

Escenciales en Biomedicina (Biología, Patobiología y Bioclínica) Humana de las NOSS (Óxido Nítrico-Sintetasas)

Essentials in Human Biomedicine (Biology, Patobiology and Bioclinic)
of the Nitric Oxide Synthetases (NOS)

GRÉGORY ALFONSO GARCÍA MORÁN¹, DIANNEY CLAVIJO GRIMALDI², ÓMAR RAMÓN MEJÍA³, ANANÍAS GARCÍA CARDONA⁴,
MARIO VITTORINO⁵, CIRO ALFONSO CASADIEGO TORRADO⁶.

Forma de citar: García GA, Clavijo D, Mejía OR, García A, Vittorino M, Casadiego CA. Escenciales en biomedicina (biología, patobiología y bioclínica) humana de las NOS (óxido nítrico-sintetasas). Rev CES Med. 2007; 21(2): 61-82

Al respecto del NO como nuestro arquetipo formal de trabajo,
recuerda la oración célebre: "*Mensajero sois, amigo; No merecéis culpa, no*".

Quijote, IV, 2, 31.

*"It is ironical that I am now ordered by my physician to eat nitroglycerin
(Es irónico que yo esté recibiendo una indicación por parte de mi
médico de consumir nitroglicerina)"*

Alfred Nobel

¹ MD. M Sc(C). Docente Facultad de Medicina. Unidad de Educación e Instituto de Investigación. Fundación Universitaria UNISANITAS (FUS) y Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana(PUJ). E- mail: ikarosgreg@gmail.com

² MD. Docente Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia. Docente. Facultades de Medicina y Enfermería. Unidad de Educación e Instituto de Investigación. Fundación Universitaria UNISANITAS (FUS).

³ MD. Docente Universidad Colegio Mayor de Nuestra del Rosario y Universidad El Bosque.

⁴ Odontólogo. Docente. Coordinador Unidad de Morfología. Facultad de Medicina, y Facultad de Rehabilitación, Terapia y Desarrollo Humano. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Colegio Mayor de Nuestra del Rosario.

⁵ Oftalmólogo. Docente Universidad Colegio Mayor de Nuestra del Rosario. Oftalmólogo Adscrito a Colsubsidio.

⁶ MD. Docente Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia y Facultades de Medicina y Enfermería. Unidad de Educación e Instituto de Investigación. Fundación Universitaria UNISANITAS (FUS).

Recibido: 4 junio / 2007. Revisado: 8 agosto / 2007. Aceptado: 15 septiembre / 2007

RESUMEN

El Óxido Nítrico (NO) es un radical libre gaseoso que juega roles prominentes en señalamiento celular, expresión y regulación génica, energética celular, proliferación celular y citostasis, e inmunidad celular y tolerancia, incluyendo funciones inflamatorias. Aunque NO sirve a roles beneficiosos como citotrófico, vasodilatador, anti-angiogénico, anti-trombótico, anti-inflamatorio, defensa inmune del huésped, antiproliferativo y antioxidante, su excesiva producción puede ser citotóxica, vasoconstrictora, pro-angiogénica, protrombótica, pro-inflamatoria, pro-proliferativa y oxidante, a causa de la endógena producción de intermediarios reactivos del nitrógeno y/o el oxígeno. Esta revisión explora el conocimiento colectivo del rol de las NO-Sintetasas (NOSs) en biología, patobiología, bioclínica humana y nuevas oportunidades en prevención y tratamiento.

PALABRAS CLAVE

Bioquímica
Biología Celular y Molecular
Óxido Nítrico
Óxido Nítrico-Sintetasas
Fisiología

SUMMARY

The Nitric Oxide (NO) is a gaseous free radical that plays prominent roles in cell signaling, gene expression and regulation, cellular energetics, cell proliferation and cytostasis, and cell immunity and tolerance including inflammatory functions. Although NO serves beneficial roles as cytotrophic, vasodilator, anti-angiogenic, antithrombotic, anti-inflammatory, host defense, antiproliferative and antioxidant, excessive production can be cytotoxic, vasoconstrictor, pro-angiogenic, prothrombotic, pro-inflammatory, pro-proliferative and oxidant, because endogenous production of reactive nitrogen and/o oxygen intermediates. The review explores the collective knowledge

of the role of NO-Synthetases (NOSs) in human biology, pathobiology, bioclinic and new opportunities in prevention and treatment.

KEY WORDS

Biochemistry
Molecular Cell Biology
Nitric Oxide
Nitric Oxide-Synthetase
Physiology

INTRODUCCIÓN

La comunicación en los organismos complejos es un fenómeno metacelular por medio del cual los aspectos morfofisiológicos y el devenir ecológico socio-ambiental trascienden y garantizan la génesis de la homeostasis, que es la base del trabajo en grupo y orquestado, en aras de garantizar eventos como la Aclimatación frente a un cambio interno y/o externo. En 1980 aparecen los gases en la trama de la citocomunicación, con la entrada en escena del Óxido Nítrico (NO), con la posterior aparición del Monóxido de Carbono (CO) de producción endógena, e incluso el probable rol de otras moléculas como el Ácido Sulfhídrico (H₂S). Esta transmisión celular "Gasocrina" es en la actualidad uno de los focos de estudio más intensos y en particular la temática del NO, es un campo de muy rápida y creciente importancia en biología, patobiología, bioclínica y fármaco-terapéutica humana, desde su mención "honorífica" como la molécula del año en 1992(1).

METODOLOGÍA

Nuestra búsqueda se sustentó en dos campos: los Bancos de Genética, Genómica, Proteómica

y Enzimología y los Bancos de Bibliografía Científica.

En el primer caso se consultó el Banco de Genética y Genómica Humana MIM (*Mendelian Inheritance McKusick-*)(2) y el HUGO (*Human Genome Organization-*)(3). La nomenclatura y codificación para genes, proteínas y trastornos relacionados que se utilizará es la asignada por MIM y HUGO. Los elementos claves en enzimología se consultaron del banco IUBMB (*International Union of Union of Biochemistry and Molecular Biology-*)(4). Para la búsqueda de bibliografía y literatura científica médica humana se consultaron los dos principales bancos electrónicos: el banco norteamericano PUBMED (*National Library of Medicine database*)(5) y el banco europeo EMBASE (*The bibliographic database for biomedical and pharmacological information-*)(6). La matriz de búsqueda que se aplicó para PubMed y EMBASE fue "human nitric oxide review" con los campos "Physiology, Biochemistry, Molecular Cell Biology, Enzymology, Biology, Pathobiology, Immunology, Pathology, Neurobiology, Neuroscience", con operadores booleanos "or/and" con los límites de fecha "2002-presente". Algunas referencias históricas de importancia crucial, anteriores al 2002 serán tenidas en cuenta.

Definiendo el Problema

El NO y sus generalidades

El NO por mucho tiempo se ha reconocido como un gas nocivo y un agente de contaminación ambiental y dentro de los parámetros de la Biología resulta bastante curioso y paradójico su rol como un mediador de comunicación celular que ejerce acciones celulares autocrinas, tisulares paracrinas y sistémicas endocrinas, esto último a causa de que puede ser transportado por proteínas plasmáticas (Ej.: albúmina y hemoglobina), desde un sitio primario de biosíntesis, a sitios blancos distantes. Incluso hay evidencia del papel de los nitritos y menormente de los nitratos de origen dietario (a partir de vegetales y frutas) como generadores de complejos NO-Hemoglobina, lo

cual va de la mano del rol saludable de esta dieta en la Salud Cardiovascular. Se ha estimado que la concentración de nitrosothioles plasmáticos es tan sólo de $1\mu\text{M}$, siendo la forma más abundante la nitroso-albúmina y se ha sugerido que está directamente relacionado a la concentración intracelular. Otros transportadores plasmáticos son la proteína membranal eritrocitaria AE1 (intercambiador aniónico 1) y la gamma-glutamil-cisteína-transpeptidasa, que en la nomenclatura de antígenos de diferenciación corresponden a CD233 y CD224. CD233 fuera de ello en su estructura acarrea el grupo antigénico sanguíneo menor denominado *Diego*. Para poder explicar su variada gama de efectos celulares, tisulares y sistémicos se deben tener en cuenta ciertos grados de complejidad que han sido parcialmente dilucidados, ellos son:

- La bioquímica de las enzimas NO-Sintetasas.
- La existencia de una gran variedad de derivados o, por decirlo mejor, de especies relacionadas al NO, las cuales tienen dinámicas bioquímicas variables y funcionalidades diversas.
- El umbral de concentración, ya que concentraciones bajas suponen un comportamiento y concentraciones altas otro.
- El ambiente celular, ya que su acción se tornaría moduladora al participar de una sumatoria de eventos dependientes de la acción sinérgica tanto como antagónica en una circunstanciales temporales-espaciales, donde están co-existiendo y co-actuando factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y demás. Este ambiente celular varía de acuerdo a determinantes tan específicas como la fase de desarrollo ontogénico, los ritmos circadianos, la presencia de estrés y el tipo de este, la etapa de desarrollo celular, *verbigracia*, si la célula está en comprometimiento, proliferación, diferenciación y maduración.

Todos los tópicos anteriores explican la gran cantidad de información conflictiva y difícil en oca-

siones de conectar para formular cuerpos conceptuales, sin embargo hoy el meta-análisis de hallazgos tempranos de la mano del conocimiento contemporáneo, han abierto la caracterización de algunos modelos plausibles (7, 8).

Dinámica del NO

1. Generalidades de la Dinámica del NO

El NO es un gas radical libre paramagnético incoloro incluso a temperaturas tan bajas como 1500 °C. Se ha estimado que tiene un coeficiente de largo de difusión a 370 °C, de 1.4 veces con respecto al oxígeno, lo cual le permite teóricamente difundir sobre 100µm en unos pocos segundos. Sin embargo la química biológica bajo las condiciones expuestas es aún pobremente conocida y entendida. El NO es una molécula supremamente lábil, con una vida media en soluciones oxigenadas de hasta 10 segundos y en soluciones acuosas fisiológicas de 3 a 5 segundos, lo que contrasta con su vida media de hasta 500 segundos o más en soluciones acuosas puras. La inactivación del NO es en especial dependiente del radical libre superóxido (nomenclatura técnica en química orgánica) y menormente del oxígeno molecular, claro dependiendo de si hablamos de fase acuosa o fase gaseosa. En general, se ha estimado que la vida media no es un valor constante y es inversamente proporcional a la concentración del NO, así que la vida media incrementa tanto como el NO llega a ser más disuelto. La fisiología del NO se deriva de los eventos bioquímicos estructurales que desencadena y todos estos a su vez se considera hoy que favorecen también su transporte, de tal forma, que se podría hablar de un "Ciclo del NO". Estos eventos son su actividad óxido-reductiva generadora de especies reactivas, sean o no radicales libres, y la interacción con metales de transición. En el primer caso, es decir, en la dinámica de los radicales libres, esto es aún un gran problema para los bioquímicos y las personas de las áreas de la salud que no tienen conocimiento en Química Inorgánica y Orgánica, ya que la

nomenclatura es bastante confusa para quien no la maneje y la entienda, dado que se deriva de los estados de oxidación, tanto del nitrógeno como del oxígeno y otros factores asociados como el pH. La propiedad de radical libre sucede tanto en fase acuosa como en fase gaseosa, esto último podría tener una trascendencia inusitada en biología y patobiología ventilatorio-respiratoria, pero esto es hipotético y va más allá de esta breve revisión. La generación de especies reactivas se hace por tres grandes mecanismos:

- La oxidación y reducción del NO interconvertiblemente en una forma tal que la pérdida de un electrón genera NO⁺ (*Nitrosonium*) o la ganancia de un electrón genera NO⁻ (anión nitroxil). El *Nitrosonium* puede oxidarse hacia ión *nitronium* (NO₂⁺). Estas formas de NO varían de acuerdo al número de oxidación del nitrógeno, la carga molecular y el largo del puente entre el Nitrógeno y el Oxígeno. Otro rasgo llamativo y aparentemente fundamental a este ítem es que la carga de neutralidad del NO está en función del pH, en medio acuoso.
- La reactividad del NO y sus radicales interconvertibles con oxígeno atómico, oxígeno molecular (O₂), o moléculas que contienen oxígeno y los radicales libres derivados en todas estas presentaciones. Ejemplos de estas especies oxidativas son el singlete de oxígeno, el superóxido, el radical hidroperoxil, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxil, el ácido hipocloroso y el radical trioxocarbonato. Esta reactividad varía según se presente el proceso en fase acuosa o en fase gaseosa, es así que en la ausencia de oxígeno el NO se disuelve en agua quizás pobremente. En el aire el NO reacciona con oxígeno para formar dióxido de nitrógeno (NO₂) el cual es un gas. El NO₂ puede oxidarse hacia el radical dióxido de nitrógeno (NO₂[•]). En agua con alta concentración de oxígeno, se forma nitrito (NO₂⁻) preferencialmente a nitrito junto con nitrato (NO₃⁻).
- Procesos de clivaje simétrico o asimétrico y la isomerización. Por ejemplo, la reacción en fase

acuosa del NO con superóxido genera el intermediario anión peroxinitrito (OONO⁻), el cual es inestable y se reordena para formar nitrato, pero en fase gaseosa se descompone hacia hidroxilo y dióxido de nitrógeno. La formación de nitrato en fase acuosa se ha demostrado que es pH dependiente, ya que la conformación isomérica en pH alcalino es *cis* y sólo un porcentaje menor está protonado, situación clave dado que cuando se protona, se isomeriza a *trans* y se rearregla a nitrato. También a nivel *in vivo* parece fundamental y esencial la descomposición del peroxinitrito en la presencia de CO₂ hacia dos radicales: el NO₂ y el radical carbonato.

Otras especies nitroxidativas potenciales que se conocen y se producen por diversos mecanismos como los anteriores son el ácido peroxinitroso (ONOOH) y el halogenado nitril-cloruro (NO₂Cl)(9).

2. Generalidades sobre la interacción del NO con dianas moleculares

Este campo tiene un connotación histórica ya que se habían identificado con mucha anterioridad al descubrimiento y a la consecuente explosión de información del NO, puesto que había un conocimiento importante en Toxicología, en el campo referente a la intoxicación con óxidos de nitrógeno a nivel industrial. El NO a causa de su capacidad REDOX es capaz de nitrar sitios nucleofílicos en cualquier biomolécula, sin embargo, hay información pertinente en el contexto de las proteínas y, en especial, en algunas de ellas (reactividad proteica variable, no todas las proteínas parecen ser blanco), ya que pueden ser nitradas tanto en sus grupos aminos, anillos aromáticos, grupos alcohol y tioles reducidos. De tal forma que teóricamente cualquier aminoácido aislado o en contexto proteico puede ser nitrado (reacción de Nitración), aunque hay una prioridad por los aminoácidos con grupos thiólicos (cisteína y metionina) y estructura aromática (tirosina, el triptófano y la fenilalanina). De la

Nitración en particular hay información importante sobre la reactividad del NO y sus derivados, procesos denominados respectivamente: "Nitrosilación" y "Nitrosación". Esta reactividad se da con el grupo thiólico en estado reducido de la cisteína y de la metionina, y con la posición 3 del anillo aromático de la tirosina. Los grupos thiol que se ubican en los residuos de cisteína y metionina de las proteínas pueden ser blanco de una regulación compleja, por cuanto pueden sufrir S-thiolación por medio del glutatión y moléculas thiolicas similares, S-nitrosilación con NO y S-nitrosación con derivados del NO o ser oxidado por radicales libres hacia ácido sulfénico, ácido sulfínico o ácido sulfónico. Su actividad formadora de complejos con iones metálicos de transición (M-NO), es la propiedad clave para explicar su unión al hierro del grupo HEMO, al igual que lo hace el oxígeno molecular (O₂) y el CO; su unión al hierro de los grupos prostéticos Ferro-Azufre (Fe-S); su interacción con el zinc (ej.: factores de transcripción del tipo dedos de zinc, y las Metalothioneínas); su unión al manganeso (ej.: manganeso-superóxido-dismutasa); y su interacción con el cobre (ej.: ceruloplasmina). Una diferencia fundamental con el O₂ y el CO, es que NO une tanto la forma ferrosa como la forma férrica del hierro del grupo HEMO. La interacción del hierro con el grupo HEMO depende de la conversión de el grupo HEMO hacia la molécula protoporfirina IX. La unión del NO permite que proteínas de almacenamiento y de transporte de metales los liberen, como sucede con la Transferrina, la Ferritina y la Ceruloplasmina. Queda pues el interrogante del rol pro-oxidante generado por el NO, al favorecer la liberación de metales y metaloides de transición que potencialmente por medio de reacciones Fenton desencadenarían cascadas oxidativas. La regulación puede ser bastante compleja ya que las modificaciones oxidativas de las hemo-proteínas pueden desencadenar la liberación del grupo hemo y/o degradación, tal como sucede con la mioglobina y el citocromo c. En otras instancias la oxidación de residuos de histidina, disrupta la coordinación con núcleos metálicos, como sucede con la Co-

bre/Zinc-Superóxido-Dismutasa. Su actividad formadora de nitro-aductos, es decir mediante el proceso de "Nitración", se produce ya sea, porque cataliza la formación de "Thionitritos" con grupos thiol en cisteínas (formulación técnica en química orgánica RSNO), produciéndose la S-nitro/nitroso-cisteína (proceso denominado "S-Nitrosilación o S-Nitrosación") o de N-Nitración cuando el NO (N-Nitrosilación) o especies derivadas del NO (N-Nitrosación) reaccionan con la Tirosina generándose residuos de di-tirosina, o, o'-di-tirosina, nitro-tirosina (ej.: 3-nitrotirosina, trinitrotirosina), hálido-tirosina (ej.: cloro-tirosina, bromotirosina), 3-hidroxitirosina, pulcherosina y variedades isoméricas (ej.: iso-di-tirosina) (24). Hoy se ha establecido que a nivel biológico el actor clave de la nitración no es el NO en sí mismo sino que mayormente lo son sus derivados, e *in vivo* por ejemplo la tirosina-nitración sucede ana-enzimáticamente en condiciones hidrofóbicas, o enzimáticamente por medio de HEMO-Peroxidasas, sin contar que algunas proteínas pueden catalizar su propia tirosina-nitración a partir del peroxinitrito como sucede con la

Prostaciclina-Sintetasa y la Manganeso-Superóxido-Dismutasa, y otras se nitrán por radicales altamente reactivos, lo que incluye un intermedio reactivo formado a partir de la reacción entre el peroxinitrito y el dióxido de carbono (CO₂) y el ácido nitroso, el cual se forma primariamente por la acidificación del nitrito. De tal forma que a *grosso modo* el anión peroxinitrito primariamente y secundariamente el dióxido de nitrógeno son los involucrados en la tirosina-nitración, y ellos se forman como productos secundarios del NO en la presencia de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y centros catalíticos enzimáticos que poseen metales de transición. Fuera de lo anterior se ha descubierto que la Mieloperoxidasa, la Eosinófilo-peroxidasa, la Mioglobina y los Citocromos P450 catalizan la oxidación del nitrito a dióxido de nitrógeno, el cual también es capaz de nitrar. La Eosinófilo-peroxidasa y la Mieloperoxidasa, son capaces directamente de nitrar proteínas blanco (10-14). En la tabla 1 se mencionan los ejemplos más significativos de diversas proteínas que son diana del NO.

Tabla 1. ALGUNOS DIANAS PROTEICOS DEL NO, TIPO DE INTERACCIÓN Y RESULTADO FUNCIONAL

Tipo de interacción	Proteína	Acción funcional
HEMO	NOSs(Óxido-Nítrico-Sintetasas)	Negativa
	Guanilato-ciclasas solubles	Positiva
	Ciclo-oxigenasas	Negativa/Positiva
	Lipo-oxigenasas	Negativa
	Citocromos P450	Negativa
	Citocromos de la Cadena Respiratoria(a1, a3, c, c1)	Negativa
	Catalasa	Negativa
	Familia de las ferro-globinas (hemoglobina, mioglobina, neuroglobina)	Modulación de la unión y/o transporte de O ₂ y CO ₂ . Transporte de NO unido a HEMO o cisteína estructural.
Fe-S	Cis-Aconitasa Citosólica/IRFs(Factores Reguladores del Hierro)	Positiva para la función IRF y negativa para la enzima
	Cis-Aconitasa Mitocondrial	Negativa

Tabla 1. ALGUNOS DIANAS PROTEICOS DEL NO, TIPO DE INTERACCIÓN Y RESULTADO FUNCIONAL (continuación)

Tipo de interacción	Proteína	Acción funcional
	Complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial	Negativa
	Ribonucleótido-Reductasa	Inhibición
Otras interacciones metal-NO		En general hay liberación de núcleos metálicos. Rol Pro-oxidante?
Zinc	Factores de Transcripción con dedos de zinc	Inhibición
	Metallothioneínas	Liberación del zinc y secundariamente potencial anti-apoptótico.
Cobre	Ceruloplasmina	Inhibición de su actividad Óxido-Reductasa
Hierro	Ferritina	
	Tranferrina	
S-NITROSILACIÓN	Albúmina	Transporte plasmático
	Intercambiador aniónico eritrocitario AE1	Transporte plasmático
	Hemoglobina	Regulación del transporte O ₂ y CO ₂ , y transporte plasmático
	Gamma-glutamyl-cisteína-transpeptidasa	Transporte plasmático
	Glutamato-receptor tipo NMDA(N-metil-D-Aspartato)	Desensibilización
	Receptores Serpentina asociados a sistemas de proteínas G triméricos	Potencian los receptores colinérgicos muscarínicos M ₂ /M ₄ muscarinic cholinergic receptors, inhiben el purina-receptor P ₂ Y ₁₂ purinergic el receptor tipo 1 para LPA1(ácido lisofosfatídicos) y el receptor CB1. Efecto marginal sobre receptores A1 para Adenosina, receptores para opioides Mu y otro receptores para opioides.
	Familia Ras	Negativa/Positiva
	PKCs(Proteínas Kinasas C-calcio dependientes)	Negativa
	Adenilil-Ciclasas	Negativa
	Canales de Potasio Calcio dependientes	Positiva
	VOCs(Canales de Calcio voltaje dependiente)	Positiva
	Tirosina-Kinasa(Receptores y Citosólicas)	Negativa
	Tirosina-Fosfatasas	Negativa

Tabla 1. ALGUNOS DIANAS PROTEICOS DEL NO, TIPO DE INTERACCIÓN Y RESULTADO FUNCIONAL (continuación)

Tipo de interacción	Proteína	Acción funcional
	RYRs(Rianodina-Receptores)	Positiva
	Dynaminas	Facilita su endocitosis a partir de la plasmalema durante el proceso de gemación
	GADPH(Glicera-aldehído-3-fosfato-deshidrogenasa)	Negativa
	5'-ecto-nucleotidasa	Negativa
	Factores de Transcripción	Negativa
	CASPASAs	Negativa
	Glutación	Señalamiento intracelular REDOX
	Glutación-Reductasa	Negativa
	Metionina-Adenosil-Transferasa	Negativa
	Alfa-1-Proteasa Inhibidor	Positiva: gana actividad bacteriostática
	Activador del Plasminógeno Tisular(tPA)	Positiva: gana actividad vasodilatadora y antiplaquetaria
	Arginino-succinato sintetasa	Negativa
	Alcohol-Deshidrogenasas	Negativa
	MMP9	Positiva
	Transglutaminasas	Negativa
	Proteína-Disulfido-Isomerasa	Negativa
	Angiotensina II Receptor 1	Negativa: disminuye afinidad de unión del ligando
N-Nitrosilación	Superóxido-Dismutasa Manganeseo-Hierro	Negativa
	Lisozima	¿Potenciación?
	PKCe(Proteína Kinasa C épsilon)	Positiva. Translocación al núcleo celular.
	Glutamina-Sintetasa	Negativa
	Aldolasa A	Negativa
	SPA(Surfactante-Proteína A)	Negativa
	Alfa-Sinucleína	Papel inclaro en neuroamiloidosis pro-neurodegenerativa
	Actinas	Negativa
	Alfa-Tubulina	Negativa
	Neurofilamentos	Negativa
	Fibrinógeno	Positiva. Se acelera su rol pro-coagulativo.
	Fibronectina	¿Rol pro-inflamatorio?
	ERBB1 (Receptor de la familia del Factor de Crecimiento Epitelial)	Homodimerización covalente activante
	Prostaciclina-Sintetasa	Negativa
	Histonas	Rol en expresión génica no definido aún. ¿Importante en génesis del cáncer?

Tabla 1. ALGUNOS DIANAS PROTEICOS DEL NO, TIPO DE INTERACCIÓN Y RESULTADO FUNCIONAL (continuación)

Tipo de interacción	Proteína	Acción funcional
	ProCaspasa 3	En quimioterapia pero no relacionado a promoción de la apoptosis. Rol por definir.
	Citocromo c	En quimioterapia pero no relacionado a promoción de la apoptosis. Rol por definir.
Mecanismo aún inclaro	Receptor para el activador tisular del Plasminógeno(tPA)	Positiva

3. Actividad HEMO- y Fe-S dependiente

Potencialmente toda proteína con grupos HEMO es blanco regulatorio del NO, y la regulación puede ser supremamente compleja, si sumamos que potencialmente la fracción proteica de la hemoproteína puede sufrir S-Nitración de las cisteínas y las tirosinas. Se puede concluir entonces lo fascinante del proceso. A partir de esto el NO puede explicar muchas de sus funciones biológicas, mediante su acción en la Hemoglobina sanguínea, la Mioglobina muscular, la Neuroglobina neural, el sensor de oxígeno llamado Histoglobina, las Guanilato-Ciclasas Solubles, la Lipooxigenasas, las Ciclo-oxigenasas, la Catalasa Peroxisomal y la gran familia de los Citocromos tanto mitocondriales como el Citocromo C con roles tanto en óxido-reducción en la cadena respiratoria como en apoptosis, como los CytP450 de expresión preponderante en el Retículo Endoplásmico Liso.

Proteínas con grupos prostéticos Fe-S son también diana. Así, proteínas Fe-S son componentes que se encuentran en la cadena respiratoria mitocondrial (en los Complejos I, II y III), y también son enzimas de actividad Aconitasa (15,16).

4. Roles Fisiológicos de la S- y la N-Nitración y la formación de metal-NO aductos (M-NO)

La finalidad de los procesos de S-, N-Nitración y la formación de M-NO, es la regulación bioquí-

mica funcional de las proteínas que son diana de ellos. Tres ejemplos referidos a lo anterior son:

- La maraña de eventos derivados a partir de estas modificaciones en la Hemoglobina, en la cual como resultado se modula la actividad transportadora de oxígeno y CO₂. En la hemoglobina es clave destacar que de la S-nitrosilación de la cisteína en la posición 93 de la cadena beta depende de la transición alostérica hacia la forma relajada de alta afinidad. De tal forma que la forma T(tensa) es de bajo potencial de S-nitrosilación. Una co-relación bioclínica interesante es como la Meta-hemoglobina es esencialmente de forma T, lo que explica su bajo potencial de S-nitrosilación. Adicionalmente el NO y sus especies derivadas son transportadas desde el pulmón a los tejidos vasculares para que ejerzan ahí su actividad biológica, primordialmente el vaso-trofismo, del cual puntualizaremos las propiedades de éste posteriormente (17).
- La activación de las Guanilato-Ciclasas Solubles, con la consecuente producción del segundo mensajero guanosin-monofosfato cíclico (GMPc) y la posterior activación de las serina/treonina-proteína-quinasas dependientes de GMPc (PKGs). Tanto el GMPc directa como indirectamente a través de las PKGs controlan la dinámica de transporte electrolítico en la plasmalema, la dinámica del calcio en el retículo endoplásmico liso y la dinámica

citoesquelética, favoreciendo a dosis nanomolares la relajación de tejidos musculares (18).

- La interacción con las Metallothioneínas aumenta la liberación del zinc, y favorece así un efecto anti-apoptótico, ya que es el zinc es la némesis natural del calcio (19,20).

5. Denitración

Este es un campo en etapa temprana de investigación. Hay evidencia de la existencia de enzimas de naturaleza "Denitrasa", pero aún esto es elusivo (21). Hay reportes científicos de una actividad Denitrasa dependiente de la coenzima NAD(P)H(22), de una actividad similar óxido-reductasa dependiente de núcleos metálicos como se ha evidenciado con la Ceruloplasmina (23), y hay evidencia de que sistemas proteolíticos celulares podrían remover proteínas nitradas (24,25). También hay evidencia del rol de la remoción mediada inmunológicamente (26).

Fisiología y Patofisiología del NO

Los roles fisiológicos celulares están enfocados a la regulación del metabolismo energético, la regulación de la expresión génica, la regulación de la división y proliferación celular, la regulación de la decisión vida-muerte, la regulación del metabolismo hidro-electrolítico y la regulación de las cascadas de transducción de señales. A partir de estos roles fisiológicos celulares se fundamenta la regulación de la actividad contráctil de los músculos lisos (ej.: vasodilación, vaciamiento gástrico, erección peneana...) y el músculo estriado tanto esquelético como cardiaco, la actividad hemato-inmune (tanto inmunidad como autoinmunidad, inflamación y agregación plaquetaria), la actividad neurobioquímica (neurotransmisor clave en especial en aprendizaje, memoria y la fase cefálica de la excitación sexual), la actividad cardiorenovascular, entre otros (7). Su rol en metabolismo energético es

múltiple, pero es importante mencionar que NO por medio de la generación de GMPc activa la expresión del gen codificante de PGC1A (coactivador isoforma Ialfa para el factor de transcripción PPARG (*Peroxisome Proliferator Activated Recepto*-)), el cual ha mostrado convincentemente una actividad pro-generadora de mitocondrias (biogénesis mitocondrial) ya que actúa como un regulador positivo de la actividad de los factores de transcripción NRFs (*Nuclear Respiratory Factors*) y mtTFA (*Mitochondrial Transcription Factor A*), que son respectivamente reguladores maestros de la expresión de genes nucleares de destino mitocondrial y genes del genoma mitocondrial (27,28). Es así que partiendo de todo lo plasmado en los renglones anteriores, se puede determinar que las concentraciones nanomolares son anti-oxidantes, vasculotróficas (vasodilatador, regulador de la permeabilidad, regulador de la angiogénesis), anti-trombóticas, anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y anti-proliferativas (citostasis), y por el contrario las concentraciones micromolares son pro-oxidantes, vasopáticas (vasoconstrictoras, pro-permeabilidad, pro-angiogénicas), pro-trombóticas, pro-inflamatorias, pro-apoptóticas y pro-mitógenas. En el determinante vasopático, la activación desafiada de la isoforma clásicamente denominada inducible, se relaciona a la hipotensión severa y la cardio-inotropia negativa en el contexto de los Síndromes de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS). Sobre algunas especies RNS hay evidencia de su función *in vivo* como miembros de lo que se denomina como Factores Hiperpolarizantes del Endotelio (EDHF (*Endothelium-derived hyperpolarizing factor*)). Los EDHF contrariamente a la percepción inicial y difundida, no son vasoconstrictores sino que por el contrario son vasodilatadores (29). Interesantemente, en los últimos años hay apreciaciones en principio curiosas de disfunción en la producción del NO como causa de un trastorno mixto de enfermedad cardiovascular y trastorno depresivo (30,31). Una temática fundamental del NO en inmunidad es el rol que tiene la nitración como un factor asociado en la inmunogenicidad de antígenos,

lo que es clave tanto en inmunidad como en autoinmunidad (32). En relación a esto último también, NO es un factor pro-apoptótico para linfocitos T auto-reactivos tanto a nivel central tímico en una forma co-activa con factor de crecimiento para células T derivado del Estroma Tímico (TSTGF), como periféricamente (33). Otra función biológica del NO es la regulación del metabolismo del Hierro, de ahí que niveles elevados de NO unen a las proteínas denominadas IRPs (*Iron Regulatory Proteins*), las cuales pasan de comportarse enzimáticamente como Aconitasas-Citosólicas hacia Proteínas IRPs, que unen regiones regulatorias del tipo UTR (*Untranslated Region*, se traduce: regiones no traducibles génicamente, es decir que son regiones de ARN mensajero que no son codificadoras de segmentos proteicos) en los extremos de los ARN mensajeros codificantes de varias proteínas involucradas en la biodinámica del hierro, y en esa forma evitan que ellas sean traducidas génicamente a sus proteínas correspondientes. En la Anemia de las Enfermedades Crónicas, hay pues mediante este mecanismo un exceso de almacenamiento retículo-endotelial férrico, que no permite su disposición para la estructuración y ensamblaje de la hemoglobina (34,35).

NOS (NO-Sintetasas)

Generalidades de las NOS

Estas enzimas entran por su estructura y función dentro del grupo I en la clasificación general de enzimas, es decir que son óxido-reductasas. En la fecha actual se asume que son enzimas cuya actividad es la oxigenación del nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina y la reducción de la coenzima NADPH (nucleótido adenina-nicotinamida fosfato, forma reducida). Las NOS poseen dos grandes módulos proteicos, uno que es un módulo reductasa (también denominado diaforasa) carboxiterminal con un dominio reductasa de la coenzima NADPH, un dominio reductasa de la coenzima FAD, un dominio reductasa de la coenzima FMN y un dominio

unidor de las calmodulinas; y un módulo oxidasa aminoterminal con un dominio oxigenasa de la coenzima BH4, un dominio oxigenasa del tipo HEMO y el dominio unidor del sustrato L-Arginina. Como parte de la reacción se forma un intermediario altamente reactivo denominado N-Hidroxi-L-Arginina, el cual se forma por la oxidación inicial que es sustentada por los electrones provenientes del NADPH, y de la incorporación de un átomo de oxígeno que se obtiene a partir del oxígeno molecular. La N-Hidroxi-L-Arginina tras una posterior oxidación que necesita de dos electrones donados por BH4, puede liberar la L-citrulina y el NO. En la estequiometría total se observa que se usan 1.5mol de NADPH y 2 mol de oxígeno molecular (36).

Las chaperoninas Hsp90 se acoplan a las NOS y las activan. Hsp90 se acomplejan con su familiar Hsp 70 por medio de la proteínas acopladoras HOP/STIP1 (*Hsp70/Hsp90 organizing protein/stress-induced phosphoprotein 1*). La actividad moldeante ATPasa-dependiente de las Hsp90 es activada por la proteína p38/AHSA1 (*Activator of Heat-Shock 90-kd protein ATPase 1*) (37). Pero si bien lo que se acabó de mencionar es lo clave en general, hoy también existen temáticas adicionales que transforman en supremamente complejo el tema e igualmente fascinante y que aún esperan de estudios para poder armar mapas conceptuales biológicos y patobiológicos, ellos son:

1. El complejo holoenzimático que sintetiza NO es un homodímero- esto es lo que clásicamente es admitido, pero pueden formarse heterodímeros dada la promiscua expresión de las isoenzimas, lo que permite que haya variabilidad en la tasa porcentual en tiempo y concentración en la producción de NO. Como si no fuera suficiente las isoenzimas NOS pueden dimerizar cuaternariamente en diversas formas, por ejemplo oxidasa a oxidasa, reductasa a reductasa o mixto. Finalmente, la existencia del fenómeno de dominante negativo, es decir que se producen isoenzimas no funcionales que por mecanismo de señuelo

- dimerizan con la isoenzima funcional y la sequestran. La dimerización requiere de la presencia de HEMO y variablemente de BH4 según lo que muestran los estudios llevados a cabo. También se ha dilucidado un centro zinc-tetrathiolato que estaría implicado en la dimerización.
2. Estas óxido-reductasas sino existe la presencia de todos los cofactores y/o el sustrato L-arginina necesarios, pueden igualmente ser activas y generar especies reactivas intermedias, ya sea cuando forman monómeros, homodímeros e igualmente la formación de complejos holoenzimáticos heterodiméricos elevan la variabilidad en la producción de estas especies tanto en velocidad como en concentración.
 3. Existe una alta variabilidad en la estructura de las NOS que se eleva a partir de procesos como: el uso de promotores alternos en los genes, el corte y empalme alternativo de los ARN mensajeros y modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la acilación y la nitrosilación.
 4. El NO puede ser sintetizado por otras enzimas distintas a las NOS, entre ellas varias hemoproteínas tales como la misma hemoglobina, la catalasa peroxisomal y los citocromos P450 microsomal, pueden a partir del intermediario N-hidroxi-L-arginina sintetizar L-citrulina y NO. Bajo circunstancias especiales se pueden usar como elementos de la reacción moléculas no comúnmente utilizadas como el H₂O₂.
 5. En condiciones especiales como el Síndrome Urémico, las NOS pueden utilizar sustratos similares a la L-arginina, lo cual puede tener trascendencia en la patogenia y la fisiopatología de esta entidad. La explicación dada se basa en que posiblemente la guanidina, el guanidino-acetato, el guanidino-propionato y la metil-guanidina pueden ser sustratos atípicos para las NOS y en consecuencia hay producción de NO, el cual tiene efectos cla-

ramente anti-coagulante, rasgo clave de la coagulopatía urémica (38).

6. Las NOS pueden participar en el metabolismo de xenobióticos (fármacos y tóxicos), como por ejemplo el Paraquat (39,40).

Expresión de las NOS (NO-Sintetasas)

A la fecha se han identificado 8 isoformas de NOS de las cuales las mejor caracterizadas son las isoformas NOS1, NOS2A y NOS3 (36), y están siendo inicialmente caracterizadas estructural y funcionalmente las NOS2B, NOS2C (41), NOS4 (42) y la mtNOS (mitocondrial) (43). Esta versión mitocondrial explicaría gran parte de los fenómenos derivados de la disfunción primaria y/o secundaria de este organelo. Fuera de ello, la enzima NDOR1 (también denominada NR1-NADPH (*dependent diflavin oxidoreductase 1*)) es una octava enzima con actividad biosintetizadora de NO, de alta expresión placentaria y en líneas neoplásicas. NDOR1 tiene capacidad reductiva sobre el citocromo c y está involucrada en la activación metabólica por reducción de fármacos quimioterápicos tales como la doxorubicina y intermediarios estructurales de la vitamina K como la menadiona (44). La nomenclatura numeral hace referencia al orden histórico de clonamiento y caracterización. Si bien se ha establecido la existencia de una NOS de expresión específica mitocondrial, previamente también se había determinado la presencia de la NOS1 en las mitocondrias de ciertos tejidos, con plena actividad. Existen reportes sobre la existencia de otras isoenzimas NOS tales como unas que convierten la arginina estructural de la bradiquinina hacia L-citrulina y NO, pero no se ha profundizado en esta técnica adecuadamente (45). Clásicamente se ha aceptado que la isoformas NOS1 y NOS3 son constitutivas con una expresión basal, que la isoforma NOS2 es de expresión inducible, en particular en células fagocíticas, sin embargo el panorama es más complejo y hoy se aprecia que la NOS2 es constitutiva en algunos sitios de la economía, y las NOS1 y NOS3 son inducibles en otros sitios bajo

ciertas condiciones. La actividad constitutiva de la NOS1 y NOS3 se puede definir principalmente por su necesidad del complejo calcio-calmodulina que se forma transitoriamente tras la activación celular y que dispara la producción de NO sólo por segundos o minutos. La actividad inducible de la NOS2 se define por la necesidad basal de calcio para formar el complejo calcio-calmodulina, lo que se explica por la alta afinidad de la enzima por el complejo, y se dispara la producción de NO por horas y en mayor concentra-

ción. En los últimos años se ha demostrado que biológicamente *in vivo* hay una regulación altamente específica por los diversos componentes del citoesqueleto, directa e indirectamente, a nivel transcripcional génico, post-transcripcional génico y post-traducciona l génico, temática que no se discutirá en este artículo dada la extensión (46). En la tabla 2 se exponen la Genética, Genómica, y Patobiología de estas enzimas, y en la tabla 3 se exponen algunas de las propiedades de las NOS1, NOS2 y NOS3.

Tabla 2. GENÉTICA, GENÓMICA, Y PATOBIOLOGÍA DE LAS NOS.

Proteína	MIM	Locus cromosómico del gen	Función	Código Enzima IUBMB	Entidad Patológica Monogénica (Código MIM)
NOS1(nNOS: neuronal)	163731	12q24.2-24.31	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Estenosis Pilórica Hipertrófica Infantil (MIM179010)
NOS2A(iNOS: inducible macrófago-hepatocito)	163370	17cen-q11.2	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Hipertensión Arterial Escencial(MIM145500), Resistencia a Infección Malárica (MIM 248310), Gen de susceptibilidad a Diabetes Mellitus tipo 1, Gen modificador de Nefropatía Diabética en Diabetes Mellitus tipo 1, Gen modificador en Enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple?.
NOS2B	600719	17p13.1-q25	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Aún no
NOS2C	600720	17p13.1-q25	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Aún no
NOS3	163729	7q36	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Susceptibilidad a Vaso-espasmos Coronario y Enfermedad Isquémica Cardiaca, Susceptibilidad a Hipertensión Gestacional, Hipertensión Arterial con Hipertrofia Ventricular Izquierda, Hipertensión resistente a terapia farmacológica convencional, Susceptibilidad a Enfermedad de Alzheimer de presentación tardía, Gen modificador de Nefropatía Diabética en Diabetes Mellitus tipo 1, Gen Modificador en la Enfermedad Poliquística del Adulto Autosómica Dominante, Gen Modificador en la Enfermedad de Fabry
NOS4(NOS condrocito)	163728	No definido aún	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Aún no

Tabla 2. GENÉTICA, GENÓMICA, Y PATOBIOLOGÍA DE LAS NOS. (Continuación)

Proteína	MIM	Locus cromosómico del gen	Función	Código Enzima IUBMB	Entidad Patológica Monogénica (Código MIM)
NOS Mitocondrial (AtNOS, C4ORF14, MGC3232)	No definido aún	4q12	Óxido-Reductasa	1.14.13.39	Aún no
NDOR1 (del inglés- NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1-)	606073	9q34.2	Óxido-Reductasa	No definido claramente aún	Aún no

Tabla 3. PROPIEDADES DE LAS NOS MEJOR DEFINIDAS.

	NOS1	NOS2	NOS3
TIPO CELULAR PROTOTIPO	Neuronas	Macrófagos, Hepatocitos	Células Endoteliales
LOCUS GÉNICO	12q24.2	17q11.2-12	7q35-36
TALLA EN KILOBASES(KB)	240	35	21
TALLA EN KB DEL mRNA MÁS SIGNIFICATIVO	8.5-9.5	4.3-4.5	4.3.-4.8
NÚMERO DE AMINOÁCIDOS EN LA ISOENZIMA MÁS SIGNIFICATIVA	434	1153	1203
PESO MOLECULAR EN KILODALTONS (KDs)	150-160	131.1	133.2
DEPENDENCIA DE CALCIO	+	-	+
DEPENDENCIA DE CALMODULINA	+	+	+
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	Citosólica, o anclada al Retículo Endoplásmico Rugoso en Neuronas	Citosólica	Balsas esfingolípídicas plasmalémicas
EXPRESIÓN CONSTITUTIVA BASAL	Neuronas, Músculo Estriado Esquelético,	Epitelio Bronquial, Macrófagos	Endotelio, Neuronas hipocampales CA1, Cardiomiocitos

Tabla 3. PROPIEDADES DE LAS NOS MEJOR DEFINIDAS. (Continuación)

	NOS1	NOS2	NOS3
	Mácula Densa Renal de la Nefrona, Epitelio Bronquial y Traqueal	Alveolares, Ileo, Útero, Plaquetas	
EXPRESIÓN INDUCIBLE	Mácula Densa Renal y Ductos Colectores de la Nefrona, y Pelvis Renal	Túbulos Proximales de la	Endotelio. En riñón se expresa en el endotelio de las arteriolas aferentes eferentes, y la vasa

Principales Proteínas Regulatorias de las NOS

Las NOS son reguladas estrechamente por tres grandes tipos de proteínas: las Calmodulinas, las Chaperoninas Hsp90 y las Caveolinas. Las Calmodulinas son proteínas intracelulares que unen calcio, lo que se traduce en que unan blancos proteicos, los cuales son generalmente activados. Tanto NOS1 como NOS3 son activadas por la unión del complejo calmodulina-calcio, lo cual exige un incremento transitorio del calcio citosólico, y la NOS2 se dice que es calcio independiente, pero lo que en realidad ocurre, es que esto se ha dicho a causa de que NOS2 posee una alta afinidad a concentraciones basales del complejo calmodulina-calcio. Por su parte las Caveolinas participan directamente en el ciclo de reclutamiento de la NOS3 a estructuras de la plasmalema que se denominan como "Balsas Esfingolípidas (*Lipid Raft*)". Las Balsas son regiones membranales ricas en esfingolípidos, colesterol y menormente en fosfatidil-inositol, pero con diversas expresiones en calidad y cantidad de lípidos y proteínas de localización específicas, lo que ha dado su nomenclatura como proteínas "Raftofílicas". Las Balsas Esfingolípídicas son enclaves plasmalémicos donde se reclutan receptores y moléculas de adhesión celular, para coordinar y amplificar el señalamiento intracelular. El ciclo activación-inactivación de las NOS depende de dos factores: la actividad de las enzimas

· acilantes y desacilantes, y el reclutamiento de las
 · Caveolinas. En el primer caso cuando cesa el
 · influjo estimulador trófico, en especial ocurre la
 · depalmitolación para liberar la NOS3 a partir de
 · la Balsa. En el segundo caso, el reclutamiento de
 · las Caveolinas, por medio de la interacción di-
 · recta con la NOS3 inhiben a estas enzimas, y
 · adicionalmente se forma una vesícula de reclu-
 · tamiento que toma la Balsa y la gema a partir de
 · la plasmalema hacia un compartimento endo-
 · sómico temprano especializado denominado
 · "Caveosoma". Por otro mecanismo aún no diluci-
 · cado es plausible que la Caveolina facilite la de-
 · gradación proteasómica de NOS3. El ciclo es
 · dependiente en sus 2 aspectos, es decir, en la
 · acilación/desacilación como en el rol caveolínico
 · de calcio. En realidad, las Caveolas se están co-
 · menzado a entender como Balsas Esfingolípídicas
 · que poseen en localización periférica caveolinas,
 · que favorecen su gemamiento y transporte a los
 · Caveosomas. Las Caveolinas son miembros de
 · una familia en expansión conformada por las
 · Caveolinas (Caveolinas-1, -2 y -3) *per se*, la
 · Estomatina, las Flotilinas (Flotilinas-1, -2 y -3),
 · las MAL/BENE, la LAT/PAG y la VIP36/LMAN2.
 · En las Balsas también se ubican los transporta-
 · dores de L-arginina como CAT1, el cual permite
 · la carga celular de este aminoácido sustrato. Fi-
 · nalmente, al respecto de las Hsp90, las NOS se
 · acoplan a variablemente a diversas proteínas,
 · pero de interés es la unión de las chaperonas del

tipo chaperoninas Hsp90. Las Hsp son proteínas que se describieron inicialmente como agentes promoldeadores que necesitan ATP, pero que en la actualidad han mostrado una infinidad de funciones. Es así por ejemplo, que las Hsp90 poseen un rol activatorio cuando se acomplejan a las NOS. Las Hsp90 se acomplejan a si vez con

su familiar Hsp70, por medio de un mecanismo que ya se mencionó anteriormente (47). En la tabla 4 se consigna la información correspondiente a la biología y patobiología de las distintas proteínas asociadas y reguladoras de las NOS. En la figura 1 se esquematiza la interacción de las NOS con sus proteínas regulatorias.

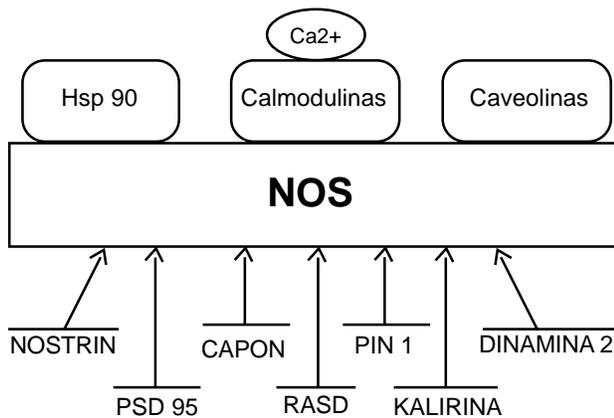
Tabla 4. GENÉTICA, GENÓMICA, Y PATOBIOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS REGULATORIAS DE LAS NOS

Proteína	Otras denominaciones	MIM	Locus gen	Función	Código Enzimático IUBMB	Entidad Patológica Monogénica (Código MIM)
NOSTRIN(del inglés- <i>nitric oxide synthase trafficker-</i>)		607496	2q31.1	No aplicable	No aplicable	Aún no
PSD95(del inglés- <i>Postsynaptic density protein 95-</i>)	DLG4/ SAP90(del inglés- <i>Discs large homolog/ Synapse-associated protein 90-</i>)	602887	17p13.1	No aplicable	No aplicable	Aún no
CAPON(del inglés- <i>c-terminal pdz domain ligand of neuronal nitric oxide synthase</i>)	NOS1AP(del inglés- <i>neuronal nitric oxide synthase adaptor protein-</i>)	605551	1	No aplicable	No aplicable	Aún no
RASD1/ DEXRAS1(del inglés- <i>ras protein, dexamethasone-induced, 1/ dexamethasone-induced ras protein 1-</i>)		60550	17p11.2	GTP asa	EC 3.6.5.2	Aún no

Tabla 4. GENÉTICA, GENÓMICA, Y PATOBIOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS REGULATORIAS DE LAS NOS (Continuación)

Proteína	Otras denominaciones	MIM	Locus gen	Función	Código Enzimático IUBMB	Entidad Patológica Monogénica (Código MIM)
RASD2/ DEXRAS2/ RHES/ TEM2(del inglés-Ras homolog enriched in striatum Tumor endothelial marker 2-)		Aún no	22q13.1	GTP asa	EC 3.6.5.2	Aún no
RASD3/ DEXRAS3(del inglés-ras protein, dexamethasone-induced, 3/ dexamethasone-induced ras protein 3-)	Rab44	Aún no	6q14.3-15	GTPasa	EC 3.6.5.2	Aún no
PIN1(del inglés-Protein inhibitor neuronal NOS-)	DYNLL1 (Cadena liviana LC8 de la Dineína Citosólica)	601562	12q14.2	No aplicable	No aplicable	Aún no
Kalirina	DUO, DUET, TRAD, P-CIP 10, HAPIP(del inglés-huntingtin-associated protein-interacting protein-)	604605	3q21.2	Proteína multi-domino	Multi-enzima	Aún no
Dynamina 2		602378	19p13.2	GTP asa	EC 3.6.5.5	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo Dominante Intermedia B con o sin Neutropenia(MIM600482), Miopatía Centronuclear Autosómica Dominante(MIM160150)

Figura 1. PROTEINAS REGULADORIAS DE LAS NOS



Regulación de las NOS por ADMA (Di-Metil-Arginina Asimétrica)

El ADMA (Di-metil-Arginina Asimétrica) es el inhibidor endógeno de las NOS, originalmente descubierto como una toxina urémica, el cual se une al sitio de entrada de la L-arginina compitiendo con ésta y ello favorece la inhibición enzimática. Se biosintetiza mediante la metilación del nitrógeno guanidino de las argininas estructurales proteicas por las enzimas PRMT (Proteína-Arginina-Metil-Transferasas) cuya actividad es dependiente de la S-adenosil-metionina y posteriormente es liberada proteolíticamente. Inicialmente se genera el intermediario mono-metil (L-NMMA). Las PRMT se clasifican en dos grandes grupos:

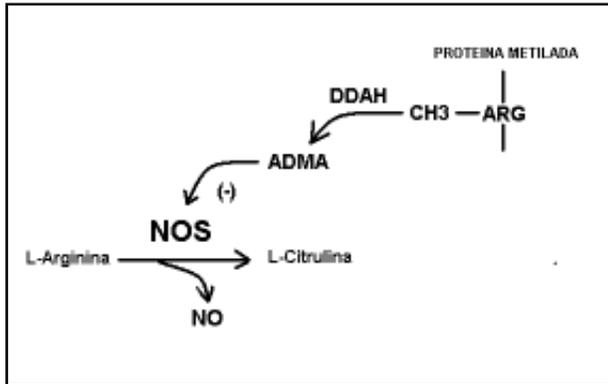
- Las del tipo I: PRMT1, PRMT3, PRMT4 y PRMT6, que sintetizan la molécula asimétrica (ADMA).
- Las tipo II (PRMT5 y PRMT7) que sintetizan la molécula simétrica (SMDA).

Las PRMT2, PRMT8 y PRMT9 no han sido clasificadas aún. Las proteínas arginina-metiladas tienen una alta tasa de recambio. La metilación irreversible de la arginina como tal, es un proceso de gran esencia biológica, que regula procesos como la transcripción génica, la traducción génica y el corte y empalme alternativo del ARN men-

sajero (del inglés *splicing*). La metilación de la arginina es un mecanismo protector en contra de las modificaciones por dicarbonilos reactivos tales como el MG (metil-glioxal), el cual es una molécula producto colateral de la glicólisis y otras vías metabólicas, con actividad citotóxica que modifica proteínas y ácidos nucleicos, y es detoxificado por el sistema enzimático glioxalasa. Estos carbonilos son producto entre otras rutas, de la modificación por oxidación de las proteínas, de tal forma que constituyen una toxina y una carga urémica. La arginina natural y el intermediario monometil-arginina son blanco de la deiminación por las enzimas PADs (Proteína-Arginina-Deiminasas) como una modificación postraduccional reguladora de la función proteica, o desfavorablemente es blanco de la modificación por MG hacia AGEs (Productos de Glicosilación Avanzada). Como es irreversible es pues evidente que sólo se neutraliza por proteólisis. El ADMA tiene su propio ciclo metabólico. Las Di-metil-arginina-di-metil-amino-hidrolasas (DDAHs) son enzimas intracelulares que catabolizan por hidrólisis el ADMA y así regulan la concentración de ella. Por medio de mecanismo aún no claros DDAH2 puede regular negativamente la secreción de su sustrato ADMA e incrementa la expresión de VEGFA (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial isoforma A). No todo el ADMA es degradado y escapa a partir de las células a través de transportadores para aminoácidos catiónicos, los cuales también están implicados en la captación por otras células o en la recaptación por parte de la misma célula que lo produce. ADMA sufre aclaramiento renal y hepático y puede excretarse en parte por vía urinaria. Tanto las PRMT como las DDAH son reguladas por estrés REDOX. Los niveles de ADMA son elevados en falla renal y enfermedad cardiovascular (enfermedad hipertensiva incluyendo las variantes gestacionales, diabetes, aterosclerosis, hiperhomocisteinemia) y síndrome metabólico. De tal forma que es un blanco potencial para intervenciones terapéuticas. Mucha de la Terapéutica Farmacológica y no Farmacológica para las entidades nosológicas

mencionadas muestran que afectan negativamente los niveles plasmáticos de ADMA (48,49). Ver figura 2.

Figura 2. REGULACIÓN DE LAS NOS POR ADMA



Mecanismos novedosos de regulación de las NOS

Se ha identificado un gen denominado NOS3AS (*Endothelial nitric-oxide synthase antisense*), también denominado APG9L2 (*Autophagy-Related Protein 9-like2*), el cual se localiza en el locus cromosómico 7q36. El comportamiento de este gen es bastante singular, porque puede ser decodificado hacia una proteína directamente relacionada con el proceso autofágico, o puede funcionar como un ácido nucleico antisentido que se hibrida con el ARNm codificante de la NOS3, evitando así que este último sea traducido hacia la enzima (50).

CONCLUSIÓN

El NO y sus derivados reactivos tanto los radicales libres como los que no los son, generan una problemática llamativa, interesante y, ante todo, importantísima en comportamiento celular, tisular y sistémico. Es un tema fascinante con múltiples ramas y nodos confluentes en la temática biológica y patobiológica. Casi ningún aspecto rela-

cionado a funcionamiento celular y evento fisiopatológico escapa a los dominios de este gas y sus derivados. El conocimiento de su naturaleza abre nuevos campos en el entendimiento de la normalidad y la enfermedad, permite formular modelos más reales, al igual que es motor en la búsqueda Fármaco-Terapéutica.

REFERENCIAS

1. Culotta E, Koshland DE. NO: new is good news. *Science* 1992; 258: 1862-1865.
2. OMIM [base de datos en Internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 1966- [fecha de último acceso 3 de agosto de 2005]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim>.
3. HUGO [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine and others (exp.: Celera Genomics and the Sanger Center); 1989- [fecha de último acceso 3 de agosto de 2007]. Disponible en: <http://www.hugo-international.org/index.html>.
4. IUBMB [base de datos en Internet]. Mile End Road, London: International Union of Biochemistry and Molecular Biology; 1955- [fecha de último acceso 3 de agosto de 2007]. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
5. PubMed [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966- [fecha de último acceso 3 de agosto de 2007]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>.
6. IUBMB [base de datos en Internet]. London: International Union of Biochemistry and Molecular Biology; 1977- [fecha de último acceso 3 de agosto del 2007]. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbr/index.html#2>.

7. Thippeswamy T, McKay JS, Quinn JP et al. Nitric oxide, a biological double-faced *janus*— is this good or bad? *Histol Histopathol* 2006; 21:445-458.
8. Wiley JW. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19:541-544.
9. Reiter TA. NO chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep* 2006; 11:194-206.
10. Gow AJ, Farkouth CR, Munson DA et al. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *AJP Lung* 2004; 262-268.
11. Palmer LA. Regulation of Respiration and Endothelial Gene Expression by S-Nitrosothiols in Health and Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 166-169.
12. Radi R. Nitric oxide, oxidants and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4003-4008.
13. Tannenbaum SR, White FM. Regulation and specificity of S-nitrosylation and denitrosylation. *ACS Chem Biol* 2006; 1:615-618.
14. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007; 75:291-302.
15. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12:1161-208.
16. Ullrich V, Kissner R. Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg Biochem* 2006; 100:2079-2086.
17. Cosby MK, Partovi KS, Crawford JH et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9: 1498-1505.
18. Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 507-510.
19. St Croix CM, Leeavaninchkul K, Watkins SC et al. Nitric Oxide and Zinc homeostasis in acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 236-242.
20. Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT et al. Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* 2007; 13:993-996.
21. Gow AJ, Duran D, Malcolm S et al. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996; 385: 63-66.
22. Kwo WN, Kanadai RN, Shanbhang VP et al. Denitration of peroxynitrite-treated proteins by "protein nitrases" from rat brain and heart. *Mol Cell Biochem* 1999; 201: 11-16.
23. Krainev AG, Williams TD, Bigelow DJ. Enzymatic reduction of 3-nitro-tyrosine generates superoxide. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 495-502.
24. Toubin C, Yeung DY, English AM et al. Theoretical evidence that Cu(I) complexation promotes degradation of S-nitrosothiols. *J Am chem Soc* 2002; 124: 14827-14837.
25. Souza JM, Choi I, Chen Q et al. Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* 2003; 380: 360-366.
26. Birnboim HC, Lemay AM, Lam DK et al. MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J Immunol* 2003; 171: 52-62.
27. Brown GC. NO says yes to mitochondria. *Science* 2003; 299: 838-839.

28. Uldry M, Yang W, St-Pierre J et al. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 2006;3:333-341.
29. Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA et al. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3:221-229.
30. Plante GE. Depression and cardiovascular disease: a reciprocal relationship. *Metabolism* 2005;54(5 Suppl 1):45-48.
31. Yanga Q, Yima AP, He GW. The significance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human circulation. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5:85-92.
32. Mannick JB. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 161-165.
33. Downing JE, Virag L, Perry ME. Nitroergic mechanism of DC-mediated T-cell elimination. *Immunol Today* 1998;19:190-191.
34. Mueller S. Iron regulatory protein I as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors* 2005;24:171-181.
35. Mladenka P, Simunek T, Hubl M et al. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res* 2006;40:263-272.
36. Kharitonov SA. NOS:molecular mechanisms, clinical aspects, therapeutic and monitoring approaches. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:141-149.
37. Osawa Y, Lowe ER, Everett AC et al. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase: effect of inhibitors and role of hsp90-based chaperones. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:493-497.
38. Mansuy D, Boucher JL. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1105-1121.
39. Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 2005;208: 273-288.
40. Miller RT. NOx and R-NOx: effects on drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2004;5:535-542.
41. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM et al. Three members of the nitric oxide synthase II gene family (NOS2A, NOS2B, and NOS2C) colocalize to human chromosome 17. *Genomics* 1995; 27: 526-530.
42. Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-11423.
43. Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1569-1580.
44. Paine MJI, Garner AP, Powell D et al. Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J Biol Chem* 2000;275: 1471-1478.
45. Chen Y, Rosazza JP. Oligopeptides as substrates and inhibitors for a new constitutive nitric oxide synthase from rat cerebellum. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 303-308.
46. Su Y, Kondrikov D, Block ER. Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 2005;43:439-449.
47. Zhang W, Kunczewicz T, Yu ZY et al. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand* 2003; 179:137-142.

48. García GA, Clavijo DA, Mejía OR et al. Biología, Patobiología, Bioclínico y Farmacoterapéutica de la Di-Metil-Arginina Asimétrica (ADMA). Universitas Médica PUJ (Bogotá) 2006; 47: 335-348.
49. Zsuga J, Torok J, Magyar MT et al. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* 2007; 56: 394-399.
50. Fish JE, Matouk CC, Yeboah E et al. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2007; 282:15652-15666.

