

Oxido Nítrico en la Nocicepción

Rebecca E. Franco-Bourland* y Gabriel Guízar-Sahagún**

RESUMEN

Las investigaciones en el campo del dolor y de la analgesia se están enfocando hacia los eventos celulares y moleculares subyacentes a los mecanismos de dolor crónico. En particular, mucha atención está recibiendo el óxido nítrico (ON), un nuevo tipo de neurotransmisor. El ON es un radical libre gaseoso e inestable que resulta de la oxidación de la L-arginina a L-citrulina en una reacción catalizada por la sintasa del óxido nítrico.

El ON cumple un papel de molécula citotóxica de macrófagos activados y de relajante de músculo liso. Además de estas funciones, el ON actúa como neuromodulador y/o neurotransmisor en el sistema nervioso.

Reportes recientes han comenzado a definir el papel del ON en los procesos nociceptivos a nivel de la médula espinal. Asociado a receptores sensibles al N-metil-D-aspartato (NMDA), parece estar involucrado en los mecanismos subyacentes de la hiperalgia térmica, involucrado en la facilitación de reflejos térmicos. Es más, parece que la producción sostenida del ON y la subsecuente activación de la guanilato ciclasa soluble en la médula espinal lumbar, son condiciones requeridas para el mantenimiento de la hiperalgia térmica producida en modelos de dolor persistente. La inhibición de la sintasa del ON con nitro-L-arginina bloquea la tolerancia a la morfina en ratones. La nitro-L-arginina también es capaz de revertir lentamente tolerancia preexistente, además de reducir la dependencia y de revertir la dependencia a la droga previamente establecida. La acción del ON es selectivo para la tolerancia y dependencia a receptores del subtipo μ .

Palabras Clave: Oxido Nítrico, analgesia, nocicepción

*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán. ** Centro de Investigación CAMINA - IMSS, México D.F., México. Correspondencia: Rebecca E. Franco-Bourland, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, 14000 México D.F., México.

SUMMARY

NITRIC OXIDE AND NOCICEPTION

Pain and analgesia research are focusing on cellular events underlying mechanisms of chronic pain. In particular, considerable attention is being given to nitric oxide (NO) a new and intriguing class of neurotransmitter. It is a labile free-radical gas, obtained during the oxidation of L-arginine to L-citrulline in a reaction catalyzed by NO synthetase.

NO has a role as a cytotoxic molecule of activated macrophages and is a relaxer of smooth muscle. Besides these functions, NO functions in the nervous system as a neuromodulator and or neurotransmitter.

Recent reports have begun to define the role of NO in spinal nociceptive processing. Linked to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, it appears to be involved in the mechanisms that underly thermal hyperalgia in the spinal cord, involving the facilitation of thermal reflexes. Moreover, the sustained production of NO and subsequent activation of soluble guanylate cyclase in the lumbar spinal cord appears to be required for maintenance of the thermal hyperalgia produced in persistent pain models.

Inhibition of NO synthase with nitro-L-arginine blocks morphine tolerance in mice. Nitro-L-arginine is also able to slowly reverse pre-existing tolerance, as well as being able to reduce dependence and reverse previously established dependence to the drug. NO action is selective for u tolerance and dependence.

Key Words: Nitric oxide, analgesia, nociception

Generalidades sobre el óxido nítrico y la sintasa del óxido nítrico¹

El óxido nítrico (ON) es un gas; es a la vez un radical libre, y un atrapador de radicales libres². El ON es un mensajero biológico: es un relajante del músculo liso;

es una molécula citotóxica de macrófagos activados; es un neurotransmisor en el sistema nervioso central; es un mediador en la hiperalgesia térmica y tiene un papel en procesos de tolerancia y dependencia a la morfina.

El ON es un producto en la oxidación de la L-arginina a L-citrulina. Esta reacción es catalizada por una enzima oxidativa similar a la reductasa del citocromo P-450, denominada sintasa del ON.

La sintasa del ON es una hemoproteína dependiente de Ca-calmodulina, a la que la nicotinamida-adenina-dinucleótido fosforilada (NADPH), el flavín-mononucleótido (FMN) y el flavín-adenín-mononucleótido (FAD) se unen estequiométricamente, a sitios específicos de reconocimiento.

La reductasa del citocromo P-450 es la única otra enzima de mamífero que se sabe posee sitios de reconocimiento para los tres nucleótidos mencionados. Tal y como ha sido descrito para la reductasa del citocromo P-450, es muy probable que la transferencia de electrones en la sintasa del ON ocurra de NADPH al FAD y de éste al FMN, que a su vez transfiere los electrones al Fe^{+3} del grupo hemo, promoviendo así la interacción con el oxígeno molecular. Al parecer el ON mismo puede interactuar con el grupo hemo e inhibir su formación por retroalimentación negativa.

La sintasa del ON también utiliza a la tetrabiopterina como un cofactor para la transferencia de electrones. Se desconoce su papel exacto, pero es posible que establezca la unión de la L-arginina a la enzima.

Existen varias isoenzimas de la sintasa del ON. Existe una variedad neuronal, una endotelial, otra propia de macrófagos y una hepática. Los genes de estas enzimas están localizados en diversos cromosomas: en el cromosoma 12, el gen de la enzima neuronal, en el cromosoma 7, el gen de la endotelial (misma que contiene el gen de la reductasa del citocromo P-450), en el cromosoma 17 los genes de las enzimas hepática y de macrófago.

De las isoenzimas de la sintasa del ON, las enzimas neuronal y la endotelial son enzimas constitutivas (son producto del metabolismo basal), cuya actividad es regulable por incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{+2} . Esto se explica, porque en estos sistemas el ON es mediador de eventos rápidos, tales como la neurotransmisión y la vasodilatación, respectivamente. No obstante, tanto la sintasa del ON neuronal como la enzima endotelial son inducibles en presencia del factor de crecimiento neuronal y en respuesta a una lesión de la médula espinal la primera y después de isquemia cerebral, la segunda.

En condiciones basales, la sintasa del ON de macrófagos no es detectable, pero la estimulación de los macrófagos con lipopolisacáridos o citocinas como el gama-interferón resultan en un aumento en la cantidad de enzima en poco más de 2h. Esta inducción de la sintasa del ON de macrófagos resulta en la producción de cantidades masivas de ON para la destrucción de microorganismos y tumores, aunque también puede resultar en daño tisular patológico. Contrario a las isoenzimas neuronal y endotelial, la enzima de macrófagos no es estimulada por Ca^{+2} , aunque posee sitios de reconocimiento para la calmodulina.

Las isoenzimas de la sintasa del ON neuronal, endotelial y hepática, pero no la de macrófagos, son regulables por fosforilación. En su forma fosforilada las enzimas son inactivas y su desfosforilación, mediante la acción de la calcineurina (una fosfatasa dependiente de Ca^{+2} -calmodulina), resulta en su activación. Estas enzimas son sustrato de la cinasa de proteínas dependiente de AMPc, la proteína cinasa C y la cinasa de proteínas dependiente de GMPc. Dado que la cinasa de proteínas dependiente de GMPc es activable con ON, su acción sobre las sintasas del ON constituye un mecanismo de retroalimentación negativa en la producción de ON.

El óxido nítrico neuronal

El ON parece influenciar la liberación de neurotransmisores. Se ha observado que la inhibición de la sintasa del ON con nitro-L-arginina inhibe la liberación de diversos neurotransmisores como el ácido aspártico, la acetilcolina y la dopamina.

El ON mismo parece ser un neurotransmisor que puede actuar en la misma neurona donde se produce o difundir hacia otras células adyacentes, células gliales o neuronas, para activarlas a través de un mecanismo GMPc dependiente.

El ON ha sido implicado en la plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo (PLP). En el hipocampo, el ON ha sido implicado en la PLP como un mensajero retrógrado. En este sistema el ON es generado por la activación de un receptor post-sináptico. Luego, por difusión, regresa rápidamente hacia la neurona pre-sináptica para modular su excitabilidad y aumentar las conexiones sinápticas. Es en esta forma que se piensa puedan reforzarse las conexiones pre- y post-sinápticas en el sistema nervioso central como consecuencia de su uso frecuente.

El receptor post-sináptico activado durante la

PLP es un receptor de ácido glutámico sensible a N-metil-D-aspartato (NMDA). Una vez activado este receptor, se permite la entrada de Ca^{+2} al interior de las neuronas excitadas. Este aumento en Ca^{+2} intracelular desencadena una cascada de eventos que incluyen la activación de la sintasa del ON neuronal, lo que resulta en un aumento en la producción del ON. El ON regresa a la neurona pre-sináptica, donde activa una ciclasa de guanilato soluble, que resulta en el incremento en los niveles de GMPc.

Después del aumento en los niveles de GMPc, no está claro lo que ocurre. Se sabe que el GMPc puede activar serina/treonina cinasas de proteínas dependientes de GMPc, activar canales de cationes dependientes de GMPc, así como fosfodiesterasas dependientes de GMPc. Es a través de una fosfodiesterasa de AMPc dependiente de GMPc, que se piensa que el ON participa en la regulación de vías de señalización dependientes de AMPc.

La formación excesiva de ON es tóxica a la célula y resulta en la fragmentación del ADN. El exceso de ON se puede producir cuando se activan receptores de glutámico sensibles a NMDA en presencia de un exceso de ácido glutámico. En estas condiciones también se aprecia un aumento en los niveles del radical superóxido, que con el ON forman peroxinitrito, otra molécula tóxica a la célula.

Gangliósidos reducen la neurotoxicidad del glutámico. Esto es debido a que los gangliósidos pueden formar complejos con calmodulina reduciendo así su disponibilidad para la activación de la sintasa del ON y con ello inhibiendo la formación de ON.

La ciclosporina A y el FK506, unidos a sus respectivas proteínas acarreadoras, inhiben a la calcineurina, una fosfatasa capaz de desfosforilar a la sintasa del ON. Dado que la forma activa de la sintasa del ON es la especie desfosforilada, la inhibición de la fosfatasa es un mecanismo de inhibición de la producción de ON.

El óxido nítrico en la nocicepción

Pocos son los estudios que han examinado el papel potencial del ON en la nocicepción. Uno de ellos involucra su papel en la hiperalgia térmica³ y la otra su papel en el bloqueo de la tolerancia a la morfina⁴. La administración intratecal de NMDA produce una hiperalgia térmica aguda, transitoria, de corta duración y dosis-dependiente, que puede bloquearse reversiblemente con AP5, un antagonista específico del receptor sensible a NMDA⁵. Esta hiperalgia térmica puede ser inhibida con N-nitro L-arginina metil

ester (L-NAME, un inhibidor de la sintasa del ON)⁶ y con azul de metileno (un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble)⁵. Estos resultados sugieren que la hiperalgia térmica producida por el NMDA, involucra, secuencialmente, la activación del receptor sensible a NMDA, la producción de ON y finalmente un incremento en los niveles de GMPc. Un aumento en la producción de ON endógeno después de la administración intratecal de L-arginina, también resulta en un estado de hiperalgia térmica, que muestra un curso temporal y una magnitud similar a la que se produce cuando se administra NMDA.

Además, parece que la producción sostenida del ON y la subsecuente activación de la guanilato ciclasa soluble en la médula espinal lumbar, son condiciones requeridas para el mantenimiento de la hiperalgia térmica producida en modelos de dolor persistente. Esta hiperalgia térmica también puede inhibirse con hemoglobina, sugiriendo que una vez que se produce ON debe abandonar la célula en el que se produjo y viajar extracelularmente a otra célula para allí activar a la guanilato ciclasa donde, finalmente se produce el incremento en GMPc.

Las acciones de las sustancias opiáceas son moduladas por una red de neurotransmisores facilitatorios e inhibitorios. El uso crónico de analgésicos opiáceos invariablemente conduce a la tolerancia, aunque no parece haber una tolerancia cruzada entre los analgésicos tipo μ , $\kappa 1$ y $\kappa 3$. Esto sugiere que los mecanismos analgésicos de estos tres subtipos son diferentes, y que mecanismos para bloquear la tolerancia a los opiáceos a su vez van a ocurrir a través de mecanismos diferentes.

La tolerancia a la morfina mediada por receptores pertenecientes al subtipo m involucra la activación de receptores sensibles a NMDA. Su inhibición con el antagonista MK 801 resulta en el bloqueo de la tolerancia a la morfina. La nitro-L-arginina dada en forma aguda o crónica no afecta las latencias basales y no influencia dosis únicas de morfina, pero previene el desarrollo de la tolerancia a la morfina a través de un mecanismo que no involucra la potenciación de la morfina, sino la tolerancia al opiáceo propiamente.

La nitro-L-arginina es capaz de revertir tolerancia a morfina ya establecida aunque en forma muy lenta, lo que indica que el proceso involucra pasos que van más allá de la inhibición de la sintasa del ON. Probablemente el ON regula cambios en sistemas adicionales. Estas acciones sobre la tolerancia están restringidas a la analgesia mediada por los subtipos μ . Los subtipos $\kappa 1$ y $\kappa 3$ no se afectan por la presencia de la nitro-L-arginina.

La nitro-L-arginina también es capaz de reducir la dependencia a la morfina y de revertir la dependencia a la droga previamente establecida. Esta acción del ON también es selectiva para la dependencia a receptores del subtipo μ .

REFERENCIAS

1. Dawson TM, Snyder SH: Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994; 14: 5147-5159.
2. Kanner J, Harel S, Granit R: Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids* 1992; 27: 46-49
3. Meller ST, Gebhart GF: Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52: 127-136
4. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW: Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5162-5166
5. Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF: Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol* 1992; 214: 93-96
6. Kitto KF, Haley JE, Wilcox GL: Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett* 1992; 148: 1-5