

# Efectos de los lípidos de la dieta en la contracción vascular y la concentración de derivados del óxido nítrico en plasma de ratas

Candelaria Alfonso-Pérez<sup>1</sup>, Holger Ortiz<sup>2</sup>, Miguel Rodríguez<sup>3</sup>, Juan De Sanctis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Profesores Agregado. Sección de Investigaciones Cardio-Renales, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina. UCV

<sup>2</sup>Profesor Agregado. Cátedra de Bioquímica, Escuela de Enfermería, Facultad de Medicina, UCV. Adscrito al Instituto de Medicina Experimental. UCV

<sup>3</sup>Profesor Agregado. Cátedra de Farmacología, Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina

<sup>4</sup>Profesor Asociado. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina. UCV

Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela

Candelaria Alfonso. Instituto de Medicina Experimental, Sección de Investigación Cardio-Renales. Facultad de Medicina. UCV. alfonsoc@ucv.ve. No hay separatas disponibles.

Agradecimiento: Este trabajo fue financiado parcialmente por el CDCH-UCV, mediante los proyectos N° 09.33.5385.04 y 09.00.5704.04

Recibido: 12/5/2007

Aceptado: 02/10/2007

## Resumen

Determinamos el efecto de los lípidos de la dieta en la contracción de anillos de aorta y en la concentración de derivados del NO• en el plasma. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos alimentadas por 6 semanas con una de las 3 dietas: ratarina, ratarina más 5% de aceite de soya ó ratarina más 5% de aceite de oleína de palma + soya. Anillos de aorta torácica se fijaron en un baño de superfusión y se determinó el porcentaje de fuerza de contracción a dosis crecientes de norepinefrina ( $1 \times 10^{-10}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$  M). Se analizaron los nitritos, nitratos y nitrotirosina como derivados del NO•. La dieta con oleína+soya presentó el mayor porcentaje del ácido graso C18:1,n-9 y el grupo que la ingirió presentó el menor porcentaje de la fuerza de contracción, la mayor concentración de nitrotirosina y menor concentración de nitratos en el plasma ( $p<0,05$ ). Concluimos que el tipo de aceite vegetal ingerido modula la vasoconstricción aórtica y modifica la concentración de derivados del NO• que está relacionado con el estrés oxidativo.

131

**Palabras claves:** Oleína, aorta, nitrotirosina, rata

## Introducción

En los humanos, los lípidos de la dieta modifican el riesgo cardiovascular, posiblemente porque los ácidos grasos con diferente grado de instauración y número de carbonos modulan la función vascular. El ácido linolénico (C18:3,n-3) en relación al ácido esteárico (C18:0) produjo menor inhibición de la relajación dependiente del endotelio en anillos de aorta; mientras que, los ácidos grasos incrementan la inhibición con el aumento de número de carbonos, desde C12:0 hasta C18:0<sup>1</sup>. En cultivos de células endoteliales arteriales del pulmón de porcino, el ácido linoleico en relación al ácido oleico, aumentó la concentración de nitrotirosina y la  $[Ca^{2+}]_i$ , con lo cual, Saraswathi y col (2004) relacionaron la  $[Ca^{2+}]_i$  con la respuesta inflamatoria en el tejido endotelial, ya que, el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  estimula la formación de óxido nítrico (NO•) sustancia vasodilatadora, que en presencia del radical superóxido ( $O_2^-$ ) forma peroxinitrilo (ONOO<sup>-</sup>)<sup>2</sup>. La nitración en residuos esenciales Tir294 y Tir295 de la SERCA2a (ATPasa  $Ca^{2+}$  del RS) inhibe la acción

## Abstract

We determined the effect of lipids diet in the aorta ring contraction and NO• derivatives in the plasma. Male rats Sprague-Dawley were fed during 6 weeks with one of the 3 diets: rat chow, rat chow more 5% of soy oil or rat chow more 5% of olein palm + soy oil. The aorta thoracic ring stuck at superfusion bath and percent of the contraction force to different doses from norepinephrine ( $1 \times 10^{-10}$  to  $1 \times 10^{-5}$  M) were determined. The NO• derivatives analyzed were nitrite, nitrate and nitrotyrosine. The diet with olein + soy presented the greater percentage of the fatty acid C18:1,n-9. The consumed of the olein + soy oil decrease the percent of the contraction force of aorta thoracic, increase the concentration of nitrotyrosine and decrease the concentration of nitrates in the plasma ( $p<0,05$ ). We concluded that the type of ingested vegetal oil modulates the aortic vasoconstriction and modifies the concentration of NO• derivatives, related to oxidative stress.

**Key words:** olein, aorta, nitrotyrosine, rat

enzimática en el músculo estriado, por lo tanto, la nitrotirosina en plasma es considerada un marcador del daño tisular agudo o crónico<sup>3</sup>. La nitrotirosina está relacionada con los procesos proinflamatorios, a través del factor nuclear Kappa-B (NF-κB) que activa genes relacionados con la formación de sustancias quimiotácticas, 1COX-2 y moléculas de adhesión<sup>4</sup>. Los lípidos parecen ser mediadores de la respuesta inmune; ya que, ratones de la cepa DC-1 sometidos a dietas deficientes de ácidos grasos esenciales fueron resistentes a sufrir diabetes inducida por estreptozotocina inyectada vía intraperitoneal en múltiples dosis por 5 días (40 mg/Kg de peso) con respecto a los ratones controles<sup>5</sup>. El transporte y utilización de los ácidos grasos en el músculo cardiaco, dependen en gran parte de la actividad metabólica del músculo. Los lípidos de la dieta producen cambios en el perfil de los ácidos grasos en los fosfolípidos, que podrían modular la actividad de receptores y canales iónicos de las membranas<sup>6</sup>.

En la pared arterial, los radicales libres del oxígeno se producen en las células del músculo liso y en los fibroblastos en respuesta a la angiotensina II, que estimula la actividad NADPH oxidasa de membrana y del endotelio<sup>7</sup>. Fridovich en 1978 señaló que los radicales del oxígeno se originan con la producción del O<sub>2</sub><sup>•</sup><sup>8</sup>. Una producción elevada de O<sub>2</sub><sup>•</sup> inactiva al NO<sup>•</sup>, pues al reaccionar producen ONOO<sup>-</sup><sup>9</sup>, que al aumentar su concentración nitrifica a las proteínas integrales y solubles, en los carbono 3 del anillo aromático de los residuos de L-tirosina cercano a un glutamato que se encuentra en la estructura externa de las proteínas, formando la nitrotirosina<sup>10</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de dietas enriquecidas con aceites de oleína+soya o soya en la fuerza de contracción a dosis crecientes de norepinefrina en la aorta de ratas, así como, en la producción de nitrotirosina, sustancia relacionada con los procesos inflamatorios.

## Métodos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos alimentadas por 6 semanas con una de las 3 dietas: ratarina (grupo control), ratarina más 5% de aceite de soya ó ratarina más 5% de aceite de oleína de palma + soya (N = 5 por grupo). Los animales en ayuno de 12 h fueron anestesiados vía intraperitoneal con thiopental sódico (50 mg/kg de peso). La muestra de sangre heparinizada se extrajo por la cola de la rata y se practicó toracotomía mediana. Se extrajo la aorta torácica y se colocó en cápsula de petri que contenía solución Krebs-Henseleit (NaCl 119 mM; KCl 4,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y Glucosa 11 mM), burbujeada con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>, pH 7,4 a 37 °C. Se eliminó los tejidos conectivo y adiposo adheridos a la pared externa de la aorta. Anillos de aorta 3 a 5 mm de longitud se colocaron en uno de los estribos conectado verticalmente en el fondo del baño de superfusión y el otro extremo al transductor de fuerza-desplazamiento FT0 3C (Grass instruments®) con un preamplificador Grass® modelo 7C. La tensión aplicada fue 2 g y se dejó estabilizar por 2 h, lavando cada 30 min con solución Krebs-Henseleit. Los registros de las contracciones isométricas se obtuvieron en un polígrafo Grass® modelo 7C a 2,5 mm/min. Se efectuó una prueba de respuesta de contracción a acetilcolina ( $1 \times 10^{-6}$  M) de la preparación precontraída con norepinefrina ( $1 \times 10^{-7}$  M) a fin de asegurar la presencia de endotelio. La preparación es lavada con solución Krebs-Henseleit y estabilizada por 30 min. Se determinó el porcentaje de fuerza de contracción a diferentes dosis de norepinefrina ( $1 \times 10^{-10}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$  M)<sup>11,12</sup>.

La concentración de nitrotirosina en plasma se determinó mediante una prueba de ELISA tipo sándwich<sup>13</sup>. La concentración de nitritos se determinó mediante el método colorimétrico de Griess con pequeñas modificaciones<sup>14</sup>. Los nitratos fueron reducidos a nitritos utilizando la enzima nitrato reductasa, para luego aplicar el método de Griess modificado<sup>14</sup>.

El porcentaje de ácidos grasos se analizó por cromatografía en fase gas-líquida, previa extracción de los lípidos con cloroformo-metanol en proporción 2:1 (v/v) y agua<sup>15</sup>. Como antioxidante se utilizó 10 mg de butil-hidroxi-tolueno (BHT)/100 ml de solvente. Los lípidos se transesterificaron a ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando 5 ml de la mezcla anhídrica metanol:tolueno:ácido sulfúrico en proporción 90:10:1 (v: v: v) en reflujo a 80 °C por 1 h. Los ésteres metílicos se extrajeron con 5 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con agua a 4 °C y se filtró sobre papel Whatman® número 1. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron en un cromatógrafo marca Hewlett-Packard® modelo 6890, con detector de llama, columna capilar de 30m x 0,25mm con INOWAX® de 0,25 µm a 200° C. La fase móvil fue H<sub>2</sub>. Los ésteres metílicos se identificaron utilizando el tiempo de retención de patrones Sigma®.

En la tabla N° 1 se observa el porcentaje de los ácidos grasos de las dietas suplementadas con 5 % de aceite de oleína+soya o de soya y del grupo sin suplemento de aceite (control). La dieta con oleína+soya presentó mayor porcentaje de ácido palmítico (C16:0) y ácido oleico (C18:1,n-9) respecto a la dieta con soya (p<0,05); mientras que el porcentaje del ácido linoleico (C18:2,n-6) fue mayor en la dieta con soya (p<0,05).

## Resultados

En la figura N° 1 se muestra el porcentaje de contracción de los anillos de aorta de rata, en respuesta a dosis creciente de norepinefrina. Los anillos de aorta del grupo oleína+soya presentaron menor porcentaje de contracción (p< 0,05) a dosis de norepinefrina entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M respecto a los grupos control y soya.

Tabla 1.- Porcentaje de los ácidos grasos en los lípidos de las dietas suplementadas con 5 % de diferentes aceites

Ácidos grasos	Control	Oleína + soya	Soya
C16:0	20,8 ± 0,7 a	22,2 ± 0,4 b	13,9 ± 0,4 a,b
C18:0	5,5 ± 0,7	3,4 ± 1,5	4,0 ± 0,9
C18:1,n-9	25,5 ± 1,2 a	38,2 ± 3,0 a,b	25,2 ± 1,0 b
C18:2,n-6	39,6 ± 1,2 b	33,7 ± 3,8 a	54,3 ± 0,6 a,b
C18:3,n-3	2,7 ± 0,7	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,9
C20:5,n-3	3,0 ± 0,9	Trazas	Trazas
C22:6,n-3	3,0 ± 0,9	Trazas	Trazas
Lípidos totales (%)	2,0 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,1

Letras iguales indican diferencias significativas de los porcentajes del mismo ácido graso entre los grupos, p <0,05. La dieta control contiene menor porcentaje de lípidos totales que las dietas suplementadas, p <0,05. Trazas < 0,8 %, N=3 para cada grupo, Media ± E.E.

En la figura N° 1 se muestra el porcentaje de contracción de los anillos de aorta de rata, en respuesta a dosis creciente de norepinefrina. Los anillos de aorta del grupo oleína+soya presentaron menor porcentaje de contracción (p< 0,05) a dosis de norepinefrina entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M respecto a los grupos control y soya.

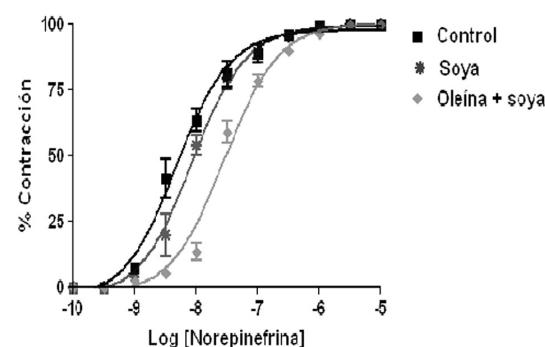


Figura 1.- Curva dosis - respuesta a la norepinefrina en anillos de aorta de rata con dietas suplementadas con 5 % de diferentes aceites. N = 5 para cada grupo. Media ± EE. Los anillos de aorta del grupo oleína+soya presentaron menor porcentaje de contracción (p< 0,05).

En la figura N° 2 se observa la concentración de nitrotirosina en el plasma de ratas con dietas suplementadas con 5 % de diferentes aceites. El grupo suplementado con aceite oleína+soya presentó aumento significativo ( $p<0,05$ ) de la nitrotirosina con respecto a los grupos control y soya. En la tabla N° 2 se reporta la concentración de nitritos y nitratos en plasma de ratas, el grupo suplementado con oleína+soya presentó menor concentración de nitratos respecto a los grupos control y soya ( $p<0,05$ ), pero no hay diferencia significativa ( $p>0,05$ ) en la concentración de nitritos.

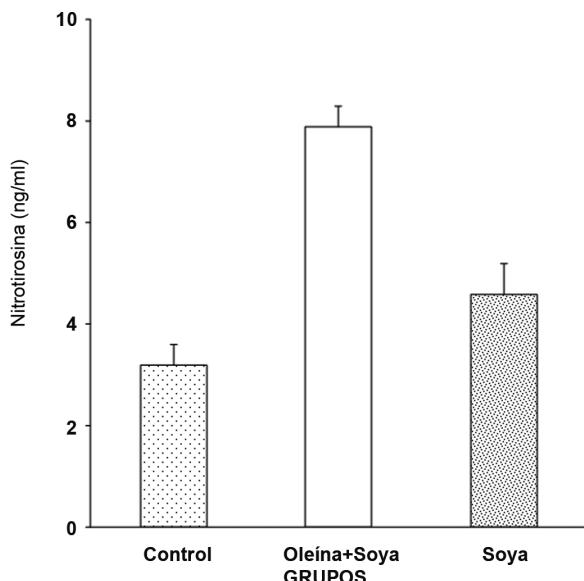


Figura 2.- Concentración de nitrotirosina en el plasma de ratas con dietas suplementadas con 5 % de diferentes aceites. N = 5 para cada grupo, Media ± EE. El grupo suplementado con 5 % de aceite oleína + soya presentó diferencia significativa ( $p<0,05$ ) con respecto a los grupos control y soya

**Tabla 2.- Nitritos y nitratos en plasma de ratas sometidas a dietas suplementadas con 5 % de diferentes aceites**

	Control	Oleína + soya	Soya
Nitritos	7,3 ± 0,3	5,7 ± 0,3	6,4 ± 0,2
Nitratos	23,2 ± 1,0 a	18,6 ± 0,5 a,b	22,2 ± 0,8 b
Total	30,6 ± 1,1 a	24,3 ± 0,4 a,b	28,5 ± 1,0 b

Letras iguales indican diferencias significativas para cada sustancia entre los grupos,  $p < 0,05$ . N=5 para cada grupo, Media ± EE. El grupo suplementado con 5% de aceite oleína + soya presentó menor concentración de nitratos respecto a los grupos control y soya ( $p<0,05$ )

## Discusión

En Venezuela, el tipo de aceite que se consume dependen de la disponibilidad en el mercado externo, estos aceites aportan ácidos grasos esenciales necesario para la salud, pero también, contienen ácidos grasos que pueden estar asociados con efectos adversos, ocasionando patologías cardiovasculares<sup>16,17</sup>. La formación de nitrotirosina está relacionada con el aumento de la producción de los radicales libres, que ocasionan oxidación de los lípidos de las membranas<sup>18</sup>. Los ácidos grasos desempeñan un papel relevante en la disfunción endotelial, sin embargo, el papel exacto de los diferentes ácidos grasos y sus mezclas, particularmente durante la fase inicial del daño endotelial no es bien conocido, no obstante, las dietas enriquecidas con ácidos grasos de la serie n-3 reducen el riesgo de desarrollar enfermedad cardio-

vascular<sup>19</sup>, en nuestros resultados el porcentaje de ácidos de la serie n-3 fue mayor en el grupo control cuyo origen puede ser la harina de pescado utilizada en la formulación de la dieta basal. La fracción de oleína del aceite de palma aportó el mayor porcentaje de ácido oleico en la dieta oleína+soya y posiblemente este ácido graso o el porcentaje relativo de los ácidos grasos está involucrado en la disminución de la contracción de los anillos de aorta, que se refleja en un desplazamiento de la curva dosis- respuesta hacia la derecha, con una DE50 de norepinefrina mayor. Además, Herrera y col. han demostrado que el aceite de oliva con alto contenido de ácido oleico contribuye a una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares en la región del mediterráneo<sup>20</sup>. Los efectos hipolipemiantes de las estatinas mejoran la función endotelial, entre otras razones, por incremento de la óxido nítrico sintetasa endotelial y por una reducción de la expresión de las moléculas de adhesión celular<sup>21</sup>. Cuando analizamos la acción de la hidralazina, un vasodilatador, se observó que el grupo soya disminuyó el efecto máximo de la contracción respecto al grupo control (resultados no publicados), la composición de los lípidos de la dieta modificó la respuesta a agentes vasodilatadores.

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son los productos finales del catabolismo del  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{ONOO}^-$  en la actividad microbiana<sup>22</sup> y en ciertas patologías. En muestras de líquido cefalorraquídeo, así como, en suero de pacientes con esclerosis múltiple se ha encontrado metabolitos del  $\text{NO}^\bullet$ <sup>23</sup>, también se ha reportado niveles altos de nitrotirosina con bajas concentraciones de nitratos y nitritos que varían con el estado y la actividad de la esclerosis múltiple<sup>24</sup>. No obstante, en nuestros resultados realizado en animales sanos, en el grupo oleína+soya encontramos mayor concentración de nitrotirosina (marcador citotóxico), con disminución significativa ( $p<0,05$ ) de la concentración de nitratos en el plasma, respecto a los grupos control y soya, que se diferencian en el porcentaje de ácidos grasos y la cantidad de lípidos totales (tabla 1). Hu y col. reportaron que el tipo de ácidos grasos es más influyente que la cantidad total de los lípidos de la dieta en el riesgo de enfermedad coronaria<sup>25</sup>. El aumento de nitrotirosina indicaría la presencia de un proceso inflamatorio en el grupo que ingirió oleína+soya, que parece estar influenciado por el aumento del porcentaje del ácido oleico, pero debido a la complejidad de la mezcla de los distintos ácidos grasos de las dietas, también puede existir diferencia en la modulación de la reactividad muscular, quizás asociada a la expresión de genes mediante la activación de receptores nucleares, o quizás también a la modulación de canales iónicos a nivel de membrana por los diferentes ácidos grasos. Podemos concluir que: (i) los anillos de aorta de la dieta oleína+soya presentaron menor contracción en presencia de norepinefrina, posiblemente por la modulación de la función de los receptores o de los canales iónicos a través de los ácidos grasos de los fosfolípidos o por la acción directa de los ácidos grasos, además, (ii) el grupo oleína+soya presentó mayor concentración de nitrotirosina plasmática, lo cual se relaciona a procesos proinflamatorio, posiblemente a través del factor nuclear kappa beta.

## Referencias

1. Edirisnghe I McCormick Hallam K, Kappagoda CT. Effect of fatty acids on endothelium-dependent relaxation in the rabbit aorta. *Clin Sci (Lond)* 2006; 111:145-151
2. Saraswathi V, Wu G, Toborek M, Hening B. Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. *J Lipid Res.* 2004; 45:794-804
3. Viner RI, Ferrington DA, Williams TD, Bigelow DJ, Schoneich C. Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of de SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in skeletal muscle. *Biochemical J.* 1999; 340: 657-669
4. Han B, Logsdon C. CCK stimulates mob-1 expression and NF- $\kappa$  B activation via protein kinase C and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; C344-C351
5. Wright JR, Lefkowitz JB, Schreiner G, Lacy PE. Essential fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in CD-1 mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:6137 - 6141
6. Leifert WR, MC Murchie EJ, Saint DA. Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol.* 1999; 520:671-679
7. Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat smooth muscle cell. *J Clin Invest* 1995; 96:141-149
8. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-880
9. Kooy N, Lewis S, Royall J, Ye Y, Nelly D, Beckman J. Extensive Tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med.* 1997; 25:812-819
10. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004; 114:529-541
11. Furchtgott R. Spiral-cut strips of rabbit aorta for Vitro studies of responses of arterial smooth muscle. *Methods Med. Res.* 1960; 8:177-186
12. Furchtgott R. y Zawadzki. J. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-376
13. Ye YZ, Strong M, Huang ZQ, Bekerman JS. Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol* 1996; 269:201-209
14. Garmendia JV, Gutierrez Y, Blanca I, Bianco NE, De Sanctis JB. Nitric oxide in different types of hypertension during pregnancy. *Clinical Science.* 1997; 93:413-21
15. Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from tissues. *J Biol Chem* 1957; 266: 497-509
16. Sundram K, Hayes KC, Siru OH. Dietary palmitic acid results in a lower serum cholesterol than a lauric-myristic acid combination in non-malipemic humans. *Am J Clin Nutri.* 1994; 59: 841-846
17. Müller H, Kirkhus B y Pedersen J. Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on trans and saturated fatty acids. An analysis from designed controlled studies. *Lipids.* 2001; 36: 783-791
18. Mc Cord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Int Med.* 1978; 89: 122-127
19. Goodfellow J, Bellamy MF MW, Jones CJ, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega -3 fatty acids improve systemic target artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 265-270
20. Herrera MD, Pérez-Guerrero C, Marhuenda E, Ruiz-Gutierrez V. Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high oleic acid sunflower) on vascular reactivity in wistar-kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Br. J Nutr.* 2001; 86: 349-357
21. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Cono K, Imazumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 576-582
22. Klebanoff. Seymour J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. *Free Radical Biology and Medicine.* 1993; 14:351-360
23. Parkinson JF, Mitrovic B, Cerril JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med.* 1997; 75: 174-186
24. Zabaleta ME, Bianco NE, De Santis Juan B. Serum nitrotyrosine levels in patients with multiple sclerosis: relationship with clinical activity. 1998; 26: 407-408.
25. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1997; 337: 1491-1499