

Es realmente difusa la barrera entre la revisión de investigación de frontera de un tema especializado y una contribución para la actualización docente. Esta sección recoge artículos de revisión adecuados para la enseñanza.

El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno: aspectos básicos e importancia biológica

Noemí Cárdenas-Rodríguez, Yolanda I. Chirino, José Pedraza-Chaverri*

Abstract (Nitric oxide and reactive nitrogen species: Basic concepts and biologic importance)

Nitric oxide (NO) is a free radical synthesized from the amino acid L-arginine by a family of enzymes, the nitric oxide synthases (NOS). There are three isoforms of NOS named neuronal NOS (nNOS or NOS type I), endothelial NOS (eNOS or NOS type III) and inducible NOS (iNOS or NOS type II). nNOS and eNOS are constitutively expressed in mammalian cells which synthesize NO[•] in response to the increase in intracellular calcium level. iNOS activity is independent of the calcium levels in the cell. Many biological functions of NO[•] depend on activation of soluble guanylate cyclase, resulting in elevated production of cyclic guanosin monophosphate (cGMP) levels and activation of cGMP dependent protein kinases which induce diverse biological responses such as smooth muscle relaxation and vasodilation, inhibition of platelet aggregation and neurotransmission. NO is able to react with thiol groups (S-nitrosylation) forming S-nitrosothiols; however NO reactivity is low despite is a free radical. NO is the precursor of reactive nitrogen species (RNS) such as peroxyxynitrite (ONOO⁻), peroxyxynitrous acid (ONOOH), nitrogen dioxide radical (NO₂[•]), dinitrogen trioxide (N₂O₃) and nitryl chloride (NO₂Cl). NO overproduction is associated with enhanced production of RNS, which induce structural damage to multiple biomolecules including proteins and deoxyribonucleic acid. The presence of 3-nitrotyrosine is considered a footprint of RNS.

Introducción

El oxígeno atmosférico se encuentra en un porcentaje aproximado de 21% y es producto de la oxidación del H₂O que se lleva a cabo en el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias. El oxígeno es

indispensable para la mayoría de los seres vivos debido a que es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria y dicho transporte está acoplado a la síntesis de ATP. Sin embargo, altas concentraciones de oxígeno resultan tóxicas para la mayoría de los organismos debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno y este término incluye metabolitos que pueden o no ser radicales libres (RL). Dentro de las ERO se encuentran el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (OH[•]), el radical peróxido (ROO[•]) y el singulete de oxígeno (¹O₂). Los organismos aerobios producen ERO en forma continua como parte de su metabolismo y algunas tienen funciones fisiológicas definidas como el O₂⁻ producido por la NADPH oxidasa, el cual tiene un papel bactericida. Otro ejemplo es el H₂O₂, el cual tiene una importante función como molécula de señalización. Sin embargo, las células cuentan con sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos para detoxificar las ERO que se producen de forma endógena. Dentro del sistema de defensa enzimático se encuentran enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la cual pertenece a una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión del O₂⁻ a H₂O₂ y a O₂; la catalasa (CAT) que es una hemoproteína tetramérica que cataliza la descomposición del H₂O₂ a H₂O y O₂ y la glutatión peroxidasa (GPx) que cataliza la descomposición del H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos a H₂O. Por otra parte, entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran moléculas que pueden reducir antioxidantes o compuestos oxidados, prevenir la lipoperoxidación y/o participar como cofactor de reacciones enzimáticas antioxidantes. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el glutatión (GSH), un tripéptido compuesto por cisteína, glicina y glutamato; el ácido ascórbico, una vitamina hidrosoluble que el humano no puede sintetizar por lo que debe de adquirirse a través de la dieta; el α-tocoferol, una vitamina liposoluble que debe ser ingerida a través de la dieta ya que no se sintetiza endógenamente; los carotenoides, una familia de pigmentos presentes en frutas y vegetales formados por largas cadenas hidro-

Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Edificio B, Segundo Piso, Lab 209, Ciudad Universitaria. 04510 México, D.F.

Correo electrónico: pedraza@servidor.unam.mx

Recibido: 11 de octubre de 2005; aceptado: 1 de abril de 2006.

Tabla 1. Especies reactivas de nitrógeno producidas en el cuerpo humano (Ueda *et al.*, 2001).

Radicales	No radicales
Óxido nítrico (NO·)	Peroxinitrito (ONOO ⁻)
Dióxido de nitrógeno (NO ₂ ·)	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
	Catión nitrosonio (NO ⁺)
	Catión nitronio (NO ₂ ⁺)
	Anión nitroxilo (NO ⁻)
	Tetraóxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄)
	Trióxido de dinitrógeno (N ₂ O ₃)
	Cloruro de nitrilo (NO ₂ Cl)

carbonadas con dobles enlaces conjugados, y el ácido úrico, el producto final del catabolismo de purinas en el humano. Además de las ERO, existen especies reactivas de nitrógeno (ERN) que pueden o no ser RL y se producen en forma constitutiva. Entre ellas se encuentran los radicales libres óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO₂) y los no radicales como el catión nitronio (NO₂⁺) y el peroxinitrito (ONOO⁻), entre otros. Dentro de las ERN, el NO es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos. El NO participa en el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria y en procesos de neurotransmisión. Los sistemas de detoxificación enzimáticos para las ERN son menos específicos que aquellos con los que cuenta la célula para eliminar las ERO. La GPx es uno de los sistemas enzimáticos que puede detoxificar el ONOO⁻ y recientemente se ha demostrado que la peroxirredoxina 5 de humano (Dubuisson *et*

al., 2004) y la tiorredoxina reductasa (Arteel *et al.*, 1999) actúan también como peroxinitrito reductasas. En lo que respecta a los antioxidantes no enzimáticos, se conoce que el GSH, el ácido ascórbico y el ácido úrico son capaces de detoxificar a la célula de ONOO⁻ (Alvarez y Radi, 2003). No obstante, existen condiciones en las que se genera desequilibrios entre la producción y la neutralización de las ERO o ERN a las cuales se conoce como estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente. Estos desequilibrios se pueden presentar por una producción excesiva de ERO o ERN, por una disminución de las defensas antioxidantes o por una combinación de ambos eventos que desemboca en daño a biomoléculas y dependiendo de la cantidad, en daño a tejidos.

En las últimas décadas se han descrito un gran número de fisiopatologías donde se postula al aumento de las ERO y de las ERN como fuentes que contribuyen de forma importante al desarrollo de enfermedades como Alzheimer, Huntington, diabetes e hipertensión, entre otras. Lo anterior se debe a que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo pueden tener como resultado daño estructural en la célula, como la lipoperoxidación de las membranas, la oxidación y nitración de proteínas y el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN).

Formación de NO y de otras ERN

El NO se sintetiza enzimáticamente por medio de la óxido nítrico sintasa (NOS), una familia de enzimas con 3 isoformas producto de 3 genes distintos. La tipo I o neuronal (nNOS) y la tipo III o endotelial (eNOS) son constitutivas y su actividad está regulada por concentraciones intracelulares de calcio. La actividad de la isoforma tipo II o inducible (iNOS) es independiente de calcio y está regulada transcripcionalmente por citocinas como interferón γ o productos bacterianos como lipopolisacáridos, entre otras. Todas estas isoformas tienen un dominio reductasa y un dominio oxigenasa y es necesaria su conformación homodimérica para que se lleve a cabo la síntesis de NO. El dominio reductasa se encuentra en el extremo carboxilo donde se localiza un sitio de unión a flavín adenín mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En dominio oxigenasa se encuentra en el extremo amino donde se localiza un grupo hemo y sitios de unión a tetrahidrobiopterina (BH₄), a L-arginina y a Ca²⁺-calmodulina (CaM) (figura 1).

La síntesis de NO a partir de L-arginina se lleva

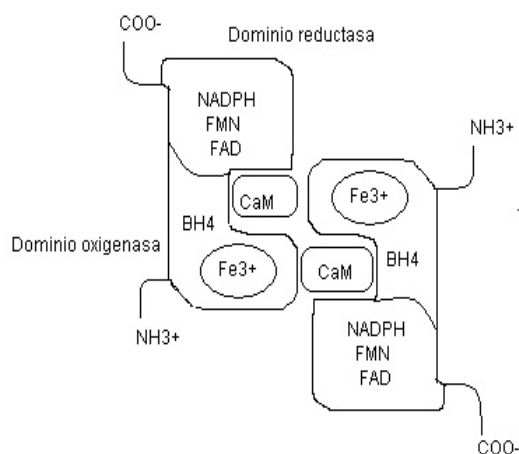


Figura 1. La estructura homodimérica de las tres isoformas de la NOS es indispensable para la síntesis de NO.

a cabo por las tres isoformas de la NOS y ocurre en dos pasos, el primero involucra la formación de la N^w-hidroxi-L-arginina, un intermediario unido a la enzima, y el segundo consiste en la oxidación de dicho intermediario a NO y a L-citrulina. Esta síntesis requiere de tres electrones donados por 1.5 moles de NADPH y dos electrones donados por el grupo guanidino de la L-arginina (figura 2). Los electrones fluyen del dominio reductasa al dominio oxigenasa y se transfieren a través de las flavinas de la NOS al grupo hemo, el cual requiere O₂ en ambos pasos de la síntesis de NO (Knowles y Moncada, 1994; Alderton *et al.*, 2001; Stuehr *et al.*, 2004; Stuehr, 2004).

A pesar de ser un RL, el NO· tiene baja reactividad pero es de gran importancia debido a que es precursor de ERN entre las que se encuentran el ONOO⁻, el ONOOH, el NO₂ y el N₂O₃. La formación de ONOO⁻ se debe a la reacción entre el NO con el O₂⁻ con una k = de 6.7 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ la cual indica que esta reacción es más rápida que la que se lleva a cabo entre el O₂⁻ y la SOD, la cual es de 2 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹. En la tabla 2 se presentan las reacciones de formación de diversas ERN.

La formación de ONOO⁻ es de gran importancia por su capacidad para modificar biomoléculas como aminoácidos y proteínas mediante procesos de oxidación y nitración; este último consiste en la adición de un grupo nitro a una biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1999; Evans y Halliwell, 2001; Olinescu y Terrance, 2002). El NO también es capaz de formar complejos con iones metálicos, lo cual es muy importante para su actividad biológica ya que es por medio de estas interacciones que ejerce sus efectos fisiológicos. Por ejemplo, el NO activa a la guanilato ciclasa soluble (GC), la enzima que sintetiza el segundo mensajero guanosín monofosfato cíclico (GMPc). La activación de la GC se debe precisamente a la formación del complejo hemo-Fe^{II}-NO. Por otra parte, algunas hemoproteínas como la hemoglobina, la mioglobina y el citocromo c pueden reaccionar rápidamente con NO para producir aductos nitrosil-hemo (NO-hemo) que pueden impedir las funciones fisiológicas tanto del NO como de las hemoproteínas; así la unión del NO al grupo hemo de la citocromo c oxidasa inhibe en forma competitiva y reversible la actividad de esta enzima (Radi, 1996)

La inactivación de hemoproteínas se debe a la formación de complejos que alteran el estado de oxidación de iones presentes en la célula. Un ejem-

plo de ello es la hemoglobina, la proteína responsable del transporte de O₂ en la sangre y que contiene al grupo hemo. Esta proteína enlaza hierro (Fe) en el estado de oxidación 2⁺ y puede enlazar O₂ en forma reversible para formar oxihemoglobina (HbO₂) sin cambios en el estado de oxidación del Fe. Sin embargo, el Fe²⁺ puede ser oxidado por una gran variedad de agentes. En presencia de aniones inorgánicos u orgánicos, el Fe²⁺ puede reaccionar con el NO para formar complejos que tienen la estructura general Fe(NO)₂(A⁻)₂, donde A⁻ puede ser Cl⁻, OH⁻, HPO₄²⁻ o RS⁻, los cuales se encuentran en el medio celular.

El NO también reacciona con compuestos que contienen grupos amino (N₂) y tiol (RSH). Sin embargo, para que se lleve a cabo la reacción entre el NO y los RSH es necesaria la presencia de O₂. Además, el NO puede reaccionar con O₂ para formar en última instancia N₂O₃ (tabla 2). Esta última especie puede reaccionar con los RSH para formar S-nitrosotioles (RSNO) o con H₂O para genera nitritos (NO₂⁻) (Keshive, 1996), los cuales han sido considerados productos finales del metabolismo del NO (Eberhardt, 2001) (tabla 2). Sin embargo, los NO₂⁻ pueden formar otras ERN como NO₂ y NO₂Cl al reaccionar con H₂O₂ y HOCl, respectivamente (tabla 2).

Mecanismo de acción fisiológico del NO

El mecanismo de acción del NO consiste en la activación de la GC y la consecuente formación de GMPc (figura 3). Este último es capaz de activar proteínas cinasas dependientes de GMPc y desencadenar diversas respuestas como la relajación del músculo liso, la inhibición de la agregación plaque-

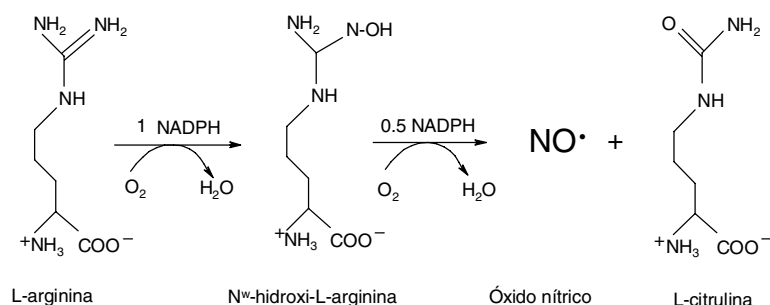


Figura 2. La NOS cataliza la oxidación de la L-arginina a un intermediario, la N^w-hidroxi-L-arginina y posteriormente a NO y L-citrulina.

Tabla 2. Reacciones de formación de especies reactivas de nitrógeno (Tarpey *et al.*, 2004, Ignarro *et al.*, 1993, assina *et al.*, 2000, Eberhardt, 2001).

Reacción	Comentarios
$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^- \xrightarrow{\text{H}^+} \text{ONOOH}$	Formación de peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido. La protonación del peroxinitrito conduce a la formación del ácido peroxinitroso.
$\text{ONOOH} \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_2$	El ácido peroxinitroso se puede descomponer en los radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno. El radical hidroxilo es capaz de oxidar bases del ADN. El radical dióxido de nitrógeno es un poderoso agente nitrante y promueve procesos de lipoperoxidación.
$\text{NO} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{NO}^-$ $\text{NO}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{ONOO}^-$	Cuando el NO gana un electrón se forma el anión nitroxilo. Este a su vez puede reaccionar con el oxígeno para formar peroxinitrito.
$\text{NO} - 1\text{e}^- \rightarrow \text{NO}^+$	El catión nitrosonio se forma cuando el óxido nítrico pierde un electrón. Este catión participa en la formación de nitrosotioles (RSNO), los cuales prolongan la vida media del óxido nítrico.
$\text{NO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$	El dióxido de nitrógeno puede generar trióxido de dinitrógeno, un agente capaz de desaminar guanina, citosina y adenina convirtiéndolas a xantina, uracilo e hipoxantina, respectivamente
$2\text{NO}_2 \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_4 \leftarrow \text{NO} + \text{OONO} \quad \text{NO} + \text{O}_2$	Mediante diferentes reacciones puede generarse tetraóxido de dinitrógeno, un poderoso agente nitrante.
$\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$ $2\text{NO} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$ $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2 + 2\text{NO} \rightarrow 2\text{N}_2\text{O}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+$	Mediante diversas reacciones se producen los aniones nitrito y nitrato que se han considerado los metabolitos finales del óxido nítrico.
$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2$	A su vez, el nitrito en presencia de peróxido de hidrógeno y de peroxidasas puede generar radical dióxido de nitrógeno.
$\text{NO}_2^- + \text{HOCl} \rightarrow \text{NO}_2\text{Cl}$	El cloruro de nitrilo es un agente nitrante que se forma por reacción entre nitrito y ácido hipocloroso, este último proveniente de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa.
$\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow [\text{ONOOCO}_2^-] \rightarrow \text{CO}_3^- + \text{NO}_2$	La reacción entre el peroxinitrito y el dióxido de carbono forma un intermediario, el nitrosoperoxicarboxilato que es precursor del radical carbonato. Este último oxida aminoácidos aromáticos como tirosina y triptofano.

Activación de la guanilato ciclasa

(Algunos de los efectos son vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y neurotransmisión)

Terminación del proceso de lipoperoxidación

(El NO puede reaccionar directamente con radicales peróxilo formados durante la lipoperoxidación y actuar como un terminador en la cadena de propagación de radicales lipídicos)

ÓXIDO NÍTRICO

Formación de S-nitrosotioles
(Actúan como donadores de NO)

Formación de S-nitrosoalbúmina
(Es un reservorio de NO y tiene especial importancia porque esta proteína es muy abundante en circulación)

Figura 3. Algunas de las acciones fisiológicas del NO. El NO puede reaccionar con compuestos fácilmente oxidables, como los que contienen RSH. La S-nitrosoalbúmina se forma *in vivo* por la S-nitrosilación en el residuo de cisteína 34 de albúmina; de esta manera se prolonga la vida media del NO. El NO puede reaccionar con ácidos grasos previamente oxidados con lo cual se detiene el proceso de lipoperoxidación.

taria y la neurotransmisión, entre otras (Hamad *et al.*, 2003). Además el NO puede almacenarse en forma de RSNO (figura 3) y ser liberado posteriormente para difundir a través de las membranas y activar a la GC. Los RSNO se forman por la reacción de un grupo NO⁺ con RSH del aminoácido cisteína libre o presente en proteínas y péptidos (Gaston *et al.*, 2003). Los principales RSNO en sistemas biológicos son S-nitrosoalbúmina, S-nitrosoglutatión (GSNO), S-nitrosohemoglobina y S-nitrosocisteína (Rauhala *et al.*, 2005). Existen diversos estudios que soportan que la relevancia biológica de los RSNO se debe a su actividad antimicrobiana, vasodilatadora y a su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria (Giustarini *et al.*, 2004; Stamler, 2004; Tsikas *et al.*, 2001; Sandmann *et al.*, 2005). Específicamente, la formación de S-nitrosoalbúmina tiene especial importancia al ser la mayor fuente de reserva de NO en plasma (Gandley *et al.*, 2005). La S-nitrosoalbúmina se forma por la S-nitrosilación de la cisteína 34; se ha postulado que la S-nitrosocisteína o el GSNO son los donadores de NO en dicho proceso (Tsikas *et al.*, 2001) (ver la figura 3). De hecho estos compuestos se han encontrado en el torrente sanguíneo y en varios tejidos animales y vegetales (Tsikas *et al.*, 2001).

Debido a la capacidad vasodilatadora del NO y de los RSNO, se han utilizado compuestos sintéticos que mimetizan este efecto al liberar NO (Halliwell, 1997; Richardson y Benjamin, 2002). Dichos compuestos se conocen como nitrosovasodilatadores y algunos han sido utilizados por varias décadas en el tratamiento contra enfermedades en las que se observa una vasoconstricción anormal como en la angina de pecho. En la tabla 3 se presenta una lista de algunos donadores de NO.

Efecto de las ERN sobre algunas biomoléculas

A. Reacciones con el ácido desoxirribonucleico (ADN)

La reactividad del NO es insuficiente para inducir alteraciones importantes en el ADN. Sin embargo, el ONOO⁻ puede causar transiciones de tipo guanina-citosina → timina-adenina (GC → TA) al reaccionar con G y formar la 8-oxo-desoxiguanosina (ver la figura 4) la cual puede conducir a mutaciones (Eberhardt, 2001). Estas mutaciones se originan por apareamiento equivocado durante la replicación, recombinación o reparación del ADN o bien por desaminación u oxidación. Al desaminarse C se produce uracilo (U) y por lo tanto se aparea con A en lugar de aparearse con G, mientras que la G

oxidada se aparea con A y no con C. Por otra parte, a pesar de que se ha demostrado que existen otras especies capaces de inducir nitración como el NO₂Cl (Eberhardt, 2001), no se ha demostrado que esta especie pueda inducir alteraciones al ADN de la misma forma que el ONOO⁻. Otro de los mecanismos por medio del cual el ONOO⁻ puede inducir alteraciones en el ADN es por medio de la abstracción de un átomo de hidrógeno de la desoxirribosa causando ruptura en sus cadenas. El ONOO⁻ puede generar la formación de 8-nitrodesoxiguanosina (figura 4) lo cual favorece la activación de endonucleasas, del tipo AP (sitio apurínico o apirimidínico) que catalizan la ruptura de un ácido nucleico dentro de la cadena de ADN removiendo la base modificada para su posterior reparación. Otra ERN que ejerce importantes efectos sobre el ADN es el N₂O₃, el cual puede reaccionar con amins primarias presentes en las bases del ADN (posición 6 en A, posición 4 en C y posición 2 en G) formando el intermediario R-NH₂⁺-N=O (García-Santos *et al.*, 2002) lo que da lugar a transiciones tipo GC → AT, GC → TA y AT → GC. La consecuencia más importante de estas alteraciones es ruptura de la cadena de ADN.

B. Reacciones con lípidos

Un posible mecanismo de lipoperoxidación en el que están involucradas las ERN consiste en la reacción del NO₂ con lípidos abstrayendo un átomo de

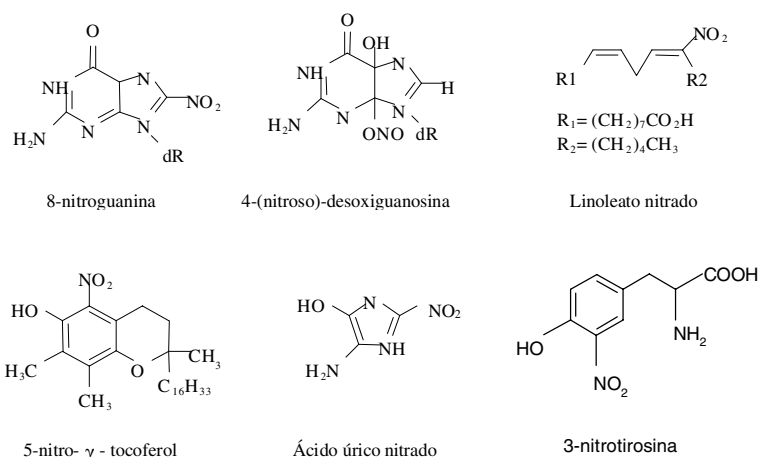
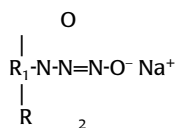


Figura 4. El ONOO⁻ modifica un gran número de moléculas de importancia biológica que incluyen bases de ADN como la guanina, lípidos de membrana tal como el linoleato, algunos aminoácidos como la tirosina y moléculas antioxidantes como el ácido úrico y el γ-tocoferol.

Tabla 3. Ejemplos de donadores de NO (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Tipo de compuesto	Ejemplos
Complejos nitrosilmetálicos	Nitroprusiato de sodio (NPS): Na ₂ Fe(CN) ₅ NO Nitrosilpentacloruro de rutenio (NPR): K ₂ Ru(Cl) ₅ NO
S-nitrosotioles R-S-N=O	Nitrosocisteína S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP)
Nitritos y nitratos orgánicos	Nitrito de amilo: (CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ -O-N=O Nitroglicerina (éster de glicerol trinitrato)
NONOatos Contienen el grupo funcional [N(O)NO] ⁻	Dietilenetriamina (DETA): R ₁ =R ₂ = H ₂ NCH ₂ CH ₂ Espermina: R ₁ = H ₂ N(CH ₂) ₃ NH ₂ ⁺ (CH ₂) ₄ R ₂ = H ₂ N(CH ₂) ₃ Propilamina propilamina (PAPA): R ₁ = CH ₃ CH ₂ CH ₂ R ₂ = H ₃ N ⁺ (CH ₂) ₃ Metilamina hexametileno metilamina (MAHMA): R ₁ = CH ₃ NH ₂ ⁺ (CH ₂) ₆ R ₂ =CH ₃



H o por su adición a las dobles ligaduras. Además el NO tiene un papel dual al actuar como prooxidante cuando reacciona con O₂⁻ para producir ONO⁻ y también como antioxidante al reaccionar directamente con radicales ROO formados durante la lipoperoxidación. De esta manera actúa como un terminador en la cadena de propagación de radicales lipídicos, como se ilustra en las reacciones (Eberhardt, 2001; Zmijewski *et al.*, 2005) (figura 5).

Bajo condiciones aeróbicas, el NO reacciona rápidamente con O₂ para formar el NO₂ y éste puede reaccionar con linoleato o metilésteres para producir derivados nitro y nitrito alílicos (Gallon, 1993). Las reacciones de la figura 6 ilustran la formación del linoleato nitrado, como mecanismo alterno

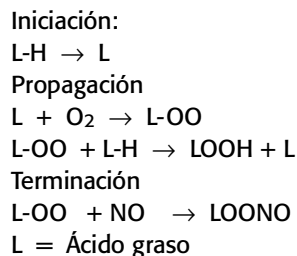
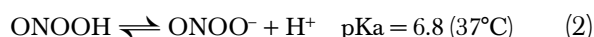


Figura 5. Papel del NO como antioxidante.

de terminación de la lipoperoxidación (O'Donnell *et al.*, 1999).

C. Reacciones con grupos tiol y algunas proteínas

Los RSH son blancos frecuentes del ataque de los RL y cabe mencionar que dichos grupos se encuentran en el sitio activo de muchas enzimas. La reacción del ONOO⁻ con los RSH, sigue el siguiente equilibrio (Eberhardt, 2001) dando como resultado la reacción (3):



Como el estado de disociación de las especies reactivas (RSH y ONOOH) está en función del pH; bajo condiciones fisiológicas se encuentran de la siguiente forma:



La reacción es seguida de la adición del anión tiólo (RS⁻) a la molécula de ácido sulfénico (RSOH), dando como producto final la cisteína y al mismo tiempo la producción del anión hidroxilo (Trujillo y Radi, 2002):



Algunas proteínas modifican su función en forma reversible debido a la S-nitrosilación en los RSH por ejemplo:

- El canal bloqueador de nucleótidos cíclicos en el residuo de cisteína 460 (Broillet, 2000).
- La cisteínproteasa 32 en el residuo de cisteína 163 (Dimmeler *et al.*, 1997).
- La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa probablemente en el residuo de cisteína 149 ya que es un residuo involucrado en el sitio activo de la enzima (Molina y Vedia *et al.*, 1993).

También se ha informado que las ERN como el ONOO⁻ pueden inactivar a enzimas como la tirosina hidroxilasa, la prostaciclina sintasa (Virag *et al.*, 2003) y la SOD (Alvarez y Radi, 2003).

D. Reacciones con aminoácidos

Algunas ERN como el ONOO⁻, el NO₂ y el NO₂Cl son capaces de inducir modificaciones sobre aminoácidos como la tirosina formando 3-nitrotirosina (Radi, 2004). En estudios realizados para conocer la reacción de los 20 aminoácidos que componen las proteínas, se ha encontrado que el ONOO⁻ reac-

- and Radi, R., Cytochrome c nitration by peroxy-nitrite, *J. Biol. Chem.*, **275**(28), 21409-21415, 2000.
- Dedon, P. and Tannenbaum, S., Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**(1), 12-22, 2004.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. and Zeiher, A.M., Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases, *J. Exp. Med.*, **185**(4), 601-607, 1997.
- Domenico, R., Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies, *Curr. Pharm. Des.*, **10**(14), 1667-1676, 2004.
- Dubuisson, M., Vander, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W., Rees, J. and Knoops, B., Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase, *FEBS Lett.*, **571**(1-3), 161-165, 2004.
- Eberhardt, M. K., *Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences*, CRC Press, Florida, USA, 2001.
- Evans, P. and Halliwell, B., Micronutrients: oxidant/antioxidant status, *Br. J. Nutr.*, **85**(Suppl 2), S67-S74, 2001.
- Floriano-Sánchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O., Rocha, D., Cárdenas-Rodríguez, N. and 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.*, **40**(5), 523-533, 2006.
- Furchgott R. F. and Zawadzki, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, **288** (5789), 373-376, 1980.
- Gallon, A. A. and Pryor, W. A., The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy, *Lipids*, **28**(2), 125-133, 1993.
- Gandley, R. E., Tyurin, V.A., Huang, W., Arroyo, A., Daftary, A., Harger, G., Jiang, J., Pitt, B., Taylor, R. N., Hubel, C. A. and Kagan, V. E., S-nitrosoalbumin-mediated relaxation is enhanced by ascorbate and copper: effects in pregnancy and preeclampsia plasma, *Hypertension*, **45**(1), 21-27, 2005.
- García-Santos, M. del P., González-Mancebo, S., Hernández-Benito, J., Calle, E. and Casado, J. Reactivity of amino acids in nitrosation reactions and its relation to the alkylating potential of their products, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(10), 2177-2182, 2002.
- Gaston, B. M., Carver, J., Doctor, A. and Palmer, L.A., S-nitrosylation signaling in cell biology, *Mol. Interv.*, **3**(5), 253-263, 2003.
- Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., Dalle-Donne, I. and Rossi, R., Nitric oxide, S-nitrosothiols and hemoglobin: is methodology the key?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**(6), 311-316, 2004.
- Goss, S., Hogg, N. and Kalyanaraman, B., The effect of alpha-tocopherol on the nitration of gamma-tocopherol by peroxynitrite, *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**(2), 333-340, 1999.
- Halliwell, B., What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?, *FEBS Lett.*, **411**(2-3), 157-160, 1997.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Nueva York, USA, 3rd edition, 1999.
- Hamad, A., Clayton, A., Islam, B. and Knox, A., Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **285**(5), L973-L983, 2003.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. and Byrns, R. E., Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 8103-8107, 1993.
- Keshive, M., Singh, S., Kinetics of S-nitrosation of thiols in nitric oxide solutions, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(6), 988-993, 1996.
- Klotz, L. O. and Sies, H., Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids, *Toxicol. Lett.*, 140-141, 125-132, 2003.
- Knowles, R. and Moncada, S., Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem. J.*, **298** (Pt 2), 249-258, 1994.
- Kuhn, D. M. and Geddes, T. J., Tetrahydrobiopterin prevents nitration of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite and nitrogen dioxide, *Mol. Pharmacol.*, **64**(4), 946-953, 2003.
- Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G. and Dikalov, S., Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric

- oxide synthase, *Biochem. Pharmacol.*, **70**(3), 343-354, 2005.
- Miranda, K., Espey, M., Jourdain, D., Grisham, M., Fukuto, J., Feelisch, M. and Wink, D., The chemical biology of nitric oxide, en Ignarro, J. (editor), *Nitric oxide: biology and pathobiology*, Academic Press, San Diego, California, USA, 2000, p. 41-47.
- Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brune, B., Di Silvio, M., Billiar, T. R. and Lapetina E. G., Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation, *J. Biol. Chem.*, **267**(35), 24929-24932, 1993.
- O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Chumley, P. H., Jablonsky, M. J., Krishna, N. R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M. and Freeman, B. A., Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion, *Chem. Res. Toxicol.*, **12**(1), 83-92, 1999.
- Olinescu, R., Smith, T. L., *Free Radicals in Medicine*, Nova Science Publishers Inc., Huntington, NY, USA, 2002.
- Radi, R., Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**(12), 4003-4008, 2004.
- Radi, R., Reactions of nitric oxide with metalloproteins, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(5), 828-835, 1996.
- Rauhala, P., Andoh, T. and Chiueh, C. C., Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207**(2 Suppl), 91-95, 2005.
- Richardson, G. and Benjamin, N., Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols, *Clin. Sci.*, **102**(1), 99-105, 2002.
- Sandmann, J., Schwedhelm, K. S. and Tsikas, D., Specific transport of S-nitrosocysteine in human red blood cells: Implications for formation of S-nitrosothiols and transport of NO bioactivity within the vasculature, *FEBS Lett.*, **579**(19), 4119-4124, 2005.
- Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L. O. and Briviba, K., Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations, *J. Biol. Chem.*, **272**(44), 27812-27817, 1997.
- Stamler, J., S-Nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis, *Circ. Res.*, **94**(4), 414-417, 2004.
- Stuehr, D., Wei, C., Santolini, J., Wang, Z., Aoyagi, M. and Getzoff, E., Radical reactions of nitric oxide synthases, *Biochem. Soc. Symp.*, **71**, 39-49, 2004.
- Stuehr, D., Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway, *J. Nutr.*, **134**(10 Suppl), 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S, 2004.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A. and Grisham M.B., Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**(3), R431-R44, 2004.
- Trujillo, M. and Radi, R., Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols, *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**(1), 91-98, 2002.
- Tsikas, D., Sandmann, J., Lueben, P., Savva, A., Rossa, S., Stichtenoth, D. O. and Frölich, J. C., S-Transnitrosylation of albumin in human plasma and blood in vitro and in vivo in the rat, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1546**(2), 422-434, 2001.
- Ueda, N., Mayeux, P. and Baliga, R., Oxidant Mechanisms in Acute Renal Failure, in Molitoris, B. and Finn, W. (editors), *Acute Renal Failure. A companion to Brenner & Rectors. The kidney*, W.B. Saunders Company, USA, 2001, p. 60-77.
- Vertuani, S., Angusti, A. and Manfredini, S., The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Curr. Pharm. De .*, **10**(14), 1677-1694, 2004.
- Virag, L., Szabo, E., Gergely, P. and Szabo, C., Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention, *Toxicol. Lett.*, **140-141**, 113-124, 2003.
- Zhou, J., Cai, D., Zhu, Y., Yang, J., Peng, C. and Yu, Y., A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis, *World J. Gastroenterol.*, **6**(4), 501-507, 2000.
- Zmijewski, J. W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D. A., Noguchi, N. and Darley-Usmar, V. M., Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium, *Biochem. Soc. Trans.*, **33** (6), 1385-1389, 2005.