

## **Estrés oxidativo en los músculos soleo y extensor *digitorum longus* (EDL) de ratas espontáneamente hipertensas.**

Noelina Hernández<sup>1</sup>, Juan B De Sanctis<sup>2</sup>, Mercedes Losada<sup>3</sup>, Sonia H Torres<sup>1</sup>, Amparo Sosa<sup>3</sup> y Miriam Rivas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Experimental, Sección de Adaptación Muscular;

<sup>2</sup>Instituto de Inmunología; <sup>3</sup>Escuela de Medicina José María Vargas.

Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** músculo esquelético, estrés oxidativo, hipertensión arterial, sintasas del óxido nítrico, TNF- $\alpha$ .

**Resumen.** Las enfermedades sistémicas crónicas afectan el músculo esquelético, siendo la inflamación y el estrés oxidativo algunos de los mecanismos involucrados. El efecto de la hipertensión arterial esencial sobre el músculo esquelético no es bien conocido. Se estudiaron los músculos soleo y extensor *digitorum longus* (EDL) de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), comparadas con las controles normotensas Wistar Kyoto (WKY). Se determinaron los niveles de nitritos y nitratos en  $\mu$ moles/mg-proteína; las sintasas del óxido nítrico: endotelial (eNOS); neuronal (nNOS); e inducible (iNOS), nitrotirosina y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) en ng/mg-proteína. En las SHR, en el soleo y el EDL respectivamente, se incrementó la nitrotirosina ( $24,4 \pm 5,0$  vs.  $3,3 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ;  $20,2 \pm 4,3$  vs.  $4,5 \pm 0,4$ ,  $p < 0,0037$ ), iNOS ( $26,6 \pm 3,7$  vs.  $8,3 \pm 0,9$ ;  $21,3 \pm 3,7$  vs.  $11,0 \pm 0,8$  ambos  $p < 0,0001$ ), y TNF- $\alpha$  ( $2,2 \pm 0,5$  vs.  $0,6 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$ ;  $1,9 \pm 0,2$  vs.  $0,6 \pm 0,1$ ,  $p < 0,02$ ); disminución de eNOS en el soleo ( $20,6 \pm 1,4$  vs.  $30,3 \pm 1,2$ ,  $p < 0,00001$ ); de nNOS (soleo  $16,8 \pm 1,4$  vs.  $20,7 \pm 1,8$ ,  $p < 0,05$ ; EDL  $13,6 \pm 1,3$  vs.  $21,9 \pm 1,8$ ,  $p < 0,005$ ) y de nitrito en el EDL ( $5,8 \pm 0,3$  vs.  $7,1 \pm 0,5$ ,  $p < 0,026$ ). En las SHR se observó correlación positiva entre TNF- $\alpha$  vs. nitrotirosina: Soleo ( $r = 0,798$ ;  $p < 0,031$ ) y tendencia en EDL ( $r = 0,739$ ;  $p < 0,057$ ); iNOS vs. nitrotirosina (soleo:  $r = 0,908$   $p < 0,0001$ ; EDL:  $r = 0,707$ ;  $p = 0,01$ ), tendencia entre TNF- $\alpha$  vs. iNOS en EDL ( $r = 0,736$ ;  $p = 0,059$ ); y correlación negativa entre eNOS vs. nitrotirosina en soleo ( $r = -0,816$ ;  $p = 0,0012$ ). En conclusión, las SHR presentan un proceso inflamatorio muscular, evidenciado por el incremento de TNF- $\alpha$ , nitrotirosina, e iNOS. La disminución de las sintasas constitutivas, con incremento de la iNOS es evidencia de la disfunción endotelial.

## **Oxidative stress in soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles of spontaneously hypertensive rats.**

*Invest Clin 2011; 52(3): 239 - 251*

**Key words:** skeletal muscle, oxidative stress, arterial hypertension, nitric oxide synthases, TNF- $\alpha$ .

**Abstract.** Systemic diseases affect skeletal muscle, and inflammation and oxidative stress are some of the involved mechanisms. There is scarce information about the effects of essential hypertension on skeletal muscle. The soleus and extensor *digitorum longus* (EDL) muscles of spontaneously hypertensive rats (SHR) were studied compared to control Wistar Kyoto (WKY) rats. The levels of nitrite and nitrate in  $\mu\text{mol/mg-protein}$ ; endothelial (eNOS), neuronal (nNOS), and inducible (iNOS) nitric oxide synthases, nitrotyrosine and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in  $\text{ng/mg-protein}$  were determined. Compared with controls, the SHR showed increased levels of nitrotyrosine (soleus  $24.4 \pm 5.0$  vs.  $3.3 \pm 0.3$ ,  $p < 0.001$ ; EDL  $20.2 \pm 4.3$  vs.  $4.5 \pm 0.4$ ,  $p < 0.0037$ ), iNOS (soleus  $26.6 \pm 3.7$  vs.  $8.3 \pm 0.9$ ; EDL  $21.3 \pm 3.7$  vs.  $11.0 \pm 0.8$ , both  $p < 0.0001$ ) and TNF- $\alpha$  (soleus  $2.2 \pm 0.5$  vs.  $0.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ; EDL  $1.9 \pm 0.2$  vs.  $0.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.02$ ). A decrease of eNOS was found in soleus muscle ( $20.6 \pm 1.4$  vs.  $30.3 \pm 1.2$ ,  $p < 0.00001$ ); of nNOS (soleus  $16.8 \pm 1.4$  vs.  $20.7 \pm 1.8$ ,  $p < 0.05$ ; EDL  $13.6 \pm 1.3$  vs.  $21.9 \pm 1.8$   $p < 0.005$ ) and nitrite in EDL ( $5.8 \pm 0.3$  vs.  $7.1 \pm 0.5$ ,  $p < 0.026$ ). There was a positive correlation between TNF- $\alpha$  vs. nitrotyrosine in soleus ( $r = 0.798$ ;  $p < 0.031$ ) and a tendency in EDL ( $r = 0.739$ ;  $p = 0.059$ ); iNOS vs. nitrotyrosine (soleus:  $r = 0.908$ ;  $p < 0.0001$ ; EDL:  $r = 0.707$ ;  $p < 0.01$ ), a tendency between TNF- $\alpha$  and iNOS (EDL:  $r = 0.736$ ;  $p < 0.059$ ); and a negative correlation between eNOS vs. nitrotyrosine in soleus muscle ( $r = -0.816$ ;  $p < 0.0012$ ). In conclusion, in skeletal muscles of SHR an inflammatory process was found evidenced by the increase in TNF- $\alpha$ , nitrotyrosine and iNOS. The decreased levels of constitutive synthases, together with the higher level of iNOS, are indicative of endothelial dysfunction.

*Recibido: 22-09-2010. Aceptado: 23-06-2011*

### **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades crónicas no sólo producen el daño específico sobre el sistema que atacan, sino que pueden repercutir sobre otros órganos y sistemas. Los músculos esqueléticos pueden ser afectados por una variedad de enfermedades que tienen su origen en diversos sistemas del organismo y pueden verse involucrados en la perpe-

tuación de mecanismos patológicos, o su lesión puede aumentar la discapacidad ocasionada por la enfermedad originaria (1). Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar las alteraciones que las enfermedades crónicas producen en el músculo esquelético está la inflamación (2-4), en la cual se produce la migración hacia ellos de los glóbulos blancos, la activación de citocinas y el aumento del estrés oxidativo; en

este último proceso juegan un papel importante las especies reactivas de oxígeno y las de nitrógeno (ROS y NRS) (5).

En la hipertensión arterial esencial se han encontrado alteraciones en los músculos esqueléticos en el ser humano (6), e igualmente en modelos de la hipertensión arterial en animales (7). En la hipertensión arterial hay una disfunción endotelial asociada a la presencia de citocinas proinflamatorias (8), con estrés oxidativo y disminución de la biodisponibilidad de NO que se manifiestan en alteraciones de la relajación vascular (9, 10). Hay evidencia de que el estrés oxidativo en el músculo esquelético podría ser consecuencia de la hipertensión arterial (11). El óxido nítrico (NO), generado por la oxidación de la L-arginina a L-citrulina, es una molécula clave de varias funciones celulares. En condiciones fisiológicas regula el tono vasomotor, inhibe la adhesión leucocitaria al endotelio, la agregación plaquetaria y la proliferación del músculo vascular liso; además protege contra el daño inducido por las citocinas, y suprime la inmunidad por células T (12, 13). Por otra parte la generación en cantidades excesivas del NO, en conjunción con la producción de superóxido ( $O_2^-$ ), produce el potente oxidante peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) el cual está asociado a la acción citostática y citotóxica de los macrófagos (14) y a la producción de una serie de procesos patológicos (15). La producción del NO es un proceso complejo, su síntesis está catalizada por al menos tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico (NOS); dos de estas isoformas son constitutivas y calcio dependientes, siendo una de ellas originalmente descrita en las células endoteliales (eNOS, NOS3) y la otra en el tejido nervioso (nNOS, NOS1), las cuales han sido luego halladas en otros tejidos; la tercera isoforma (iNOS, NOS2) es inducible por citocinas inflamatorias como la interleucina- $1\beta$  o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en los macrófagos y otros tipos de células (12, 16). A ba-

jas concentraciones el NO estimula la actividad de la guanilato ciclasa, la cual media sus efectos fisiológicos. Sin embargo, la activación de la forma inducible de la sintasa (iNOS) produce NO en cantidades mil veces mayores, mediando entonces procesos patológicos (16). El NO reacciona con el radical libre superóxido para formar peroxinitrito. Esta reacción es muy fuerte, y su velocidad es tres veces mayor que la de la superóxido dismutasa con el  $O_2^-$ . El peroxinitrito puede nitrar lípidos y proteínas produciendo alteración en sus funciones; una de estas proteínas nitradas, la nitrotirosina, por su estabilidad se usa como marcador de la producción de  $ONOO^-$  (15, 17), a pesar de que es derivada de reacciones secundarias, de que representa una pequeña porción del peroxinitrito formado (15) y de que puede provenir de varias otras vías de nitración (18).

Los músculos esqueléticos están formados predominantemente por tres tipos de fibras clasificadas desde el punto de vista histoquímico sobre la base de la actividad de la miosina ATP-asa, o según su reacción inmunocitoquímica contra los distintos tipos de la cadena pesada de la miosina. Las fibras tipo I son de contracción lenta, desarrollan tensiones relativamente bajas, y por depender principalmente del metabolismo aeróbico son resistentes a la fatiga. Las fibras tipo II son de contracción rápida, en la rata se subclasifican en IIA y IIB. Las IIB desarrollan altas tensiones, y por depender del metabolismo anaerobio (glicolítico) son muy susceptibles a la fatiga. Las fibras tipo IIA tienen propiedades intermedias, desarrollan tensiones moderadas, son relativamente resistentes a la fatiga y poseen buena capacidad tanto aeróbica como anaeróbica. Los músculos esqueléticos varían en su composición fibrilar y las características de un músculo dado están dadas por el predominio de la proporción de un tipo dado de fibra. Así en la rata el músculo Soleo, que tiene una proporción de fibras tipo I de

75% es un músculo aeróbico de contracción lenta, y el *extensor digitorum longus* (EDL) tiene cerca de un 87% de fibras tipo II, es de contracción rápida y de metabolismo anaeróbico (7).

Las tres isozimas para la producción de NO se encuentran en el músculo esquelético. En la rata la nNOS ha sido encontrada en las fibras tipo II, la eNOS en bajas cantidades en las mitocondrias de todos los tipos de fibras y en el endotelio de los vasos musculares, y la iNOS en el citoplasma de las fibras tipo I (19).

El presente estudio fue diseñado para evaluar la presencia de estrés oxidativo y la mediación de la inflamación en el músculo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Para ello se analizaron las isozimas productoras del óxido nítrico, tanto las constitutivas eNOS y nNOS, como la inducible iNOS, los niveles de los productos del NO: nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrotirosina. Se midió una citosina inflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Las determinaciones se hicieron en el músculo soleo y en el EDL para ver si la hipertensión afecta en forma diferente a los músculos lentos de metabolismo aeróbico, como lo es el soleo y a los de contracción rápida de metabolismo predominantemente anaeróbico, representado por el EDL.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales experimentales

En este estudio, se utilizaron ratas macho, 12 genéticamente hipertensas (ratas espontáneamente hipertensas, SHR) y 12 ratas Wistar Kyoto (grupo control, WKY). Las ratas eran de la misma edad, fueron recibidas al tener 3 semanas (aproximadamente 50 g de peso), se les suministró agua y alimento Ratarina® ad libitum, y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y ciclos de luz-oscuridad naturales de 12 horas. Todas las ra-

tas provenían de una colonia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Los experimentos se iniciaron cuando las SHR tenían un peso mayor de 270 g. Las ratas hipertensas habían aumentado de peso a un ritmo menor que las controles, teniendo al momento de tomar las muestras un peso promedio de  $283 \pm 8$  g y  $315 \pm 10$  g respectivamente ( $p \leq 0,01$ ).

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 40 mg/kg, e hidrato de cloral 200 mg/kg (i.p.). La presión arterial, fue medida en la arteria carótida izquierda, previamente canulada. Se tomaron muestras musculares de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup> de los músculos soleo y EDL, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido, y almacenadas a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

### Métodos analíticos

**Ensayo de los productos del NO en músculo.** Las muestras musculares congeladas, fueron pesadas y se homogeneizaron manualmente con 1 mL buffer (Tris-HCl 10 mmoles/L, pH 7,5), NaCl (150 mmoles/L), EDTA (5 mmoles/L), Triton X-100 (1% (v/v), leupeptina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aprotinina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y pepstatina A (2,5 g/mL), utilizando un homogeneizador de vidrio (Krogh Institute, Copenhagen, Denmark). El tejido homogeneizado fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugado a 90 g por 5 min. El sobrenadante fue usado para los ensayos. La concentración de proteínas se midió usando el método de Bradford (Bio-Rad Biochemical). Los niveles de óxido nítrico (NO) se determinaron indirectamente, cuantificando sus productos oxidados ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ), usando nitrato reductasa y el reactivo de Griess (una solución que contiene cantidades equimolares de solución A (2,5% de ácido fosfórico y 10% de sulfonamida) y solución B (0,1% de etilendiamina), según el método de Mosh-

ge y col. (20). Brevemente, el sobrenadante del tejido homogeneizado fue diluido cuatro veces con agua destilada e incubado con nitrato reductasa de *Aspergillus* spp. para la cuantificación total de los productos de óxido nítrico ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ). En ausencia de la enzima sólo se determina la concentración de  $\text{NO}_2^-$ . Después de 30 min. de incubación a 37°C en presencia de la enzima y sus cofactores, NADPH y FADH<sub>2</sub>, se realizó una posterior incubación con piruvato de sodio y lactato deshidrogenada, durante 10 min., para degradar el exceso de NADPH.

Las muestras fueron desproteinizadas con sulfato de zinc, y 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fue mezclado con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess. Se realizó una curva estándar con nitrito de sodio disuelto en agua, o en un pool de suero normal. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  se determinó usando un lector de placas ELISA a 540 nm (MCC/340; Labsystems Multiscan, Helsinki, Finland). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo de la reacción de Griess fueron de 5,6% y 3,6% respectivamente.

**Determinación de las sintasas del óxido nítrico (NOS) y nitrotirosina por ELISA.** Para los ensayos de las sintasas del óxido nítrico (eNOS, nNOS e iNOS), se usó la técnica del inmunoanálisis enzimático estándar tipo sándwich (ELISA). La eNOS (NOS3) constitutiva fue determinada con un kit comercial adquirido de R & D systems (Minneapolis, MN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad fue de 25 pg/mL, bajo las condiciones tratadas usando eNOS recombinante. Las variaciones inter- e intra-ensayo fueron menores del 8%.

Las formas constitutiva nNOS (NOS1) e inducible iNOS (NOS2), fueron ensayadas mediante la técnica de ELISA según lo describe Montes de Oca y col. (4). Para la detección de nNOS, se utilizó el anticuerpo monoclonal antinitrotirosina, IgG de ratón (adsorbido en la placa) y posteriormente se

le añadió el anticuerpo policlonal antinitrotirosina, generado en conejo (para detección de la enzima unida al monoclonal), ambos obtenidos de BD Biosciences (San Diego, CA, USA). La enzima recombinante, Calbiochem (San Diego, CA, USA), se utilizó para la curva estándar. Para la determinación de la forma inducible iNOS, se usaron un par de anticuerpos obtenidos de Serotec (Kidlington, Oxford, UK). Para la curva estándar se utilizó iNOS purificado (por columna de afinidad). La sensibilidad de ambos ensayos fue de 25 pg/mL. Las variaciones inter- e intra-ensayo fueron del 12%.

La cantidad total de nitrotirosina fue determinada mediante el inmunoensayo ELISA (21). El anticuerpo monoclonal antinitrotirosina, IgG de ratón, es adsorbido a la placa en presencia de la solución tampón carbonato-bicarbonato pH, por toda la noche en frío. La placa es lavada y bloqueada para luego añadir el tejido homogeneizado diluido o la proteína usada como estándar y posteriormente se le añade el anticuerpo policlonal antinitrotirosina, generado en conejo, y se revela con anti IgG de conejo peroxidada. Los anticuerpos fueron obtenidos de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). La cuantificación de nitrotirosina se realizó usando una curva estándar con concentraciones conocidas de nitrotirosina de albúmina de suero bovino químicamente modificada. Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo fueron 8% y 11% respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 50 pg/mL.

**Ensayo del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).** La determinación del factor de necrosis tumoral alfa sólo pudo realizarse en 7 ratas WKY y en 7 ratas espontáneamente hipertensas. El TNF- $\alpha$  se determinó utilizando un ensayo "Quantikine"® de TNF- $\alpha$  de tercera generación (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de

0,5-3 pg/mg de proteína. La relación del coeficiente no fue obtenida del kit, fue la real ensayada para los tejidos homogenizados realizados en el laboratorio. Los resultados corresponden al análisis de 10 ensayos diferentes.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente. Se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar de la media mediante la prueba de Student (Student t test) para muestras no pareadas, y se hicieron pruebas de correlación entre diferentes variables en los músculos soleo y extensor *digitorum longus* (EDL), para lo cual se utilizaron los programas estadísticos "Excel" y "GraphPad Prism". Las correlaciones se determinaron por el método de Pearson. Para considerar las diferencias como significativas, en todos los análisis se utilizó un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0,05$ ). Los valores de las figuras y tablas se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SE).

## RESULTADOS

Al calcular la presión arterial media, se encontró que esta fue significativamente

mayor en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR):  $167 \pm 4$  mm de Hg, comparadas con las ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY):  $114 \pm 8$  mm de Hg;  $p < 0,001$ .

### Diferencias entre el músculo Soleo y el EDL

Al comparar los valores de los productos de NO (nitritos, nitratos y nitrotirosina) entre los dos músculos EDL y Soleo, no se observaron diferencias en ninguno de estos parámetros en las ratas controles ni tampoco en las ratas hipertensas (Tabla I). Al analizar los niveles de las enzimas, se encontró que la iNOS es mayor en el músculo EDL que en soleo de las ratas controles WKY, y que la eNOS es menor en el soleo que en el EDL de las ratas hipertensas (Tabla II). En cuanto al TNF- $\alpha$ , esta citocina no presentó diferencias entre el soleo y el EDL en los animales controles, ni en los hipertensos (Fig. 1).

### Diferencias entre las ratas controles y las hipertensas

En la Tabla I se muestran los resultados en los niveles de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), la suma de nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) y nitrotirosina, en los mús-

**TABLA I**  
NIVELES DE NITRITOS, NITRATOS, ÓXIDO NÍTRICO TOTAL ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) Y NITROTIROSINA EN LOS MÚSCULOS SOLEO Y EDL DE RATAS CONTROLES WISTAR KYOTO (WKY) Y ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

		WKY	SHR	p
Nitritos	SOLEO	$6,70 \pm 0,45$	$6,06 \pm 0,36$	N.S.
( $\mu\text{moles/mg}$ proteína)	EDL	$7,08 \pm 0,45$	$5,81 \pm 0,27$	$<0,026$
Nitratos	SOLEO	$20,51 \pm 0,99$	$18,88 \pm 0,84$	N.S.
( $\mu\text{moles/mg}$ proteína)	EDL	$20,39 \pm 0,88$	$19,42 \pm 0,81$	N.S.
NO total ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ )	SOLEO	$27,21 \pm 1,33$	$24,95 \pm 1,13$	N.S.
( $\mu\text{moles/mg}$ proteína)	EDL	$27,48 \pm 1,21$	$25,24 \pm 0,97$	N.S.
Nitrotirosina	SOLEO	$3,33 \pm 0,30$	$24,41 \pm 5,00$	$<0,001$
( $\text{ng/mg}$ proteína)	EDL	$4,51 \pm 0,39$	$20,15 \pm 4,26$	$<0,0037$

Valores: media  $\pm$  error estándar. N.S. = no significativo.

**TABLA II**  
SINTASAS DEL ÓXIDO NÍTRICO: ENDOTELIAL (eNOS), NEURONAL (nNOS) E INDUCIBLE (iNOS) EN LOS MÚSCULOS SOLEO Y EDL DE RATAS WISTAR KYOTO (WKY) Y ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

		WKY	SHR	p
eNOS (NOS3)	SOLEO	30,32 ± 1,23	20,62 ± 1,20 <sup>a</sup>	<0,00001.
(ng/mg proteína)	EDL	31,47 ± 1,73	27,34 ± 1,37 <sup>b</sup>	N.S.
nNOS (NOS)	SOLEO	20,70 ± 1,84	16,83 ± 1,36	<0,05
(ng/mg proteína)	EDL	21,92 ± 1,75	13,64 ± 1,27	<0,005
iNOS (NOS2)	SOLEO	8,33 ± 0,92 <sup>c</sup>	26,60 ± 3,72	<0,00006
(ng/mg proteína)	EDL	11,01 ± 0,80 <sup>d</sup>	21,25 ± 2,42	<0,00009

Valores: media ± error estándar. N.S.: no significativa. <sup>a</sup>vs<sup>b</sup> p<0,002. <sup>c</sup>vs<sup>d</sup> p<0,04.

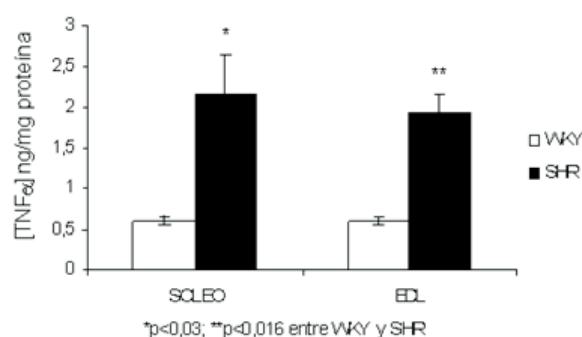


Fig. 1. Niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en los músculos soleo y extensor *digitorum longus* (EDL) de ratas Wistar Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR).

culos soleo y EDL. En la misma se observa que en el EDL, los niveles de nitritos fueron significativamente menores en las SHR que en las WKY ( $p<0,026$ ), mientras que en el soleo fueron similares. Los niveles de  $\text{NO}_3^-$  y la suma de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , fueron similares en ambos músculos, tanto en las ratas hipertensas como en las normotensas (Tabla I), mientras que en la misma tabla se observa un incremento muy marcado y altamente significativo en los niveles de nitrotirosina en las ratas hipertensas, tanto en el músculo soleo ( $p<0,001$ ), como en el EDL ( $p<0,0037$ ). Al analizar los niveles de las sintasas del óxido nítrico se encontró que la

forma constitutiva endotelial, eNOS, está disminuida significativamente en el músculo soleo de las ratas hipertensas, y aunque no fue significativamente diferente en el músculo EDL entre las ratas controles y las SHR, mostró una tendencia a serlo en la misma dirección ( $p<0,08$ ). En cuanto al nivel de la sintasa neuronal nNOS fue significativamente menor tanto en el músculo EDL como en el soleo, al comparar las ratas hipertensas con las controles. Al contrario, comparando el nivel de la sintasa inducible iNOS en ambos músculos de las ratas normotensas con las hipertensas, se encontró un incremento altamente significativo, tanto en el soleo ( $p<0,0003$ ) como en el EDL ( $p<0,0014$ ) (Tabla II).

Los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) se muestran en la Fig. 1. Como puede verse, están incrementados en las ratas espontáneamente hipertensas tanto en el soleo ( $2,2 \pm 0,5$  vs.  $0,6 \pm 0,1$  ng/mg de proteína,  $p<0,05$ ), como en el EDL ( $1,9 \pm 0,2$  vs.  $0,6 \pm 0,1$  ng/mg de proteína,  $p<0,02$ ).

Haciendo el análisis de correlación entre la eNOS y la suma de nitritos y nitratos encontramos que hay una relación directa significativa ( $r=0,58$ ,  $p<0,047$ ) (Fig. 2) en el músculo soleo, pero no en el EDL. En los músculos soleo y EDL de las ratas hiperten-

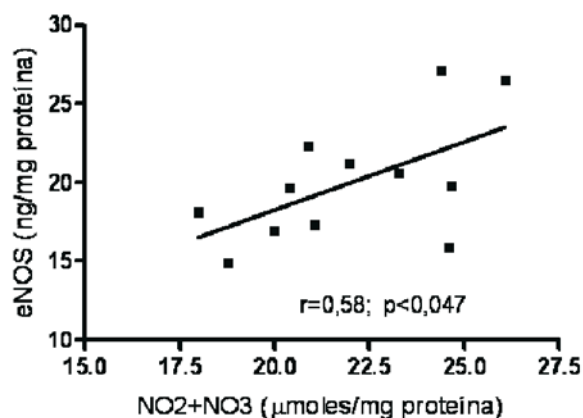


Fig. 2. Correlación entre los niveles de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) y los niveles de nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) en el músculo soleo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

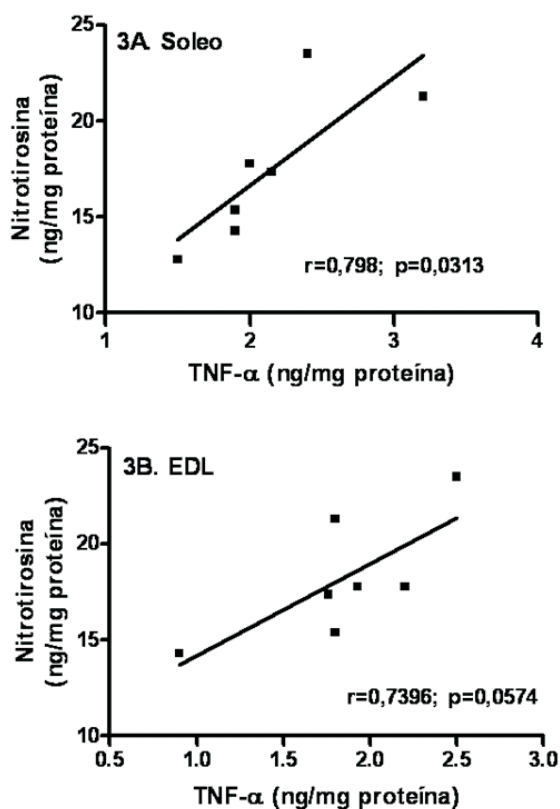


Fig. 3. Correlación entre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) y los niveles de nitrotyrosina en los músculos (3A) soleo y (3B) extensor *digitorum longus* (EDL).

sas, se encontró una correlación positiva entre los niveles de  $\text{TNF-}\alpha$  y nitrotyrosina, siendo significativa en el músculo soleo ( $r=0,798$ ;  $p<0,0313$ ) y mostrando una tendencia a serlo en el EDL ( $r=0,7396$ ;  $p=0,059$ ) (Figs. 3A y 3B). Igualmente hubo una correlación positiva en ambos músculos de las SHR entre los niveles de la sintasa inducible iNOS y los niveles de nitrotyrosina ( $r=0,908$ ;  $p<0,0001$ ) en el soleo y en el EDL ( $r=0,707$ ;  $p=0,01$ ) (Figs. 4A y 4B). Entre los niveles de  $\text{TNF-}\alpha$  y la iNOS en el músculo EDL, la correlación positiva mostró una tendencia a ser significativa ( $r=0,7364$ ;  $p<0,0591$ ) (Fig. 5); en el músculo soleo no se encontró correlación significativa entre estos parámetros. Por otra parte, se encontró una correlación ne-

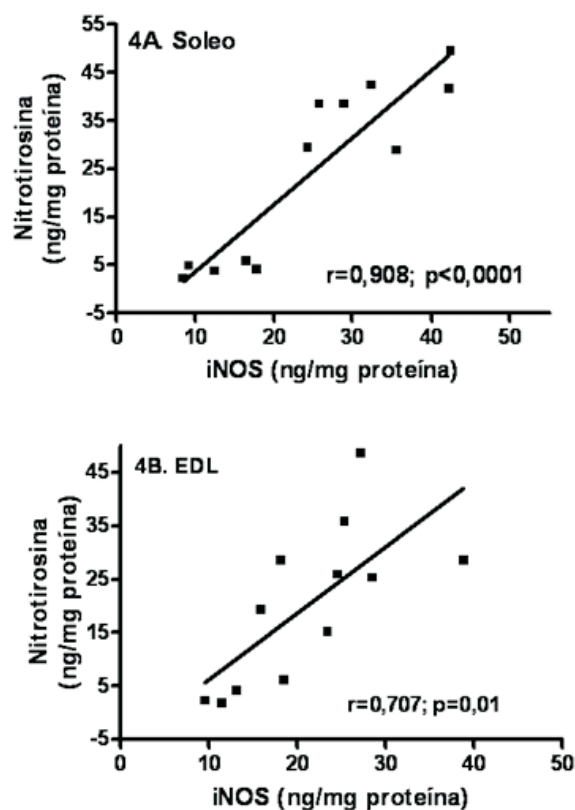


Fig. 4. Correlación entre los niveles de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y los niveles de nitrotyrosina en los músculos (4A) soleo y (4B) extensor *digitorum longus* (EDL).



gativa entre los niveles de la sintasa endotelial eNOS y los niveles de nitrotirosina en el músculo soleo de las ratas hipertensas ( $r = -0,816$ ;  $p=0,0012$ ) (Fig. 6), pero no en el EDL. No se encontró correlación significativa de los niveles de TNF- $\alpha$  con la eNOS en ninguno de los músculos estudiados.

## DISCUSIÓN

### Ratas controles

En las ratas controles los resultados de las distintas sintasas del NO son coincidentes con lo reportado en otros trabajos (19), en los cuales se encuentra una mayor actividad de la nNOS en músculos con mayor proporción de fibras tipo II; la eNOS se expresa por igual independientemente del tipo de fibras en el músculo y la iNOS tiene una baja expresión en los músculos de ratas normales. El músculo EDL mostró un nivel mayor de iNOS que el soleo ( $11,01 \pm 0,8$  vs.  $8,33 \pm 0,9$  ng/mg de proteína,  $p<0,02$ ), lo cual coincide con lo reportado por Punkt y col. (22) y puede ser explicado por el metabolismo predominantemente anaeróbico de este músculo.

En cuanto a los productos del NO, al no haber diferencias entre las enzimas constitutivas eNOS y nNOS entre los músculos soleo y EDL era de esperarse que nitritos y nitratos fuesen similares en ambos músculos, que fue lo encontrado. Esto está en concordancia con el reporte de que las arteriolas de estos músculos tienen un diámetro similar en reposo (23), lo cual puede deberse a una producción semejante de NO.

### Ratas hipertensas

En ambos músculos EDL y soleo de las ratas SHR podemos decir que las enzimas constitutivas están disminuidas (haciendo la salvedad de que la eNOS en el EDL mostró una tendencia a estar disminuida sin alcanzar significación). Newaz y col. (24) encontraron reducida la actividad de estas en-

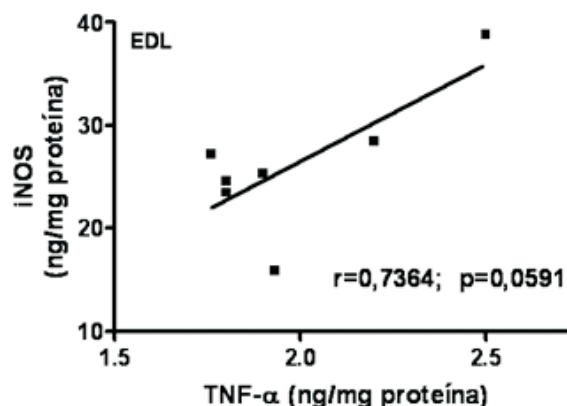


Fig. 5. Correlación entre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y los niveles de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) en el músculo extensor *digitorum longus* (EDL).

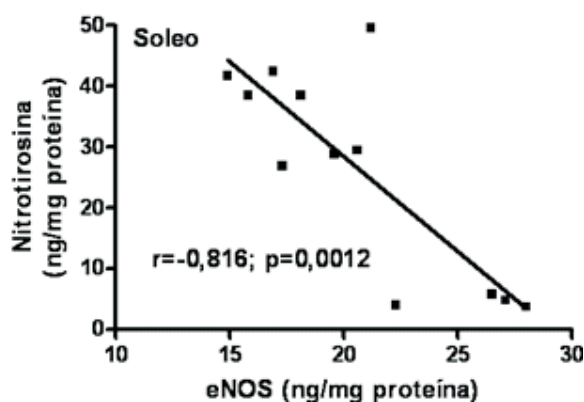


Fig. 6. Correlación entre los niveles de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) y los niveles de nitrotirosina en el músculo soleo.

zimas, medida en vasos sanguíneos de SHR, y además hallaron disminución del nivel de nitrito en el plasma. En el presente trabajo sólo encontramos reducido el nitrito en el EDL de las ratas hipertensas, sin variación del total de nitritos más nitratos. Si bien se tiene a los nitritos y nitratos como medida de la producción de NO, la complejidad de las reacciones que permiten que parte del peroxinitrito pueda generar nitritos y nitratos en ciertas condiciones (25) y la posibilidad de que el nitrito pueda ser transforma-

do en intermediarios de nitrógeno reactivo por acción de varias peroxidasas (26), podrían modificar los niveles de nitritos y nitratos, y éstos no necesariamente reflejar sólo la producción por parte de las NOS constitutivas. Por ejemplo, en el músculo de pacientes diabéticos se han encontrado niveles de eNOS similares a los de sujetos controles, con un aumento de los niveles de nitritos y nitratos (4), mientras que en músculo esquelético de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica la disminución de la eNOS sí se acompaña de disminución de nitritos y nitratos (3).

Desde el punto de vista cuantitativo, es relevante el marcado aumento de la iNOS en ambos músculos de las SHR, además de que este aumento está correlacionado directamente con el aumento de los niveles de nitrotirosina. Zalba y col. (27) han reportado en la aorta de SHR el aumento de la producción de superóxido por la actividad oxidasa de NADH/NADPH, lo cual unido al aumento del NO producido por acción de la iNOS, puede generar un aumento de peroxinitrito y finalmente evidenciarse por el aumento de la nitrotirosina. Por otra parte, ha sido demostrado en macrófagos que la iNOS puede generar tanto el superóxido como el óxido nítrico, al mismo tiempo y en cercanía, de forma que estos interactúan para formar el peroxinitrito (14). La presencia de macrófagos ha sido demostrada en los músculos de ratas SHR (7), y estos macrófagos podrían contribuir a la generación del peroxinitrito, aparte de que este pueda formarse en las fibras musculares.

La correlación directa y altamente significativa entre la iNOS y la nitrotirosina en ambos músculos, es una indicación de que la nitrotirosina proviene del NO generado por la activación de dicha enzima.

Es de hacer notar que salvo la disminución de la eNOS en el músculo soleo, que no se encontró en el EDL, y que puede ser explicada por el metabolismo oxidativo pre-

ponderante en el primero, no hubo diferencias entre ambos músculos en las SHR, lo cual hace pensar que la hipertensión arterial afecta a los músculos esqueléticos independientemente de su composición fibrilar. De acuerdo con esto, no se han reportado diferencias en la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina en las arteriolas de los músculos soleo y EDL de las SHR (23).

### **Inflamación en el músculo esquelético en ratas hipertensas**

En el presente trabajo se comprueba el aumento de los niveles de la citosina TNF- $\alpha$ , tanto en el músculo soleo como en el EDL de las SHR. Hay evidencias de que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de la iNOS y en algunos trabajos se ha encontrado que disminuye la expresión de la eNOS (28). Los presentes resultados muestran que el TNF- $\alpha$  tendió a relacionarse directamente con la iNOS; sin embargo no pareció tener relación con la eNOS en los músculos estudiados. Los posibles mecanismos por medio de los cuales el TNF- $\alpha$  altera la disponibilidad de NO son 1) la disminución de su producción fisiológica, actuando sobre las enzimas constitutivas, especialmente la eNOS, o 2) por una disminución de la biodisponibilidad del NO, aunque éste se genere excesivamente al estar aumentada la iNOS, ya que desaparece al reaccionar con el radical superóxido producido simultáneamente, para generar peroxinitrito. El TNF- $\alpha$  además puede estimular la producción del superóxido por la vía de la NADPH y la xantino oxidasa (28). Los presentes resultados sugieren que la inducción de la iNOS por el TNF- $\alpha$  es importante, ya que se encontró una correlación significativa entre la iNOS y la nitrotirosina, indicando la producción de peroxinitrito en el soleo y una tendencia similar en el EDL (Fig. 3). Por otra parte el TNF- $\alpha$  produce acumulación de neutrófilos y macrófagos en el músculo esquelético (29) que podrían contribuir a la producción de peroxinitrito.

En una muestra de músculo están presentes fibras musculares, tejido conectivo, vasos sanguíneos y fibras nerviosas; también, en el músculo de las SHR hay macrófagos (7). La presencia de la eNOS y la iNOS ha sido descrita en las células endoteliales de los vasos y en las fibras musculares, mientras que la nNOS ha sido encontrada en los nervios y las fibras musculares; la iNOS puede originarse además en los macrófagos infiltrados, por lo tanto no es posible precisar la identidad de las células de dónde provienen las enzimas que medimos. En cuanto a la contribución de los derivados del óxido nítrico provenientes de la sangre contenida en los vasos sanguíneos que irrigan el tejido muscular, pensamos que no es un factor determinante por varias razones. Primero que si se compara el peso del árbol vascular de los músculos soleo y EDL llenados con una sustancia plástica y destruyendo el resto del músculo por corrosión, con el peso previo del músculo completo, se obtiene que el árbol vascular es menos del 5% (30). Segundo, en determinaciones realizadas en plasma de ratas SHR y Wistar (resultados no publicados) el nitrito y el nitrato son significativamente menores en el plasma de ratas hipertensas ( $\text{NO}_2^-$ :  $6,7 \pm 0,18$  y  $5,96 \pm 0,23$   $\mu\text{moles/mL}$  en Wistar y SHR respectivamente;  $p=0,0181$  y  $\text{NO}_3^-$ :  $21,26 \pm 0,38$  y  $19,76 \pm 0,57$   $\mu\text{moles/mL}$  en Wistar y SHR respectivamente;  $p=0,0378$ ), mientras que en el músculo disminuye un 17%, solo en el EDL. En cuanto al aumento de la nitrotirosina, en el plasma es 29% mayor que en los controles ( $5,2 \pm 0,27$  y  $7,34 \pm 0,43$   $\text{ng/mL}$  en Wistar y SHR respectivamente;  $p=0,0003$ ), mientras que en músculo soleo fue del 85% y en el EDL, del 70%. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que haya una contribución en el aumento observado en los músculos proveniente de los niveles de este elemento en sangre. Sea como fuere, en el presente estudio se demuestra que en

los músculos de las ratas hipertensas, hay un aumento del estrés oxidativo manifestado por la disminución de las NOS constitutivas y un aumento de la iNOS que conlleva a la formación de peroxinitrito. Este estrés oxidativo está relacionado con la presencia de un estado inflamatorio demostrado por el aumento del  $\text{TNF-}\alpha$ . Esta citocina, junto a la interleucina- $1\beta$  y el interferón- $\gamma$ , actuando a través del factor nuclear-kappaB (NF- $\kappa\text{B}$ ), los productos finales avanzados de la glicación (AGE) y otras señales, producen inducción de la iNOS y varias citocinas (5, 31).

La microcirculación controla la perfusión de los tejidos en respuesta a los requerimientos metabólicos. La exposición de los vasos sanguíneos a presión elevada, como ocurre en la hipertensión, conduce a remodelado de arterias pequeñas, arteriolas y rarefacción, con alteraciones de la reactividad vascular (6, 7, 23). Estos cambios están asociados a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en las células endoteliales, que conducen a cambios estructurales y funcionales de los vasos sanguíneos. Por tanto, es de esperar que el remodelado y la rarefacción microvascular disminuyan el flujo sanguíneo y afecten el intercambio entre la sangre y los tejidos, conduciendo a una inadecuada perfusión e hipoxia, principalmente en situaciones de demanda metabólica elevada. Ha sido poco estudiado el efecto de una perfusión inadecuada sobre el tejido que estos vasos irrigan, principalmente en el músculo esquelético. Nosotros encontramos el proceso inflamatorio en el músculo y aumento del estrés oxidativo. Esto podría comprometer la capacidad metabólica del tejido y reducir su rendimiento, transformando al músculo esquelético en un tejido fácilmente fatigable, lo cual limitará con el tiempo la movilización del paciente y su capacidad para hacer ejercicio.

En conclusión, en el músculo esquelético de las SHR se encontró un estado de inflamación demostrado por el aumento del

TNF- $\alpha$ , y un aumento del estrés oxidativo manifestado por disminución de las NOS constitutivas y el aumento de la iNOS, y de peroxinitrito, medido por los niveles de nitrotirosina. Se encontró que ambos procesos están relacionados.

### AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (N<sup>o</sup> PG-09-6590-2006).

### REFERENCIAS

1. **Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ, Schols AM.** Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1033-1047.
2. **Barnes PJ, Celli BR.** Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 1165-1185.
3. **Torres SH, De Sanctis JB, Briceño ML, Hernández N, Finol HJ.** Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 2004; 181:419-427.
4. **Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, Mata A, Hernández N, Tálamo C.** Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J* 2005; 26: 390-397.
5. **Reid MB, Li YP.** Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 225-232.
6. **Hernández N, Torres SH, Finol HJ, Vera O.** Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension. *Anat Rec* 1999; 256: 425-32.
7. **Hernández N, Torres SH, Losada M, Finol HJ.** Morphological alterations in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *Invest Clin* 2008; 49: 79-91.
8. **Stenvinkel P.** Endothelial dysfunction and inflammation- is there a link? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1968-1971.
9. **Thoyz RM.** Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension. What is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44: 248-252.
10. **Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G.** Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16: 222-233.
11. **Grossman E.** Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care* 2008; 31: S185-S189.
12. **Moncada S.** Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *Clin Med* 1992; 120: 187-91.
13. **Vallance P, Chan N.** Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001; 85: 342-350.
14. **Xia Y, Zweier L.** Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 6854-6958.
15. **Ferrer-Sueta G, Radi R.** Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chemical Biology* 2009; 4: 161-177.
16. **Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J.** Inducible NO synthase: Role in cellular signalling. *J Exp Biol* 1999; 202: 645-653.
17. **Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.
18. **Ischiropoulos H.** Protein tyrosine nitration- An update. *Arch Biochem Biophys* 2009; 484:117-121.
19. **Stamler JS, Meissner G.** Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2001; 8: 209-237.
20. **Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL.** Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896.
21. **Ye YZ, Strong M, Huang ZQ, Beckman JS.** Antibodies that recognize nitrotyrosin. *Methods Enzymol* 1996; 269: 201-209.
22. **Punkt K, Naupert A, Weliner M, Asmussen G, Schmidt C, Buchwalow IB.** Nitric oxide synthase II in rat skeletal muscles. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 371-379.

23. **Losada M, Torres SH, Hernández N, Lippo M, Sosa A.** Muscle arteriolar and venular reactivity in two models of hypertensive rats. *Microvasc Res* 2005; 69: 142-148.
24. **Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal N, Adeeb N.** Nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats: antioxidant protection by  $\gamma$ -tocotrienol. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 319-27.
25. **Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M.** No NO from synthase. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1996; 93: 14492-14497.
26. **Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE.** Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; 272:7617-7625.
27. **Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J.** Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(1): 2-5.
28. **Zhang H, Park Y, Wu J, Chen XP, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C.** Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116: 219-230.
29. **Peterson JM, Feedback KD, Baas JH, Pizza FX.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2006; 101: 1394-1399.
30. **Hudlicka O, Torres SH.** Collateral circulation in skeletal muscles: Effect of pentoxifylline and torbafylline. *J Med* 1990; 21: 165-180.
31. **Adams V, Nehrhoff B, Späte U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G.** Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 $\beta$  and NF $\kappa$ B activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 95-104.