



# NO, NO, NO. Óxido nítrico en la fisiología vascular

Samuel Olson <sup>1</sup>.  
Hermes J. Garbán <sup>2</sup>.  
Louis J. Ignarro <sup>3</sup>.

<sup>1</sup>MD, PhD

<sup>2</sup>MD, PhD hgarban@mednet.ucla.edu

<sup>3</sup>PHD

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

A mediados de la década de los ochenta el óxido nítrico fue identificado como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) implicando su importancia en el sistema cardiovascular y en casi todos los demás sistemas biológicos, motivo por el cual fue escogida como la molécula del año en 1992 por la revista Science y fue la razón por la que se le otorgara el premio Nobel en medicina y fisiología en 1998 a los investigadores responsables de tan importante descubrimiento (Ferid Murad, Robert Furchtgott y Louis Ignarro). En esta revisión uno de estos investigadores, el Dr. Louis Ignarro, comparte su experiencia en el descubrimiento y desarrollo de tan fascinante campo de investigación en la medicina molecular.

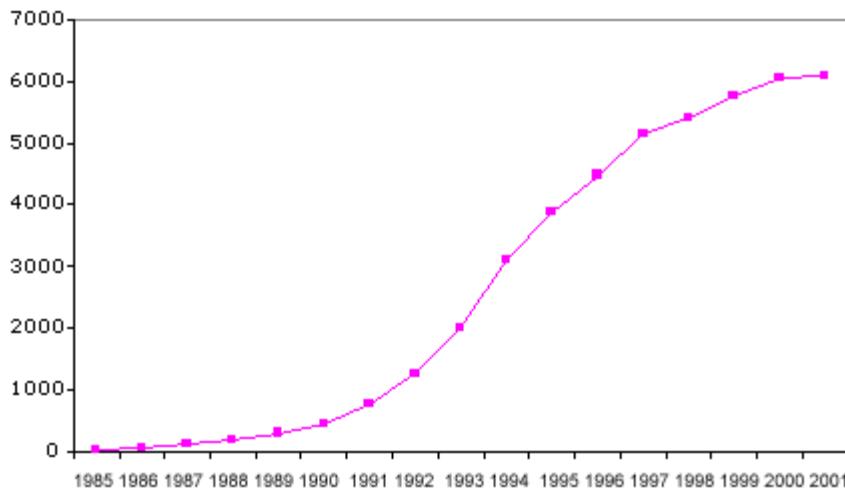
**PALABRAS CLAVE:** Oxido Nítrico, EDRF, óxido nítrico sintetasa, vasorelajación, medicina molecular, biología vascular.

## INTRODUCCIÓN

Lo simple y ubicuo del óxido nítrico (CAS 10102-43-9) (escrito NOo o simplemente NO) en sistemas biológicos, lo hace una de las moléculas mas atractivas dentro de la amplia gama de

sus funciones. El NO es considerado un gas de fácil difusión con características de radical libre (electrón no apareado), producido en forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, a través de una compleja reacción, catalizada por el enzima óxido nítrico sintetasa (NOS EC 1.14.13.39.). El NO participa en una variedad de importantes funciones biológicas incluyendo neurotransmisión, vasodilatación, immunotoxicidad y transducción de señales.

La explosión de investigación relacionada al papel del NO en sistemas biológicos ha sido exponencial, como lo refleja el número creciente de publicaciones por año en las que se involucra NO (Fig. 1). Es casi imposible encontrar un área dentro de la investigación biomédica donde no exista la participación del NO.



**Figura 1: Oxido Nítrico en la Literatura biomédica**  
Representación gráfica del número de citaciones por año en PubMed donde se menciona NO

La primera observación del papel biológico del NO fue en macrófagos y neutrófilos de roedores. La exposición *in vitro* de estas células a lipopolisacárido endotóxico, indujo la producción en cantidades significantes de nitrito y nitrato, que se acumularon en el medio de cultivo. Además, la inyección *in vivo* de endotoxina elevó la producción de nitrito y nitrato (los dos productos de oxidación del óxido nítrico) en orina. La producción de óxido nítrico fue asociada originalmente a la oxidación del grupo guanidino del L-arginina.



Portada de la revista Science  
NO Molecule of the Year  
Diciembre de 1992

La segunda observación fue hecha por el Dr. Furchtgott y el Dr. Zawadzki en 1980 usando preparaciones de musculatura lisa vascular. Ellos descubrieron que luego de la estimulación con acetilcolina o carbacol, el endotelio vascular producía un factor vasodilatante con una muy corta vida media el cual, a diferencia de las prostaciclinas derivadas del endotelio, no era bloqueado por inhibidores del ciclooxygenasa. Ellos llamaron este vasodilatador "Factor Relajante Derivado del Endotelio" (EDRF) ya que promovía la relajación de preparaciones de musculatura lisa pre-contraídas farmacológicamente. En 1987, comparando las propiedades farmacológicas y bioquímicas de este factor, tres grupos independientes reportaron que el óxido nítrico y el EDRF eran la misma molécula. Estudios posteriores demostraron que el NO era generado por muchos otros tipos

de células y que se podía encontrar en casi todo tipo de tejido.

A pesar de lo reciente de la investigación sobre la molécula en cuestión en sistemas biológicos, la primera síntesis de NO fue reportada por Joseph Priestly (el descubridor del oxígeno) en 1790. Es sintetizado en sistemas biológicos por una familia de enzimas que son llamadas óxido nítrico sintetasas (NOS). Se han identificado tres tipos de NOS (Tabla 1). Estas tres isoformas son hemo-flavoproteínas, que utilizan L-arginina como substrato y, requieren NADPH, dinucleotido de flavina-adenina (FAD) y tetrahidrobiopterrina (3HB) como co-factores. La actividad de estas enzimas es controlada mayormente al ser fosforiladas. Por ejemplo, fosforilación reduce significativamente la actividad de NOS I, mientras que incrementa la actividad de NOS III. En el caso de NOS II, es estrechamente regulada a nivel de expresión por varios factores transcripcionales.

Propiedad	NOS I	NOS II	NOS III
<b>Nombre</b>	bNOS, cNOS, nNOS	iNOS, mNOS	eNOS
<b>Tejido preferencial donde se expresa</b>	Neuronal, epitelial.	Macrófagos, Músculatura lisa, etc.	Endotelio
<b>Expresión</b>	Constitutiva	Inducible	Constitutiva/variable
<b>Requerimientos de Ca<sup>+</sup></b>	Si	No	Si
<b>Cromosoma</b>	12	17	7
<b>Tamaño</b>	150-160 kDa	125-135 kDa	133 kDa

Tabla 1 Propiedades de las tres isoformas de Óxido Nítrico Sintasa (NOS)

### Agradecimientos

Muchos individuos han sido responsables por mi desarrollo como científico y a ellos les estoy agradecido. Mis mentores Fred Shideman y Elwood Titus me enseñaron el significado de conceptos como el abordaje experimental, el establecimiento y comprobación de la hipótesis, la evaluación crítica de los experimentos que funcionan y también de los que no funcionan como uno espera, y la importancia de pensar. En mi primer trabajo después de mi entrenamiento post-doctoral, Barbara Petrack me enseñó el significado del respeto y el trabajo duro en la ciencia. En mi carrera académica temprana, mis colegas Bill George y Phil Kadowitz, me brindaron mucho aliento y motivación. Jim Fisher me motivó consistentemente, con su ejemplo, a convertirme en un profesor efectivo, tanto de estudiantes de medicina como de estudiantes graduados. Quizás, le debo la mayor de mis gratitudes a Gautam Chaudhuri, quien me brindo el mayor aliento y motivación para continuar con mi trabajo y llevarlo a un nivel más alto. Todos mis estudiantes graduados, post-doctorantes y científicos visitantes, han hecho contribuciones substanciales. Entre estos individuos están: John Adams, Ernesto Aeberhard, Nicole Arabolos, William Aronson, Bryan Ballot, Barbara Barry, Georgette Buga, Theresa Burke, Peggy Bush, Russell Byrns, Stella Cech, Gordon Cohen, Ronald Day, Jonathan Degnan, James Edwards, Richard Fitch, Hermes Garbán, Michele Gold, Jeanette

Griscavage, Rosemarie Gross, Carl Gruetter, Darlene Gruetter, Richard Harbison, Toshio Hayashi, Adrian Hobbs, Philip Horwitz, Aarón Jacobs, Howard Lipton, Dennis McNamara, B. Theo Mellion, Steve Napoli, Eliot Ohlstein, Richard Paddock, Waldemar Radziszewski, Norma Rogers, Robert Smith, Hugo Vargas, Liu Hua Wei, Michael Wolin y Keith Wood.

Las colaboraciones con otros miembros de la Facultad y de otros lugares, han sido instrumentales en nuestros logros. Roles particularmente notables fueron los de William Baricos, Gerald Buckberg, Steven Cederbaum, Gautam Chaudhuri, Jon Fukuto, William George, Scott Henderson, Albert Hyman, Philip Kadowitz, Jack Lancaster, Jean Merrill, William Pearce, Jacob Rajfer, Michael Sherman, Dennis Stuehr y Sherwin Wilk.

## NO.BEL

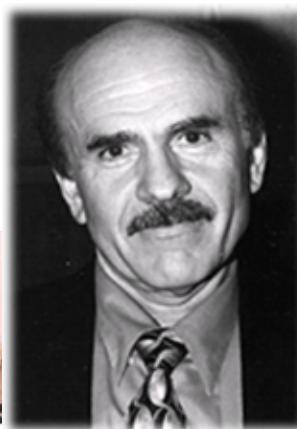
La etapa temprana de mi carrera de investigación, mientras era estudiante graduado, estuve enfocada en tratar de desarrollar un mejor entendimiento de los mecanismos las catecolaminas durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso simpático. En ese tiempo no existía tal cosa como el GMP cíclico. Y el óxido nítrico no era considerado mas que un agente contaminante en la atmósfera a nuestro alrededor. Aunque mi investigación aun no involucraba el uso de AMP cíclico, continué leyendo la literatura sobre este metabolito y presencie el descubrimiento del GMP cíclico. Entonces decidí determinar si el AMP cíclico y el GMP cíclico tenían algún papel en la modulación del proceso inflamatorio. Claramente, en ese tiempo, se desarrollaba una tendencia conceptual en la que el AMP cíclico y el GMP cíclico mediaban procesos opuestos en la función celular.



Dr. Ferid Murad



Video de NO

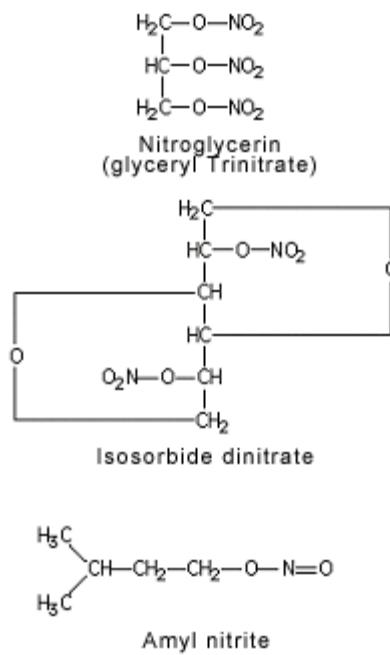


Dr. Louis Ignarro

Recuerdo que mientras realizábamos nuestros estudios sobre el AMP cíclico y el GMP cíclico, leí dos publicaciones interesantes sobre el GMP cíclico que fueron escritas por Ferid Murad y colegas (Arnold et al., 1977; Katsuki et al., 1977). Estos estudios revelaron que el óxido nítrico y los compuestos nitrogenados capaces de liberar óxido nítrico, todos activaban a la guanilato ciclase citosólica. La nitroglicerina fue uno de los compuestos estudiados. El óxido nítrico y los compuestos nitrogenados también estimularon la producción de GMP cíclico en tejidos aislados in vitro (Murad et al., 1978). Estas observaciones sugerían que la nitroglicerina podría activar la guanilato ciclase y estimular la formación de GMP cíclico mediante mecanismos que involucran al óxido nítrico. Estudios adicionales revelaron que el óxido nítrico podría estar

involucrado en los efectos relajantes de la nitroglicerina y otros compuestos nitrogenados sobre el músculo liso no vascular (Katsuki and Murad, 1977). Estos resultados me llevaron a realizar algunos experimentos para aclarar si la nitroglicerina y sus parientes químicos, el nitrato orgánico y los esteres de nitrito en realidad eran capaces de liberar el gas, óxido nítrico, en una solución acuosa. Después de observar que una serie de compuestos nitrogenados que eran conocidos relajantes del músculo liso generaban óxido nítrico, pensamos que el óxido nítrico también podrían ser responsables del efecto vasodilatador atribuible a la nitroglicerina y que el GMP cíclico podría ser el segundo mensajero intracelular que media este efecto del óxido nítrico. Al mismo tiempo, se condujeron una serie de experimentos para probar la hipótesis propuesta por Ferid Murad que la nitroglicerina, el nitroprusiato de sodio y los compuestos nitrogenados causan la relajación del músculo liso, mediante la liberación de óxido nítrico, el cual actúa estimulando la producción de GMP cíclico.

## MECANISMO DE LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR NITROGLICERINA Y OTROS COMPUESTOS NITROGENADOS



El más importante de los experimentos que se condujo para comprobar que el óxido nítrico es responsable por la acción vasodilatadora de la nitroglicerina, fue el que determinó que esta molécula es causa de la relajación del músculo liso vascular. En 1979, (Gruetter et al., 1979) reportamos que el gas, óxido nítrico, es un potente relajante de la arteria coronaria bovina y activa la guanilato ciclase aislada en este tejido. Estas observaciones confirmaron lo que Ferid Murad había encontrado y extendió como hipótesis al incluir al músculo liso vascular. Por ende, el nitroprusiato de sodio, la nitroglicerina y los compuestos nitrogenados, relacionados, mediante la liberación de óxido nítrico, que entonces estimula la formación de GMP cíclico, resulta en la relajación del músculo liso vascular.

La hipótesis que plantea que el GMP cíclico está involucrado en la relajación del músculo liso fue recibida con algo de descepticismo a finales de los setentas, porque prevalecía la creencia de que el GMP cíclico y el AMP cíclico eran mediadores

de acciones biológicas opuestas. Se sabía que el AMP cíclico mediaba los efectos relajantes de ciertas catecolaminas y prostaglandinas sobre el músculo liso. Sin embargo, el trabajo que se llevó a cabo en varios laboratorios, incluyendo el de Ferid Murad y el mío, indicaba que el GMP cíclico y el AMP cíclico podían mediar acciones biológicas comunes en el músculo liso como la relajación.

El próximo paso para elucidar el mecanismo de acción específico de la nitroglicerina, era aclarar como el óxido nítrico era liberado de la molécula precursora en el tejido muscular liso. La liberación espontánea de óxido nítrico desde compuestos nitrogenados, tales como el nitroprusiato de sodio, ya había sido estudiada y entendida. Pero la nitroglicerina y otros nitratos orgánicos y esteres de nitrito, son compuestos químicamente estables, que

Figura 3: Compuestos generadores de NO de uso clínico

necesitarían ser sometidos a reacciones químicas y enzimáticas para liberar óxido nítrico. En experimentos iniciales encontramos que tioles, tales como el ditiotreitol (DTT), aumentaron la activación de la guanilato ciclase por el nitroprusiato de sodio y compuestos nitrosilados, sin afectar la activación enzimática por óxido nítrico en si (Ignarro et al., 1980a; Ignarro et al., 1980b; Ohlstein et al., 1979). El mecanismo de esta modulación positiva se le atribuyó a una reacción entre el tiol y el compuesto nitrogenado para formar un S-nitrosotiol, el cual se descompone con la descarga de óxido nítrico. Una serie de S-nitrosotioles se sintetizaron y se encontró que eran agentes donadores lábiles de óxido nítrico.

## IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR RELAJANTE DERIVADO DE ENDOTELIO (EDRF) COMO ÓXIDO NÍTRICO



**Dr. Robert Furchtgott**

La mayoría de la investigación, que hemos discutido, se llevo acabo antes o poco tiempo después del descubrimiento de la vasodilatación endotelio dependiente por Robert Furchtgott en 1980 (Furchtgott and Zawadzki, 1980). El conocimiento de que la nitroglicerina era un vaso relajante tan potente y los hallazgos más recientes que demuestran que el óxido nítrico era un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, nos llevó a preguntarnos por qué los mamíferos tienen receptores para compuestos farmacológicos tan potentes. Esta idea sugería que quizás los mamíferos poseen un compuesto nitrogenado endógeno que libera óxido nítrico o poseen óxido nítrico. Los primeros estudios sobre el factor relajante derivado de endotelio (EDRF) se condujeron sin ningún conocimiento de su estructura química. Nosotros empezamos a estudiar la vasodilatación dependiente de endotelio, porque queríamos determinar si el GMP cíclico estaba involucrado y, no porque pensábamos que el EDRF podría ser óxido nítrico. De hecho, se estaba llevando a cabo un proyecto separado para encontrar óxido nítrico endógeno. Justamente, mientras completábamos nuestros experimentos sobre el EDRF y el GMP cíclico, el grupo de Ferid Murad publicaba un artículo en el que se mostraba que la vasodilatación endotelio dependiente por acetilcolina y otros agentes estaba asociada con la producción de GMP cíclico en el músculo liso vascular (Rapoport and Murad, 1983). Nosotros encontramos resultados similares y también encontramos que el azul de metileno, un inhibidor de la actividad de la guanilato ciclase, prevenía tanto el efecto de acumulación de GMP cíclico como el efecto vasodilatador de la acetilcolina (Ignarro et al., 1984). Al principio entretuvimos la idea de que la acetilcolina podría estar estimulando la formación de un metabolito de ácido araquidónico, el cual de alguna manera activaba la guanilato ciclase para elevar los niveles de GMP cíclico. Esta posición fue apoyada por estudios de éste y otros laboratorios, que mostraban que agentes que interfieren con la formación de ácido araquidónico y ciertos metabolitos del ácido araquidónico, también interfieren con la vasodilatación mediada por acetilcolina (Furchtgott et al., 1981; Ignarro et al., 1984; Rapoport and Murad, 1983). Pero yo no estaba satisfecho con esta idea, porque los experimentos en mi laboratorio no demostraban que la guanilato ciclase era activada por ninguna otra cosa que no fuera óxido nítrico. Después de revisar nuestros datos de nuevo, de repente nos dimos cuenta de que nuestro hallazgo, al demostrar que el azul de metileno prevenía tanto el aumento del GMP cíclico como la

vasodilatación en respuesta a la acetilcolina, era similar a nuestro anterior descubrimiento sobre la prevención de la formación de GMP cíclico y de la vaso relajación en respuesta al óxido nítrico (Gruetter et al., 1981). Esto indicaba que la acción vasodilatadora de la acetilcolina era farmacológicamente similar a la del óxido nítrico. Sin embargo, tuvimos cuidado en no sugerir en el texto que el EDRF podría ser óxido nítrico. Luego, una vez que otros laboratorios demostraron que el EDRF era una molécula muy inestable (Gryglewski et al., 1986; Rubanyi and Vanhoutte, 1986), nos dimos cuenta de que los datos de varios laboratorios eran consistentes con nuestra opinión de que el EDRF y el óxido nítrico eran bastante similares. Los dos proyectos distintos en mi laboratorio, uno enfocado en EDRF/GMP cíclico y el otro enfocado en el óxido nítrico endógeno, eran convergentes pero todavía no estaban listos para proponer que el EDRF era óxido nítrico.

Una serie de experimentos fue diseñada para probar nuestra hipótesis - aun sin publicar- de que el EDRF podría ser óxido nítrico. El primer experimento era determinar si el EDRF, liberado de arterias y venas, podía activar la guanilato ciclase y así explicar los niveles elevados de GMP cíclico en tejido, en respuesta a la acetilcolina o la bradikinina. Este estudio se publicó en 1986 (Ignarro et al., 1986b). Anillos arteriales y venosos se aislaron de vasos intrapulmonares bovinos y fueron incubados en mezclas de reacción, que contenían guanilato ciclase citosólica purificada de pulmón bovino. La adición de acetilcolina a las mezclas de reacción que contenían los anillos arteriales, resultó en la activación de la guanilato ciclase, y la bradikinina causó el mismo efecto en las mezclas de reacción, indistintamente de que tipo de anillos contenía. La activación de la guanilato ciclase por la acetilcolina y la bradikinina, era dependiente de la presencia de un endotelio intacto en los anillos arteriales y lo anillos venosos, y la respuesta era bloqueada por azul de metileno y aumentada por antioxidantes. Estos experimentos revelaron que el EDRF de arterias y venas, activa a la guanilato ciclase, mediante mecanismos que pueden ser inhibidos por azul de metileno y optimizados por antioxidantes. Claramente, los datos apuntaban hacia la posibilidad de que el EDRF es óxido nítrico o alguna sustancia relacionada químicamente, como un compuesto nitrogenado labil. El próximo experimento fue para determinar si la activación de la guanilato ciclase por EDRF era hemo-dependiente, al igual que la activación enzimática por óxido nítrico. Experimentos similares a los descritos anteriormente, se repitieron utilizando guanilato ciclase, que había sido purificada en su forma hemo-deficiente y en la forma de la enzima que contiene hemo. Como lo esperábamos, la activación de la guanilato ciclase por EDRF, al igual que la activación de la enzima por óxido nítrico, era hemo-dependiente. Al finalizar el primero de esta serie de experimentos, sabíamos que lo teníamos. EDRF tenía que ser óxido nítrico. Pero yo quería conducir experimentos más definitivo, antes de irme al extremo de declarar que el EDRF es óxido nítrico. Un aparato de bioensayo en cascada fue ensamblado para estudiar las propiedades químicas y farmacológicas del EDRF liberado por arteria y vena, así como para comparar éstas con las propiedades del óxido nítrico. Estos experimentos revelaron una gran similitud entre el EDRF y el óxido nítrico, y se presentaron en varias conferencias en 1986 y a principios de 1987 (Ignarro, 1986; Ignarro et al., 1987a; Ignarro et al., 1986a) antes de su publicación en 1987 (Ignarro et al., 1987a; Ignarro et al., 1987b).



Hubo un experimento en particular que me convenció, sin lugar a dudas, de que el EDRF



**Figura 5: Aparato de bioensayo en cascada acoplado a un sistema de adquisición de datos computarizado**

era óxido nítrico. Nos aprovechamos de un experimento que se había realizado previamente en mi laboratorio sobre la guanilato ciclase, en el cual demostramos que ésta era una hemo-proteína, como la hemoglobina, que reaccionaba con el óxido nítrico para formar nitrosil-hemo, lo cual se hizo evidente mediante el monitoreo del cambio de espectro de absorción de la región Soret (Ignarro et al., 1982). Este análisis químico clásico provee pruebas de la presencia del

hierro del hemo, y estableció a la guanilato ciclase como una hemoproteína. Este hallazgo es impresionantemente similar a la producción de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), a partir de arginina observada en macrófagos activados por citoquinas (Hibbs et al., 1987a; Hibbs et al., 1987b; Iyengar et al., 1987; Palmer et al., 1988). De hecho, estos estudios revelaron que el análogo estructural de la arginina, la NG-metilarginina, inhibe la formación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , a partir de arginina en las células endoteliales. La confirmación de estas observaciones originales y la demostración inequívoca de la presencia de una enzima que cataliza la conversión de arginina a óxido nítrico y citrulina fue lograda por Bredt y Snyder (Bredt and Snyder, 1990). A la enzima se le llamó óxido nítrico sintasa y, este estudio originó una avalancha de investigación, que llevó a la caracterización de las isoformas de la enzima, su purificación, la descripción del mecanismo catalítico y la caracterización estructura-función de la óxido nítrico sintasa (Bredt and Snyder, 1994; Crane et al., 1997; Feron et al., 1998; Forstermann et al., 1994; Garcia-Cardena et al., 1997; Griffith and Stuehr, 1995; Presta et al., 1998; Salerno et al., 1996; Stuehr and Griffith, 1992).

Durante este período de tiempo, también se estaba logrando un increíble progreso en el estudio de las propiedades fisiológicas y pato-fisiológicas del óxido nítrico endógeno. Las células endoteliales vasculares sintetizan óxido nítrico sintasa continuamente para causar vasodilatación y limitar cualquier incremento en la presión sanguínea sistémica (Aisaka et al., 1989; Rees et al., 1989). Esta conclusión fue el fruto de experimentos, en los cuales la NG-metilarginina, un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa, causó un aumento sostenido de la presión sanguínea sistémica en animales, luego de una inyección intravenosa. La respuesta hipertensiva fue completamente revertida por una inyección intravenosa de exceso de L-arginina, el sustrato para la óxido nítrico sintasa. La generación continua de óxido nítrico, derivado de endotelio, parece ser una consecuencia del flujo sanguíneo continuo o del estrés del flujo o fricción (Holtz et al., 1983), y puede disparar la activación de óxido nítrico sintasa endotelial calcio dependiente (Buga et al., 1991). El óxido nítrico, derivado de endotelio, también funciona para inhibir la agregación y la adhesión plaquetaria (Moncada et al., 1991), y para frenar o prevenir la proliferación del músculo liso vascular subyacente (Buga et al., 1998). Se continua investigando el papel protector del óxido nítrico en la lesión de reperfusión o reoxigenación, estenosis y ateroesclerosis. Los efectos protectores del óxido nítrico, quizás, se ramifican de su capacidad para mejorar el flujo sanguíneo local, inhibir la trombosis o adhesión celular, interferir con la proliferación celular, inhibir enzimas claves involucradas en mediar la modificación o destrucción celular.

## ÓXIDO NÍTRICO Y SU FUNCIÓN COMO NEUROTRANSMISOR RELACIONADO A LA RESPUESTA VASCULAR

La función del óxido nítrico como neurotransmisor, fue primero comprobada en el cerebro (Garthwaite and Garthwaite, 1987). Estas observaciones partieron de que el glutamato y el óxido nítrico estimulan la formación de GMP cíclico en el cerebro, y que la arginina también eleva los niveles de óxido nítrico, bajo ciertas condiciones. La función del óxido nítrico como neurotransmisor en el sistema nervioso central se mantiene desconocida, pero una posible hipótesis ha sido que el óxido nítrico modula la potenciación a largo plazo en el control del aprendizaje y la memoria (Moncada et al., 1991). El lado negativo del óxido nítrico es que su producción excesiva en el cerebro, estimulada por glutamato, puede causar serias lesiones en el tejido en regiones especializadas de dicha parte del cuerpo (Garthwaite and Garthwaite, 1987). Más aún, la producción excesiva de óxido nítrico, en proximidad a oligodendrocitos, puede causar la inhibición de la formación de mielina y quizás esclerosis múltiple (Merrill et al., 1993). Se ha recogido evidencia de que el óxido nítrico es un importante transmisor de neuronas no adrenérgicas - no colinérgicas (NANC), las cuales inervan el músculo liso en varios tejidos, tales como vías aéreas, tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario (Moncada et al., 1991).

Exploramos la posibilidad de que el óxido nítrico puede ser el neurotransmisor principal en la mediación de la erección del pene. La razón para llevar a cabo este proyecto era que antes de 1990 el mecanismo fisiológico, mediante el cual la estimulación nerviosa promueve la estimulación eréctil, era desconocido. Lo que se creía, era que la excitación del sistema nervioso parasimpático causaba respuestas eréctiles mediadas por acetilcolina. La respuesta eréctil consiste en una relajación, mediada por neuronas del músculo liso vascular y no vascular, asociada con la disposición cavernosa, trabecular o sinusoidal de las arteriolas del cuerpo cavernoso. El problema que presenta esta hipótesis, para farmacólogos y fisiólogos, es que el neurotransmisor colinérgico, acetilcolina, no puede relajar músculo liso no vascular, y relaja el músculo liso vascular, sólo por mecanismos endotelio dependientes. Se veía como poco probable que la acetilcolina, un compuesto de amonio cuaternario - altamente cargado-, podría alcanzar las células endoteliales vasculares, desde las uniones sinápticas en las células musculares lisas. Sin embargo, se esperaría que la excitación de cualquier nervio NANC, que contenga óxido nítrico e inerva el músculo liso vascular y no vascular del cuerpo cavernoso, promueva la extensa relajación del músculo liso y la consiguiente erección del pene. En el tiempo en el cual conducíamos nuestro primer experimento, no se sabía si el tejido eréctil en mamíferos era o no inervado por nervios NANC, y no estábamos equipados para conducir tales experimentos histoquímicos. Entonces, utilizamos el clásico experimento de baño de tejido -bioensayo-, en el cual tiras de cuerpo cavernoso aislado de penes de conejos y humanos, se montaron en cámaras de baño, fueron precontraídas, y después estimuladas eléctricamente para causar la relajación del músculo liso.



Nuestro primer experimento reveló que la estimulación de tiras aisladas de cuerpo cavernoso de conejo por neuronas NANC, resultó en la relajación del músculo liso, la cual a su

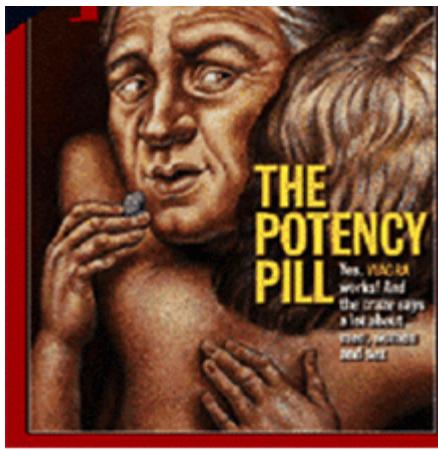


Figura 7: Portada de la revista TIMES aludiendo al uso de Viagra

vez era bloqueada por inhibidores del óxido nítrico sintasa, la hemoglobina y el azul de metileno (Ignarro et al., 1990). El óxido nítrico, en forma de S-nitrosotioles, también causó la relajación del músculo liso, y la estimulación eléctrica del tejido resultó en niveles elevados, tanto de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como de GMP cíclico (Ignarro et al., 1990). La conclusión era obvia. El óxido nítrico es el neurotransmisor en los nervios NANC, que inervan al cuerpo cavernoso y, la estimulación nerviosa resulta en la mediación por óxido nítrico de la relajación del músculo liso vascular y no vascular. La acción del neurotransmisor óxido nítrico, es a su vez, mediada por el

GMP cíclico. Así vemos que la vía de transducción de señal que involucra al óxido nítrico como neurotransmisor parece ser la misma que la del óxido nítrico derivado de endotelio. Experimentos adicionales con cuerpo cavernoso humano, produjeron datos virtualmente idénticos a los que produjeron los experimentos con tejido de conejo (Bush et al., 1992; Rajfer et al., 1992). Nos sorprendió la naturaleza altamente pasajera de estas respuestas y el hecho de que las mismas, inducidas eléctricamente, podían ser reproducidas con la adición de auténtico gas óxido nítrico. Quizás, el experimento más convincente que indicaba que la estimulación eléctrica dispara la función eréctil, mediante mecanismos que involucran al óxido nítrico, fue el encontrar que la NG-nitroarginina, un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa, abolió las respuestas al estímulo eléctrico, mientras que el exceso de sustrato de la enzima, L-arginina, lograba que el sistema se repusiera a el efecto inhibitorio de la NG-nitroarginina. Nuestros estudios tempranos también revelaron que la inhibición de la degradación de GMP cíclico, a través del uso de inhibidores de la fosfodiesterasa, causaron un aumento tanto de la relajación del músculo liso inducida eléctricamente, como por la inducida por el óxido nítrico (Bush et al., 1992; Ignarro et al., 1990; Rajfer et al., 1992). Estas observaciones indican claramente, que la relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso por excitación de nervios NANC o adición de óxido nítrico, es mediada por el GMP cíclico.

Estas observaciones esclarecen en gran manera los mecanismos fisiológicos de la erección del pene, ya que revela una crítica vía de transducción de señal, que podría ser modulada por drogas. Por ejemplo, drogas que interfieren con la formación o acción del óxido nítrico o el GMP cíclico, también podrían interferir con la respuesta eréctil, y podrían ser útiles para el tratamiento del priapismo. Pero mucho más importante que esto, sería el desarrollo de drogas que aumenten la formación o acción de óxido nítrico o GMP cíclico, podrían también aumentar la respuesta eréctil, y podrían ser efectivos en el tratamiento de la impotencia, el desorden médico de mayor prevalencia en hombres. En 1998, la droga sildenafil (Viagra ®) se mercadeó para el tratamiento efectivo de la impotencia. El sildenafil es un inhibidor relativamente selectivo de una de las isoformas de la fosfodiesterasa, que degrada al GMP cíclico y está presente en cantidades relativamente grandes en el cuerpo cavernoso. Por esto, el sildenafil permite que se acumule el GMP cíclico intracelular en el músculo liso del cuerpo cavernoso, siempre que exista una señal de óxido nítrico proveniente de nervios NANC. La erección peneana resulta de cualquier tipo de excitación de los nervios NANC, que inervan el cuerpo cavernoso, sea mental o física, podría ser aumentada por el sildenafil, pero no se puede esperar que la droga sola cause una respuesta eréctil en ausencia de excitación de

nervios NANC. El sildenafil parece ser efectivo en el tratamiento de varios tipos de impotencia en varios estadios de la enfermedad. Nuestros avances en el entendimiento de la fisiología de la función eréctil, permitirán que los científicos descifren la pato-fisiología y las causas de la impotencia, abriendo las puertas para el desarrollo de drogas más prometedoras para el tratamiento de la impotencia.

## FUTURAS DIRECCIONES PARA LA INVESTIGACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA BIOLOGÍA VASCULAR

El conocimiento de que el óxido nítrico, derivado de endotelio vascular y generado mediante la actividad neuronal, promueve la relajación del músculo liso vascular y no vascular, asociado con el sistema vascular, sin duda, le dará a científicos y clínicos la oportunidad para hacer grandes avances en el diagnóstico, tratamiento y prevención de desordenes cardiovasculares, que amenazan la vida, tales como la enfermedad de arteria coronaria, hipertensión esencial, embolismo, complicaciones vasculares de la diabetes y enfermedades relacionadas. De hecho, en el presente ya es aparente que el óxido nítrico juega muchos roles fisiológicos críticos en la regulación y protección de numerosas funciones de tejidos y órganos. Defectos o lesiones en la vía de óxido nítrico - GMP cíclico, pueden ser probablemente los causantes de mucha de la pato-fisiología observada en la enfermedad cardiovascular. El desarrollo de un mejor entendimiento de los mecanismos fisiológicos básicos que involucran la vía de óxido nítrico - GMP cíclico podría llevar al desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas para reducir la morbilidad y la mortalidad atribuidas a la enfermedad cardiovascular.

## REFERENCIAS

1. Aisaka, K., Gross, S. S., Griffith, O. W., and Levi, R. (1989). NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 160, 881-886.
2. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3203-3207.
3. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682-685.
4. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63, 175-195.
5. Buga, G. M., Gold, M. E., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1991). Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17, 187-193.
6. Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1998). NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Physiol* 275, R1256-1264.
7. Bush, P. A., Aronson, W. J., Buga, G. M., Rajfer, J., and Ignarro, L. J. (1992). Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 147, 1650-1655.

8. Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., and Tainer, J. A. (1997). The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278, 425-431.
9. Feron, O., Michel, J. B., Sase, K., and Michel, T. (1998). Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37, 193-200.
10. Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.
11. Furchtgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
12. Furchtgott, R. F., Zawadzki, J. V., and Cherry, P. D. (1981). *Vasodilatation* (New York, Raven Press).
13. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M. P., and Sessa, W. C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272, 25437-25440.
14. Garthwaite, J., and Garthwaite, G. (1987). Cellular origins of cyclic GMP responses to excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellum in vitro. *J Neurochem* 48, 29-39.
15. Griffith, O. W., and Stuehr, D. J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57, 707-736.
16. Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P. J., and Ignarro, L. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 5, 211-224.
17. Gruetter, C. A., Gruetter, D. Y., Lyon, J. E., Kadowitz, P. J., and Ignarro, L. J. (1981). Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 219, 181-186.
18. Gryglewski, R. J., Moncada, S., and Palmer, R. M. (1986). Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 87, 685-694.
19. Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R., and Vavrin, Z. (1987a). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473-476.
20. Hibbs, J. B., Jr., Vavrin, Z., and Taintor, R. R. (1987b). L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138, 550-565.
21. Holtz, J., Giesler, M., and Bassenge, E. (1983). Two dilatory mechanisms of anti-anginal drugs on epicardial coronary arteries in vivo: indirect, flow-dependent, endothelium-mediated dilation and direct smooth muscle relaxation. *Z Kardiol* 72 Suppl 3, 98-106.
22. Ignarro, L. J. (1986). Invited Talk Presented at the IV International Symposium on Mechanisms of vasodilatation. Paper presented at: IV International Symposium on Mechanisms of vasodilatation. (Rochester, Minnesota).

23. **Ignarro, L. J., Barry, B. K., Gruetter, D. Y., Edwards, J. C., Ohlstein, E. H., Gruetter, C. A., and Baricos, W. H.** (1980a). Guanylate cyclase activation of nitroprusside and nitrosoguanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 93-100.
24. **Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G.** (1987a). Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9265-9269.
25. **Ignarro, L. J., Burke, T. M., Wood, K. S., Wolin, M. S., and Kadowitz, P. J.** (1984). Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 228, 682-690.
26. **Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., Wood, K. S., Fukuto, J. M., and Rajfer, J.** (1990). Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 843-850.
27. **Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., and Wood, K. S.** (1987b). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61, 866-879.
28. **Ignarro, L. J., Byrns, R. E., and Wood, K. S.** (1986a). Pharmacological and Biochemical Properties of Endothelium-Derived Relaxant Factor Evidence That Endothelium-Derived Relaxant Factor Is Closely Related To Nitric Oxide Radical. American Heart Association Monograph, II-287.
29. **Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J., and Wolin, M. S.** (1982). Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718, 49-59.
30. **Ignarro, L. J., Edwards, J. C., Gruetter, D. Y., Barry, B. K., and Gruetter, C. A.** (1980b). Possible involvement of S-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compounds. *FEBS Lett* 110, 275-278.
31. **Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S., and Kadowitz, P. J.** (1986b). Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 237, 893-900.
32. **Iyengar, R., Stuehr, D. J., and Marletta, M. A.** (1987). Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6369-6373.
33. **Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., and Murad, F.** (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3, 23-35.
34. **Katsuki, S., and Murad, F.** (1977). Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 13, 330-341.
35. **Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J., and Lane, T. E.** (1993). Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151, 2132-2141.

36. **Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A.** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
37. **Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S., and Kimura, H.** (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9, 145-158.
38. **Ohlstein, E. H., Barry, B. K., Gruetter, D. Y., and Ignarro, L. J.** (1979). Methemoglobin blockade of coronary arterial soluble guanylate cyclase activation by nitroso compounds and its reversal with dithiothreitol. *FEBS Lett* 102, 316-320.
39. **Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S.** (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.
40. **Presta, A., Siddhanta, U., Wu, C., Sennequier, N., Huang, L., Abu-Soud, H. M., Erzurum, S., and Stuehr, D. J.** (1998). Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 37, 298-310.
41. **Rajfer, J., Aronson, W. J., Bush, P. A., Dorey, F. J., and Ignarro, L. J.** (1992). Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 326, 90-94.
42. **Rapoport, R. M., and Murad, F.** (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52, 352-357.
43. **Rees, D. D., Palmer, R. M., and Moncada, S.** (1989). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3375-3378.
44. **Rubanyi, G. M., and Vanhoutte, P. M.** (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250, H822-827.
45. **Salerno, J. C., McMillan, K., and Masters, B. S.** (1996). Binding of intermediate, product, and substrate analogs to neuronal nitric oxide synthase: ferriheme is sensitive to ligand-specific effects in the L-arginine binding site. *Biochemistry* 35, 11839-11845.
46. **Stuehr, D. J., and Griffith, O. W.** (1992). Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65, 287-346.

#### Sitios de interés

- <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1998/> (Premio Nobel en Medicina y Fisiología 1998)
- <http://www.medsch.ucla.edu/som/Nobel/default.htm> (Celebración del Premio Nobel en UCLA)
- <http://www.apnet.com/www/journal/no.htm> (Revista especializada en NO)
- <http://www.apnet.com/no/> (Página oficial sobre NO)
- <http://www.apnet.com/cgi-bin/netforum/no/a.cgi/1> (Foro de discusión sobre NO)
- <http://www.apnet.com/inscight/10121998/grapha.htm> (Publicaciones referente al NO)