

# Expresión de las sintasas de óxido nítrico inducida por lipopolisacárido en cerebro de ratas

Dr. Dolores Javier Sánchez-González,\*,\*\*

Dr. Gerardo Martín González-López,\*\*\* Dr. Carlos Armando Sosa-Luna,\*\*\*

Dra. Nayeli Isabel Trejo-Bahena,\*\*\*\* Dra. Claudia María Martínez-Martínez\*

\* Subsección de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México.

\*\* Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

\*\*\* Sección de Investigación, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México.

\*\*\*\* Sección de Medicina Legal, Hospital Central Militar, México.

## RESUMEN

**Introducción.** El óxido nítrico (NO) se forma del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOSs) y desempeña muchas funciones biológicas. El NO se sintetiza en neuronas del sistema nervioso central donde actúa como neuromodulador en la memoria, coordinación entre reactividad neuronal y flujo sanguíneo y modulación del dolor. En el sistema nervioso periférico se libera por nervios no adrenérgicos y no colinérgicos. Estos nervios median algunas formas de vasodilatación neurogénica y regulan funciones gastrointestinales respiratorias y genitourinarias. Las NOSs contienen hemo y comparten homología con la citocromo P-450 reductasa. Se conocen tres isoformas NOSs: dos constitutivas (neuronal y endotelial) y una inducible por LPS (nNOS, eNOS e iNOS respectivamente).

**Objetivo.** Explorar la expresión e inmunolocalización de las NOSs en cerebros aislados de ratas Wistar macho inducida por LPS.

**Metodología.** En nuestro modelo, empleamos la técnica de inmunohistoquímica.

**Resultados.** Encontramos expresión moderada de las NOSs en núcleos basales, mientras que en rinencéfalo y tractos olfatorios, se encontró abundante expresión.

## *Expression of the synthases of nitric oxide induced for lipopolysaccharide in brain of rates*

## ABSTRACT

**Introduction.** Nitric oxide (NO) is formed from the amino acid L-arginine by a family of enzymes, the NO synthases (NOSs), and plays a role in many physiological functions. NO is synthesized in neurons of the central nervous system, where it acts as a neuromediator with many physiological functions, including the formation of memory, coordination between neuronal activity and blood flow, and modulation of pain. In the peripheral nervous system, NO is now known to be the mediator released by a widespread network of nerves, previously recognized as nonadrenergic and noncholinergic. These nerves mediate some forms of neurogenic vasodilation and regulate certain gastrointestinal, respiratory and genitourinary functions. NOS is a heme-containing enzyme with a sequence similarity to cytochrome P-450 reductase. Several isoforms of NOS are now known to exist, two of which are constitutive; neuronal and endothelial and one of which is inducible by LPS (nNOS, eNOS and iNOS, respectively).

**Objective.** To explore expression and immunolocalization of NOSs in brains isolated from male Wistar rats by LPS.

**Methodology.** In our model, we used immunohistochemistry technique.

**Results.** We found moderate expression of NOSs in basal nuclei, while in rhinencephalo and olfactory tracts it was abundant expression.

**Palabras clave:** Óxido nítrico, neuronas nitrérgicas.

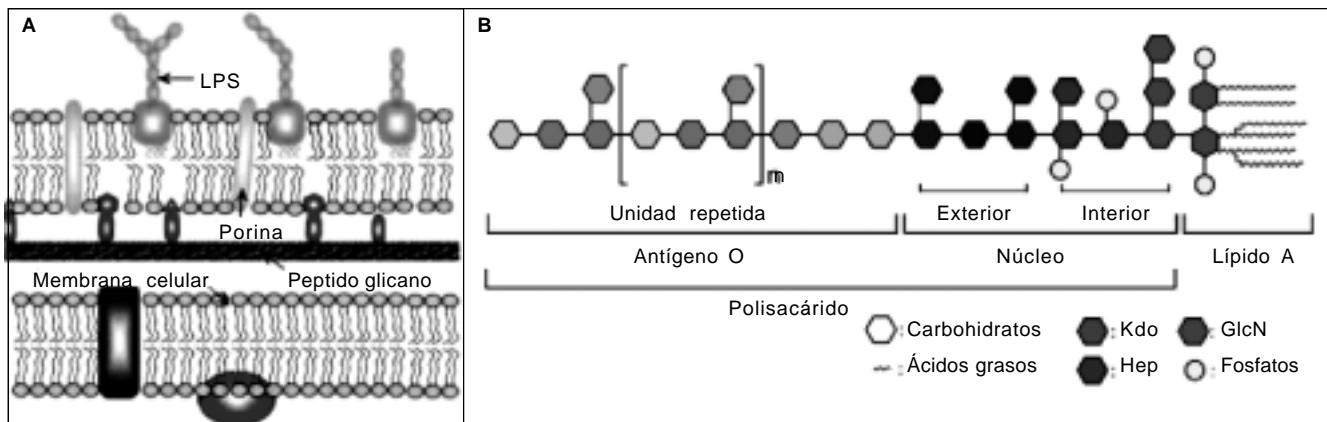
**Key words:** Nitric oxide, nitrergic neurons.

## INTRODUCCIÓN

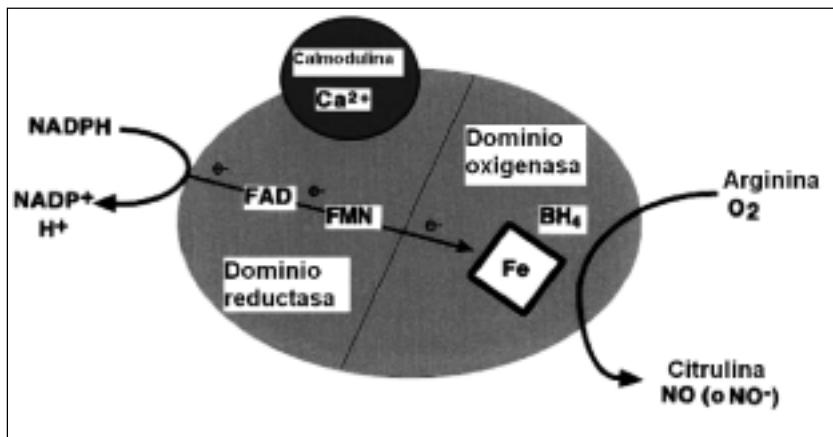
El choque séptico es la sepsis con hipotensión a pesar del adecuado aporte de fluidos. Esto incluye trastornos de la perfusión como la acidosis láctica, oliguria o alteración aguda en el estado mental.<sup>1</sup> El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es un constituyente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, las cuales son el principal agente causal del choque séptico<sup>2</sup> (Figura 1). El LPS puede ser detectado en sangre en un 78% de los pacientes con sepsis severa.<sup>3</sup> Una vez que el LPS o la bacteria gramnegativa ingresa en la sangre después del trauma, infección o enfermedad inducida por una translocación de la flora intestinal se dispara una cascada de mecanismos hostiles de defensa. Aunque es muy beneficiosa en casos de infecciones localizadas, esta respuesta puede encabezar serios efectos adversos como una gran activación sistémica de leucocitos.<sup>2</sup> De los modelos inducidos en la actualidad, la fisiopatología de la infección por gramnegativos es la mejor comprendida. La fisiopatología molecular de la sepsis se puede dividir en tres fases: inducción de la síntesis de citocinas, síntesis y secreción de citocinas y la fase de cascada de la sepsis.<sup>4</sup> La inducción de la síntesis de citocinas implica la interacción de ciertas moléculas microbianas que, al ser reconocidas por el hospedero, inducen la producción de mediadores que amplifican y transmiten la señal microbiana a otras células y tejidos.<sup>4</sup> Cuando un individuo sufre una infección por gramnegativos éste queda expuesto a los LPS fijos en la membrana del microorganismo, pero además a las endotoxinas libres presentes sobre los fragmentos de la membrana bacteriana externa que comúnmente se desprenden durante el crecimiento y replicación bacterianas.<sup>4</sup> Los LPS libres se unen a proteínas

fijadoras de LPS y forman un complejo LPS-proteína fijadora de LPS. Este complejo es 1,000 veces más potente que los LPS solos para inducir la producción de TNF en los macrófagos. Se sabe que el receptor de este complejo es la molécula CD14 que se encuentra en monocitos, macrófagos y neutrófilos.<sup>4</sup>

La fase de síntesis y secreción de citocinas incluye varios pasos regulados: transcripción, traducción de ARNm a proteína, procesamiento, postraducción y secreción de proteínas. Cuando el complejo LPS-proteína fijadora de LPS interactúa *in vitro* con CD14, la transcripción del gen TNF se incrementa al triple con el correspondiente aumento de 100 veces en las concentraciones de ARNm de TNF. Sin embargo, la biosíntesis y secreción de TNF aumentan más de 10,000 veces; esto se debe al incremento de la eficiencia de traducción de ARNm TNF, tanto del preformado como del recién transcrita.<sup>4</sup> La cascada septicémica se debe a la activación y liberación de un mediador central (TNF, interleucina-1 [IL-1]), que produce secreción de mediadores secundarios (IL-1, IL-6, IL-8, PAF, prostaglandinas y leucotrienos); activación de neutrófilos, sistema del complemento y células endoteliales vasculares; síntesis de reactivos de fase aguda, e inicio de coagulopatía. Es probable que los LPS y el TNF favorezcan al principio la coagulación intravascular para inducir a los monocitos sanguíneos a expresar el factor hístico, al iniciar la liberación del inhibidor-1 del activador de plasminógeno (PAI-1) e inhibir la expresión de trombomodulina y activador del plasminógeno en las células del endotelio vascular. El desenlace fisiológico de esta secuencia compleja corresponde al síndrome de reacción inflamatoria generalizada.<sup>4</sup> El óxido nítrico (NO) se produce por una familia de enzimas que se denominan óxido nítrico sintetasas (NOSs).<sup>5,6</sup>

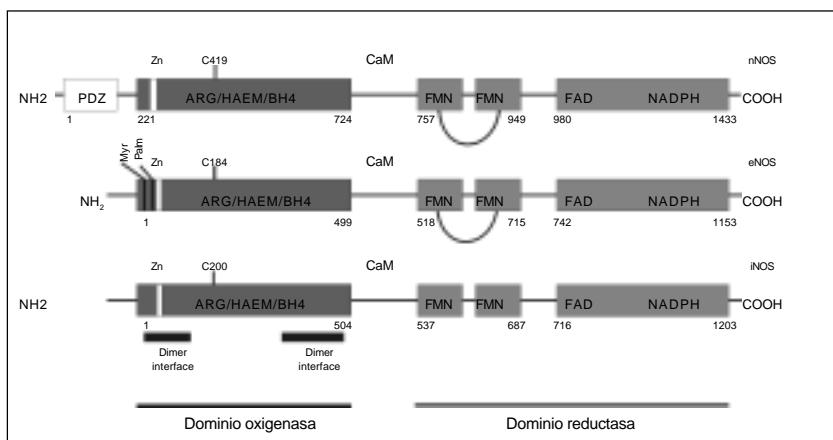


**Figura 1.** A. El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es un constituyente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. B. La toxicidad del LPS ha sido identificada en el lípido A, el LPS tiene dos grupos fosfato centrales, los cuales juegan un papel principal en la generación de la respuesta inflamatoria del LPS. La eliminación química de uno de estos grupos fosfato resulta en la conversión del LPS a un monofosforil lípido A (MPLA) aboliendo la toxicidad del LPS. Este MPLA ha mostrado tener efectos protectores en choque séptico experimental en animales e induce tolerancia a endotoxina en humanos.



**Figura 2.** Las NOSs tienen sitios de unión para el NADPH, el FAD, el FMN, la calmodulina y para el grupo hemo (hierro protoporfirina IX). En la síntesis de NO por las NOSs intervienen cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1.5 moles de NADPH y dos de dióxigeno por cada mol de NO formado. Esta reacción necesita también  $\text{H}_4\text{B}$ , FAD, FMN, iones  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulina y grupo hemo como co-factores y se realiza en dos eventos de monooxigenación, en el primero se incorpora un átomo de  $\text{O}_2$  al substrato, mientras que otro átomo se reduce hasta agua, para producir N-hidroxil-arginina (NOH-L-Arg) como producto intermedio. En el segundo paso, un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el  $\text{O}_2$  en forma de dióxigeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de  $\text{O}_2$  y la escisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y formando L-citrulina.

En el segundo paso, un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el  $\text{O}_2$  en forma de dióxigeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de  $\text{O}_2$  y la escisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y formando L-citrulina. En esta reacción un átomo de  $\text{O}_2$  se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO.



Se denomina isoforma particulada, aunque se ha demostrado la existencia de una eNOS citosólica, derivada probablemente de un mismo gen y cuyas diferencias sólo subyacen a nivel posttranscripcional y/o posttraduccional. Estas dos localizaciones de la eNOS se debe al ciclo que presenta con la proteína de membrana caveolina 1 (Cav 1) durante el cual la eNOS se inactiva mientras está anclada a la membrana. La isoforma eNOS también está palmitoilada de manera reversible.

Con la denominación cNOS se identifican a su vez dos isoformas: una denominada endotelial (eNOS), por estar mayoritariamente presente en las células endoteliales de la pared de los vasos y otra constitutiva neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico. La isoforma de la NOS inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios se le conoce como iNOS.<sup>5,6</sup>

El NO es la principal molécula mensajera que regula la dilatación de los vasos sanguíneos, aunque también tiene función inmunitaria y de neurotransmisión en el cerebro y sistema nervioso periférico. El NO es sintetizado de la arginina por medio de las NOSs, generando citrulina como producto<sup>6</sup> (Figuras 2 y 3). El LPS y las citocinas pueden estimular la producción de NO por la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS).<sup>7</sup>

A partir de la década de los noventa, los trabajos científicos sobre el NO en el sistema nervioso cam-

biaron el paradigma sobre los conceptos de neurotransmisión y neuromodulación vigentes, por el cual las neuronas deben tener sistemas para sintetizar y almacenar una sustancia, que debe liberarse de las neuronas mediante exocitosis e interaccionar con receptores específicos. Sin embargo, este proceso no se aplica a la neurotransmisión del NO, ya que es un gas inorgánico distinto a los neurotransmisores clásicos como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina, melatonina, etc. que difunde rápidamente a través de las membranas celulares y su acción sobrepasa el espacio sináptico. Su vida media depende del ambiente químico y oscila de entre unos segundos en sangre hasta algunos minutos en tejidos normales.<sup>8</sup>

Aunque el NO puede tener diversos orígenes en el cerebro, ya que puede provenir de las células endoteliales de los capilares cerebrales (eNOS), de la microglia por inmunoestimulación (iNOS). El NO en el sistema nervioso se produce principalmente por la

nNOS, que puede detectarse mediante técnicas de inmunolocalización. Se encuentra aproximadamente en 2% de las neuronas, tanto las interneuronas cortas como neuronas de vías largas, de casi todas las áreas cerebrales, con concentraciones especiales en cerebro e hipocampo, núcleos basales y tractos olfatorios. En la corteza cerebral en la banda diagonal del área de Broca representa 2% y en el cuerpo estriado es de 5 a 10%. Existe en los cuerpos celulares y dendritas, así como en las terminaciones axónicas, lo que sugiere que el NO no se almacena sino que se libera continuamente. La nNOS depende de la calmodulina y se activa por el incremento en la concentración intracelular de calcio; este aumento puede producirse por la conducción del potencial de acción y por la unión del neurotransmisor a su receptor. Muchos estudios han demostrado que la producción del NO aumenta por la activación de las vías sinápticas u otras situaciones, como la isquemia cerebral.<sup>8</sup>

Existen evidencias de que el NO desempeña un papel en la potenciación (PLP) y depresión (DLP), ya que ambos fenómenos disminuyen o se evitan con inhibidores de las NOS y están ausentes en ratones transgénicos en los que se ha alterado el gen de la nNOS.<sup>8</sup>

El estrés oxidativo en el SNC aumenta en el cuerpo estriado la liberación de NO, arginina, citrulina, dopamina y glutamato en la rata, así como aumento en los niveles de lípidos peroxidados que se correlacionan con cambios motores y conductuales.<sup>8</sup>

Se cree que el NO participa en los mecanismos de muerte neuronal durante la isquemia y se ha especulado que podría estar implicado en la neurodegeneración que se presenta en algunas enfermedades como la enfermedad de Parkinson, la demencia senil, enfermedad de Alzheimer, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. A pesar de que se ha descrito al NO como neuroprotector, existen condiciones en las que participa como neurotóxico, las cuales han sido asociadas a la generación del anión peroxinitrito.<sup>9</sup> La mayoría de los estudios conducidos a combatir el choque séptico se han enfocado en la eliminación o neutralización de la producción excesiva de mediadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6 pero no se ha mapeado la expresión de las NOSs, en cerebro ante una situación de choque séptico inducida por LPS.

## MATERIAL Y MÉTODOS

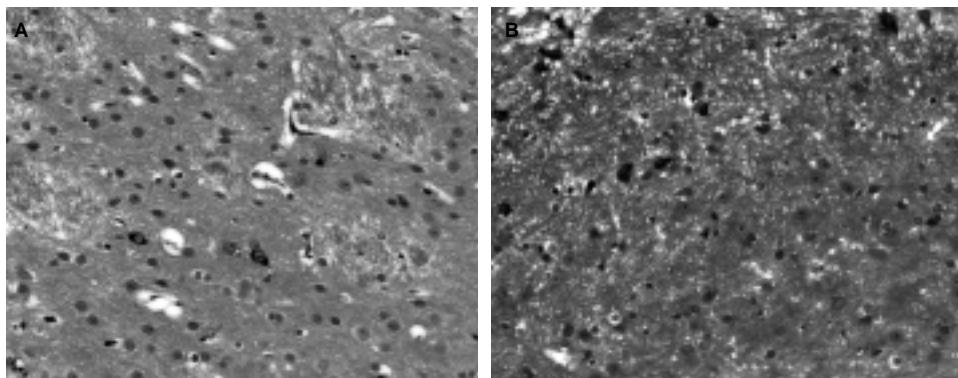
### Diseño experimental

Adquirimos 20 ratas Wistar machos, sanas de ocho semanas de edad de entre 200 y 250 g de peso, de Harlan, México para realizar el presente trabajo de investigación.

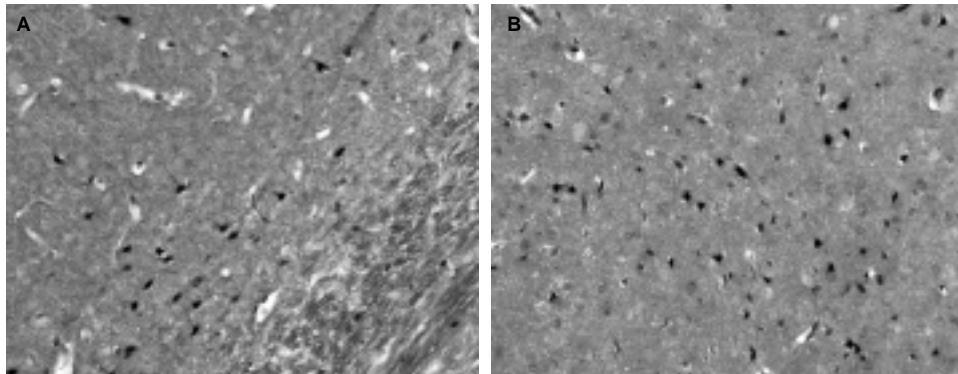
Se diseñó un modelo piloto para explorar la expresión de las NOSs en un lapso de 24 hrs, con lo cual determinamos que a las 6 hrs se encontró la expresión máxima de estas enzimas. Las ratas fueron alimentadas con *Purina chow* y agua *ad libitum*, las cuales se mantuvieron en el bioriego de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, con ciclos luz-oscuridad 12 x 12 horas.<sup>10-12</sup> Se formaron dos grupos de 10 ratas cada uno. Al primer grupo experimental (A) se le administró LPS de *E. coli* (Sigma) diluido con solución salina isotónica al 0.9%, vía intraperitoneal (LPS-SS). Al grupo control sólo se le inocularon solución salina isotónica al 0.9% vía intraperitoneal. Al finalizar el tiempo del experimento, se sacrificó a los animales mediante sobredosis de pentobarbital intraperitoneal<sup>13-15</sup> y se extrajeron los cerebros para fijación con etanol absoluto e inclusión en parafina<sup>16-18</sup> en donde se realizaron tinciones con hematoxilina y con el ácido peryódico de Schiff (PAS) para la tinción de polisacáridos.<sup>19,20</sup>

### Estudio histológico e inmunohistoquímico

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico 45mg/Kg intraperitoneal y se perfundieron por vía intracardiaca e intratraqueal en etanol absoluto. Por disección, se extrajeron los cerebros que se fijaron por inmersión con etanol absoluto durante 48 horas y después se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 3 m de espesor que se montaron en portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina (1:10) (*Sigma-Aldrich Co. USA*), los cuales fueron desparafinados y rehidratados con Declere<sup>®</sup>, (*Cell Marque, USA*). La peroxidasa endógena se inhibió por incubación con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 30% (34 mL de metanol y 6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (*Merck, Darmstadt, Germany*), durante dos horas en un vaso de *Coplin*. Luego de lavar con alcohol de 96°, agua y buffer salino de fosfatos (PBS) se bloquearon los sitios libres antígenicos con suero de cabra al 3% (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) en PBS/Triton 0.3% por 30 minutos. Posteriormente se decantó el exceso y se aplicaron los anticuerpos primarios: inmunoglobulina G<sub>1</sub> monoclonal (IgG<sub>1</sub>) de ratón anti-nNOS (A-11: sc-5302 *Santa Cruz Biotechnology, USA*) que reconoce a los aa 2-300 de la enzima, a una dilución 1:25 en la solución de bloqueo; IgG<sub>1</sub> monoclonal de ratón anti-iNOS (C-11: sc-7271 *Santa Cruz Biotechnology, USA*) que reconoce el extremo carboxilo terminal de la enzima, a una dilución 1:25 en la solución de bloqueo; IgG policlonal de conejo anti-eNOS (C-20: sc-654 *Santa Cruz Biotechnology, USA*) que reconoce la región carboxilo terminal de la enzima, a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo y el anticuerpo IgG purificado de conejo anti-NT (*Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA*) a una dilución 1:100 en la solución



**Figura 4.** A. Representa la expresión de nNOS inducida por LPS en cerebro: se observa una expresión nítida de tres neuronas. B. Representa la expresión de nNOS en rinencéfalo: se observa un aumento en la expresión con numerosas neuronas nitrérgicas. IHC para nNOS 200X.



**Figura 5.** Representan de la expresión de iNOS inducida por LPS en el cerebro. Se observan algunas microglias en color café positivas para esta enzima. IHC para iNOS 200X.

de bloqueo. Se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Terminado este tiempo, las laminillas se lavaron dos veces en agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm) con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios: anti-ratón (para nNOS e iNOS) biotinilado (*Jackson Immunoresearch, USA*) a una dilución 1:500 y anti-conejo (para eNOS y NT) biotinilado (*Jackson Immunoresearch, USA*) a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo y se dejaron incubar por una hora a temperatura ambiente en agitación de 20 rpm; luego se lavó dos veces en agitación de 100 rpm con PBS. Las preparaciones se colocaron 30 minutos en la cámara húmeda en contacto con el complejo avidina-biotina (VECTASTAIN ABC®) al 0.05% del reactivo A, y 0.05% del reactivo B (*Vector Laboratories, Burlingame, California, USA*) en PBS. La reacción antígeno anticuerpo fue detectada empleando una solución que contiene 40 L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, (*Merck, Darmstadt, Germany*), ya que es el sustrato de la enzima peroxidasa, 1 mg del cromógeno diaminobencidina (*SIGMA, St. Louis, MO, USA*) (que funciona como acceptor de electrones), disueltos en 1 mL de PBS. Después de 15 minutos de exposición a esta solución las laminillas se lavaron con agua corriente; se contrastaron con hematoxilina de Harris; se deshidrataron y se montaron con resina sintética (*Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA*) y cubreobjetos de 25 x 25 mm del número 1 (*VWR International, USA*). Posteriormente, se observaron en el invertoscopio Axio-

vert 200 M y se tomaron fotografías digitales con la *Axiocam HRC (Carl Zeiss, Germany)*. Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el software KS-300 versión 3.0 (*Carl Zeiss, Germany*).

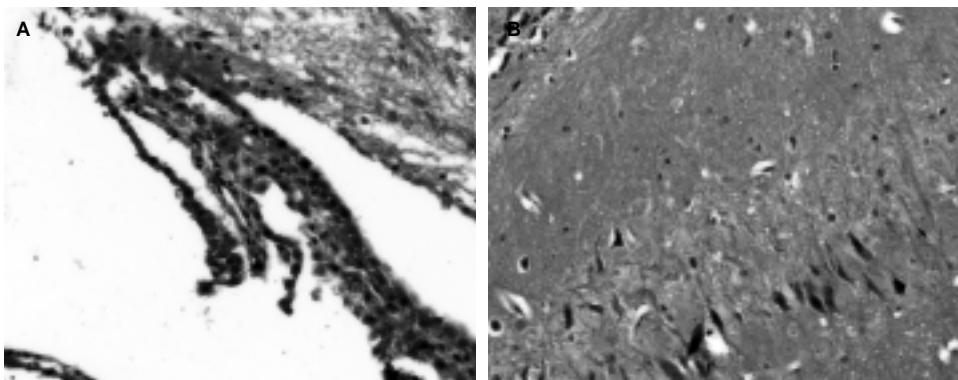
## RESULTADOS

Encontramos expresión de todas las NOSs en los cortes histológicos de cerebro de ratas tratadas con LPS. Se tomaron dos fotografías representativas de cada enzima, las cuales se muestran en las *figuras 4-6*.

En esta investigación se encontró que la nNOS se expresa de manera constitutiva en cerebro, como se muestra en la *figura 4*, en donde se observa la expresión e inmunolocalización de nNOS, las neuronas nitrérgicas se observan en color café.

También encontramos que la iNOS no se expresó tanto de forma constitutiva como inducible (*Figura. 5*). La eNOS se expresó de manera constitutiva en endotelio vascular y en el epitelio de los plexos coroides como se muestra en la *figura 6*. También detectamos expresión e inmunolocalización de eNOS en somas neuronales grandes como se muestra en la *figura 6*.

En concordancia con un estudio previo,<sup>8</sup> la expresión de la nNOS se inmunolocalizó casi exclusivamente en el rinencéfalo (*Figura 4*). Las neuronas nitrérgicas se localizaron en amígdala y cuerpo estriado, mientras que las vías nitrérgicas se encon-



**Figura 6.** A. Representa la expresión de eNOS en epitelio de los plexos coroideos: se observa una expresión basal epitelial en color café. B. Representa la expresión de eNOS en somas neuronales grandes. IHC para eNOS 200X.

traron de manera abundante en los tractos olfatorios. No se observaron neuronas nitrérgicas en la corteza cerebral.

## DISCUSIÓN

La inoculación de LPS intraperitoneal reprodujo algunos de los efectos del choque séptico al disminuir la presión arterial y la temperatura, así como aumentar la frecuencia respiratoria. En otros modelos la expresión del mRNA de iNOS fue detectada a las 2 horas, con una expresión máxima a las 6 horas, con un decaimiento de sus niveles a las 12 horas hasta llegar a niveles difícilmente detectables a las 24 horas.<sup>21</sup>

En modelos experimentales la inducción de choque séptico por LPS provoca una expresión aumentada de iNOS en diversos tejidos y existen muchas hipótesis sobre el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo.<sup>21</sup> En nuestro estudio pudimos reproducir este modelo al observar el aumento de la iNOS en cerebro. Por otro lado, existen reportes de que la administración de monofosforil lípido A aumenta la resistencia del hospedero a la infección mediante el mejoramiento en la resistencia inespecífica más que en acción directa sobre el agente infeccioso.<sup>7</sup>

Al NO se le consideró como la molécula del año 1992<sup>22</sup> y posteriormente fue el motivo del otorgamiento del premio Nobel a Robert F. Furchtgott, Louis Ignarro y Ferid Murad en el año 1998.<sup>22</sup> Las NOSs son enzimas que se encuentran en todos los mamíferos; sin embargo, a pesar de que la homología entre las isoformas equivalentes de las NOSs es de 90% entre estas especies, la homología intraespecie entre las diversas isoformas de NOS es del 53%. La gran diversidad entre los genes de las NOS se debe a que los genes de las NOSs evolucionaron de genes preexistentes por duplicación, reorganización, fusión o debido a polimorfismos alélicos.<sup>22</sup> Las NOSs son muy ubicuas y se expresan en casi todas las células del organismo,<sup>22</sup> su actividad enzimática se regula por fosforilación<sup>22</sup> y se incrementa por el cofactor H<sub>4</sub>B.<sup>22</sup>

El incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, además de activar a las cNOS, a las fosfolipasas y a las endonucleasas, también estimula a las proteasas tipo caspasas que ejecutan la apoptosis.<sup>22</sup> De forma interesante, el NO a través de la mitocondria, regula la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico liso (REL).<sup>22</sup> La nNOS se purificó en el cerebelo rata y se clonó del cerebro de rata y humano, es un homodímero soluble de 155 kDa que muestra homología con la citocromo P450 reductasa<sup>22</sup> y con la NADPH diaforasa.<sup>22</sup> En esta investigación se demostró que la nNOS es la isoforma que tiene la expresión más estable de manera constitutiva en las neuronas, a diferencia de la eNOS cuya expresión predomina en el epitelio de los plexos coroideos y en endotelio.

Las ratas, bovinos y humanos compartimos 39% de los 1,114 aminoácidos de la iNOS murina, esta isoforma inducible se detectó por primera vez en macrófagos activados de ratón, tiene una conformación dimérica y masa molecular de 135 kDa y su expresión es dependiente de LPS y citocinas tipo Th1. Esta enzima casi no es dependiente de Ca<sup>2+</sup> para la síntesis de NO, ya que el complejo de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina se encuentra unida a la enzima.<sup>22</sup> Se ha demostrado que si se inhibe la iNOS, mejora el cuadro de choque séptico y de inflamaciones crónicas.<sup>22</sup> En concordancia con reportes previos,<sup>22</sup> nosotros encontramos que la iNOS es la isoforma que se expresa de forma predominante en microglia. Las NOSs transforman el aminoácido L-arginina en L-citrulina, para producir equimolarmente NO. Aunque la síntesis de NO desde la L-arginina está bien demostrada, aún existe la duda de que la molécula efectora sea un precursor de NO, el NO o un complejo intermediario que contiene NO, ya que el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) de la arteria femoral del perro se ha identificado como un precursor del NO. En este contexto, se ha postulado que el EDRF puede de ser un nitrosotiol como el S-nitroso-L-cisteína que contiene NO y que actúa como un vasodilatador más potente que el NO mismo. También se cree que el EDRF puede ser un complejo nitrosil-hierro con grupos tioles y

con cisteína.<sup>22</sup> Sin embargo, está bien demostrado que las NOSs por medio de la producción de NO incrementan la actividad de la guanilatociclasa soluble (sGC).<sup>22</sup>

El NO es un neurotransmisor gaseoso de vida media corta (5-10 seg), que actúa como segundo mensajero y que difunde intercelularmente sin requerir transportadores. Este gas participa en diversos procesos biológicos como en la regulación de la expresión génica, en el metabolismo del hierro, en el control del ciclo celular, en la glicólisis y transporte de electrones mitocondriales, en la acilación de proteínas, en la síntesis de desoxinucleótidos, en la adherencia plaquetaria y leucocitaria, en la producción de linfocitos T, de queratinocitos y células tumorales, en la liberación de hormonas pituitarias, en la regulación del tono bronquial y de los esfínteres, en la regulación del peristaltismo del tubo digestivo y en la contracción del útero.<sup>22</sup> También regula la fisiología cardiaca, pulmonar y la erección del pene, además de participar en la tolerancia a los opioides. El efecto fisiológico del NO se debe a que estimula la sGC para catalizar la síntesis del GMPc y con ello inducir la relajación muscular y la vasodilatación, regulando el flujo y la presión sanguínea.<sup>22</sup> Debido a que el NO es lipofílico, es moderadamente soluble en el agua, con una concentración en una solución saturada (1 atmósfera) de 1.8 mM a 25 °C. Difunde de manera bidireccional en el plasmalema, el cual es utilizado como reservorio. La constante de difusión del NO en agua es de  $2.4 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s, y se incrementa con la temperatura. En el organismo en homeostasis a 37 °C, la constante de difusión del NO es de  $3.3 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s. De los 11 electrones de valencia del NO uno no está apareado, este electrón se puede estabilizar con el O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxidos y puede formar complejos con metales.<sup>22</sup> La interacción del NO con otras moléculas se incrementa de forma paralela a la inducción de la expresión de la iNOS, que al producir cantidades superiores a 1 M de NO rebasa las concentraciones fisiológicas en las células y produce nitrosilación, desaminación del ADN y nitración de proteínas.<sup>22</sup> Estos reportes concuerdan con nuestros resultados, donde observamos de forma paralela el incremento en la expresión de la iNOS inducida por LPS.

El NO tiene actividad antioxidante intrínseca al reaccionar con el ONOO<sup>-</sup> y con los radicales alcoxil y peroxil, originando nitrito-, nitro-, nitroso-peroxolípidos y lípidos nitrados como productos.<sup>22</sup> Muchas proteínas como la hemoglobina, la mioglobina, la citocromo oxidasa, las peroxidases, las desoxigenasas, las mioglobinas y los citocromos P450 se unen al NO por la similitud de esta molécula con el dioxígeno. Los grupos nitrosilos pueden liberar NO o aniones nitroxil (NO<sup>-</sup>) o actuar como agentes ni-

etrosantes a través de la donación de NO<sup>+</sup> en condiciones biológicas.<sup>5</sup>

Las consecuencias de la formación de NO dependen de las especies de óxidos de nitrógeno que se formen, de sus relativas velocidades de formación, de la naturaleza de los blancos disponibles en vecindad y de la rapidez con que reaccionan con estas especies. La distancia de difusión del NO en un medio proteico es de 10 m.<sup>22</sup> Cuantitativamente, la reacción más importante del NO en los mamíferos es la reacción con la oxihemoglobina. Esta reacción es una transferencia de O<sub>2</sub> más un electrón al NO, formando el anión nitrato y la metahemoglobina.

Aunque la nitración de proteínas se interpreta como índice de la producción de peroxinitrito, también puede ocurrir por la formación de NO<sub>2</sub>, nitritos ácidos o nitrilcloruro (NOCl) debido a la acción de la mieloperoxidasa (MPO) en procesos inflamatorios.<sup>22</sup> Sin embargo, se requieren grandes cantidades de estos compuestos para formar NT. Por otra parte, los antioxidantes endógenos previenen eficazmente la nitración por NO<sub>2</sub>, nitritos ácidos o cloruro de nitrilo; pero sólo parcialmente la nitración por ONOO<sup>-</sup>, ya que una sola molécula de este radical, puede ceder los dos electrones necesarios para la oxidación de la tirosina. Por esta razón, la detección de NT se utiliza como marcador de la producción de ONOO<sup>-</sup>.<sup>22</sup>

Las células tienen sistemas enzimáticos antioxidantes que inactivan a las ERO, ERN.<sup>23</sup> Entre estos sistemas de defensa antiestrés oxidativo, se encuentran las enzimas SOD, GSP, GST, GOR y catalasa.<sup>23</sup> Los genes que codifican y regulan la expresión de estas enzimas, así como los que modifican su función, se conocen como gerontogenes por la relación que guardan con el proceso de envejecimiento.<sup>22</sup> Los animales más longevos dentro de su especie, presentan isoformas muy eficaces de enzimas antioxidantes y detoxificantes y ciertas afecciones asociadas a envejecimiento precoz presentan déficit de estas enzimas.<sup>22</sup> Se ha demostrado que los antioxidantes pueden modular la expresión génica e inducen la expresión de las enzimas quimoprotectoras GST y NAD(P)H: quinona reductasa. Los antioxidantes fenólicos pueden inhibir la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios como moléculas de adhesión celular vascular y moléculas de adhesión intercelular.<sup>22</sup>

Está bien demostrado que la expresión de iNOS se incrementa con estímulos inflamatorios e infecciosos como se observó en esta investigación, debido a la activación del factor de transcripción NF-κB.<sup>22</sup> Las NOSs se pueden comportar como constitutivas o inducibles dependiendo del tejido donde se expresan. La hipoxia severa en ratas induce la expresión de las tres isoenzimas y el PIV estimula la expresión de

nNOS en ratas, mientras que la deprivación de oxígeno y glucosa la regulan negativamente.<sup>22</sup> La iNOS, además de que se induce por LPS y citocinas como interferón gama (INF $\gamma$ ), FNT $\alpha$  e IL-1, está presente constitutivamente en el epitelio bronquial, riñón y algunos tejidos fetales.<sup>22</sup> La eNOS se regula constitutivamente en endotelio por la tensión que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular (tensión de fricción o "shear stress"), pero puede inducirse durante el ejercicio crónico o el embarazo. Se ha postulado la existencia de otra isoenzima, la mtNOS. En realidad no se sabe si esta enzima es producto de un gen independiente o si es el resultado de cambios posttraduccionales de la nNOS translocada a mitocondria; aunque también se han encontrado eNOS e iNOS dentro de la mitocondria, además de otra isoforma aparentemente diferente de las tres descritas.<sup>22</sup> A nivel transcripcional, las NOSs tienen la secuencia consenso 5'GGGACTTCC-3', que sirve como sitio de unión al factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La activación de este factor ocurre en respuesta a gran variedad de estímulos como estrés oxidativo, LPS, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, radiación ultravioleta (UV), etc.<sup>22</sup> La nNOS, tiene un control en su expresión muy complejo, con nueve primeros exones intercambiables, también se ha demostrado que la endotoxina reduce su expresión y la inhibición de nNOS con 7-nitroindazole, incrementa la expresión de la iNOS.<sup>22</sup> La disminución de la eNOS e incremento de la iNOS vascular fue detectada en un modelo de LPS en ratas de forma similar a lo que reportamos en un estudio previo.<sup>11</sup>

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT (Apoyo No. 33834), por el Centro Médico de Terapia Celular, Medicina Regenerativa y Antienvejecimiento, por la Fundación Gonzalo Río Arronte IAP y por el Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

## REFERENCIAS

1. American College of Chest Physicians-Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20(6): 864-74.
2. Verweij WR, Bentala H, Huizinga-Van der Vlag A, Loenen-Weemaes A, Meijer DKF, et al. Protection against an escherichia coli-induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. Shock 2004; 22(2): 174-9.
3. Su F, Brands R, Wang Z, Verdant C, Bruhn A, Cai Y, et al. Beneficial effects of alkaline phosphatase in septic shock. Crit Care Med 2006; 34(8): 1-8.
4. Rivers EP, Rady MY, Bilkozki R. Choque. En: Tintinalli JE, Gabor D (eds.). Medicina de Urgencias. US: McGrawHill, p. 263-4.
5. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. BS 2001; 357: 593-615.
6. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. Med Sci Monit 2001; 7(4): 801-19.
7. Lortie MJ, Ishizuka SJ, Schwartz D, Blantz RC. Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. AJPCELL 2000; 278: 1191-9.
8. Sánchez-González DJ, Villanueva-López GC, Sosa-Luna CA, Orjuela-Henry DJ, Ortega-Rangel JA, Martínez-Martínez CM, Herrera-González NE. Óxido nítrico en el sistema nervioso central. Neuronas nitrógenas. Neurol Neurocir Psiquiat 2004; 37(2): 73-8.
9. Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Fernández-Guzmán MP, Valdés-Espinosa RA, Martínez-Martínez CM, León-Contreras JC, et al. Producción de iNOS y nitración de proteínas en la aorta de ratas expuestas a ozono. Rev Sanid Milit Mex 2005; 59(4): 223-40.
10. Sánchez-González DJ, Moro MA, Hernández-Pando R, Castillo-Henkel C, Mendoza R, Herrera-González N, et al. Peroxynitrite formation in aorta isolated from rats exposed to ozone. Free Radic Biol Med 2004; 36(1): S102.
11. Villanueva C, Sánchez-González DJ, Moro MA, Hernández-Pando R, Castillo-Henkel C, Mendoza R, Herrera-González N. Immunohistochemistry of nitric oxide synthases in lungs of rats exposed to ozone. Free Radic Biol Med 2004; 36(1): S79.
12. Villanueva C, Sanchez-Gonzalez DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Floriano-Sánchez E, Herrera-Gonzalez N. Antioxidant Treatment Prevents Effects of Ozone on Nitric Oxide Synthases Expression in Lung. Free Radic Biol Med 2006; 41(1): S97.
13. Aguilera P, Chávez-Cárdenas ME, Floriano-Sánchez E, Barrera D, Santamaría A, Sánchez-González DJ, et al. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. Neurotoxicology 2007; 28(6): 1200-7.
14. Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sanchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion, and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. Free Radic Res 2006; 40(5): 523-33.
15. Sánchez-González DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Hernández-Pando R, Medina-Santillán R, Larios FJ, et al. Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. Environ Toxicol Pharmacol 2004; 17: 1-7.
16. Canul-Andrade LP, Rodríguez-Perales MA, López-Chavira A, Pacheco-Ramírez MA, Sánchez-González DJ. Valoración histológica del daño tisular ocasionado por diferentes medios de corte en piel de conejo. Rev Sanid Milit Mex 2007; 61(3): 162-9.
17. Aguilera-Hernández P, Chávez-Cárdenas ME, Sánchez-González DJ, Floriano-Sánchez E, Díaz-García M, Barrera D, et al. Regulación de las sintetasas de óxido nítrico en el estriado de rata en el modelo de la enfermedad de Huntington inducido por quinolínico. Arch Neurocienc Mex 2006; 11: 31.
18. Pacheco-Ramírez MA, Rodríguez-Perales MA, López-Chavira A, Canul-Andrade LP, Martínez-Martínez CM, Sánchez-González DJ. Expresión de las sintetasas de óxido nítrico en tumores glómicos de cabeza y cuello. Rev Sanid Milit Mex 2006; 60(6): 369-78.
19. Sánchez-González DJ, Trejo-Bahena NI. Biología Celular y Molecular. México: Editorial Alfil; 2006.
20. Sánchez-González DJ, Trejo-Bahena NI. Histología. Biología Celular y Atlas. México: Editorial Alfil; 2007.
21. Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H. Coinduction of Nitric-oxide Synthase and Arginase I in Cultured Rat Peritoneal Macrophages and Rat Tissues in vivo by Lipopolysaccharide. JBC 1997; 272(6): 3689-93.
22. Sánchez-González DJ. Expresión de las sintetasas de óxido nítrico en pulmones de ratas expuestas a ozono. México: Tesis Doctoral, IPN; 2007.
23. Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martínez-Martínez CM, Floriano-Sánchez E, Santamaría A, et al. Evaluation of oxidative stress in d-serine induced nephrotoxicity. Toxicology 2007; 229: 123-35.

Recibido: Agosto 22, 2007.  
Aceptado: Septiembre 7, 2007.