

El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes

Patricia Cuéllar Mata*, Martha Olivia Solís Martínez**, Ma. del Carmen Sánchez Leyva*, Rosa María García Nieto*, Sergio Arias Negrete*

RESUMEN

El óxido nítrico (NO), una de las diez moléculas más pequeñas que existen, es un gas importante como contaminante ambiental y un compuesto clave en los sistemas biológicos porque participa en la señalización intracelular. Fue nombrada Molécula del Año en 1992 y tres investigadores recibieron el Premio Nobel en Medicina en 1998 por el descubrimiento de su participación en la relajación del músculo liso del sistema cardiovascular. El NO es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa y tiene una vida media muy corta de 0.5 s - 5 s, reacciona con derivados del oxígeno generando productos tóxicos, o con diversas macromoléculas reduciendo su disponibilidad; ambos procesos ocasionan diversas patologías. La producción de NO es considerada como un mecanismo de defensa inespecífico en infecciones causadas por patógenos como *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Salmonella*. Así, la regulación en la síntesis del NO es importante para mantener el equilibrio entre la salud y la enfermedad.

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is one of the ten smallest molecules existing, this gas is important as pollutant and also by its role in intracellular signaling in many biological processes. This molecule was distinguished as the Molecule of the Year on 1992; three researchers were awarded the Nobel Prize in Medicine or Physiology, on 1998, by their participation in its discovery and relaxation of smooth muscle in the cardiovascular system. Nitric oxide is enzymatically synthesized by the Nitric Oxide Synthase. This short-lived molecule, 0.5 - 5 s, rapidly reacts with oxygen to generate toxic products, as well as with some macromolecules by reducing its availability; both processes are involved in diverse pathologies. Moreover, nitric oxide production is considered as an unspecific defense mechanism in infections caused by *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* and *Salmonella*. Therefore, regulation in NO synthesis is very important to maintain a balance between health and disease.

Recibido: 10 de junio de 2010
Aceptado: 13 de diciembre de 2010

INTRODUCCIÓN

Este artículo presenta una revisión actual sobre el óxido nítrico, una de las diez moléculas más pequeñas e importantes que existen, abarcando de manera muy breve, desde el aspecto químico como contaminante ambiental hasta el papel activo que desempeña en diversos procesos biológicos. Asimismo, se describen los experimentos que dieron lugar al descubrimiento de su papel en la homeostasis de los mamíferos que le valieron la denominación de Molécula del Año en 1992. También se mencionan las investigaciones que finalmente han puesto al descubierto su importancia en una gran variedad de alteraciones biológicas, proponiéndola como una señal bioquímica que modifica el funcionamiento celular para preservar la salud o para generar algunas enfermedades en el hombre.

El óxido nítrico está presente en la naturaleza

El monóxido de nitrógeno, mejor conocido como óxido nítrico, forma parte del grupo de óxidos de nitrógeno que existen en la naturaleza como contaminantes del aire, entre ellos, el bióxido de nitrógeno (NO₂) y el monóxido de dinitrógeno (N₂O). La fórmula química del óxido nítrico es NO y así lo referimos en esta revisión. El NO es un gas de aroma dulce y penetrante, incoloro o ligeramente marrón que se libera al ambiente desde los tubos de escape de

Palabras clave:

óxido nítrico; radical libre; peroxinitrito.

Keywords:

nitric oxide; free radical; peroxinitrite.

*Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n C.P. 36050 Guanajuato, Gto., México. Tel: 732 0006 Ext: 8127 y 8126. Correos electrónicos: mata@quijote.ugto.mx y sergio@quijote.ugto.mx

**Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus León. Universidad de Guanajuato. 20 de Enero no. 929, Col. Obregón, C.P. 37320 León, Gto., México. Tel: (01) 4777143812

los automotores o cuando se quema carbón, petróleo o gas natural y es también un producto contenido en el tabaco (Lavoie *et al.*, 1970; Cueto y Pryor, 1994).

Una vez en la atmósfera, el NO puede reaccionar con el O₂ y el agua para formar ácido nítrico (HNO₃), que es uno de los componentes de la lluvia ácida, o bien, puede reaccionar con el ozono (O₃) destruyendo una de las capas de la atmósfera más importantes (The Student Nitric Oxide Explorer, 2010).

Los antiguos sumerios, sin saberlo, usaban el NO pues curaban las carnes con sales de nitrato, que se transforman a nitrito y luego a NO, el cual actúa como inhibidor del crecimiento microbiano. El NO le confiere a la carne curada, como el jamón, un color rosado característico debido al mononitrosil hemocromógeno, pigmento formado por la reacción del NO con el grupo hemo de la mioglobina, proteína que se encuentra en el músculo. Esta transformación es la base de la utilización del nitrito de sodio como un conservador alimentario.

Actualmente, la fertilización intensiva de suelos agrícolas incrementa la velocidad a la que el amoníaco y el nitrato se rompen por la actividad bacteriana, aumentando la liberación de NO al ambiente. Incluso, el NO también se puede producir en algunos sitios abandonados que han sido utilizados para pastar donde se encuentran heces depositadas por el ganado, con la consecuente degradación de estos materiales orgánicos por la acción de algunos microorganismos (Keller y Reinert, 1994).

Por otro lado, el NO es utilizado en la industria para la fabricación de ácido nítrico (HNO₃), en el blanqueamiento de fibras tales como el rayón y como estabilizador de algunos compuestos químicos (The Chemical Database, 2010). Recientemente se ha descubierto que el NO es producido por muchos seres vivos, desde microorganismos hasta animales superiores, incluido el hombre (Ren *et al.*, 2000; McMicking *et al.*, 1997). En los mamíferos el NO juega un papel muy importante en el mantenimiento de la salud y también participa en algunos procesos patológicos. Algunos compuestos como la nitroglicerina que liberan NO pueden salvar vidas en pacientes que padecen algunas enfermedades cardíacas.

De la nitroglicerina al óxido nítrico

La síntesis de la nitroglicerina y el descubrimiento de las funciones del NO son dos hechos que están íntimamente ligados, aunque con una distancia de más de un siglo entre ellos. La nitroglicerina es una sustancia altamente explosiva que fue sintetizada por primera vez en el año de 1846 por Ascanio Sobrero en la ciudad de Turín, Italia, quien encontró que cuando

se colocaban pequeñas cantidades de este compuesto debajo de la lengua producían un violento dolor de cabeza. Poco después, Constantine Hering formuló un medicamento homeopático a base de nitroglicerina que afectaba el ritmo cardíaco y la tensión arterial. Por otra parte, T. Lauder Brunton en 1867, encontró que cuando el nitrito de amilo (3-metilbutil nitrito, CH₃CH(CH₃)CH₂CH₂ONO) era inhalado durante una crisis dolorosa de angina de pecho, causaba una disminución de los síntomas en menos de un minuto, aunque desconocía cómo lo hacía. Murrell observó que los efectos de la nitroglicerina y del nitrito de amilo eran similares (Hurst y Fye, 1995) intuyendo que tenían algo en común. Alfred Nobel, por su parte, encontró cómo manejar este compuesto y dado el efecto fisiológico más duradero de la nitroglicerina sobre el nitrito de amilo para aliviar la angina de pecho, se retomó su uso como medicamento. Ahora se conoce que la rápida degradación de estos compuestos en el organismo libera NO, el cual es responsable del efecto terapéutico que causa la dilatación de los vasos sanguíneos permitiendo que llegue más sangre y oxígeno al corazón, lo que alivia la angina de pecho (Lüllmann *et al.*, 2001). Paradójicamente, Nobel sufría de esta enfermedad por lo cual se le prescribió nitroglicerina aunque siempre se negó a tomarla debido, probablemente, a su escepticismo sobre las propiedades curativas de esta sustancia.

El conocimiento preciso de los mecanismos de la regulación de la presión sanguínea requirió diversos estudios que condujeron al descubrimiento de un compuesto biológico desconocido y denominado inicialmente "factor relajante del endotelio". Investigaciones posteriores revelaron que este factor es el NO, un gas sintetizado por las células a partir del aminoácido L-arginina. Actualmente está bien documentado que el NO es el responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos y que corresponde al factor relajante antes referido (Centelles *et al.*, 2004).

De molécula del año al premio Nobel

El NO participa en muchos procesos biológicos que son fundamentales para mantener la homeostasis del organismo, en funciones tan diferentes que van desde la digestión hasta la inmunidad. Por ello, la prestigiada revista científica *Science*, que hace un reconocimiento a los grandes descubrimientos, en 1992 distinguió al NO como la Molécula del Año (Cullotta y Koshland, 1992). Seis años después, el Premio Nobel de Medicina se otorgó a tres investigadores norteamericanos, los doctores Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad, por sus descubrimientos en relación al NO como una molécula de señalización en el sistema cardiovascular. El Dr. Salvador Moncada, de origen hondureño y nacionalizado británico, también contribuyó de manera importante

a este descubrimiento pero no fue incluido en el premio, dado que esta distinción sólo se otorga como máximo a tres investigadores. Durante la recepción del premio Nobel, Furchgott mencionó que se debería haber hecho una excepción e incluir al Dr. Moncada por sus trabajos sobre el NO. A continuación la frase textual mencionada por el Dr. Furchgott:

“I feel that the Nobel Prize Committee could have made an exception this year and chosen a fourth person, Salvador Moncada (to share the prize)” (“Yo siento que el Comité del Premio Nobel podía haber hecho una excepción este año y haber escogido a una cuarta persona, Salvador Moncada... (para compartir el premio)”.

(Citado en Berrazueta, 1999).

Posteriormente en España, para reconocer las contribuciones del Dr. Salvador Moncada sobre el NO, se le concedió el Premio Príncipe de Asturias a la Investigación Científica y Técnica (Centelles *et al.*, 2004).

El logro de este premio Nobel requirió de una investigación profunda y coincidencias afortunadas que dieron lugar al descubrimiento de la identidad del NO. Por ello, es interesante mencionar cómo dos grupos de investigadores, trabajando de manera independiente en proyectos aparentemente distintos, llegaron a dilucidar los mecanismos que conducen a la síntesis del NO en la célula. Las aportaciones individuales de cada uno de los ganadores del premio Nobel se describen a continuación:

El Dr. Ferid Murad conocía la importancia de la molécula monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) como un segundo mensajero (molécula señalizadora intracelular), pero aún no se explicaba el papel del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), sustancia sintetizada a partir del trifosfato de guanosina (GTP) por la enzima guanilato ciclasa, que comenzaba a emerger como un segundo mensajero potencial. Por ello, sus trabajos se enfocaron a determinar cómo se regulaba la actividad de esta enzima y, en consecuencia, cómo se sintetizaba el GMPc. Esto lo llevó a estudiar los procesos de contracción y relajación del músculo liso y encontró que la acumulación de GMPc inducía su relajación. Entonces sus investigaciones se dirigieron a estudiar las diversas sustancias que tenían acción sobre el músculo liso, tales como la nitroglicerina y el nitroprusiato de sodio que causan la acumulación de GMPc y la relajación del músculo liso; a este grupo de sustancias las designó como nitro-vasodilatadores. Para comprobar su hipótesis, Murad hizo burbujear NO en una preparación de tejido que contenía la enzima guanilato ciclasa y encontró que al incrementarse la concentración del GMPc, el tejido se relajaba con lo cual demostró el papel del NO como relajante muscular (Murad, 2004; Nathan *et al.*, 2009).

Por su parte, Furchgott desarrolló un modelo experimental con anillos de aorta de conejo para estudiar la fisiología de la dilatación y la contracción de los vasos sanguíneos usando sustancias como la acetilcolina; este compuesto inducía la dilatación de los vasos siempre y cuando la capa que los recubre, denominada endotelio, permaneciera intacta. La necesidad de mantener la integridad del tejido fue descubierta al frotar inadvertidamente la cara interior de las preparaciones de aorta pues con este procedimiento se eliminaba la capacidad de los vasos sanguíneos para relajarse como respuesta a la acetilcolina; por esto supuso que el papel de las células endoteliales era crucial. Su hipótesis fue que la acetilcolina, al interaccionar con sus receptores celulares en los vasos sanguíneos, estimulaba la liberación de un compuesto en las células que difundía y relajaba las células musculares vecinas; esta sustancia resultó ser el gas NO (Furchgott, 1999; Nathan *et al.*, 2009).

Los experimentos de Ignarro no fueron menos afortunados, pues él estaba interesado en entender el mecanismo de acción de las sustancias que elevan la presión arterial y en el estudio sobre nuevas sustancias anti-inflamatorias. En uno de sus experimentos probó la participación del GMPc y encontró que se estimulaba la función de los leucocitos. Al continuar con sus investigaciones, leyó los trabajos de Murad, donde se describía que algunos compuestos que contienen grupos nitro podían liberar NO y activar a la enzima guanilato ciclasa que sintetiza el GMPc. A raíz de estas observaciones, Ignarro sugirió que el NO liberado por la nitroglicerina activaba la producción de GMPc (Ignarro, 1999; Nathan *et al.*, 2009). Así, se encontró que la molécula de NO estimula la síntesis de GMPc y este último produce la dilatación de los vasos sanguíneos.

Cómo funcionan las moléculas vasodilatadoras

Uno de los siguientes pasos fue dilucidar el mecanismo de acción de la nitroglicerina y probar cómo esta molécula libera el NO en el músculo liso. Se sabía que la molécula de nitroprusiato de sodio liberaba espontáneamente el NO; sin embargo, otros nitro-compuestos y ésteres de nitrato eran químicamente estables, por lo cual, debían sufrir una biotransformación para poder liberar el NO. Unos experimentos iniciales habían indicado que algunos compuestos que contienen residuos de azufre, denominados grupos tiol (-SH) tal como el ditiotreitól, aumentaban la activación de la enzima guanilato ciclasa cuando se incubaban en presencia de nitroprusiato de sodio o de compuestos que contienen grupos nitro, sin afectar la activación de la enzima por el propio NO (Ignarro, 1999).

Después de varios estudios sobre los vasodilatadores que contienen grupos nitro, se sugirió que el NO o uno de sus productos oxidados o reducidos, eran probablemente los activadores de la enzima guanilato ciclasa. Así, el NO podía provenir de un grupo de sustancias llamadas pro-drogas o moléculas precursoras. Se encontró que algunos compuestos oxidantes, tales como el azul de metileno, el ferrocianuro de potasio, $K_4Fe(CN)_6$, un exceso de O_2 , así como algunos atrapadores de NO, como la hemoglobina o la mioglobina, inhiben la actividad del NO. Por ello, se propuso que este mecanismo de estimulación se debe a la reacción entre el grupo tiol (-SH) y el nitro-compuesto (R-NO₂) que forman un nuevo compuesto llamado S-nitrosotiol, el cual al descomponerse libera el NO y, en consecuencia, activa a la enzima guanilato ciclasa (Ignarro, 1999).

Bioquímica del óxido nítrico

El NO es una molécula formada por dos átomos, un átomo de oxígeno (O) y otro de nitrógeno (N). El oxígeno tiene 6 electrones y el nitrógeno tiene 7 electrones; por lo tanto, cuando estos dos átomos reaccionan entre sí, sus electrones se aparean para formar una molécula de NO[•], que contiene un electrón desapareado. La presencia del electrón desapareado permite al NO[•] interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tales como el N y el azufre (S) que forman parte de las proteínas. La reacción del NO con las proteínas u otras moléculas se llama nitración y este proceso le confiere actividad fisiológica.

El NO también reacciona con átomos metálicos como el hierro (Fe), el cual forma parte de proteínas que se conocen como ferroproteínas o hemoproteínas, fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas y la generación de señales químicas intracelulares, también conocida como transducción de señales. Por otro lado, el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O₂) y con los radicales libres superóxido ([•]O₂⁻) e hidroxilo ([•]OH), los cuales son sumamente tóxicos (Stamler y col., 1992).

El NO es una molécula pequeña y neutra, con una vida media muy corta de 0.5 s – 5 s que difunde libremente a través de la membrana celular. Por estas razones, alcanza rápidamente las moléculas que se encuentran en el interior de la célula, a diferencia de las proteínas y algunas hormonas que regulan la fisiología celular. La complejidad en la acción de estas moléculas requiere de receptores en la superficie celular para poder entrar o salir, no así en el caso del NO, cuyas propiedades químicas lo convierten en un excelente mediador de respuestas celulares produciendo una amplia gama de efectos biológicos. Por ello, la síntesis y regulación del NO es de suma importancia para el organismo.

El NO, además de ser producido por los vasos sanguíneos de los mamíferos, también se sintetiza en los macrófagos, células inmunes que responden ante la agresión por algunos agentes patógenos (MacMicking *et al.*, 1997). En otros sistemas biológicos se produce por diversos mecanismos. Así, las enterobacterias y un tipo de bacterias llamadas desnitrificantes, pueden sintetizarlo mediante sistemas enzimáticos sencillos, tales como la nitrito y la nitrato reductasa (Spiro, 2007). Las plantas también lo producen a través de la nitrato reductasa cuando las concentraciones intracelulares de nitrito son muy elevadas (Meyer *et al.*, 2005). En éstas, el NO interviene en el metabolismo y el desarrollo celular (Freschi *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2010; Besson-Bard *et al.*, 2008).

Biosíntesis del óxido nítrico

Las células sintetizan el NO a partir del aminoácido L-arginina. Este proceso se efectúa por la enzima denominada óxido nítrico sintasa, NOS por sus siglas en inglés, mediante dos reacciones sucesivas que requieren de NADPH y O₂ (figura 1). Hasta la fecha se han descrito tres isoformas de NOS, es decir, tres proteínas similares que sintetizan el mismo producto, pero en diferentes tejidos. Una de las enzimas se encuentra en la cara interna de los vasos sanguíneos y se le denomina endotelial o eNOS, otra isoforma se localiza en el tejido nervioso y se le conoce como nNOS. Hay una tercera isoforma que sintetiza NO cuando las células reciben un estímulo y se le conoce como iNOS o isoforma inducible. Tanto la nNOS como la eNOS se localizan en el citoplasma y se producen continuamente, ambas son conocidas como enzimas constitutivas y requieren iones calcio. La eNOS y la nNOS liberan cantidades muy pequeñas de NO por cortos periodos de tiempo. La iNOS se sintetiza en algunas células inmunes, principalmente en los macrófagos y los neutrófilos. Esta enzima sintetiza cantidades mayores de NO por periodos de tiempo prolongados durante los procesos patológicos (Pacher *et al.*, 2007) (figura 2).

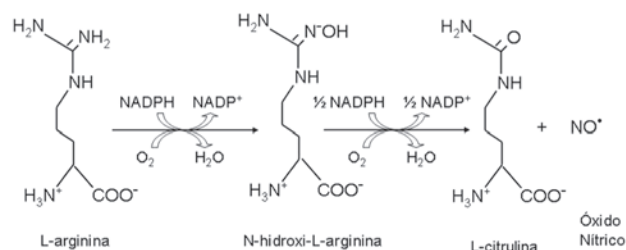


Figura 1. Producción biológica de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa. A partir de L-arginina se produce NO y L-citrulina. La reacción requiere NADPH y oxígeno molecular (Tomado de Tenorio *et al.*, 2008).

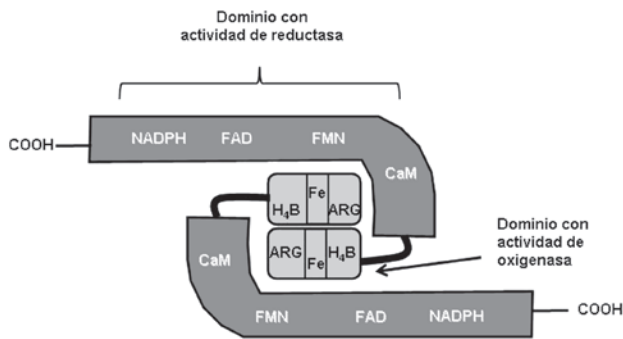


Figura 2. Modelo de la enzima óxido nítrico sintasa. Dímero de la enzima mostrando los dominios de reductasa y de oxigenasa, así como los dominios que unen a los cofactores NADPH, FAD, FMN y a la calmodulina (CaM) (Modificado de Dash, 2010).

Recientemente se han encontrado neuronas capaces de producir NO en el hipocampo, que es una región relacionada con el aprendizaje y la memoria (Machado *et al.*, 2008). Más aún, se ha detectado la producción de NO en las áreas visual y olfativa, lo que destaca su importancia en la percepción sensorial (Haghikia *et al.*, 2007; Landis y Lacroix, 2009). Además, las células del sistema nervioso periférico también producen NO en las neuronas que inervan al músculo liso del sistema vascular, el tejido endotelial del estómago y los pulmones (Yu *et al.*, 2005). Dado que estos nuevos descubrimientos rebasan las definiciones establecidas previamente, en un intento por esclarecer esta nomenclatura, actualmente las isoformas neuronal, inducible y endotelial son referidas como NOSI, NOSII y NOSIII, respectivamente, según el orden en que fueron purificadas (Nathan *et al.*, 2009). Algunos investigadores han reportado una cuarta isoforma de la enzima NOS, cuya actividad se encuentra en las mitocondrias (mtNOS) (Ghafourifar y Cadenas, 2005).

De manera interesante, en los últimos años se han estudiado enzimas bacterianas semejantes a las óxido nítrico sintasas de mamíferos que producen NO a partir de arginina desarrollando funciones novedosas en la biosíntesis de toxinas, participando en la protección contra el estrés oxidativo y en la regulación de la recuperación de daño por radiación (Crane *et al.*, 2010).

Blancos moleculares del óxido nítrico

De acuerdo con los experimentos de Furchgott descritos anteriormente, el NO actúa sobre la guanilato ciclasa. Esta enzima contiene en su estructura un sitio de reconocimiento específico para el NO, denominado grupo hemo y puede pasar de un estado activo a uno inactivo según las condiciones intracelulares (Rivero-Vilches *et*

al., 2001). La interacción de la guanilato ciclasa con el NO da por resultado la relajación del músculo liso y la dilatación del vaso sanguíneo aumentando su flujo y disminuyendo la tensión sanguínea (figura 3).

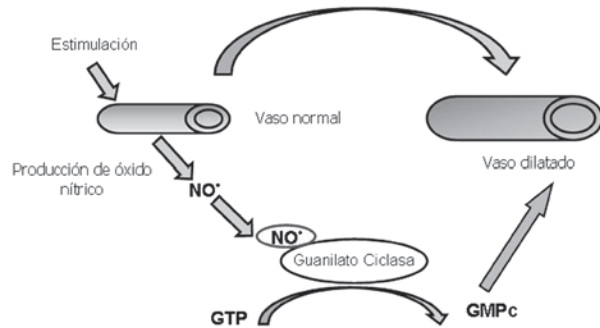


Figura 3. Acción vasodilatadora del NO. Los vasos sanguíneos producen gas NO que activa a la guanilato ciclasa, responsable de la síntesis de GMPc, el cual participa en la dilatación de los vasos sanguíneos.

También actúa sobre las plaquetas, inhibiendo su agregación; sobre los leucocitos impidiendo su adhesión a la pared de los vasos sanguíneos e incluso, evita la aterosclerosis (Antoniades *et al.*, 2007). Además, el NO es un inhibidor de la síntesis de DNA, de la mitosis y de la proliferación de células del músculo liso de los vasos sanguíneos (Tenorio *et al.*, 2008). La tabla 1 resume los efectos biológicos que tiene el NO sobre el sistema cardiovascular (Strijdom *et al.*, 2009).

Tabla 1. Efectos biológicos del NO sobre el sistema cardiovascular

Célula blanco/Tejido/Órgano	Efecto
Músculo liso	Relajación- vasodilatación
Plaquetas	Inhibe su agregación
Células inflamatorias	Acciones antiinflamatorias
Especies reactivas de oxígeno	Efectos antioxidantes
Células endoteliales	Angiogénesis
Miocardio	Crecimiento y desarrollo fetal y posnatal Aumenta o disminuye la función contráctil Antihipertrofia Cardioprotector contra daño isquémico Generación y proliferación celular Anti apoptótico: promueve la supervivencia Aumenta o disminuye la contracción
Cardiomiocitos	Daño en cantidades excesivas: pro apoptótico, pro necrótico.

(Modificada de Strijdom *et al.*, 2009)

El NO en los procesos relacionados con las enfermedades

La participación del NO en procesos biológicos simultáneos en el organismo muestra que esta molécula regula redes fisiológicas importantes. La falta de regulación en la producción o disponibilidad del NO se asocia con enfermedades tales como la hipertensión, la disfunción eréctil, algunos procesos neurodegenerativos y disfunciones del sistema inmune como el choque séptico, lo que puede causar la muerte del paciente (Pacher *et al.*, 2007).

En este contexto es evidente que el control de la producción de NO es una cuestión de vida o muerte. El rompimiento del equilibrio establecido entre el NO y su interacción con otros compuestos en el organismo desencadena la aparición de sus productos secundarios tóxicos, el superóxido y el peroxinitrito, moléculas conocidas por ser muy reactivas y oxidantes (figura 4).

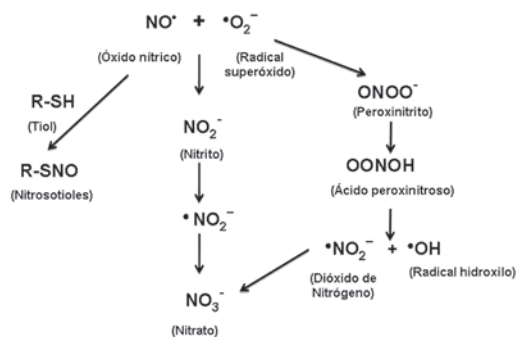


Figura 4. Reacción del NO con el superóxido. El NO y el radical superóxido reaccionan y forman el peroxinitrito, molécula altamente oxidante, el cual finalmente se descompone y forma los radicales dióxido de nitrógeno y radical hidroxilo. Una ruta simplificada muestra la producción de nitrito y nitrato a partir del NO. El NO reacciona con grupos sulfhidrilo (R-SH) de las proteínas formando nitrosotioles provocandoles daño (Modificado de Nathan y Shiloh, 2000).

Bajo condiciones fisiológicas el superóxido y el peroxinitrito pueden dañar a las proteínas y a los lípidos esenciales para el buen funcionamiento celular. El superóxido reacciona con el NO y reduce su biodisponibilidad, alterando la homeostasis vascular. El peroxinitrito atraviesa membranas celulares mediante canales aniónicos causando la oxidación de lípidos y proteínas. Por ejemplo, la producción descontrolada de NO se ha asociado con la muerte neuronal en algunas zonas del cerebro, lo cual ocurre en procesos neurodegenerativos, tal como la enfermedad de Alzheimer (Pacher *et al.*, 2007). Además, el daño neuronal que causa la falta de O₂ al cerebro, conocida como isquemia, se debe en parte a la formación del peroxinitrito que se produce cuando se reestablece el flujo de O₂ al cerebro (Lancaster *et al.*, 1992). Asimismo, el peroxinitrito daña varias moléculas de la mitocondria, lo cual

afecta la respiración celular, disminuye la síntesis de energía y afecta el metabolismo del calcio (Radi *et al.*, 1994). Esta interacción finalmente desencadena el proceso de muerte celular conocido como apoptosis (Radi *et al.*, 2000). Estos son algunos ejemplos de los múltiples trastornos en los cuales participa el NO (tabla 2, Chirino *et al.*, 2006).

Tabla 2. Trastornos asociados con el peroxinitrito

Enfermedad	Célula blanco	Evidencia
Alzheimer	Neuronas y células glia	Se eleva la nitración de proteínas
Huntington	Células neuronales	Nitración de proteínas disminuida por metaloporfirinas que degradan el peroxinitrito
Isquemia focal cerebral	Células neuronales de cerebro	Aliviada por la administración de metaloporfirinas
Disfunción cardíaca	Células cardíacas	Nitración de proteínas reducida por metaloproteínas
Diabetes autoinmune y neuropatía diabética	Células Beta del páncreas	Aumento en la tinción de 3-NT (3-nitrotirosina en proteínas como marcador de la presencia de peroxinitrito)
Hipertensión	Endotelio vascular	Falta de biodisponibilidad de NO
Enfermedades pulmonares	Pulmones	Efecto protector con FP15 (tetrakis-2-(trietilén glicol monometil éter) piridil porfirina de cloruro de hierro), catalizador que descompone el peroxinitrito
Artritis y colitis	Celulas articulares sinoviales	FP15 reduce el MDA (malondialdehído) y aumenta la MPO (mieloperoxidasa)
Enfermedades renales	Células renales	Aumento de proteínas nitradas, lipoperoxidación y especies reactivas de nitrógeno

(Chirino *et al.*, 2006)

Participación del NO en amibiasis y tricomoniasis

El NO también tiene una función muy importante dentro del sistema inmune, tanto de defensa como de daño al propio huésped. Varios estudios demuestran su toxicidad y la del peroxinitrito hacia distintos patógenos, entre los cuales están bacterias (Nathan y Shiloh, 2000), protozoarios (Brunet, 2001; Clark y Rockett, 1996; Sannella *et al.*, 2003) e incluso virus, tanto de DNA como de RNA (Akaike y Maeda, 2000). En algunas infecciones bacterianas, el NO se ha involucrado en la inflamación de la mucosa gástrica causada por *Helicobacter pylori*, además de otras especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno que se producen durante la infección (Konturek *et al.*, 2009).

Este mismo fenómeno se ha observado en otras infecciones bacterianas causadas por *Listeria monocytogenes*, pneumococos y estreptococos, lo cual indica que la activación de las células responsables de la inmunidad no sólo eliminan al agente patógeno, sino que también dañan al hospedero (Zwaferink *et al.*, 2008).

Durante las infecciones parasitarias experimentales, el uso de ratones que tienen afectado el gene de la enzima iNOS requerida para la síntesis de NO, ha revelado que la actividad de esta enzima es esencial para controlar al agente patógeno, como en la infección provocada por el protozoario *Leishmania major* (Assreuy *et al.*, 1994). Los ratones incapaces de producir NO por la falta de la enzima son altamente susceptibles a la infección por *Trypanosoma cruzi* (Saeftel *et al.*, 2001), aunque otros estudios revelan que la enzima es importante, pero no esencial para el control de la infección por este parásito (Cummings y Tarleton, 2004). En la tricomoniasis experimental causada por el protozoario *Trichomonas vaginalis* se pone de manifiesto la importancia del NO en los mecanismos de defensa inmune puesto que los macrófagos producen NO como respuesta a la exposición a las tricomonas (Han *et al.*, 2009).

Resultados de nuestro laboratorio señalan que los macrófagos de ratón de la línea RAW264.7 sintetizan NO y expresan la proteína iNOS cuando se incuban con la bacteria *Salmonella typhimurium* previamente inactivada por calor a 80 °C. Este procedimiento conserva intacto al lipopolisacárido, molécula que estimula la síntesis de NO. Sin embargo, cuando el cultivo celular se incubaba con la bacteria viable, los macrófagos no producen el NO. Estos resultados indican que la bacteria posee mecanismos para evadir los mecanismos de defensa del huésped que la podrían destruir (figura 5) (Morales-Rosales, 2004).

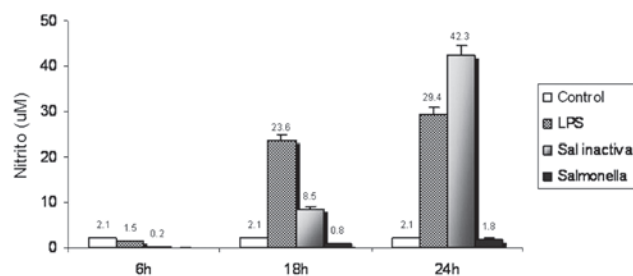


Figura 5. Producción de NO cuantificado como nitrito (NO₂) en macrófagos RAW264.7 incubados con *Salmonella typhimurium*. *Salmonella* inhibe la producción de NO en los macrófagos que regularmente lo producen, al incubarlos con lipopolisacárido (LPS) o con la bacteria inactivada. Los macrófagos incubados solos, sin inductores, no producen NO (Tomado de Morales-Rosales, 2004).

Otros experimentos de nuestro grupo de investigación se han enfocado a estudiar los mecanismos de activación de la inmunidad innata representada por los macrófagos. Estas células inmunes poseen receptores denominados TLR que reconocen diversas moléculas presentes en los agentes patógenos. Para esclarecer esta interacción, los macrófagos de ratón RAW264.7 se incubaron con DNA de los parásitos *Entamoeba histolytica* y *T. vaginalis* y se evaluó la capacidad de esta molécula para activarlos a través del receptor TLR9 involucrado en el reconocimiento de un determinado tipo de DNA. Los resultados indicaron que el DNA de estos parásitos indujo la síntesis del RNA mensajero que codifica para la iNOS y el TNF- α (figura 6), este último está involucrado en la respuesta inflamatoria (Solís-Martínez, 2005), y dicho proceso está directamente relacionado con los mecanismos de defensa inmune. Además, la incubación de macrófagos RAW264.7 con DNA de *T. vaginalis* indujo la expresión de la proteína iNOS (Alderete-Ledezma, 2005) (figura 7).

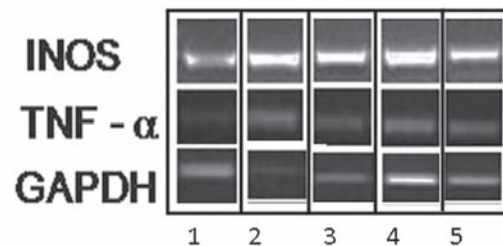


Figura 6. Producción de RNAm de la iNOS y el TNF- α por macrófagos RAW264.7. Los macrófagos se incubaron con: (1), medio de cultivo RPMI 1640 completo; (2), LPS + IFN- γ ; (3), DNA de ratón; (4), DNA de *Trichomonas vaginalis*; (5), DNA de *Entamoeba histolytica*. Se extrajo el RNA total y se realizaron ampliificaciones mediante la reacción RT-PCR. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tomado de Solís-Martínez, 2005).

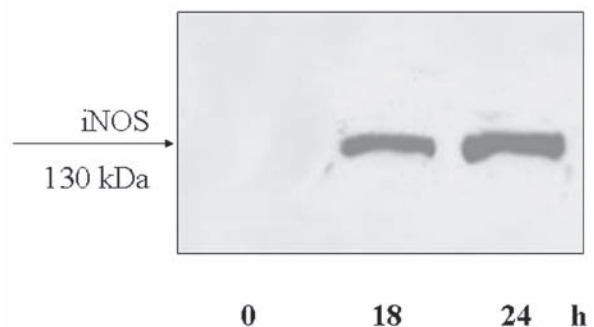


Figura 7. Inducción de la expresión de la enzima iNOS en macrófagos incubados con DNA de *T. vaginalis*. La óxido nítrico sintasa se detecta con un anticuerpo específico en homogenados de macrófagos de la línea RAW264.7 que se han incubado con DNA del parásito *T. vaginalis* (Tomado de Alderete-Ledezma, 2005).

En un modelo de ratón hembra inoculado en el peritoneo con una cepa patógena de *T. vaginalis* indujo la síntesis de NO y la expresión del RNA mensajero que codifica para la iNOS, así como el RNA mensajero de varias citocinas involucradas en la inducción de una respuesta inflamatoria (García-Negrete, 2002). Estos resultados indican que la síntesis de NO se observa no sólo en modelos *in vitro* sino también en un organismo completo.

De manera importante, en la infección hepática experimental causada por *E. histolytica*, se observó un papel contradictorio del NO, ya que se desarrolló el absceso hepático amibiano a pesar de la inducción de la síntesis del RNAm para la iNOS y la eNOS, (Ramírez-Emiliano *et al.*, 2005). Esto indica que en este caso, la presencia del NO parece ser más dañina para el hospedero que para la amiba, ya que probablemente facilitó la invasión por el parásito, lo que pone de manifiesto una vez más el doble papel de esta molécula, para proteger o para dañar al hospedero (Ramírez-Emiliano, 2007). De lo anterior, debe considerarse el estricto control a que debe estar sujeta la síntesis del NO en el organismo.

CONCLUSIONES

El NO es una molécula gaseosa que en la atmósfera es responsable del daño a la capa de ozono, pero su participación más importante está en la regulación de diversos procesos biológicos que se desarrollan en los seres vivos, desde las bacterias hasta los organismos superiores, incluido el hombre. Su papel como un mensajero intracelular originó el descubrimiento de su participación en la regulación de las funciones del sistema cardiovascular. Este gas se sintetiza de manera continua, a través de un proceso enzimático efectuado por alguna de las tres isoformas de la NOS, pero su producción se incrementa en diversos estados fisiológicos y fisiopatológicos. El NO es una molécula oxidante y reactiva, puede reaccionar con algunos derivados del oxígeno, produciendo compuestos tóxicos, como el peroxinitrito. También el NO reacciona con macromoléculas, a las que activa o daña; de allí su papel en la salud y en la generación de diversas enfermedades donde están comprometidos diversos órganos y sistemas. El NO es producido como respuesta al estímulo de diversas moléculas involucradas en la enfermedad, como el lipopolisacárido bacteriano o por productos derivados del sistema inmune, como el interferón gamma (IFN- γ). Esta respuesta a los agentes patógenos es efectuada a través de receptores que se localizan en la membrana de los macrófagos que participan en la

inmunidad innata y adquirida. Nuestros estudios han estado enfocados a entender el mecanismo inmune que se activa en infecciones experimentales causadas por los parásitos *E. histolytica* y *T. vaginalis*, y por la bacteria patógena *Salmonella spp*, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. En estos sistemas se ha puesto de manifiesto la producción de NO como lo han descrito otros autores y como nosotros lo corroboramos en algunos de nuestros trabajos de investigación, donde se ha propuesto la hipótesis del daño causado por el NO al propio hospedero en la amibiasis hepática experimental. Por todo lo anterior, es claro que la producción de NO en los seres vivos es un proceso altamente regulado, con un fino balance entre la protección y el daño causado al huésped, por lo que resulta importante seguir explorando los mecanismos que regulan la síntesis del NO para poder estimular o interrumpir su síntesis, dependiendo del resultado que se desee lograr, en especial con fines terapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con fondos proporcionados por el CONACYT, CONCYTEG y la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- Akaike, T. y Maeda, H. (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, 101(3) 300-308.
- Alderete-Ledezma, J. E. (2005). *Inmunodetección de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos de ratón estimulados con ADN de Trichomonas vaginalis*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- Antoniades, Ch., Shirodaria, Ch., Crabtree, M., Rinze, R., Alp, N., Cunnington, C., Diesch, J., Tousoulis, DF., Stefanadis, Ch., Leeson, P., Ratnatunga, Ch., Pillai, R. y Channon, K.M. (2007). Altered Plasma Versus Vascular Bioproteins in Human Atherosclerosis Reveal Relationships Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling, Endothelial Function, and Inflammation. *Circulation*, 116 2851-2859.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C. A., Liew, F. Y. y Moncada, S. (1994). Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, 24(3) 672-676.
- Berrazueta, J.R. (1999). El Nobel para el óxido nítrico. La injusta exclusión del Dr. Salvador Moncada. *Revista Española de Cardiología*, 52(4) 221-226.
- Besson-Bard, A., Griveau, S., Bedioui, F. y Wendehenne, D. (2008). Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 59(12) 3407-3414.
- Brunet, L. R. (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, 1 1457-1467.

- Centelles, J. J., Esteban, C. e Imperial, S. (2004). Óxido nítrico un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *Ámbito farmacéutico. Bioquímica OFFARM* 23(11) 96- 102.
- Crane, B.R., Sudhamsu, J. y Patel, B.A. (2010) Bacterial nitric oxide synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 79 445-470.
- Chirino, Y.I., Orozco-Ibarra, M. y Pedraza-Chaverri, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de Investigación Clínica*, 58(4) 350-358.
- Clark, I. A. y Rockett, K. A. (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Advances in Parasitology*, 37 1-56.
- Cueto, R., Pryor, W. A. (1994). Cigarette smoke chemistry: conversion of nitric oxide to nitrogen dioxide and reactions of nitrogen oxides with other smoke components as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 7(1) 97-111.
- Culotta, E. y Koshland, DE Jr. (1992). NO news is good news. *Science*, 18(258) 1862-1865.
- Cummings, K. L. y Tarleton, R. L. (2004). Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity* 72 4081-4089.
- Dash, P. Nitric Oxide. Basic Medical Sciences. St. George's, University of London. [En línea]. (<http://www.sglu.ac.uk/dept/immunology/-dash>). (Consulta: 08 diciembre 2010).
- Freschi, L., Rodrigues, M. A., Domingues, D. S., Purgatto, E., Van Sluys, M. A., Magalhaes, J. R., Kaiser, W. M. y Mercier, H. (2010). Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant physiology*, 152(4) 1971-1985.
- Furchgott, R. F. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, 19(4) 235-251.
- García-Negrete O. H. (2002). *Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y citocinas en la infección intraperitoneal experimental por Trichomonas vaginalis en ratón*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- Ghafourifar, P. y Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(4) 190-195.
- Haghikia, A., Mergia, E., Friebe, A., Eyse, I U.T., Koesling, D. y Mittmann, T. (2007). Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *The Journal of Neuroscience*, 27(4) 818-823.
- Han, I. H., Goo, S. Y., Park, S. J., Hwang, S. J., Kim, Y. S., Yang, M. S., Ahn, M. H. y Ryu, J. S. (2009). Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(3) 205-212.
- Hurst, J. W. y Fye, W.B. (1995). William Murrell Profiles in Cardiology. *Clinical Cardiology*, 18 426-427.
- Ignarro, L. J. (1999). Nitric Oxide: A Unique Endogenous Signaling Molecule in Vascular Biology. *Bioscience Reports*, 19(2) 51-71.
- Keller, M. y Reiners, W. A. (1994). Soil-Atmosphere Exchange of Nitrous Oxide, Nitric Oxide, and Methane Under Secondary Succession of Pasture to Forest in the Atlantic Lowlands of Costa Rica. *Global Biogeochemical Cycles*, 8(4) 399-409.
- Konturek, P. C., Konturek, S. J. y Brzozowski, T. (2009). Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(3) 3-21.
- Landis, B. N. y Lacroix, J. S. (2009). Olfactory function and nasal nitric oxide. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 17(1) 18-22.
- Lavoie, G. A., Heywood, J. B. y Keck, J. C. (1970). Experimental and Theoretical Study of Nitric Oxide Formation in Internal Combustion Engines. *Combustion Science and Technology*, 1(4) 313-326.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., y Biagi, G.L. (2001) Capítulo 5. Cuore Farmaci antianginosi. En *Farmacología e Tossicología*. 5ª Edición (P. 155-160). Padova, Italia. Ed. Piccin Nuova Libreria, S.p.A.
- Machado, S., Portella, C. E., Silva, J. G., Velasques, B., Bastos, V. H., Cunha, M., Basile, L., Cagy, M., Piedade, R. A. y Ribeiro, P. (2008). Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. *Revista de Neurología*, 46(9) 543-549.
- MacMicking J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15 323-350.
- Meyer, C., Lea, U.S., Provan, F., Kaiser, W.M. y Lillo, C. (2005). Is nitrate reductase a mayor player in the plant NO (Nitric Oxide) game ? *Photosynthesis Research*, 83(2) 181-189.
- Morales-Rosales, J.E. (2004). *Producción de NO en macrófagos sensibles y resistentes a la infección por Salmonella*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- Murad, F. (2004). Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Bioscience Reports*, 24(4-5) 452-474.
- Nathan, S. S., Huvos, A. G., Casas-Ganem, J. E., Yang, R., Linkov I., Sowers, R., DiResta, G. R., Gorlick, R. y Healey, J. H. (2009). Tumour interstitial fluid pressure may regulate angiogenic factors in osteosarcoma. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38(12) 1041-1107.
- Nathan, C. y Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 8841-8848.
- Pacher, P., Beckman, J. S. y Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1) 315- 424.
- Radi, R. (2000). Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología*, 6 123-130.
- Radi, R., Rodríguez, M., Castro, L. y Telleri, R. (1994). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308(1) 89-95.
- Ramírez-Emiliano, J., González-Hernández, A., Arias-Negrete, S. (2005). Expresión de inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the development of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*. *Current Microbiology* 50(6) 299-308.
- Ramírez-Emiliano, J., Flores-Villavicencio, L. L., Segovia, J. y Arias-Negrete, S. (2007). Participación del óxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina (Buenos Aires)*, 67(2) 167-176.
- Ren, T., Roy, R., Knowlesi, R. (2000). Production and Consumption of Nitric Oxide by Three Methanotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9) 3891-3897

- Rivero-Vilches, F., de Frutos, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez Puyol, D. y Saura, M. (2001). Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPC. *Nefrología*, 21(3) 233-239.
- Saefel, M., Fleischer, B. y Hoerauf, A. (2001). Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*, 69 2252-2259.
- Sannella, A., Gradoni, L., Persichini, T., Ongini, E., Venturini, G., Colasanti, M. (2003) Intracellular release of nitric oxide by NCX972, an NO-releasing metronidazole, enhances *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7) 2303-2306.
- Solís Martínez, M.O. (2005). *Activación de macrófagos de ratón por DNA de los parásitos Entamoeba histolytica y Trichomonas vaginalis: producción de óxido nítrico y factor de necrosis tumoral alfa*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiology Reviews*, 31 193-211.
- Stamler, J. S., Singel, D. J., y Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science*, 258 1898-1902.
- Strijdom, H., Chamane, N. y Lochner, A. (2009). Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovascular Journal of Africa*, 20(5) 303-310.
- Tenorio, F.A., Torres, J. C., Zarco, G., Díaz, J., Pastelin, G., Del Valle, L. (2008) El óxido nítrico y las enfermedades cardiovasculares: cardioprotección versus cardiotoxicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3) 39-48.
- The Chemical Database. The Department of Chemistry at the University of Akron. [En línea]. *Nitric Oxide*. (<http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/Chemicals/8000/6828.html>). (Consulta: 27 de febrero de 2010).
- The Student Nitric Oxide Explorer. SNOE. Scientific Objectives. [En línea]. (http://lasp.colorado.edu/snoe/mission_overview/science_objectives.html). (Consulta: 27 de febrero de 2010).
- Yu, Z., Xia, X. y Kone, B. C. (2005). Expression profile of a human inducible nitric oxide synthase promoter reporter in transgenic mice during endotoxemia. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288(1) F214-F220.
- Zafra, A., Rodríguez-García, M.I. y Alché, J de D. (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* 10, 36-49.
- Zwaferink, H., Stockinger, S., Reipert, S. y Decker, T. (2008). Stimulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Beta Interferon Increases Necrotic Death of Macrophages upon *Listeria monocytogenes* Infection. *Infection and Immunity*, 76(4) 1649-1656.