerebro. El incremento en los niveles de glucosa en el plasma observado en nuestros experimentos, podría atribuirse a la acción glucogenolítica de la vasopresina secundaria a la aplicación del L-NAME (Kadekaro y col., 1998; Montero y col., 2000). La inyección de L-NAME induce una inhibición del 93% de la actividad de la NOS cerebral con efectos vasculares que se presentan con una latencia de 18 horas, y la consecuente reducción del flujo sanguíneo (O'Brian, Kelly y Ritchie, 1997). En nuestros experimentos, el efecto del L-NAME sobre la glucemia fue con un tiempo de latencia de 8 min, debido a que se utilizó la vía cerebral a través de la cisterna magna, y a que el efecto transcurrió por vías alternas a la vasodilatación.

- El L-NAME incrementa el metabolismo de la glucosa cerebral, y la utilización posterior de este carbohidrato en estados de hipovolemia (Kadekaro y col., 1998). El NO ejerce una influencia tónica inhibitoria sobre la secreción de vasopresina: a) a través de la formación de prostaglandinas que previenen la respuesta hormonal después de L-NAME (Kadekaro y col., 1998); b) disminuyendo las acciones de la angiotensina II). Todos los componentes del sistema renina-angiotensina y prostanoideos están presentes en el cerebro (Ferguson y Washburn, 1998), y el NO interactúa con ellos para modificar la acción de la angiotensina II en el sistema neurohormonal (sistema nervioso autónomo y vasopresina) (Kadekaro, 2004).

Se sugiere que el NO tiene un efecto semejante al de la insulina, porque aumenta el número de transportadores a la glucosa y estimula el transporte de glucosa tanto en el cerebro (Cidad y col., 2001) como en el músculo (Balon y Nadler, 1997. Young y col, 1997). La infusión de L-NAME ICV bloquea el efecto estimulador de la insulina e inhibe tanto la producción del NO (segundo mensajero de la insulina) como el metabolismo de la glucosa (Kahn y col., 2000). En las ratas tratadas con L-NAME por vía i.p., bajan las concentraciones de glucógeno en el cerebro tanto en estados normales del metabolismo como cuando se produce algún tipo de lesión o infección cerebrales. Durante los procesos inflamatorios se sintetizan moléculas asociadas con la iNOS, como son las citocinas que inducen la síntesis de altas concentraciones de NO (Cruz y Daniel, 2002).

En resumen, el NPS en la CM elevó los niveles de glucosa en la sangre arterial y venosa aumentando la retención de la glucosa encefálica. Estos resultados se acompañaron por un aumento (no significativo) de nitritos en el plasma venoso. Sin embargo, la administración de NPS acompañada de la estimulación de los RSCC, no produjo cambios significativos en la glucemia, pero sí elevó significativamente los niveles de nitritos tanto en el plasma venoso, como en el tejido hipotálamo-hipofisiario. Por otra parte, el L-NAME en la CM, sin estimulación de los RSCC no provocó cambios significativos en los niveles de glucosa en el plasma, ni en la retención de glucosa encefálica, aunque sí disminuyó significativamente la concentración de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario.

- Sin embargo, el L-NAME acompañado de la estimulación de los RSCC con NaCN, provocó hiperglucemia arterial con aumento en la retención de glucosa por el cerebro, así como una disminución significativa en la concentración de nitritos en el plasma venoso y en el tejido hipotálamo-hipofisiario.

Los resultados de este trabajo sugieren que el NO es un mediador importante en la respuesta hiperglucemiante y en el aumento de la captación de glucosa por el cerebro después de la estimulación de los RSCC durante la anoxia histotóxica. Pero es necesario realizar una mayor investigación en este campo que confirme estos resultados. Es probable que la determinación de los niveles de expresión de las distintas isoformas de NOS, así como sus posibles enlaces con la AMPK, contribuyan a dilucidar las vías involucradas en esta regulación.

Es cada vez más evidente que el NO producido en el SNC juega papeles fisiológicos importantes en la regulación del balance hídrico, en la presión sanguínea y en la homeostasis de la glucosa. Se considera que la relación entre la concentración de los niveles de glucosa, la actividad quimiorreceptora y los niveles de NO, podría aclarar el mecanismo por medio del cuál el SNC es capaz de captar la glucosa para mantener su metabolismo (Álvarez-Buylla y col., 2003; Montero y col., 2006; Cadenas y col., 2006).

CONCLUSIONES

- 1.- Se confirmó que los RSCC intervienen en la homeostasis de la glucosa y participan en la regulación de la retención de este sustrato por el SNC en la rata, como estaba planteado desde el inicio de este trabajo
- 2.- La estimulación anóxica histotóxica de los RSCC con NaCN elevó los niveles de glucosa en la sangre arterial incrementando la retención de glucosa encefálica. De la misma manera, la concentración de nitritos, tanto en el plasma como en el tejido hipotálamo–hipofisiario aumentó ante el estímulo anóxico.
- 3.- Con respecto a la hipótesis de este trabajo confirmamos, que el NO participa en la homeostasis de la glucosa. En efecto, la infusión en la CM de un donador de NO (NPS), elevó los niveles de glucosa en la sangre arterial y venosa, y en la retención de glucosa encefálica. Sin embargo, cuando la administración de NPS fue acompañada de la estimulación anóxica de los RSCC, se atenuó la respuesta observada en la retención de glucosa, aunque las concentraciones de nitritos, tanto en el plasma como en el tejido hipotálamo–hipofisiario, se elevaron significativamente.
- 4.- La infusión de L-NAME en la CM acompañada de la estimulación anóxica de los RSCC, incrementó tanto la hiperglucemia arterial y venosa como la retención de glucosa por el cerebro, prolongando el efecto observado en el grupo control, hasta los 16 min post-inyección. Estos experimentos reforzaron la hipótesis de la participación del NO como modulador en la homeostasis de la glucemia.

-

PERSPECTIVAS

La identificación indirecta del NO, a través de la determinación de nitritos, en las vías involucradas en el reflejo hiperglucémico con retención de glucosa por el cerebro, contribuirá a nuestro conocimiento de cómo el cerebro regula sus almacenes energéticos, y podrá tener importantes aplicaciones en el tratamiento de enfermedades que cursan con alteración del metabolismo energético como en las distintas formas de diabetes, así como en los problemas de hipoxia cerebral. Con la finalidad de corroborar el efecto del NO en los reflejos glucémicos ocasionados por la post-estimulación de los receptores del cuerpo carotídeo, es necesario determinar las expresiones de las isoformas de la NOS en el cerebro, en el NTS y /o en el cuerpo carotídeo, prolongando el tiempo de muestreo post-inyección. Se piensa que un futuro cercano, la disponibilidad de herramientas bioquímicas específicas para determinar los niveles de NO y su participación en el metabolismo *in vivo*, permitirán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

• BIBLIOGRAFÍA

- Acker, H. (1994). Oxygen sensing in the carotid body: ideas and models. Advances in Experimental Medicine and Biology, 360, 21-27.
- Agvald, P., Adding, L.C., Artlich, A., Person, M.G., y Gustafsson, L.E. (2002). Mechanisms of nitric oxide generation from nitroglycerin and endogenous sources during hypoxia vivo. British Journal of Pharmacology, 135,373-382.
- Alcayaga, J., Iturriaga, R., y Zapata, P. (1988). Flow-dependent chemosensory activity in the carotid body superfused in vitro. Brain Research, 455, 31-37.
- Almeida, A., Ciudad, P., y Bolanos, J.P. (2002). Nitric oxide accounts for an increased glycolytic rate in activated astrocytes through a glycogenolysis-independent mechanism. Brain Research, 945, 131-134.
- Almeida A., Ciudad P., Delgado-Esteban M., Fernandez E., Garcia-Nogales P., y Bolanos JP. (2005). Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. Journal of Neuroscience Research, 79,166-71.
- Álvarez-Buylla, R. (1954). Disociación de las actividades quimiorreceptoras y barorreceptoras en gatos. Archivos del Instituto Nacional de Cardiología (Méx), 24, 6-37.
- Álvarez-Buylla, R. (1997). La Integración de Funciones con una Finalidad: La Respiración Celular. En: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (Eds.), Actualización en Fisiología (pp. 429-439). Morelia.
- Álvarez-Buylla, R., y Álvarez-Buylla, E. (1988). Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. Respiratory Physiology, 72, 347-360.
- Álvarez-Buylla, R., y Álvarez-Buylla, E. de. (1990). Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. En: C. Eyzaguirre, S.J. Fidone, R.S. Fitzgerald, S. Lahiri y D.M. McDonald (Eds.), Arterial Chemoreception, (pp. 330-336) New York: Springer-Verlag

•

Álvarez-Buylla, R., Álvarez-Buylla, de ER., Mendoza, H., Montero, S.A., y Álvarez-Buylla, A. (1997). Pituitary and adrenals are required for hyperglycemic reflex initiated by stimulation of CBR with cyanide. American Journal of Physiology, 272, R392-R399.

Álvarez-Buylla, R., y Bencosme, S.A. (1981). Reflex hypoglycemia initiated by insulin. Acta Fisiológica Latinoamericana, 31, 5-11.

Álvarez-Buylla, R., y Carrasco-Zanini, J.A. (1960). Conditioned reflex which reproduces the hypoglycemic effect of insulin. Acta Fisiológica Latinoamericana, 10, 153-158.

Álvarez-Buylla, R., Huberman, A., Montero, S., Lemus, M., Valles, V., y Roces de Álvarez-Buylla, E. (2003). Induction of brain glucose uptake by a factor secreted into cerebrospinal fluid. Brain Research, 994, 124-133.

Álvarez-Buylla, R., Quintanar-Stephano, A., Quintanar-Stephano, J.L, y Álvarez-Buylla de, E.R. (1991). Removal of the unfragmented pituitary gland (hypophysectomy) in the rat. Boletín del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Méx.), 39, 33-38.

Álvarez-Buylla, R., y Roces de Álvarez-Buylla, E. (1975). Hypoglycemic conditioned reflex in rats: preliminary study of its mechanism. Journal Comparative Physiology and Psychology, 88, 155-160.

Álvarez-Buylla, R., y Roces de Álvarez-Buylla, E. (1994). Changes in blood glucose concentration in the carotid body-sinus modify brain glucose retention. Brain Research, 654, 167-170.

Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., y Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proceedings of the National Academy of Science, 74, 3203-3207

•

- Atkinson, L., Batten, TF, Corbett, EK, Sinfield, JK, y Deuchars, J. (2003). Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus of the solitary tract in relation to vagal afferent inputs. Neuroscience, 118, 115-22.
- Bairam, A., y Lajeunesse, Y. (2003). Concomitant effect of acetylcholine and dopamine on carotid chemosensory activity in catecholamine depleted cats. Advances in Experimental Medicine and Biology, 536, 337-343.
- Balon, T.W., y Nadler, J.L. (1994). Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. Journal of Applied Physiology, 77, 2519-2521.
- Balon, T.W., y Nadler, J.L. (1997). Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, 82, 359-363.
- Baskin, D.G., Figlewicz, D.P., Woods, S.C., Porte, D., y Dorsa, D.M. (1987). Insulin in the brain. Annual Review of Physiology, 49, 335-347.
- Bernard, M.C., Lecons sur systieme nerveux. In, Balliere, Paris, 1857, pp. 549-555.
- Bian, K. y Murad, F. (2003). Nitric oxide (NO) biogeneration, regulation, and relevance to human diseases. Frontiers in Biosciences, 8, 264-278.
- Bingham, E.M., Hopkins, D., Smith D., Pernet, A., Hallett, W., Reed, L., Marsden, P.K., y Amiel, S.A. (2002). The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. Diabetes, 51, 3384-3389.
- Bolanos, J.P., y Almeida, A, (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. Biochemical and Biophysical Acta, 1411, 415-36.
- Brown, C.G. (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. Biochemical and Biophysical Acta, 1411, 351-369.
- Brunton, T.L. (1867). Use of nitrite of amyl in angina pectoris. Lancet, 2, 97-98.
- Buerk, D.G., Iturriaga, R., y Lahiri, S. (1994). Testing the metabolic hypothesis of O₂ chemoreception in the cat carotid body in vitro. Journal of Applied Physiology, 76, 1317-23.

•

- Buerk, D G., y Lahiri, S. (2000). Evidence that nitric oxide plays a role in O₂ sensing from tissue NO and PO₂ measurements in cat carotid body. Advances in Experimental Medicine and Biology, 475, 337-347.
- Butler, A.R., Flitney, F.W., y Williams, D.L. (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. Trends in Pharmacological Sciences, 16, 18-22.
- Cadenas, J.L. (2003). Papel del óxido nítrico en la retención de glucosa cerebral post-estimulación de los receptores carotídeos con cianuro de sodio en ratas. Tesis de Maestría, CUIB, Universidad de Colima.
- Cadenas, J.L., Montero, S.A., Álvarez- Buylla, E. R., y Álvarez- Buylla, R. (2006). Papel del óxido nítrico en la retención de glucosa cerebral post-estimulación de los receptores carotídeos con cianuro de sodio en ratas. Archivo Médico de Camagüey, 10, 1025-0255.
- Cassina, A., y Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Archives of Biochemistry and Biophysics, 328, 309-16.
- Chapman, ME, y Wideman, RF (2006) Evaluation of total plasma nitric oxide concentrations in broilers infused intravenously with sodium nitrite, lipopolysaccharide, aminoguanidine, and sodium nitroprusside. Poultry Science, 85,312-320.
- Chen, I. L., Weber, J. T., y Yates, R. D. (1994). Synaptic connections of central carotid sinus afferents in the nucleus of the tractus solitarius of the rat. II. Connections with substance P-immunoreactive neurons. Journal of Neurocytology, 23, 313-322.

•

- Chugh, D. K, Katayama, M., Mokashi, A., Debout, D. E., Ray, D. K., y Lahiri, S. (1994). Nitric oxide-related inhibition of carotid chemosensory activity in the cat. Respiratory Physiology, 97, 147-152.
- Cidad, P., Garcia-Nogales, P., y Almeida, A. (2001). Expression of glucose transporter GLUT3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide. Journal of Neurochemistry, 79, 17-24.
- Cidad, P., Almeida, A., y Bolanos, JP. (2004) Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3- mediated glucose uptake through 5-AMP- activated protein kinase. Biochemical Journal, 384, 629- 636.
- Ciriello, J., Hryciyshyn, A. W., y Calaresu, F. R. (1981). Horseradish peroxidase study of brain stem projections of carotid sinus and aortic depressor nerves in the cat. Journal of Autonomic Nervous System, 4, 43-61.
- Cochran, W.G., y Cox, G.M. (1962). Experimental Designs in Statistics. USA: Wiley Public.
- Cruz, N., y Diemel, G. (2002). High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 22, 1476-1489.
- Cryer, P.E. (1983). Coordinated responses of glycogenic hormones to central glucopenia: the role of the sympathoadrenal system. Advances in Metabolic Disorders, 10, 469-483.
- Cunningham, E.T., y Sawchenko, P.E. (1988). Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. Journal of Comparative Neurology, 274, 60-76.
- Duelli, R., Maurer, M.H., Staudt, R., Heiland, S., Duembgen, L., y Kuschinsky, W. (2000). Increased cerebral glucose utilization and decreased glucose transporters Glut1 during chronic hyperglycemia in rat brain. Brain Research, 858, 338-347.

•

- Elliott, S.J. (1996). Peroxynitrite modulates receptor-activated Ca²⁺ signaling in vascular endothelial cells. American Journal of Physiology, 270, 954-961.
- Elliott, S.J., Lacey, D.J., Chilian, W.M., y Brzezinska, A.K.. (1998). Peroxynitrite is a contractile agonist of cerebral artery smooth muscle cells. American Journal Physiology, 275: 1585-91.
- Etgen, G. J Jr., Fryburg, D.A., y Gibbs, E.M. (1997). Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction and phosphatidylinositol-3 kinase-independent pathway. Diabetes, 46, 1915-1919.
- Eyzaguirre, C., y Zapata, P. (1984). Perspectives in carotid body research. Journal of Applied Physiology, 57, 931-957.
- Ferguson A.V, y Washburn D.L. (1998). Angiotensin II: a peptidergic neurotransmitter in central autonomic pathways. Progress in Neurobiology, 54:169-92.
- Fernández, A., Abudara, V., y Morales, F. (1999). El óxido nítrico como neurotransmisor y neuromodulador. Actas de Fisiología, 5, 39-77.
- Fiddler, R.M. (1977). Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. Journal of Association of Analytical Chemistry, 60, 594-599.
- Finley, J.C., y Katz, D.M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. Brain Research, 572, 108-116
- Forsyth, R.J. (1996). Astrocytes and the delivery of glucose from plasma to neurons. Neurochemistry International, 28, 231-241.
- Fray, A. E., Forsyth, R.J., Boutelle, M.G., y Fillenz, M. (1996) The mechanism controlling physiologically stimulated changes in rat brain glucose and lactate: a microdialysis study. Journal Physiology ,496, 49-47.
- Frohman, L. (1983). CNS peptides and glucoregulation. Annual Reviews of Physiology, 45, 95-107

•

- Furchgott, R. F. (1984). The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 24, 175-197.
- Gallego, R., Eyzaguirre, C., y Monti-Bloch, L. (1979). Thermal and osmotic responses of arterial receptors. Journal of Neurophysiology, 42, 665-680.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., y Chess-Williams R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. Nature, 336, 385-388.
- Ghafourifar P., y Cadenas E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends in Pharmacological Sciences, 26:190-195.
- Gibson, A., Mirzazadeh, S., Hobbs, A.J., y Moore, P.K. (1990). L-NG-monomethyl-nitro-arginine and L-NG-nitro-arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus. British Journal of Pharmacology, 99, 602-606.
- Gillespie, J.S., Liu, X.R., y Martin, W. (1989). The effects of L-arginine and L-NG-monomethylnitro-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. British Journal of Pharmacology, 98, 1080- 1082.
- Giulivi, C. (1998). Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. Biochemical Journal, 332,673-679.
- Glowinski J., y Iversen L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. Journal of Neurochemistry, 13, 655-669.
- González C, Rocher A., y Zapata P (2003). Quimiorreceptores arteriales: mecanismos celulares y moleculares de las funciones adaptativa y homeostática del cuerpo carotídea. Revista de Neurología (Esp.), 36, 239-254.
- Granger, D.L., Traintor, R.R., Boockvar, K.S., y Hibbs, J.B. (1995). Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. Methods, 7 78-85.

- Green, I.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S, y Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and 15 N nitrate in biological fluids Analytical Biochemistry, 126, 131-138.
- Grimes, P.A., Lahiri, S., Stone, R., Mokashi, A. y Chug, D. (1994). Nitric oxide synthase occurs in neurons and nerve fibers of the carotid body. Advances in Experimental Medicine and Biology, 360, 221-224
- Gruetter, C.A., Barry, B.K., McNamara, D.B., Gruetter, D.Y., Kadowitz, P.J., y Ignarro, L. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and carcinogenic nitrosamine. Journal of Cyclic Nucleotide Research, 5, 211-224.
- Hai-lei, D., y Hai-feng, Z. (2005). Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. Acta Pharmacologica Sinica, 26, 315-322.
- Harris, M.C. (1979). Effects of chemoreceptors and baroreceptors stimulation on the discharge of hypothalamic supraoptic neurones in rat, Journal of Endocrinology, 82, 115-125.
- Hasselbach, S. G., Knudsen, G. M., Videbaek, C., Pinborg, L. H., Schmidt, J. F., Holm, S., y Paulson, O. B. (1999). No effect of insulin on glucose blood-brain barrier transport and cerebral metabolism in humans. Diabetes. 48, 1915-21.
- Heinzen, E.L., y Pollack, GM. (2002). Use of an electrochemical nitric oxide sensor to detect neuronal nitric oxide production in conscious, unrestrained rats. Journal of Pharmacology and Toxicology Methods, 48, 139-146.
- Hems, D.A., Rodriguez, L.M., y Whitton, P.D. (1978). Rapid stimulation by vasopressin, oxytocin and angiotensin II of glycogen degradation in hepatocyte suspensions. Biochemistry Journal, 172, 311-317.
- Hertz, M.M., y Paulson, O.B. (1983). Glucose transfer across the blood-brain barrier. Advances in Metabolic Disorders, 10, 327-67.

•

- Hevel, J.M., y Marletta, M. A. (1994). Nitric-oxide synthase assays. Methods of Enzymology, 23, 250-258.
- Higaki, Y., Hirshman, M.F., Fujii, N., y Goodyear, L.J. (2001). Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. Diabetes, 50, 241-247.
- Houssay, B.A. (1951). The Hypophysis. En B.A. Houssay, J.T. Lewis, O. Orías, V.G. Foglia y L.F. Leloir (Eds.), Human Physiology (pp. 539-565). McGraw-Hill.
- Houssay, B.A., y Biasotti, A. (1931). The hypophysis, carbohydrate metabolism and diabetes, Endocrinology, 15, 511-523.
- Houssay, B.A., y Magenta, M.A. (1924). Sensibilidad de los perros hipofisoprivos a la insulina, Revista de la Sociedad Médica Argentina, 37, 189-193.
- Hudson, L.C., Hughes, C.S., Bold-Fletcher, N.O., y Vaden, S.L. (1994). Cerebrospinal fluid collection in rats: modification of a previous technique. Laboratory Animal Science, 44, 358-361.
- Hunter, C.J., Blood, A.B., White, C.R., Pearce, W.J., y Power, G.C. (2003). Role of nitric oxide in hypoxic cerebral vasodilatation in the ovine fetus. Journal of Physiology, 549, 625-633.
- Hoyer, S. (2003). Memory function and brain glucose metabolism. Pharmacopsychiatry, 36, 562-567.
- Ignarro L.J., Byrns, R.E., y Wood K.S. (1988). Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. En: P. M. Vanhoutte (Ed), Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium, (pp. 427-43). New York: Raven Press.
- Ignarro, L.J., Lipton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz P.J., y Gruetter C.A. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 218, 739-749.

•

- Iturriaga, R., Alcayaga J., y Rey, S. (1998). Sodium nitroprusside blocks the cat carotid chemosensory inhibition induced by dopamine, but not that by hyperoxia. Brain Research, 799, 26-34.
- Iturriaga, R., Mosqueira, M., y M., Villanueva, S. (2000) Effects of nitric oxide gas on cat carotid body chemosensory response to hypoxia. Brain Research, 855, 282-286.
- Iturriaga, R., Villanueva, S., y Mosqueira, M. (2000). Dual effects of nitric oxide on cat carotid body chemoreception. Journal of Applied Physiology, 89, 1005-1012.
- Jordan, D., y Spyer, K.M. (1986). Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. Brain Research, 67, 295-314.
- Jobgen, W.S., Fried, S.K., Fu, W.J., Meininger, C.J., y Wu G. (2006) Regulatory role for the arginine - nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. Journal of Nutritional Biochemistry, 17, 571- 588.
- Kadekaro, M. (2004) Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37, 441-450.
- Kadekaro, M., Terrell, M. L., Liu, H., Gestl, S., Bui, V., y Summy-Long, J.Y. (1998). Effects of L-NAME on cerebral metabolic, vasopressin, oxytocin, and blood pressure responses in hemorrhaged rats. American Journal of Physiology, 274, R1070-R1077.
- Kadekaro, M., Timo-Laria, C., y Vincentini, M.de L. (1980). Gastric secretion provoked by functional cytoglucoopenia in the nuclei of the solitary tract in the cat. Journal of Physiology (Lond), 299, 397-407.
- Kadish, A.H., Little, R.L., y Sternberg, J.C. (1968). A new and rapid method for determination of glucose by measurement of rate of oxygen consumption. Clinical Chemistry, 14, 116-120.
- Kahn, N.N., Acharya, K., Bhattacharya, S., Acharya, R., Mazumder, S., Bauman, W. A., y Sinha, A. K. (2000). Nitric oxide: the "second messenger" of insulin. IUBMB Life, 49, 441-50.

•

- Katayama, M., Chug, D., Mokashi, A., Ray, D., Bebout, E., y Lahiri S. (1994). NO limits O₂ in the carotid body chemoreception. Advances in Experimental Medicine and Biology, 360, 225-227.
- Kameda, Y. (2006). Dual origins of the mouse carotid body revealed by targeted disruption of *hoxa3* and *mash1*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 580, 93-97.
- Kc, P, Haxhiu, M.A., Tolentino-Silva, F.P., Wu, M., Truth, C.O., y Mack, S.O. (2002). Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites. Respiratory Physiology and Neurobiology, 23, 75-88.
- Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochemical et Biophysica Acta, 1411, 273-289.
- Kelm, M., y Schrader, J. (1988) Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. European Journal of Pharmacology, 155: 317-321.
- Kelm, M, Preik-Steinhoff, H., Preik, M., y Trauer, B. E. (1999). Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. Cardiovascular Research, 41, 765-772.
- Keppens, S., y De Wulf, H. (1979). The nature of the hepatic receptors involved in vasopressin-induced glycogenolysis. Biochemical et Biophysica Acta, 588, 63-69.
- Kety, S.S., Polis, B.D., Nadler, C.S., y Schmidt, C.F. (1948). Blood flow and oxygen consumption of the human brain in diabetic acidosis. Journal of Clinical Investigation, 27, 500-510.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S. y Stamler, J.S. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. Nature, 372, 546-8
- .

•

- Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J.L., Reid, M.B., y Stamler, J.S. (1995). Endothelial-type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochemical and Biophysical Research Communications, 211, 375-81.
- Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F., y Friebe, A. (2004). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. Neurochemistry International, 45, 813-819
- Koyama, Y., Coker, R.H., Stone, E.E., Lacy, D.B., Jabbour, K., y Williams, E. (2000) Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. Diabetes, 49, 1434-1442.
- Kumura, E., Kosaka, H., Shiga, T., Yoshimine, T., y Hayakawa, T. (1994) Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 14, 487-491.
- Kuriyama, K., y Ohkuma, S. (1995). Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. Japanese Journal of Pharmacology, 69, 1-8.
- Lahiri, S., y Buerk. (1998). Vascular and metabolic effects of nitric oxide synthase inhibition evaluated by tissue PO₂ measurements in carotid body. Advances in Experimental Medicine and Biology, 454, 455-460.
- Lautala, P., y Martin, J.M. (1981). Glucose metabolism in rat hypothalamus. Acta Endocrinologica, 98, 481-487.
- LeMay, D.R., Gehua, L., Zelenock, G.B., y D'Alecy, L.G. (1998) Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. Stroke, 11, 1411-9.
- Levin B.E. (2001). Glucosensing neurons do more than just sense glucose. International Journal Obesity and Related Metabolic Disorders, 5, S68-S72.
- Levin, B. E., Routh, V. H., Ling, K., Sanders, N. M., y Dunn-Meynell, A. (2004). Neural glucosensing What do we know after 50 years? Diabetes, 53, 2521-2528.

- Li, C.G., y Rand, M.J. (1989). Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. Clinical Experimental Pharmacology and Physiology, 16, 933-938.
- Li, J., Hu, X., Selvakumar, P., Russell III, R.R., Cushman, S.W., Holman, G.D., y Young, L.H. (2004). Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. American Journal of Physiology, 287, E834-41
- Lin, Y.F., Raab-Graham, K., Jan, Y.N., y Jan, L.Y. (2004). NO stimulation of Atp-sensitive potassium channels: Involvement of Ras/mitogen-activated protein kinase pathway and contribution to neuroprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101, 7799-7804.
- López-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. Current Opinion on Neurobiology, 13, 493-9.
- Lund-Andersen, H. (1979). Transport of glucose from blood to brain. Physiological Reviews, 59, 305-352.
- Martin, R.L., Lloyd, H.C., y Cowan, A.I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?. Trends in Neuroscience, 6, 251-257.
- Masters, B.A., Shemer, J., Judkins, J.H., Clarke, D.W., LeRoith, D., y Raizada, M.K. (1987). Insulin receptors and insulin action in dissociated brain cells. Brain Research, 417, 247-253.
- Magistretti, P., y Pellerin, L., (1999). Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain. News in Physiological Sciences, 14, 177-182.
- Mandalá, M., Heppner, T. J., Bonev, A. D. y Nelson, M. T. (2007) Effect of endogenous and exogenous nitric oxide on calcium sparks as targets for vasodilation in rat cerebral artery. Nitric Oxide, 16, 104-109.

-
- Mei, J. M., Chi, W.M., Trump, B.F., y Eccles, C.U. (1996) Involvement of nitric oxide in the deregulation of cytosolic calcium in cerebellar neurons during combined glucosa-oxygen deprivation. Molecular Chemical Neuropatology, 27, 155-166.
- Miki, N., Kawabe, Y. Kuryama, K. (1977). Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. Biochemical and Biophysical Research Communications, 75, 851-856.
- Mishra ,O P. P. , Mishra, R. Ashraf, Q. M. Y Delivoria- Papadoupoulos. (2006) Nitric oxide- medaited mechanism of neuronal nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase expression during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. Neuroscience, 140, 857- 863.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. y Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacological Reviews, 43, 109-142.
- Montero, S. (1993). Participación de los receptores senocarotídeos en la regulación de glucosa y su retención encefálica en ratas Tesis de maestría no publicada. Universidad de Colima, Facultad de Medicina, Colima.
- Montero, S. (1998). Mediadores efectores en la respuesta hiperglucemiante a la estimulación de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo con cianuro en ratas. Tesis doctoral no publicada. Universidad de Colima, CUIB, Colima.
- Montero, S., Mendoza, H., Valles, V., Lemus, M., Álvarez- Buylla, E., y Álvarez- Buylla, R. (2006). Arginine-vasopressin role in the hyperglycemic reflex and brain glucosa regulation after carotid body receptors (CBR) stimulation in rats. Jornal of Applied Physiology, 6, 1902-1909.
- Montero, S., Cadenas, JL., Lemus, M., Álvarez- Buylla, E., y Álvarez- Buylla, R. (2006).Nitric oxide in brain glucose retention after carotid body receptors stimulation with cyanide in rats. Advances in Experimental Medicine and Biology, 580, 293- 300.

- Montero, S., Yarkov, A., y Álvarez-Buylla, R., (2000). Carotid chemoreceptors participation in brain glucose regulation: role of arginine-vasopressin, Advances in Experimental Medicine and Biology, 475, 749-760.
- Mulligan, E., Lahiri, S., y Storey, B.T. (1981). Carotid body O₂ chemoreception and mitochondrial oxidative phosphorylation. Journal of Applied Physiology, 51, 438-46.
- Murrel, W. (1879). Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. Lancet, 1, 80-81.
- Nijima, A. (1986). Neural control of blood glucose level. Japanese Journal of Physiology, 36, 827-841.
- Nosaka, S., Murase, S., Murata, K., y Inui, K. (1995). Aortic baroreceptor neurons in the nucleus tractus solitarius in rats: convergence of cardiovascular inputs as revealed by heartbeat-locked activity. Journal of the Autonomic Nervous System, 55, 69-80.
- Obici, S., Zhang, B.B, Karkanas, G., y Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. Natural Medicine, 8,1376-1382.
- O'Brien, C., Kelly, P., y Ritchie, I. (1997). Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthase on ocular blood flow and glucose metabolism in the rat. British Journal of Ophtalmology, 81, 68-71.
- Okamoto, H., y Accili, D. (2003). In vivo mutagenesis of the insulin receptor. Journal Biological Chemistry, (En prensa).
- Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V., Terenina, N.B., Toltenskov, O.O., y Gustafsson, M.K. (2005). The effect of a nitric oxide donor on the synthesis of cGMP in hymenolepsis diminuta: a radiometric study. Parasitology Research, 95, 22-24.
- Oomura, Y. (1983). Glucose as a regulator of neuronal activity. En: A.J. Szabo (Ed.) Advances in Metabolic Disorders (pp. 31-65). New York Academic Press .
- Palmer, R.M. J., Ashton, D.S., y Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature, 333, 664-666.

- Pardal, R., y López-Barneo, J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. Nature Neuroscience, 5, 197-198.
- Prabhakar, N.R. (1999). NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. Respiratory Physiology, 115, 161-168.
- Prabhakar, N.R. (2000). Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. Journal of Applied Physiology, 88, 2287-2295.
- Prabhakar, N. R., y Kou, Y. R. (1994). Inhibitory sympathetic action on the carotid body responses to sustained hypoxia. Respiratory Physiology, 95, 67-79.
- Prabhakar, N.R., Kumar, G.K., Chang, C.H, Agani, F.H., y Haxhiu, M.A. (1993). Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. Brain Research, 625, 16-22.
- Prabhakar, N.R., Pieramici S.F., PremKumar, D.R., Kumar, G.K., y Kalaria, R.N. (1996). Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. Brain Research, 43, 341-346.
- Porte ,D., Baskin ,D.G., y Schwartz, M.W. (2005) Perspectives in diabetes, insulin signaling in the central nervous system. A critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to human. Diabetes, 54, 1264-1276
- Portilla, E. (2005) Papel de la fuerza cortante y vasoactivos endoteliales en la regulación del consumo de oxígeno sistémico. Tesis de Doctorado, CUIB, Universidad de Colima.
- Quian, Q., Williams, J.P., Karounos, D.G., y Ozcan, S. (2005) Nitric oxide stimulates insulin release in liver cells expressing human insulin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 329, 1329-1333.
- Rand, M.J., y Li, C.G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves : Nature of transmitter and mechanism of transmission. Annual Review of Physiology, 57, 659 - 682.
- Ricardo, J.A., y Koh, E.T. (1978). Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. Brain Research, 153, 1-26.

- Rivier, C. (2003). Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxemia. Annals of the New York Academy of Sciences, 992, 72-85.
- Roberts, C.K., Barnard, R.J., Scheck, S.H., y Balon, T.W. (1997). Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. American Journal of Physiology, 273, 220-225.
- Rodrigo, J., Fernandez, A.P., Alonso, D., Serrano, J., Fernandez-Vizarra, P., Martinez Murillo, R., Bentura, M.L., y Martinez, A. (2005). Nitric oxide in the rat cerebellum after hypoxia/ischemia. Journal of Nuclear Medicine. 46, 365-370.
- Rodriguez-Reynoso, S., Leal, C., Portilla, E., Olivares, N., y Muñiz, J. (2001). Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alfa and nitric oxide. Journal of Surgical Research, 100,141-149.
- Rohner-Jeanrenaud, F., Bobbioni, E., Ionescu, E., Sauter, J.E., y Jeanrenaud, B. (1983). Central nervous system regulation of insulin secretion. En: A.J. Szabo (Ed.). Advances in Metabolic Disorders (pp. 193-220). Annals of the New York Academy of Science.
- Ruderman, N.B., y Gooman, M.N. (1980). Brain metabolism in diabetes. Hormone. Metabolic. Research, (Suppl) 9, 1-8.
- Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G., y Leclerc, I. (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. Biochemical Journal, 375, 1-16.
- Salinas, J.A., y Gold, P.E. (2005). Glucose regulation of memory for reward reduction in young and aged rats. Neurobiology of Aging, 26, 45-52.
- Sato, M., Ikeda, I., Yoshizaki, K., y Koyano, H. (1991). Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells of newborn rabbit carotid body. Brain Research, 551, 327-330.
- Schulz, R., Kelm, M., y Heusch, G. (2004). Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc Research,61, 402-413.

- Seaquist, E. R., Damberg, G.S., Tkac, I., y Grueter, R. (2001). The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport/metabolism in humans. *Diabetes*, 50, 2203-2209.
- Seydoux, J., Brunsmann, B., Jeanrenaud, B., y Girardier, L. (1979). Sympathetic control of glucose output of mouse liver perfused in situ, *American Journal of Physiology*, 236, E323-E327.
- Shankar, R., Zhu, J.S., Ladd, B., Henry, D., Shen, H.Q., y Baron, A.D. (1998). Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action, *Journal of Clinical Investigation*, 102, 1403-1412.
- Share, L., y Levy, M. N. (1966). Effect of carotid chemoreceptor stimulation on plasma antidiuretic hormone titer. *American Journal of Physiology*, 210, 157-161.
- Shibata, M., Araki, N., Hamada, J., Sasaki, K., Shimazu, K., y Fukuuchi, Y. (1996) Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 734, 86-90.
- Siesjo, B. K. (1978). *Brain Energy Metabolism*, New York: Wiley,
- Sokoloff, L. (1984). Mapping local functional activity by measurement of local cerebral glucose utilization in the central nervous system of animals and man. En: *The Harvey Lectures* (pp. 77-143).
- Sokoloff, L. (1991). Measurement of local cerebral glucose utilization and its relation to local functional activity in the brain. En: M. Vranic and et al. (Eds.) *Fuel Homeostasis and the Nervous System* (pp. 21-42). New York, Plenum Press
- Stea, A., y Nurse, C.A. (1991). Whole cell and perforated patch recordings from =2-sensitive rat carotid body cells grown in short and long term culture. *Pflügers Archives*, 418, 93-101.
- Sugimoto, Y., Yamada, J., Yoshikawa, T., y Horisaka, K. (1997). Inhibitory effects of nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on 2-deoxy-D-glucose-induced hyperglycemia in rats. *Biological and Pharmacological Bulletin*, 20, 1307-1309.

- Suzuki M., Nishina M., Nakamura S., y Maruyama K. (2004). Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors in the commissural subnucleus of the NTS are involved in the carotid chemoreceptor reflex in rats. Autonomical Neuroscience, 27, 110, 108-13.
- Swanson, L.W., y Kuypers, H.G. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. Journal of Comparative Neurology, 194, 555-570.
- Tabata, M., Kurosawa, H., Kikuchi, Y. Hida, W., Ogawa, H., Okabe, S., Tun, Y., Hattori, T., y Shirato, K (2001). Role of GABA within the nucleus tractus solitarii in the hypoxic ventilatory decline of awake rats. American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 281, R1411-9
- Takahashi, S., Cook, M., Jehle, J., Kennedy, C., y Sokoloff, L. (1995). Lack of effects of inhibition of nitric oxide synthesis on local glucose utilization in the rat brain. Journal of Neurochemistry, 65, 414-419.
- Tanaka, T., Nakatani, K., Morioka, K., Urakawa, H., Maruyama, N., Ki Araki-Sasaki, R., Hori, Y., Gabazza, E.C., Yano, Y., Wada, H., y Nobori, Y., (2003) Nitric oxide stimulates glucose transport through insulin-translocation in 3T3-L1 adipocytes. European Journal Endocrinology, 149, 61-67.
- Tong Y.C., Wang C.J., y Cheng J.T. (1997). The role of nitric oxide in the control of plasma glucose concentration in spontaneously hypertensive rats. Neuroscience Letters, 233, 93-96.
- Trzebski, A., Sato, Y., Susuki, A., y Sato A. (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates the responsiveness of carotid chemoreceptors to systemic hypoxia in the rat. Neuroscience Letters, 190, 29-33.

- Tuzgen, S., Tanriover, N., Uzan, M., Tureci, E., Tanriverdi, T., Gumustas, K., y Kuday, C. (2003). Nitric oxide levels in rat cortex, hippocampus, cerebellum, and brainstem alter impact acceleration head injury. Neurological Research, 25, 31-34.
- Vincent, S.R. (1995). Nitric Oxide in the Nervous System. Vincent, S.R. (Ed). New York: Academic Press.
- Wang, Z. Z., Stensaas, L.J., Bredt, D.S., Dinger, B.G., y Fidone, S.J. (1994). Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body. Neuroscience, 60, 275-286.
- Wang, Z.Z., Stensaas, L.J., Dinger, B.G., y Fidone, S.J. (1995). Nitric oxide mediates chemoreceptor inhibition in the cat carotid body. Neuroscience, 65, 217-29.
- Wiklund, N.P., Cellek, S., Leone, A.M., Iversen, H.H., Gustafsson, L.E., Brundin, L., Furst, V.W., Flock, A., y Moncada, S. (1997). Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. Journal of Neuroscience Research, 47, 224-232 .
- Wu C, Fujihara H, Yao J, Qi S, Li H, Shimoji K., y Baba H. (2003). Different expression patterns of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax proteins after sublethal forebrain ischemia in C57Black/Crj6 mouse striatum. Stroke, 34, 1803-1808.
- Wurtman, R.J., Casper, A., Pohorecky, L.A., y Bartter, F.C. (1968). Impaired secretion of epinephrine in response to insulin among hypophysectomized dogs. Proceedings of the National Academy of Science (USA), 61, 522-528.
- Yamaguchi, K., y Hama, H. (2003). A study on the mechanism by which sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, applied to the anteroventral third ventricular region provokes facilitation of vasopressin secretion in conscious rats. Brain Research, 968, 35-43.
- Yarkov, A., Montero, S., Lemus, M., Roces de Álvarez-Buylla, E., y Álvarez-Buylla, R. (2001). Arginine-vasopressin in nucleus of the tractus solitarius induces hyperglycemia and brain glucose retention. Brain Research, 902, 212-222.

-

Young. E.M, Radda, G.K, y Leighton, B. (1997) Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. Biochemical Journal, 322, 223-228.

Zou, M.H., y Bachschmid, M. (1999). Hypoxia-reoxygenation triggers coronary vasospasm in isolated bovine coronary arteries via tyrosine nitration of prostacyclin synthase. Journal of Experimental Medicine, 190, 135-139.