

EFECTO ANTI-CONTRÁCTIL DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL EN LA CONTRACCIÓN MEDIADA POR AGONISTAS ADRENÉRGICOS Y SEROTONINÉRGICOS

Patricia Castro-Moreno¹, Alan Rodríguez-Martínez¹, Carmen Guadalupe Mondragón-Huerta¹, Dante Rubén Vargas-Reséndiz² y Maximiliano Ibarra-Barajas^{1*}

¹Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

²Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

*maxibarrab@unam.mx

Resumen

La disfunción vascular es una complicación común en la diabetes, afecta el balance contracción/dilatación al alterar la síntesis de moléculas vasodilatadoras y promover la producción de agentes vasoconstrictores conduciendo a la desregulación de la hemodinamia y el tono vascular. En este trabajo se investigó el efecto anti-contráctil del óxido nítrico endotelial (NO) (un mecanismo que regula la vasoconstricción) durante la estimulación de receptores que producen contracción de la aorta de ratas con diabetes experimental. Se utilizó el modelo de diabetes por inducción con estreptozotocina (STZ) permitiendo la libre evolución por 4 semanas; al finalizar este tiempo, las ratas se anestesiaron y se aisló la aorta torácica, se cortó en anillos y se montó en un equipo para órgano aislado. Los anillos fueron sometidos a contracción utilizando fenilefrina, metoxamina (agonistas adrenérgicos) y Serotonina (agonista serotoninérgico); al provocar la contracción máxima se administró L-NAME (inhibidor de la sintasa de NO endotelial, eNOS). Además, se determinó por histología el grosor de la capa media de la aorta. Los resultados muestran que la respuesta contráctil máxima a los tres agonistas fue menor en la aorta de ratas diabéticas. Además, el efecto anti-contráctil del NO fue menor en la aorta de ratas diabéticas, siendo muy importante este cambio para serotonina. El grosor de la capa media fue menor en la aorta de ratas diabéticas comparado con el grupo control, además se observó pérdida de matriz extracelular e infiltrado celular. Los datos sugieren que durante la diabetes se altera la actividad anti-

contráctil del NO endotelial, dependiendo del tipo de receptor que estimula la contracción de la aorta. La reducción de la repuesta contráctil podría estar relacionada con los cambios estructurales de la aorta en el diabético.

Palabras clave: Contracción vascular, Aorta torácica, Disfunción endotelial, Diabetes, Vasodilatación.

Introducción

Los vasculatura permite el transporte sanguíneo por todo el organismo y desempeña un papel más allá de su función como conductor mecánico, ejerciendo funciones fisiológicas que regulan el flujo sanguíneo a los tejidos y la presión arterial a través de una variedad de receptores distribuidos en toda su estructura (Liu *et al.*, 2021). En particular, el tono vascular de la aorta está regulado por distintos receptores, entre los que destacan los adrenoreceptores α_{1D} (Villalobos & Ibarra, 1996) y los receptores a serotonina (Villazón *et al.*, 2002) que desencadenan procesos de vasoconstricción, los cuales pueden ser contrarrestados por el óxido nítrico (NO), ayudando a mantener el equilibrio hemodinámico y la presión arterial (Xu *et al.*, 2022).

El óxido nítrico (NO) se ha identificado como una molécula que induce la vasodilatación, incluida la aorta, y en los años recientes se ha informado que también posee una actividad anti-contráctil, que modula negativamente la constricción ejercida sobre la vasculatura (Victorio *et al.*, 2016). La liberación del NO del tejido adiposo perivascular ejerce una participación anti-contráctil importante, donde intervienen diversos mediadores como los receptores Mas, AT2 y los receptores adrenérgicos β_3 que tras su estimulación activan la producción de NO (Bussey *et al.*, 2018; Nóbrega *et al.*, 2019). La hipertensión arterial y el envejecimiento reducen la actividad anti-contráctil mediada por el NO endotelial (Ibarra *et al.*, 1995; Ibarra *et al.*, 2006), por lo que resulta interesante analizar si el NO endotelial posee esa misma actividad durante la diabetes, dado que este padecimiento reduce la biodisponibilidad del NO (Karasek *et al.*, 2023) lo que podría generar cambios

fisiopatológicos que desempeñan un papel importante en el daño vascular y las enfermedades cardiovasculares asociadas con la diabetes mellitus.

Objetivo

Determinar el efecto anti-contráctil del óxido nítrico endotelial en la contracción mediada por agonistas adrenérgicos y serotoninérgicos en la aorta torácica de ratas diabéticas.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 200 a 250 g y se mantuvieron en condiciones ambientales controladas, agua y alimento *ad libitum* (dieta estándar de Purina SA, México) de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México.

Inducción de diabetes

Los animales se administraron con una dosis única de 65 mg/kg de peso de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich®) vía intraperitoneal (I. P.). El grupo control recibió solamente el vehículo (amortiguador de citratos, pH de 4.5, 50 mM). Previo a la inducción y 72 horas posteriores, se midió glucosa en sangre con un glucómetro Accu-Check®. Únicamente las ratas con valores ≥ 200 mg/dl de glucosa en sangre fueron incluidas en el grupo experimental y se permitió la libre evolución de la diabetes durante 4 semanas.

Extracción de la arteria aorta torácica

Al finalizar el tiempo de evolución de la diabetes, las ratas se anestesiaron con una dosis única de pentobarbital sódico (60 mg/kg, vía I.P.) y mediante una toracotomía se extrajo la aorta torácica, la cual se limpió de tejido conectivo y grasa, luego se cortó en 4 anillos de 3-4 mm de longitud que fueron colocados en cámaras para órgano aislado que contenía solución Krebs-Henseleit, burbujeo constante de O₂ al 95%, CO₂ al 5% y temperatura de 37°C, los anillos se sujetaron a un transductor de tensión isométrica (modelo FT03 Grass Force Displacement Transducer; Astro-Med, Inc. West Wawick, RI, USA), el cual se encuentra acoplado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac

Systems Inc.). Los datos de tensión isométrica fueron registrados mediante el software Acqknowledge (versión 3.9.1).

Contracción de la aorta a fenilefrina, metoxamina y serotonina

Tras un período de estabilización y sensibilización de las aortas, se utilizó un anillo para cada agonista, fenilefrina [31.6 μ M], metoxamina [316 μ M] y serotonina [100 μ M] (concentraciones que aseguran el efecto máximo). Cuando se alcanzó la contracción máxima provocada por los agonistas se agregó L-NAME [100 μ M] para inhibir la producción de NO y determinar el efecto anti-contráctil.

Análisis histológico

De las arterias utilizadas previamente, se seccionó un anillo de la arteria aorta y se fijó en paraformaldehído al 4%, posteriormente se procesaron con técnica histológica de rutina y se realizaron cortes de 4 μ m de grosor, los cuales se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson. Las fotografías de los tejidos se obtuvieron con un microscopio invertido Carl Zeiss Axio Vert.A1 usando el software ZEN 2.1 Lite. Todas las fotografías se capturaron en un aumento de 40x. Para realizar las mediciones de la túnica media se utilizó el software Fiji (versión 2.13.1).

Resultados

El peso inicial de las ratas normales y diabéticas fue 226 ± 2 g, posterior a las 4 semanas de evolución el grupo control alcanzó un incremento significativo de 130 ± 2 g, sin embargo, las ratas diabéticas, aumentaron alrededor de 46 ± 3 g (Figura 1A). La concentración de glucosa previo a la inducción de diabetes fue de 108 ± 2 mg/dL en

ambos grupos. En las ratas control este valor no se modificó durante las 4 semanas, las ratas administradas con STZ alcanzaron valores mayores a los 400 mg/dL (Figura 1B).

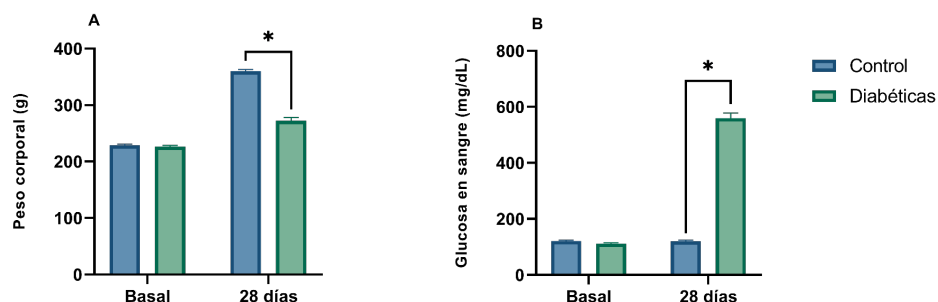


Figura 1. Peso corporal y glucosa periférica en ratas diabéticas. A) Peso corporal; B) Glucosa en sangre. n= 8-10 mediciones por grupo. *p>0.01 vs control.

Los anillos aórticos se estimularon con fenilefrina, serotonina y metoxamina en concentraciones que producen la contracción máxima a cada agonista. La contracción vascular ejercida por fenilefrina y metoxamina fue ligeramente reducida en el grupo diabético comparado con el grupo control, mientras que la estimulación con serotonina produjo un efecto presor significativamente menor en los anillos aórticos de ratas diabéticas (Figura 2).

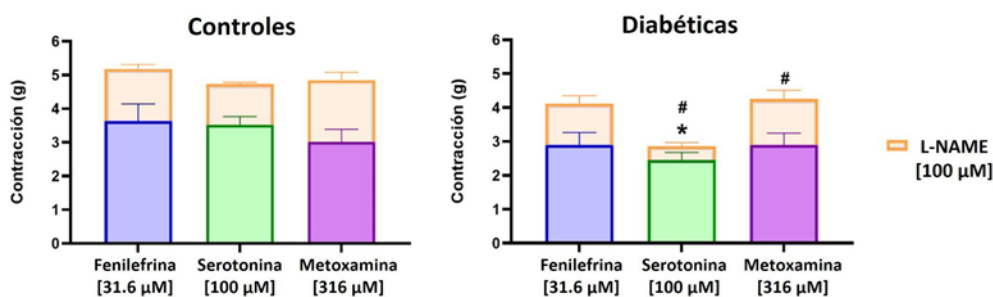


Figura 2. Efecto contráctil inducido por la Fenilefrina, Serotonina y Metoxamina y efecto anti-contráctil mediado por el óxido nítrico en la arteria aorta de ratas diabéticas. Las barras representan el promedio ± e.e de 6-9 experimentos por grupo. Significancia estadística *p<0.05 vs efecto de Serotonina en control. #p<0.05 vs L-NAME en control.

Para analizar el efecto anti-contráctil del NO se utilizó L-NAME un inhibidor de la sintasa del NO. La adición del L-NAME provocó un aumento adicional en la respuesta contráctil a los agonistas (Barras amarillas, Figura 2). Resulta interesante que el efecto anti-contráctil del NO fue levemente reducido en presencia de fenilefrina en las ratas diabéticas en comparación al grupo control, mientras que la función anti-contráctil del NO tras estimular con serotonina y metoxamina fue significativamente menor en arterias aortas diabéticas (Figura 2).

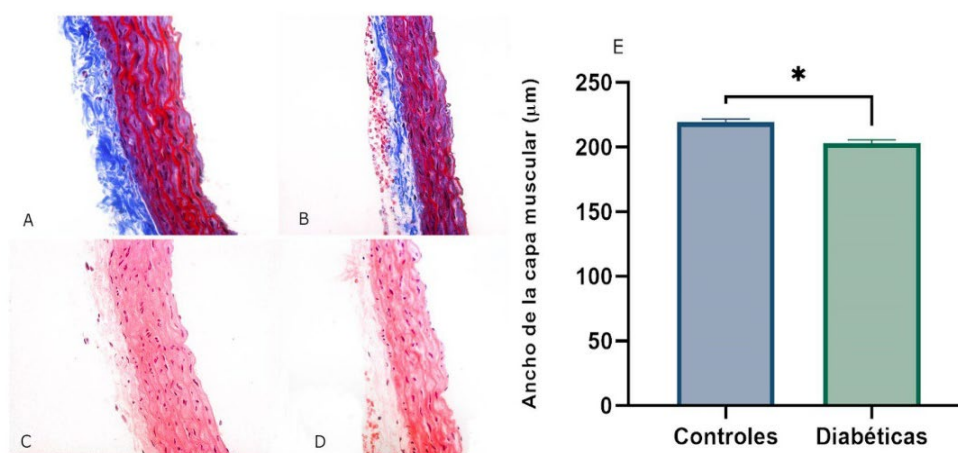


Figura 3. Histología y morfología de la arteria aorta torácica de ratas diabéticas. Tinción tricrómica de Masson (40X). A) control, B) diabéticas. Tinción H&E (40X). C) control, D) diabéticas. E) Medición de la capa muscular, las barras representan el valor promedio de 25 mediciones de 6 arterias por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

Con el fin de determinar si los cambios estructurales de la arteria podrían explicar el deterioro de la contracción en el animal diabético, las aortas se analizaron por tinción histológica y se pudo observar una evidente disminución en el grosor de la capa muscular de las arterias aortas de ratas diabéticas (Figura 3B y D) respecto a las arterias control (Figura 3E). Adicionalmente, se observa una menor cantidad de fibras de matriz extracelular en la capa adventicia y presencia de infiltrado celular, sin embargo, estos hallazgos están sujetos a un estudio más detallado.

Discusión

Las ratas del grupo diabético manifestaron menor peso corporal e hiperglucemia, así como polifagia, polidipsia y poliuria (datos no mostrados), por lo que este modelo de diabetes comparte similitudes con la diabetes en el humano en cuanto a sus manifestaciones clínicas y patológicas (King, 2012).

Como se muestra en la Figura 2, las aortas de ratas control no mostraron diferencia en la magnitud de contracción a los diferentes agonistas utilizados, las cuales alcanzaron efecto máximo similares; sin embargo, el efecto anti-contráctil provocado por el NO endotelial fue dependiente de agonista utilizado, ya que fue menor con serotonina que con los agentes adrenérgicos, sugiriendo que el efecto contrarregulador del NO en ratas sanas es dependiente de la contracción inducida por los receptores adrenérgicos y serotoninérgicos, lo que abre un nuevo campo para estudiar otros receptores que también regulan la contracción. En contraparte, en aortas diabéticas se pudo observar disminución significativa de la contracción activada por serotonina, mientras que las respuestas contráctiles con fenilefrina y metoxamina fueron solo levemente alteradas con respecto al grupo control. En aortas diabéticas, el efecto anti-contráctil del NO endotelial en respuesta a metoxamina y serotonina fue significativamente menor, mientras que con fenilefrina se redujo levemente, lo que indica que la alteración en la función anti-contráctil en la diabetes depende de agente contráctil, así como la señalización de los receptores adrenérgicos y serotoninérgicos. Además, la alteración de la actividad y/o la liberación del NO endotelial durante la diabetes puede deberse a la pérdida de la función molecular de las células endoteliales (Takeda *et al.*, 2020).

La disfunción endotelial y las alteraciones en la liberación del NO se han caracterizado en arterias aortas durante la hipertensión arterial, donde se ha demostrado que disminuye el efecto modulador negativo del endotelio cuando se induce la contracción con serotonina (Ibarra *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado que en estados de vejez disminuye la biodisponibilidad de NO debido al aumento de la concentración del anión

superóxido (O_2^-) que reacciona con el NO para la formación de peroxinitrito (Gómez *et al.*, 2015), así como la deficiencia en la producción del NO endógeno por parte de las células endoteliales (Ibarra *et al.*, 1995). Sumado a esto, en la disfunción endotelial incrementa en la formación de prostanoïdes vasoconstrictores que contrarrestan los efectos del NO (Ibarra *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que el tono vascular no solo está regulado por el NO endotelial, como se pudo observar en este trabajo; el tejido adiposo perivascular también ejerce una participación anti-contráctil importante, donde intervienen diversos mediadores como los receptores Mas y AT2 que tras su estimulación activan la producción de NO (Nóbrega *et al.*, 2019), así mismo, la estimulación de los receptores adrenérgicos β_3 localizados en los adipocitos conduce a la activación de las vías de señalización de G α con un aumento de AMPc y la liberación de NO (Bussey *et al.*, 2018).

En estudios previos, se ha publicado que durante la diabetes se altera la estructura y la ultraestructura de la aorta, incluso previo a los cambios sistémicos (Searls *et al.*, 2012), lo cual concuerda con los datos obtenidos en esta investigación, donde se observa una disminución del grosor de la capa muscular de la aorta, lo que quizá pueda relacionarse con la alteración en la contracción vascular observada en este estudio. Además, las imágenes histológicas mostraron en aortas diabéticas una menor densidad de fibras de matriz extracelular en la capa adventicia, así como la detección de un infiltrado celular. Este infiltrado podría tener características inflamatorias, ya que se ha establecido una conexión entre la disfunción endotelial y la presencia de inflamación local. Esto está respaldado por diversos estudios que han señalado que las células lesionadas liberan mediadores inflamatorios (Theofilis *et al.*, 2021), por lo que estos datos nos llevan a hacer nuevas propuestas de investigación en el campo de la disfunción endotelial.

Conclusión

El efecto anti-contráctil del óxido nítrico (NO) endotelial en la aorta de ratas diabéticas es menor en respuesta a la estimulación de receptores adrenérgicos con fenilefrina y metoxamina. Por otro lado, con la estimulación de los receptores serotoninérgicos se presenta menor respuesta anti-contráctil mediada por el NO endotelial, lo que sugiere que, durante la diabetes, los mecanismos contrarregulatorios del NO endotelial parecen alterarse dependiendo del tipo de receptor que estimula la contracción de la aorta. Además, esto podría estar relacionado con la reducción de la capa media, la pérdida de la matriz extracelular y el infiltrado celular observado en la arteria aorta.

Agradecimientos

A los financiamientos otorgados por FESI-PAPCA 2021-2022-26 y COMECYT FICDTEM-2021-058.

Referencias

- Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., de Kreutzenberg, S., & Fadini, G. P. (2011). Endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes Care*, 34(Supplement_2), S285–S290. <https://doi.org/10.2337/dc11-s239>
- Bussey, C., Withers, S., Saxton, S., Bodagh, N., Aldous, R., & Heagerty, A. (2018). B3 - Adrenoceptor stimulation of perivascular adipocytes leads to increased fat cell-derived NO and vascular relaxation in small arteries. *British Journal of Pharmacology*, 175(18), 3685-3698. <https://doi.org/10.1111/bph.14433>
- Gómez, Z. J. H., García, M. R., Lázaro, S. M., Ibarra, B. M., Kumate, J., & Cruz, M. (2015). Vascular endothelial function is improved by oral glycine treatment in aged rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(6), 465–473. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0393>
- Ibarra, M., Meneses, A., Ransanz, V., Castillo, C., & Hong, E. (1995). Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats. *Archives of medical research*, 26 Spec No. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8845647/>
- Ibarra, M., López, G. J. J., Mejía, Z. R., & Villalobos, M. R. (2006). Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Archives of Medical Research*, 37(3), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.015>

Karasek, D., Spurna, J., Macakova, D., Krystynik, O., & Kucerova, V. (2023). Vascular damage and glycometabolic control in older patients with type 2 diabetes. *Metabolites*, 13(3), 382. <https://doi.org/10.3390/metabo13030382>

Liu, C., Li, X., Fu, J., Chen, K., Liao, Q., Wang, J., Chen, C., Luo, H., Jose, P. A., Yang, Y., Yang, J., & Zeng, C. (2021). Increased AT1 receptor expression mediates vasoconstriction leading to hypertension in *Snx1*^{-/-} mice. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 44(8), 906–917. <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00661-x>

Nóbrega, N., Araújo, N. F., Reis, D., Facine, L. M., Miranda, C. A. S., Mota, G. C., Aires, R. D., Capettini, L. dos S. A., Cruz, J. dos S., & Bonaventura, D. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide induce anticontractile effect of perivascular adipose tissue via renin angiotensin system activation. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 84, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.12.011>

Searls, Y., Smirnova, I. V., VanHoose, L., Fegley, B., Loganathan, R., & Stehno-Bittel, L. (2012). Time-dependent alterations in rat macrovessels with type 1 diabetes. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/278620>

Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A. S., Siasos, G., Tsioufis, C., & Tousoulis, D. (2021). Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction. *Biomedicines*, 9(7), 781. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>

Victorio, J. A., Fontes, M. T., Rossoni, L. V., & Davel, A. P. (2016). Different anti-contractile function and nitric oxide production of thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Frontiers in physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00295>

Villalobos, M. R., & Ibarra, M. (1996). α 1-Adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α 1D or α 1A subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 298(3), 257–263. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00781-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00781-4)

Villazón, M., Padín, J. F., Cadavid, M. I., Enguix, M. J., Tristán, H., Orallo, F., & Loza, M. I. (2002). Functional characterization of serotonin receptors in rat isolated aorta. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 584–590. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.584>

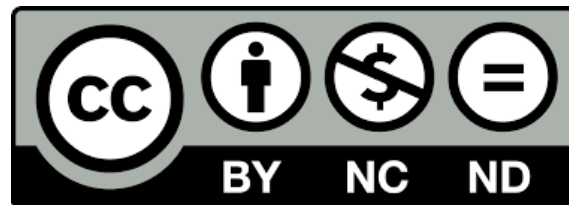
Xu, Q., Zhuo, K., Zhang, X., Zhang, Y., Xue, J., & Zhou, M.-S. (2022). Oxytocin-induced endothelial nitric oxide dependent vasorelaxation and ERK1/2-mediated vasoconstriction in the rat aorta. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 26(4), 255–262. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2022.26.4.255>



D. R. © UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Excepto donde se indique lo contrario esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución No comercial, No derivada, 4.0 Internacional (CC BY NC ND 4.0 INTERNACIONAL).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



ENTIDAD EDITORA

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México.

FORMA SUGERIDA DE CITAR:

Castro-Moreno, P., Rodríguez-Martínez, A., Mondragón-Huerta, C. G., Vargas-Reséndiz, D. R., y Ibarra-Barajas, M. (2023). Efecto anti-contráctil del óxido nítrico endotelial en la contracción mediada por agonistas adrenérgicos y serotoninérgicos. *MEMORIAS DEL CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA (CONATEC)*, Año 6, No. 6, septiembre 2023 - agosto 2024. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

https://tecnicosacademicos.cuautitlan.unam.mx/CongresoTA/memorias2023/Mem2023_Paper03-E.html