



Importancia de la sintasas del óxido nítrico en el metabolismo del hueso

Importance of nitric oxide synthases in bone metabolism

René Valdez-Mijares *, Rebecca E. Franco-Bourland,
Alejandra Quintana-Armenta, Lidia Ruiz-Rosano.

Recibido: 28/03/2012 - Aceptado: 08/06/2012

RESUMEN

Investigaciones recientes muestran que el óxido nítrico (NO•) es un mensajero molecular universal con múltiples funciones fisiológicas esenciales en diversos tejidos, entre ellos el hueso. En el hueso el NO• es producido por la sintasa del óxido nítrico (NOS) la cual puede existir en 3 formas o isomorfos: sintasa del óxido nítrico endotelial, neuronal o inducible (NOSe, NOSn, NOSi), respectivamente, cada una de ellas con funciones específicas. En esta revisión se expone la importancia que tienen las isomorfos de la NOS para el tejido óseo, así como la acción controversial que el NO• ejerce sobre el hueso producido a partir de las diferentes isomorfos de la NOS u otras fuentes externas como los donadores orgánicos de óxido nítrico.

Palabras clave: NOS, NOSe, NOSn, NOSi, donadores orgánicos de óxido nítrico

ABSTRACT

In the last 20 years, nitric oxide NO• has proven to be a universal molecular messenger essential in multiple physiological functions of diversely tissues, including bone. In bone, NO• is produced by nitric oxide synthase (NOS) which exists in three isomorphs: endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase NOSe, NOSn, and NOSi, respectively, each one with specific functions. This review describes the importance of each NOS isomorph for bone tissue, as well as the controversy surrounding the action of NO• in bone produced endogenously by these isomorphs and organic NO• donors.

Key words: NOS, eNOS, nNOS, iNOS, organic NO• donors.

Correspondencia:

Dra. en C. Q. Rebecca E. Franco y Bourland
Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación
Calz. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan
CP. 14389 México, D.F., México.
TEL 59-99-10-00 Ext. 19503, 19504, 19508.
rfranco@inr.gob.mx

INTRODUCCIÓN

El propósito de esta revisión es mostrar el papel de la NOS, y de sus diferentes isomorfos, en la regulación del metabolismo del hueso así como sus mecanismos de acción dentro del tejido óseo.

Investigaciones recientes se han centrado en el papel del óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) como un posible regulador local de la actividad celular ósea. El $\text{NO}\bullet$ es un radical libre, gaseoso, de vida media corta generado a partir de la L-arginina por una de tres isomorfos de la sintasa del óxido nítrico (NOS)¹: sintasa del óxido nítrico neuronal (NOSn), sintasa del óxido nítrico endotelial (NOSe) y la sintasa del óxido nítrico inducible (NOSi), aisladas originalmente del cerebro de rata² de aorta de bovinos³ y de macrófagos de murinos⁴, respectivamente. La NOSe y la NOSn se expresan constitutivamente y se caracterizan por una baja producción de $\text{NO}\bullet$ en sus tejidos de origen⁵. La NOSi, es una enzima inducible por ciertas citosinas proinflamatorias como el interferón gama, la interleucina -1β (IL- 1β) y el factor de necrosis tumoral $-\alpha$ (TNF- α)¹. Esta enzima se caracteriza por la producción de altas concentraciones de $\text{NO}\bullet$ ⁶ y es inhibible por el estrógeno⁷. Tanto la disminución como la elevación en la producción de $\text{NO}\bullet$, han sido implicadas en la patogénesis de enfermedades como aterosclerosis⁸, artritis reumatoide y la respuesta del hueso a los estrógenos^{9,10}. Además se sabe que el $\text{NO}\bullet$ regula la presión sanguínea, la agregación plaquetaria, la adherencia de los leucocitos al sistema vascular y la mitogénesis celular del músculo liso vascular¹.

En hueso, la isomorfa de NOS que se expresa en mayor proporción es la NOSe. Enzima constitutiva que puede inducirse por una diversidad de estímulos que van desde los químicos-biológicos^{11, 12, 13, 14, 15} hasta los mecánicos¹⁶. Se encuentra en las caveolas de la membrana plasmática de los osteoblastos¹⁷, unida a la caveolina -1 que la mantiene en estado inactivo¹⁸. Esta interacción está bajo regulación hormonal. La NOSe se activa cuando se separa de la caveolina -1 aumentando la producción de $\text{NO}\bullet$ en el tejido¹⁹. En contraste la NOSi, al parecer, media la pérdida de masa ósea causada por una deficiencia de estrógenos, ya que se encuentra bajo el control negativo de los mismos⁷. Por otro lado, el papel de la NOSn en el hueso ha sido poco estudiado, pero se sabe que tiene una importancia fisiológica en la regulación de la masa ósea y la velocidad de recambio del hueso²⁰.

En esta revisión discutiremos también la evidencia en torno al uso de los nitratos orgánicos (nitroglicerina) para el control de la osteoporosis.

NOS Y LA SÍNTESIS DE $\text{NO}\bullet$

Producción de $\text{NO}\bullet$ a partir de L-arginina. La oxidación de la L-arginina por las NOS (cualquiera de ellas) produce L-citrulina

y $\text{NO}\bullet$ ^{1, 21}. En esta reacción intervienen cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1.5 moles de fosfato de nicotinamida adenin-dinucleótido reducido (NADPH) y dos moles de oxígeno por cada mol de $\text{NO}\bullet$ formado. La reacción requiere además de tetrahidrobiopterina (BH_4), flavín-adenin-dinucleótido (FAD), flavín-mononucleótido (FMN), Ca^{2+} -calmodulina (CaM) y un grupo hemo como cofactores²² (Figura 1).

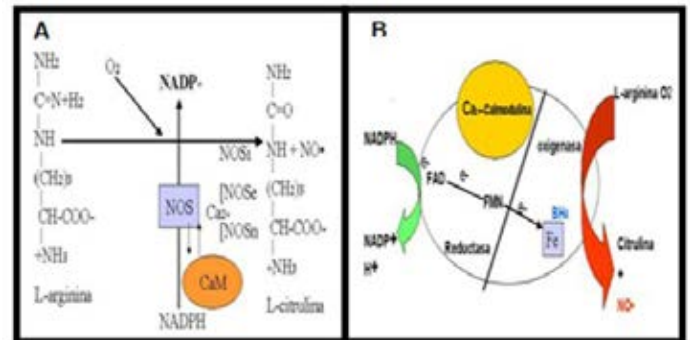


Figure1. Reactions catalized by NOS and its cofactors.

Figura 1. Reacción de las NOS y sus cofactores. A. El óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) se produce a partir de la L-arginina, en una reacción catalizada por la sintasa del óxido nítrico (NOS). B. Los electrones (e^-) son donados por el NADPH al dominio de reductasa de las NOS y procesados vía FAD y FMN, llevándolos al dominio de la oxigenasa. Aquí hay una interacción con el sitio activo del hierro y la BH_4 para catalizar la reacción del oxígeno (O_2) con L-arginina, generando L-citrulina y $\text{NO}\bullet$.

El flujo de electrones a través del dominio de reductasa requiere la presencia de Ca^{2+} -calmodulina, sólo en el caso de las NOSe y NOSn. Imágenes adaptadas de Alderton et al. (2001).

El mecanismo de reacción involucra dos pasos de mono-oxigenación: en la primera se lleva a cabo la incorporación de un átomo del O_2 molecular al sustrato, al mismo tiempo que el otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose N-hidroxi-L-arginina (N-OH-L-Arg) como producto intermedio. En la segunda de las mono-oxigenaciones, un electrón de NADPH, otro de N-OH-L-Arg y O_2 en forma de oxígeno-hierro ($\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$), reaccionan con el carbono guanidino de la N-OH-L-Arg, facilitando la incorporación de un átomo de O_2 molecular y causando la escisión del enlace C-N, liberando al $\text{NO}\bullet$ y dando lugar a L-citrulina^{23, 24}. El segundo átomo del O_2 se reduce hasta agua.

La producción de $\text{NO}\bullet$ puede ser atenuada por diferentes inhibidores de la NOS, derivados de la L-arginina tales como N^ω -monometil-L-arginina (L-NMMA)²⁵ y N^ω - N^ω -dimetil-L-arginina asimétrica (L-ADMA)²⁶. Otros inhibidores como N^ω -nitro-L-arginina (L-NNA), su ester N^ω -nitro-arginina metil ester (L-NAME) y N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO)²⁷ pueden inhibir de manera preferente a las isomorfos constitutivas de la NOS, mientras que N^ω -amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben a la NOSi de los macrófagos de una manera selectiva²⁸. Dado que estos inhibidores son análogos de la L-arginina su mecanismo de

inhibición es de tipo competitivo ²⁹.

Homología estructural entre NOSe, NOSi, NOSn. La estructura primaria de las tres isomorfias, que constituyen la familia de las NOS, muestran una alta homología de alrededor del 50% de identidad en sus aminoácidos ²⁴, en sus extremos amino (NH₂) terminal, así como carboxi terminal (COOH). En el dominio de oxigenasa, las tres isomorfias poseen sitios de unión para L-arginina (ARG), el grupo HEMO y BH₄, difiriendo una de la otra estructuralmente de la siguiente manera: NOSe se distingue por sus sitios de miristoilación (Myr) y palmitoilación (Palm) en el extremo NH₂-terminal, que facilita su asociación a las caveolas en la membrana plasmática ^{24, 30}. Para el caso de la NOSn existe en el extremo NH₂-terminal PDZ un acrónimo de: las primeras letras de tres proteínas – proteína de densidad postsináptica (PSD95), una supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA), y la proteína zonula occludens -1 (zo-1) – que fueron en las primeras en las cuales se descubrió el dominio, el cual, es único para esta isomorfa y que participa en su activación e interacción con otras proteínas en regiones específicas de la célula ³¹. En el dominio de reductasa, las tres isomorfias presentan homología, en cuanto a los cofactores con los que interactúan y que contribuyen a su función: CaM, FMN, FAD, NADPH y NADP⁺. Las formas activas de NOS requieren de la formación de un dímero de NOS, que se forma cuando los segmentos de dimerización se asocian en secuencias en el dominio de la oxigenasa ²⁴ (Figura 2).

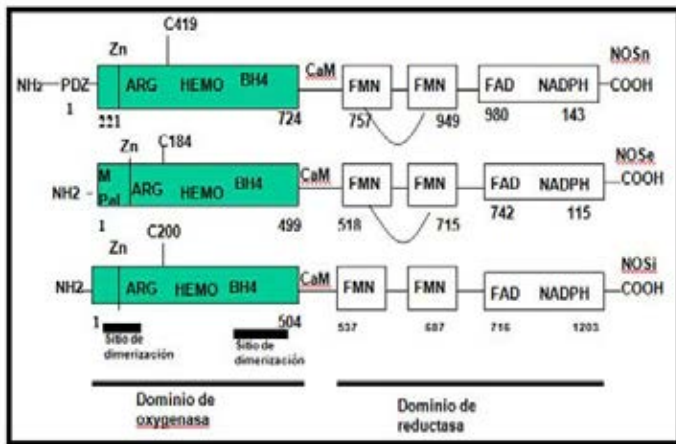


Figure2. Primary structure homologies among NOS isomorphs

Figura 2. Homologías en la estructura primaria entre las isomorfias de la NOS. Se definen los dominios de oxigenasa y reductasa numerando residuos de aminoácidos claves a lo largo de las estructuras primarias. Sitios de hierro, calmodulina, BH₄, FAD, NADPH, y Arg son indicados para cada isomorfa, sitios de miristoilación (Myr) y palmitoilación (Palm) ocurren solo en NOSe; en el extremo NH₂-terminal; la NOSn muestra el dominio PDZ, que le ayuda en su activación e interacción con otras proteínas en regiones específicas de la célula. En el dominio de la reductasa también aparecen enmarcados sitios a los que se unen el FMN en NOSn, NOSe y NOSi, los grupos de FMN de NOSn y NOSe muestran las asas de auto inhibición en el control de transferencia de electrones. Imagen adaptada de Alderton et al. (2001).

IMPORTANCIA DE NO•/NOS EN HUESO

En hueso se han identificado las tres isomorfias de NOS: NOSn, NOSe, y NOSi ^{32, 33, 34}. El interés en estas tres isomorfias radica en las diferentes acciones que ejercen en el tejido óseo: Estudios en ratones con el gen de la NOSe inactivado, sugieren que el NO• derivado de la isomorfa de NOSe parece ser esencial para la función normal de los osteoblastos y también media los efectos anabólicos de los estrógenos sobre el tejido óseo ^{35, 10}. La NOSi media los efectos proinflamatorios de las citocinas sobre el hueso. ^{36, 37, 38, 39, 40}.

Por otra parte, la NOSn está presente aunque en niveles bajos en una variedad de tejidos óseos como regiones condrales y fibrocondrales, durante el desarrollo del esqueleto y la sanación de fracturas ²⁰.

Actividad y función de las isomorfias de las NOS en hueso. NOSe: Estrógenos y Ejercicio. En hueso la producción constitutiva de NO• derivada de la acción de la NOSe sugiere que juega un papel importante en la regulación de la función de las células óseas y en la velocidad de recambio óseo. Varios grupos han mostrado que en el hueso adulto y en células derivadas de éste, la NOSe es la isomorfa más abundante que genera NO• en osteoblastos, osteocitos ^{35, 40} y en respuesta a estímulos dados por fuerzas de tensión mecánica ^{41, 42} y el flujo de fluidos ⁴³.

Por otra parte, el efecto del NO• sobre los osteoblastos o los osteoclastos puede depender de su concentración local ^{44, 45, 46}. Estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que en hueso la NOSe puede actuar como un mediador de la acción de los estrógenos ^{47, 40}. Ratones hembras con el gen de NOSe inactivado mostraron una densidad mineral ósea reducida y baja formación de hueso cortical en comparación con controles intactos (silvestres), sugiriendo que la producción de NO• en la reacción catalizada por la NOSe juega un papel esencial en la regulación de la masa ósea y velocidad del recambio óseo ³⁵. Asimismo, estudios *in vitro* empleando osteoblastos derivados de estos ratones mostraron también una velocidad de crecimiento reducida en comparación a los osteoblastos obtenidos de controles intactos ⁹.

La actividad de la NOSe, también se regula a través de estímulos bioquímicos de diversas proteínas como la acción de cinasas y fosfatasa que continuamente están fosforilando y desfosforilando a la NOSe ⁴⁸, por su asociación con la proteína de choque térmico 90 (HSP90), que potencia su actividad y por su asociación con la proteína de inhibición de la NOSe (NOSIP) ⁴⁹ [aunque se desconoce el mecanismo de acción de NOSIP sobre la actividad de la NOSe y su relevancia fisiológica]. También se conoce su asociación con la proteína de circulación de la NOSe (NOSTRIN), que junto con la NOSIP participan en la translocación del NOSe fuera de la caveola a sitios intracelulares, lo cual resulta en una disminución de la actividad de la NOSe ⁵⁰.

La caveolina-1 es una proteína transmembranal localizada en la membrana plasmática de los osteoblastos, específicamente en regiones especializadas denominadas caveolas¹⁹ a las que se une la NOSe inactiva. Cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} , el complejo Ca^{2+} -calmodulina se asocia a la NOSe⁵¹, facilitando su separación de la caveolina e incrementando con ello su actividad enzimática y la generación de $\text{NO}\bullet$ ⁵².

Se conoce que el efecto de los estrógenos es mediado por sus receptores α ($\text{ER}\alpha$) y β ($\text{ER}\beta$) y que la mayor parte de los efectos benéficos de los estrógenos son ejercidos a través de sus dos mecanismos de señalización: “*genotrópico*” y “*no genotrópico*”⁵³,¹⁴ que estimulan una serie de eventos intracelulares conectados en cascada, para lograr la activación de la isomorfa NOSe⁴⁷ y la producción de $\text{NO}\bullet$. Se ha reportado también, que este mecanismo involucra la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)⁵⁴ así como la de la cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK)⁴⁷ (Figura 3).

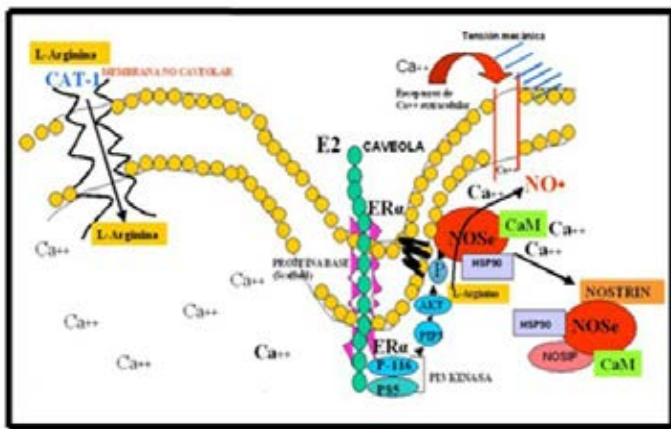


Figure 3. Mechanism of eNOS activity regulation

Figura 3. Mecanismo de regulación de la actividad de NOSe. La imagen ilustra el mecanismo de acción no genotrópico de los receptores de estrógenos (ER) asociados a membrana. Los $\text{ER}\alpha$ median la activación de la NOSe por los estrógenos a través de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3). Imágenes modificadas de datos recientemente publicados sobre el funcionamiento del estrógeno (Haynes et al. 2000; Solomon et al. 2000; Govers y Rabelink 2001; Chambliss et al. 2002; Shaul 2002; Simoncini et al. 2002).

Al respecto, algunos estudios muestran que los estrógenos estimulan la actividad de la NOSe y sus niveles de ARNm en las células endoteliales⁴⁸ y en osteoblastos⁹. El $\text{NO}\bullet$ derivado de este proceso, parece ser importante para la función normal de los osteoblastos y la respuesta anabólica del hueso⁹,^{35, 10}.

Estudios en humanos^{55, 56} y animales^{57, 58} han mostrado que la aplicación de cargas mecánicas que simulan los efectos producidos por el ejercicio, se asocian a cambios en la densidad mineral ósea, así como a cambios en la macro y micro estructura del esqueleto^{59, 60}, cuando estas cargas son retiradas, ocurre una pérdida de masa ósea^{61, 62}.

Estudios *in vitro* han revelado que la aplicación de estas cargas a células osteoprogenitoras de murinos disminuye la expresión de los receptores ligando que activan al NF κ B (RANKL)⁶³, que es la molécula de control dominante de la osteoclastogénesis. Esta acción involucra la participación de la cinasa de regulación extracelular 1 y 2 (ERK1/2) (Figura 4) que es un miembro de la familia de la cinasa activada por mitógeno (MAPK)¹⁶.

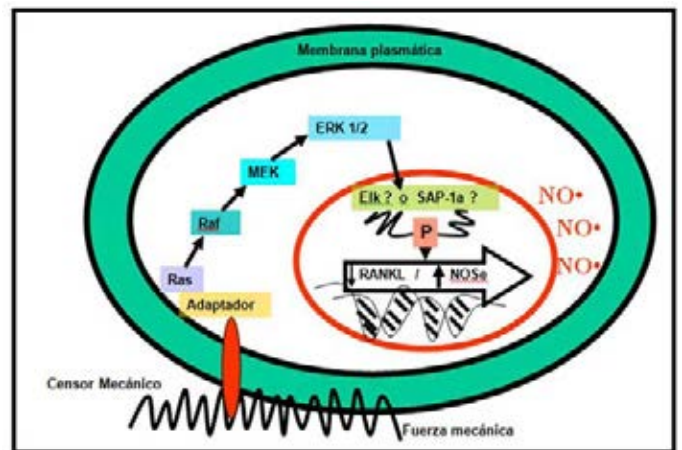


Figure 4. Exercise and eNOS

Figura 4. Ejercicio y NOSe. La imagen muestra el mecanismo que regula la inducción de expresión de NOSe y la disminución en la expresión de RANKL en células estromales del hueso sometidas a una fuerza mecánica. Para ver la respuesta funcional que produce esta fuerza mecánica, las células requieren de un mecanosensor que activa una cascada de eventos de señalización llamada vía ERK1/2 MAP-cinasa (Rubin et al. 2003), que provoca la disminución en la transcripción del gen de RANKL, el incremento de la producción de $\text{NO}\bullet$, generando así un micro ambiente local que resulta inhibitorio para los osteoclastos.

El $\text{NO}\bullet$ generado por NOSe, bajo estas condiciones, promueve un efecto anabólico sobre el hueso, al inhibir la formación y activación de los osteoclastos⁶⁴. Al parecer la disminución de RANKL y el aumento de NOSe por estas fuerzas, ayudan a mantener la densidad mineral ósea, así como la macro y micro estructura del esqueleto en buenas condiciones de salud *in vivo*, aunque se desconoce con certidumbre el mecanismo por el cual la vía ERK1/2 MAP-cinasa regula la inducción de expresión de NOSe y disminuye la expresión de RANKL en las células óseas.

NOSi. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que el $\text{NO}\bullet$ producido en forma masiva por la NOSi, contribuye a mediar el efecto de las citocinas proinflamatorias, sobre la actividad de las células óseas^{65, 10, 7}.

Ratones ovariectomizados y con el gen de NOSi inactivado (knockout) o tratados con un inhibidor específico para NOSi, N-aminoetil-L-lisina (L-NIL) mostraron un número normal de osteoclastos. Normales también fueron la velocidad de formación ósea, volumen óseo y la resorción óseas. Los niveles

de NO• en plasma tampoco cambiaron en comparación a los ratones silvestres ovariectomizados ⁷. Este estudio demuestra que la NOSi es indispensable para inducir pérdidas óseas en condiciones de deficiencia de estrógeno.

Por otra parte, en este mismo estudio, en ratones silvestres ovariectomizados se observó que la NOSi contribuye a incrementar los niveles de NO• y la acumulación de moléculas altamente reactivas (peroxinitrito y superóxido) que en conjunto funcionan como un foco local (hueso) de atracción de citocinas proinflamatorias del tipo de IL-1, IL-6 y TNFα, que como se sabe son potentes estimuladores de la resorción ósea ^{66, 39, 67}.

Por otro lado estudios *in vitro* muestran que en presencia del estrógeno disminuye la síntesis y la actividad de NOSi⁶⁸.

Bajo el esquema anterior, se ha documentado, que la deficiencia de estrógenos resulta en la pérdida de masa ósea como la osteoporosis ⁶⁹, debido a una sobre activación de la osteoclastogénesis por mecanismos no completamente definidos que involucran a varias citocinas como: el factor de necrosis tumoral α (TNFα), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y del RANKL ^{70, 71} por lo que la osteoporosis pudiera considerarse una enfermedad inflamatoria.

NOSn. Varios investigadores han fracasado en su intento por detectar NOSn en el hueso adulto normal o en cultivo de células óseas ^{33, 34}. Sin embargo, la NOSn ha sido detectada en osteoblastos y osteoclastos durante el desarrollo del esqueleto en ratas ⁷² y durante la recuperación de una fractura, donde está presente en las regiones condrales y fibrocondrales ⁷³, ya que las acciones de la NOSn sobre la remodelación ósea, observada en los estudios *in vivo*, es realizada, probablemente, a través de relevos de transmisión neurogénicos o por vías endócrinas no bien definidas aún, que regulan la velocidad de recambio óseo ⁷⁴.

Hasta ahora el papel de NOSn en el metabolismo del hueso ha sido poco estudiado. La regulación de la masa ósea y la velocidad de recambio en hueso producida por la actividad de la NOSn han sido recientemente evaluados en ratones “knockout” ²⁰, para el gen del NOSn. Estos ratones presentaron incremento de masa ósea y disminución en la velocidad de recambio óseo, lo cual sugiere que la NOSn es importante en la regulación de estos parámetros.

Estudios *in vitro* de osteoblastos y de formación de nódulos de hueso derivadas de estos mismos ratones, mostraron un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina, así como un aumento en los niveles de RANKL y TNFα. En comparación con los osteoblastos de ratones silvestres.

CONTROVERSIA DE LA ACCIÓN DEL NO• EN HUESO

En busca de un tratamiento económico para osteoporosis y de

amplia disponibilidad se ha buscado conocer el efecto de la nitroglicerina (un donador de NO•) sobre la prevención de la pérdida de masa ósea en la postmenopausia.

El NO• puede producir efectos anabólicos o catabólicos en el tejido óseo y modular el metabolismo mineral óseo, dependiendo de su concentración y de las condiciones locales en el tejido ⁴⁴. Estudios con inhibidores de las NOS y donadores de NO•, han revelado que esta molécula presenta efectos bifásicos sobre el tejido óseo ³². Por un lado se ha propuesto que bajos niveles de producción de NO• median la acción de citocinas como IL-1 y TNFα potenciando la resorción ósea ³⁶, mientras que niveles de producción más altos de NO• inhiben la resorción ósea por inducción de apoptosis de progenitores de osteoclastos y por inhibición de la actividad de osteoclastos maduros ^{37, 75}. Por el contrario los resultados de otros trabajos sugieren que son altos niveles de producción de NO• los que causan la resorción ósea, ya que activan procesos inflamatorios ⁷, mientras que niveles bajos de NO• inhiben la resorción ósea y/o activan la formación de hueso ⁴⁵.

También hay evidencia experimental que sugiere que el NO• tiene efectos bifásicos sobre los osteoblastos, ya que cantidades pequeñas de NO• producidas por los osteoblastos pueden actuar como un estímulo autocrino en su proliferación, mientras que cantidades más altas de NO• tienen potentes efectos inhibitorios sobre su crecimiento y diferenciación ^{76, 77}. Estudios con administración de nitroglicerina (trinitrito de glicerol, un donador de NO•), en modelos de ratas osteopénicas, han mostrado que pequeñas cantidades del donador aplicadas en la piel tienen efectos positivos sobre el tejido óseo, ya que bloquean las pérdidas de masa ósea debidas a la deficiencia de hormonas ováricas en animales ovariectomizados ^{78, 79, 80, 81}. Las observaciones hechas por Wimalawansa y colaboradores en los años 1996 y 2000 en modelos experimentales murinos lo llevaron a realizar el primer estudio con nitroglicerina en mujeres ooforectomizadas menopausicas ⁸². En este estudio se propuso que la nitroglicerina no únicamente disminuía la actividad osteoclástica, sino también estimulaba la actividad osteoblástica concluyendo que:

A).- El efecto de los estrógenos sobre el metabolismo óseo puede ser, al menos en parte, mediado por el NO•.

B).- Los nitratos de tipo orgánico donados por la nitroglicerina, pueden ser convenientes como tratamiento para bloquear la pérdida de hueso durante la menopausia, aunque, se desconoce el mecanismo por el cual se producen estos efectos benéficos. Sin embargo, estas observaciones han sido cuestionadas recientemente por él mismo ⁸³.

Por otra parte estudios *in vitro* realizados por Wang et al. 2004 ⁸⁴ con células estromales de medula ósea tratadas con nitroprusiato de sodio (SNP), NOC18 [2,2-

(hydroxynitrosohydrazino) bis-ethanamide] o S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), todos ellos donadores de NO•, promovieron una acción antiosteoclastogénica incrementando la expresión génica osteoblástica de la osteoprotegerina (OPG) y la disminución en la expresión de RANKL. Ello reforzaría la hipótesis que el NO• obtenido a través de donadores orgánicos puede ser benéfico para la salud ósea.

Otro donador de tipo orgánico que también se ha estudiado y ha dado buenos efectos es el isosorbide. Administrado a mujeres postmenopáusicas de forma oral, resultó en incrementos positivos de la densidad mineral ósea de la cadera y talón.^{85, 86, 87}, aunque al respecto, un estudio más reciente publicado por Pouwels et al., 2010⁸⁸ cuestiona, si, en realidad hay un efecto benéfico del uso del isosorbide para la prevención o tratamiento de las fracturas óseas de cadera en humanos.

CONCLUSIÓN

Como hemos visto, la NOSe, NOSn y NOSi, isomorfos de la NOS, son expresadas por los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, principales células que se encargan del metabolismo mineral del hueso. Su presencia, funcionalidad, actividad y sobre todo, la producción de NO•, dependen de estímulos tanto físicos como biológicos.

Tanto la procedencia (endógena o exógena) del NO• como la concentración pueden afectar a las células del hueso. Existe controversia del efecto bifásico que puede tener el NO• sobre el osteoclasto, ya sea potenciando o inhibiendo su actividad. En el osteoblasto y osteocito, el NO• actúa más como un mediador de señalización. Se ha visto que dependiendo de su concentración en los osteoblastos, el NO• puede estimular su crecimiento y diferenciación o bien llevarlo a apoptosis.

La administración del NO• procedente de una fuente exógena como serían donadores de NO•, se han propuesto como agentes para prevenir las pérdidas óseas tanto en animales como en mujeres osteopóroticas. Tanto en los estudios experimentales como en la clínica, los hallazgos han sido controversiales e inclusive contradictorios.

Buscando alternativas eficaces y de bajo costo para el tratamiento de las pérdidas de hueso en humanos, tales como la osteoporosis, se pensó en el uso de donadores de NO• que pudieran estimular la síntesis de hueso e inhibir su resorción. Hasta el momento los resultados no parecen apoyar esta alternativa.

Perspectivas

Nuestro interés de recopilar y presentar las observaciones hechas tanto en estudios de animales como en humanos sobre

la presencia de las diferentes isomorfos de la NOS en hueso y la evidente función que el NO• tiene sobre el metabolismo óseo ha sido para proporcionar una base bioquímica que sustente la posible aplicación terapéutica de donadores de NO•, tales como la nitroglicerina, no solo en la clínica de osteoporosis si no para el manejo de otras enfermedades óseas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329 (27): 2002-12.
2. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87 (2): 682 - 685.
3. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, y col. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88 (23): 10480-10484.
4. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD y col. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992; 256 (5054): 225-228.
5. Feelisch M, Stamler JS. *Methods in nitric oxide research.* J Wiley y Sons, New York. 1996; 712 pp.
6. Gross S, Wolin M. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 737-769.
7. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z y col. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 2003; 144 (3): 1098 -1107.
8. Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation.* 1992; 85 (5): 1927-1938.
9. Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology.* 1998; 139 (2): 799 -802.
10. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Gödecke A, Helfrich MH, Reid DM, y col. Defective bone formation and anabolic responses to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology.* 2001; 142 (2): 760 - 766.
11. Berka V, Chen PF, Tsai AL. Spatial relationship between L-arginine and heme binding sites of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 1996; 271 (52): 33293-33300.
12. Marcelín JG, Ceja OI, Hernández PA, Escalante AB. El 17-β estradiol induce la expresión de la sintasa de óxido nítrico tipo III en células endoteliales en cultivo. *Arch Cardiol Mex.* 2001; 71 (2): 114-120.
13. Chambliss KL, Shaul WP. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002; 23 (5): 665 - 686.
14. Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation.* 2002; 105: 1368-1373.
15. De Nigris F, Lerman LO, Ignarro SW, Sica G, Lerman A, Palinski W, y col. Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (3): 1420 - 1425.
16. Rubin J, Murphy TC, Zhu L, Roy E, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2/MAPK. *J Biol Chem.* 2003; 278 (36): 34018-34025.
17. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280 (2): F193-F206.
18. Solomon KR, Adolphson LD, Wank DA, McHugh KP, Hauschka PV.

- Caveolae in human and murine osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (12): 2391- 2401.
19. Solomon KR, Danciu TE, Adolphson LD, Hecht LE, Hauschka PV. Caveolin-enriched membrane signaling complexes in human and murine osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (12): 2380-2390.
 20. Van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology.* 2004; 145 (11): 5068-5074.
 21. Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic Enzymes, Nitric oxide and infection. *J Nutr.* 2004; 134 (10 Suppl): 2820S-2825S.
 22. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411 (2-3): 217-230.
 23. Rodrigo J, Alonso D, Fernández A, Serrano J, López J. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección, y neurotoxicidad. *An Sist Sanit Navar.* 2000; 23 (2): 195-235.
 24. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases, structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357: 593 – 615.
 25. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987; 235 (4787): 473-476.
 26. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992; 339 (8793): 572-575.
 27. McCall TB, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol.* 1992; 102 (1): 234-238.
 28. Lambert LE, French JF, Whitten JP, Baron BM, McDonald IA. Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol.* 1992; 216 (1): 131-134.
 29. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 89 (13): 5159-5162.
 30. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 749-774.
 31. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu Z-Y. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285(2): F178-F190.
 32. Brandt ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS y col. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92 (7): 2954 - 2958.
 33. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H y col. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (7): 1108-1115.
 34. Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone.* 1998; 23 (1): 1-6.
 35. Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez de Marticorena I, Hukkanen M, y col. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am J Pathol.* 2001; 158 (1): 247 – 257.
 36. Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1995; 10 (7):1040-1049.
 37. van't Hof R, Ralston S H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (11): 1797-1804.
 38. Van't Hof RJ, Ralston HS. Nitric oxide is essential for IL-1 stimulated osteoclast formation in mouse co-cultures. *J Bone Miner Res.* 1997; 12:1531.
 39. Van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY y col. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1 induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (14): 7993-7998.
 40. Armour KJ, Armour KE, van't Hof RJ, Reid DM, Wei XQ, Liew FY, y col. Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 (12): 2790 - 2796.
 41. Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Bourrin S, Zaman G, Lanyon LE.. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re) modeling? *FASEB J.* 1995; 9 (15):1614-1622.
 42. Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, MacPherson H, Joldersma M, Ralston SH y col. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 250 (1): 108-114.
 43. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284 (1): R1-R12.
 44. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY y col. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49 (9): 897-902.
 45. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (3): 300 -305.
 46. Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: What a gas! *Br J Rheumatol.* 1997; 36: 831-838.
 47. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T y col. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214 (3): 847-855.
 48. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, y col. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999; 399(6736): 597-601.
 49. Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 2001; 15 (1): 79-89.
 50. Huesa CH, Helfrich MH, Aspden RM. Role of caveolin-1 in regulation of eNOS activation in osteoblastic cells. *Seventh International Bone Fluid Flow Workshop, September.* 2005. New York city.
 51. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: Why Isn't Calcium/Calmodulin Enough?. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299 (3): 818-824.
 52. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88 (5): 1788-1792.
 53. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999; 103(3): 401 – 406
 54. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M y col. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3- kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000; 87(8): 677-82.
 55. Bennell KL, Malcolm SA, Khan KM, Thomas SA, Reid SJ, Brukner PD y col. Bone mass and bone turnover in power athletes, endurance athletes and controls: a 12 month longitudinal study. *Bone.* 1997; 20 (5): 477-484.
 56. Judex S, Gross TS, Zernicke RF. Strain gradients correlate with sites of exercise-induced bone forming surfaces in the adult skeleton. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (10): 1737-1745.
 57. Rubin C, Xu G, Judex S. The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *FASEB J.* 2001; 15(12): 2225-29.

58. Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y y col. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(6):1015-1025.
59. Haapasalo H, Sievanen H, Kannus P, Heinonen A, Oja P, Vuori I. Dimensions and estimated mechanical characteristics of the humerus after long-term tennis loading. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (6): 864-872.
60. Haapasalo H, Kontulainen S, Sievänen H, Kannus P, Järvinen M, Vuori I. Exercise- Induced bone gain is due to enlargement in bone size without a change in volumetric bone density: a peripheral quantitative computed tomography study of the upper arms of male tennis players. *Bone.* 2000; 27(3): 351-357.
61. Uebelhart D, Demiaux- Domenech B, Roth M, Chantaine A. Bone metabolism in spinal cord injured individuals and in others who have prolonged immobilisation. A review. *Paraplegia.* 1995; 33 (11): 669-673.
62. Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am.* 1984; 66 (3): 397-402.
63. Rubin J, Murphy TC, Fan X, Goldschmidt M, Taylor WR. Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 (8): 1452-1460.
64. Van't Hof RJ, Ralston HS. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001; 103 (3): 255-261.
65. Armour KE, Van'T Hof RJ, Grabowski PS, Reid DM, Ralston SH. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1999; 14 (12): 2137-2142.
66. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, y col. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(12): 5134-5138.
67. Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17-and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol.* 2005; 77 (3): 388-399.
68. Zancan V, Santagati S, Bolego C, Vegeto E, Maggi A, Puglisi L. 17 β -Estradiol decreases nitric oxide synthase II síntesis in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 1999; 140 (5): 2004-2009.
69. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (8): 1043-1051.
70. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J y col. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest.* 2000; 106(10): 1229 - 1237
71. RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995; 332 (5): 305-311.
72. Hukkanen MV, Platts LA, Fernandez De Marticorena I, O'Shaughnessy M, MacIntyre I, Polak JM. Developmental regulation of nitric oxide synthase expresión in rat skeletal bone. *J Bone Miner Res.* 1999; 14 (6): 868-877.
73. Zhu W, Diwan AD, Lin JH, Murrel GA. Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001; 16 (3): 535-540.
74. Amling M, Pogoda P, Beil FT, Schilling AF, Holzmann T, Priemel M y col. Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 496: 85-94.
75. MacIntyre I, Zaidi M, Alam AS, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, y col. Osteoclastic inhibitor: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88 (7): 2936-2940.
76. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernández-Luna JL y col. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1995; 10 (3): 439-446.
77. Kanaoka K, Kobayashi Y, Hashimoto F, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K y col. A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. *Endocrinology.* 2000; 141 (8): 2995-3005.
78. Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, Yallampalli C. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy induced bone loss. *Bone.* 1996; 18 (4): 301-304.
79. Wimalawansa SJ. Restoration of ovariectomy-induced osteopenia by nitroglycerin. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66 (1): 56-60.
80. Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Konttinen YT, Goodship AE y col. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone.* 2003; 32 (2): 142-149.
81. Hao YJ, Tang Y, Chen FB, Pei FX. Different doses of nitric oxide donor prevent osteoporosis in ovariectomized rats. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; 453: 226-31.
82. Wimalawansa SJ. Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (Premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (11): 2240-2244.
83. Wimalawansa SJ, Grimes JP, Wilson AC, Hoover DR. Transdermal nitroglycerin therapy may not prevent early postmenopausal bone loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94 (9): 3356-3364.
84. Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Huang YT, Huang HC, Chang PR y col. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2004; 145 (5): 2148-2156.
85. Jamal SA, Browner WS, Bauer DC, Cumming SR. Intermittent use of nitrates increases bone mineral density: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 1998; 13 (11):1755-1759.
86. Jamal SA, Cummings SR, Hawker GA. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial. *J. Bone Miner Res.* 2004; 19 (9):1512-1517.
87. Nabhan AF, Rabie NH. Isosorbide mononitrate versus alendronate for postmenopausal osteoporosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008; 103 (3): 213-216.
88. Pouwels S, Lalmohamed A, van Staa T, Cooper C, Souverein P, Leufkens HG y col. Use of organic nitrates and the risk of hip fracture: a population based case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95 (4): 1924-1931.