

Rodrigo Marañón, Claudio Joo Turoni,
María Peral de Bruno, Leopoldo Raij

Palabras clave

Óxido nítrico, vasos, endotelio, hemodinamia renal, remodelamiento vascular, hipertensión.

Abreviaturas utilizadas

ADMA: dimetilarginina asimétrica
Ang II: Angiotensina II
BH4: tetrahidrobiopterina
CMLV: células musculares lisas
DE: disfunción endotelial
ECA: enzima convertidora de angiotensina
EDHF: factor hiperpolarizante dependiente de endotelio
FSR: flujo sanguíneo renal
GC: guanililciclase
GMPc: guanidina monofosfato cíclico
GTP: guanidina trifosfato
HR: hiperemia reactiva
NOSs: óxido nítrico sintasas
ON: óxido nítrico
PDE/s: fosfodiesterasa/s
ROS: especies reactivas de oxígeno
RTG: retroalimentación túbulo-glomerular
TGF: feedback túbulo-glomerular

Síntesis Inicial

El óxido nítrico vascular y renal está involucrado en la regulación de la presión arterial a través del control de tono vascular y la excreción de Na⁺ y agua. Se produce a través de tres isoformas de las óxido nítrico sintasas: eNOS (NOS 3), nNOS (NOS 1) e iNOS (NOS 2), estimula la guanilatociclase soluble con incremento en los niveles de GMPc y regula el Ca⁺⁺ intracelular.

La disfunción endotelial y el remodelamiento vascular son predictores independientes de riesgo cardiovascular. Además de su efecto vasodilatador, el óxido nítrico inhibe la síntesis de proteínas totales y colágeno y la migración/adhesión de macrófagos y de células musculares lisas. Tiene acción antiinflamatoria y antiaterogénica, inhibiendo la agregación plaquetaria y la activación del inhibidor tPA-1. El óxido nítrico participa en la hemodinamia renal a través de la autorregulación, de la natriuresis por presión y de la retroalimentación túbulo glomerular. Existen diferencias de sexo en la liberación y biodisponibilidad de óxido nítrico.

El NO es un gas de producción endógena y vida media corta (3-5 seg). Su difusión libre le permite interactuar de forma rápida con otros átomos, como nitrógeno o azufre, presentes en proteínas y también con átomos metálicos, como el hierro (Fe⁺⁺), que forma parte de la hemoglobina. Después de esta interacción se degrada a compuestos de desecho: nitritos y nitratos. El NO principalmente producido en las células endoteliales actúa como mensajero intra- y extracelular y

está involucrado en muchas respuestas fisiológicas, como la regulación de la presión arterial a través del control de tono vascular y la excreción renal de sodio (Na⁺) y agua. Una biodisponibilidad inadecuada de NO, ya sea por deficiencia en su producción por una disfunción endotelial o por destrucción a través del aumento del estrés oxidativo, está asociada a estados fisiopatológicos, como hipertensión arterial. El NO es un radical libre y su acción puede ser bloqueada por otros

radicales libres, tales como el anión superóxido y la hemoglobina, y puede ser protegida por barredores de radicales libres intrínsecos (scavengers), como la enzima superóxido dismutasa, e incluso por antioxidantes como la vitamina E.

ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS

En casi todos los tejidos el NO es producido por un grupo de enzimas oxidorreductasas llamadas NOSs. Las NOSs presentan dos dominios (oxidasa y reductasa). La terminal guanidina-nitrógeno de la L-arginina se une al dominio reductasa y produce NO y L-citrulina. La actividad de cada uno depende del estado de acoplamiento; cuando la NOS está acoplada, la reacción se direcciona hacia la producción de NO y cuando está desacoplada, hacia la producción de radicales libres o ROS.

Isoformas de las NOSs

En el hombre se han caracterizado, clonado y secuenciado tres NOSs diferentes: la forma endotelial (eNOS, NOS 3) en el cromosoma 7, la neuronal (nNOS, NOS 1) en el cromosoma 12 y la inducible (iNOS, NOS 2) en el 17. Tienen aproximadamente 50% de homología entre sí y con otras enzimas del citocromo p450.

Distribución renal y vascular

La nNOS es constitutiva y, aunque está expresada principalmente en tejido neuronal, en los vasos está en la capa adventicia. También ha sido descrita en CVML vasculares.^{1,2} En el tejido renal, la nNOS es expresada de forma abundante en las células de la mácula densa, cápsula de Bowman y en los conductos colectores de la médula interna y, en menor cantidad, en arteriolas aferentes y rama ascendente gruesa. La expresión de iNOS es inducida en casi todos los tejidos en respuesta a citocinas, endotoxinas y estímulos proinflamatorios. En macrófagos y fagocitos desencadena reacciones inmunológicas. En el riñón, la iNOS es expresada en CMLV, células mesangiales, de la médula intersticial y del epitelio tubular. La eNOS, además de expresarse en el endotelio vascular, en el riñón también está en células epiteliales tubulares del conducto colector y rama ascendente gruesa de Henle.

Regulación de las NOSs

Características generales

La nNOS y eNOS, al ser expresadas constitutivamente, generan NO de forma permanente y para su actividad dependen de la calmodulina. Esta enzima es activada en respuesta a un incremento de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, de la disponibilidad del sustrato y de diferentes cofactores, como el BH₄. La iNOS es Ca^{2+} independiente, se expresa ante situaciones de inflamación y libera NO de forma brusca. La actividad global de las NOSs puede ser

modulada por numerosos factores físicos y hormonales, incluyendo la biodisponibilidad de los cofactores, la interacción proteína-proteína y su estado de fosforilación.

Regulación de la eNOS Vascular

Acilación

La eNOS sufre reacciones de acilación en proteínas periféricas de la membrana celular, lo que altera su actividad y localización dentro de la célula. La N-meristoilación de la eNOS dirige a la enzima al aparato de Golgi, donde sufre la palmitoilación de la cisteína. La eNOS miristoilada y palmitoilada es entonces dirigida a la caveola en el endotelio y a otros tipos celulares, que contienen estructuras vesiculares en la membrana celular enriquecidas con colesterol y esfingolípidos. La caveolina 1, que constituye la principal capa de proteínas responsables de ensamblar la caveola, interactúa directamente e inhibe a la eNOS en la célula endotelial.

Ca^{2+} intracelular y calmodulina

Los agonistas que aumentan los niveles del $[Ca^{2+}]_i$ (por ej., bradiquinina, acetilcolina y trombina) promueven la unión de la calmodulina a eNOS y la disociación de la enzima con la caveolina 1, lo que resulta en un complejo eNOS-calmodulina activado. Las proteínas de choque térmico 90 (Hsp90) también facilitan el desplazamiento de la caveolina 1 desde la eNOS. Una vez que los niveles de Ca^{2+} retornan al estado de reposo, la calmodulina se disocia y la caveolina 1 se vuelve a asociar con la eNOS. Los receptores acoplados a la proteína G residentes en la caveola, incluyendo los receptores B2 de las quininas, de tipo I de la angiotensina II y el tipo B de la endotelina, contribuyen al complejo eNOS-membrana al regular su actividad.

Estrés de Roce

Los cambios en el flujo sanguíneo son importantes en el control y liberación del NO derivado del endotelio. En el estrés de roce hay activación de eNOS por disociación de caveolina 1 y asociación con calmodulina. La tirosinasa C-Scr modula la expresión de eNOS en respuesta al estrés de roce a través de un aumento de la transcripción de la eNOS a corto plazo y en la estabilización del ARNm de la eNOS a largo plazo.

Factores Humorales

Ang II, glucosa, peróxido de hidrógeno y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) también aumentan la expresión de eNOS. Los mediadores que disminuyen su expresión incluyen: cinasa RhoA/Rho, lipoproteínas de baja densidad, lipopolisacáridos y el factor de secreción tumoral alfa. Más aún, el gen promotor de eNOS posee secuencias de consenso que son sitios potenciales de unión para factores

de transcripción, como el complejo AP-1, el factor nuclear kappa-beta e interleuquina 6. La fosforilación de la eNOS por la proteína cinasa serina/treonina Akt inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular, insulina o estrógenos produce su activación. La Hsp90 facilita la fosforilación de eNOS.

Sustrato y cofactores

La actividad de la eNOS depende de la disponibilidad del sustrato (L-arginina) y de cofactores (por ej., BH4). Los estudios experimentales y clínicos han demostrado que la deficiencia de BH4 altera la relajación endotelio dependiente. Cambios en el microambiente endotelial del estado redox tendrían impacto sobre la biodisponibilidad del NO. Existen inhibidores competitivos endógenos de la eNOS, como la ADMA.³

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL NO

Guanililciclasa: el receptor para NO es la GC soluble, un heterodímero con subunidades alfa y beta. La activación de esta enzima es mediada por la unión del NO al grupo hemo de la GC, que forma un aducto nitrosil-hemo. Como resultado, el hierro del hemo es desplazado del plano de configuración del anillo porfirínico, lo que induce la unión y la hidrólisis de la GTP a GMPc. El aumento del nivel del GMPc activa la proteína cinasa I dependiente de GMPc, el cual, a su vez, fosforila un número de proteínas involucradas en la relajación del músculo liso vascular, proliferación celular, expresión de moléculas de adhesión y agregación plaquetaria. Recientes estudios han demostrado que la mayoría de los receptores GC funcionan como receptores de “repuesto” que aumentan la sensibilidad del NO, lo que sugiere que la biodisponibilidad del NO es el parámetro crítico para la señalización NO/GMPc.

Fosfodiesterasas

La señal del GMPc está determinada por la acción de PDEs nucleótido hidrolizante cíclico; son de importancia en el sistema vascular las PDE1, PDE3 y PDE5. La vía de señalización de la insulina para la estimulación de la producción de NO es a través de la activación de la fosfotidilinositol 3-cinasa, que subsecuentemente resulta en la fosforilación.

NO Y FUNCIÓN VASCULAR

Por su acción vasodilatadora en condiciones normales y con endotelio funcionando el NO mantiene un tono arterial vascular adecuado.⁴ Algunos factores, incluyendo el aumento de ROS, ácidos grasos libres y productos finales de glicación avanzada, contribuyen a la disfunción endotelial y a la resistencia a la insulina. Clínicamente, el empeoramiento de la producción de NO mediado por la insulina en el endotelio está asociado con hipertensión y enfermedades metabólicas.

La contribución del NO a la vasorelajación endotelio-dependiente diferiría en las arterias de conductancia y de resistencia. En las primeras, el NO sería el mediador primario de la relajación y en las de resistencia parece ser más importante el EDHF.

Efectos antitrombóticos

La liberación de NO desde el endotelio y las plaquetas juega un rol crucial en el mantenimiento de la fluidez, ya que previene la coagulación. La agregación plaquetaria local resulta en la liberación de serotonina y adenosina difosfato, activación local de la cascada de la coagulación y la producción de trombina, lo que causa una masiva respuesta de NO local. La vasodilatación inducida por NO ayuda a eliminar “microagregados” e inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, y previene la oclusión vascular.

“Paradoja de la L-arginina”

Normalmente, la administración exógena de L-arginina no incrementa la actividad de eNOS, pero en situaciones patológicas, como hipertensión arterial, su administración aumenta la biodisponibilidad de NO. Esto se debería a que en estos casos la L-arginina, aminoácido no esencial, no llega a las caveolas y es inaccesible a eNOS, aun con niveles plasmáticos normales, lo que indica alteraciones del transportador de L-arginina (CAT-1) hacia las caveolas. En la hipertensión, la disminución del NO incrementa la actividad local de la ECA (upregulation), la producción de Ang II y anión superóxido, induciendo vasoconstricción.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se ha demostrado que la DE es un factor de riesgo independiente para eventos adversos cardiovasculares mayores. La DE se puede medir in vitro en vasos aislados, mediante agentes vasodilatadores endotelio-dependientes (acetilcolina o bradiquinina) o in vivo invasivamente por inyección de acetilcolina o no invasivamente, por la maniobra de HR que se basa en evaluar los cambios de la onda de pulso luego de una isquemia. LA HR se puede realizar por ecografía vascular, pletismografía de impedancia eléctrica (midiendo la resistencia eléctrica a una corriente inyectada: cuanto más volumen tiene el brazo, mayor será la resistencia), tonometría de pulso (insuflando un manguito en el dedo índice para evaluar los cambios de volumen que ocurren en el dedo) u oximetría digital (evaluando los cambios de la onda de pulso registrada). Se ha demostrado que la edad disminuye la vasodilatación endotelio-dependiente,⁵ probablemente debido a aumento de los ROS. El peroxinitrito generado modularía la actividad de la ciclooxigenasa endotelial, favoreciendo la síntesis de prostanoídes vasoconstrictores en vez de vasodilatadores. En las CMLV se producirían también ROS, desacoplando las NOS extraendoteliales y activando factores de inflamación.⁶

REMODELAMIENTO VASCULAR

El NO juega un rol central en la fisiopatología del remodelamiento vascular: inhibe la síntesis de proteínas totales y colágeno en CMLV, activa las metaloproteinasas de la pared, inhibe la migración/adhesión de macrófagos e inhibe la migración de la CMLV. Los efectos inhibitorios del NO sobre el remodelamiento han sido comprobados en animales tratados con inhibidores de NOSs, genéticamente deficientes o que sobreexpresan eNOS. Además, el NO inhibe la agregación plaquetaria y la activación del inhibidor tPA-1, lo que sugiere que es antiinflamatorio y antiaterogénico. En ratones deficientes de Apo E, la inhibición de NO aumenta el área de superficie de la placa aterosclerótica aórtica. El HDL tiene efectos antiaterogénicos, manteniendo el microambiente lipídico en las caveolas, donde está localizada la eNOS, y aumenta la expresión de ARNm de eNOS y estimula la actividad de eNOS por la vía del fosfatidilinositol 3 cinasa/Akt.

NO Y FUNCIÓN RENAL

En el riñón el NO tiene efectos diuréticos y natriuréticos. Controla la reabsorción tubular de sodio, el TGF, la hemodinamia renal y la natriuresis por presión. Los efectos diuréticos y natriuréticos del NO están mediados por inhibición directa del transporte epitelial en el túbulo proximal, rama ascendente gruesa y conducto colector cortical. La diuresis y la natriuresis inducidas por el NO también dependen de cambios de la hemodinamia peritubular y de la presión intersticial. Inhibidores del NO administrados intrarrenalmente reducen el flujo de orina y la excreción de Na^+ y K^+ .

Efectos tubulares renales

En el asa ascendente gruesa, aislada y perfundida, el aumento del flujo laminar estimula la actividad de eNOS y la producción de NO por fosforilación de la serina 1179 por la cinasa-PI 3. En cultivos celulares de ese segmento, la HSp 90 produce la activación de eNOS por translocación desde los compartimentos intracelulares hasta la membrana celular. En la membrana luminal del túbulo proximal y rama ascendente gruesa el NO inhibe la absorción de NaCl por bloqueo del intercambiador Na^+/H^+ , luego de la estimulación de la GC soluble y generación de GMPc . El NO también inhibe los cotransportadores $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -2\text{Cl}$ sobre la membrana luminal de la rama ascendente gruesa.

Canales de Na^+ y permeabilidad al agua

El NO inhibiría la absorción de Na^+ por efecto directo sobre los canales apicales. La vía del NO podría ser también un mediador que uniría la actividad de la bomba $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{ATPasa}$ a los canales de K^+ basolateral y la conductancia del K^+ en el conducto colector. Allí, el NO inhibe la absorción del Na^+ y la permeabilidad osmótica al agua estimulada por vasopresina.

Hemodinamia Renal

Flujo sanguíneo renal

El NO intrarrenal ayuda a mantener la resistencia renal normalmente baja. La inhibición de su síntesis con análogos de la L-arginina incrementa un 30-50% la resistencia renal y disminuye del 25-40% el FSR. Estos efectos son revertidos por la L-arginina, indicando esta respuesta se debe a la inhibición endógena de la generación del NO. Estudios in vivo sugieren que el NO juega un rol importante en la hemodinamia renal al mantener los valores cerca del rango normal, en respuesta a los niveles elevados de Ang II. En ratas hipertensas infundidas con Ang II, la inhibición de las eNOS disminuye los diámetros de las arteriolas aferentes y eferentes. La administración de donantes de NO bloquea la vasoconstricción inducida por Ang II en las arteriolas aferentes, pero no en las eferentes (fig. 28-1).

Autorregulación

Aunque la inhibición de NOSs reduce el FSR de manera considerable, las respuestas correspondientes a la TFG son menos importantes ya que o no produce cambios, o solo tiene ligeras reducciones en función de la dosis y duración. La inhibición de NOS no interfiere con la capacidad del riñón para autorregular el FSR en respuesta a alteraciones en la presión arterial renal, pero la inhibición de las NOS disminuye la autorregulación.

Natriuresis por presión

El aumento de la excreción de Na^+ causada por un aumento en la presión de perfusión renal es dependiente de NO. La generación de NO intrarrenal en respuesta a elevaciones agudas de la presión arterial renal inhibe directamente la reabsorción de Na^+ en el túbulo distal e incrementa su excreción. En ratas tratadas (8 semanas) con un inhibidor de las NOSs, el bloqueo del SRA normalizó la presión arterial, pero no tuvo efecto sobre la natriuresis por presión, lo que implica que la reducción de la presión arterial no es suficiente para superar la deficiencia crónica de NO renal. Las alteraciones en el estrés de roce que acompañan al aumento de la presión arterial renal alterarían los mecanismos natriuréticos tubulares, el tono vascular y la presión hidrostática intersticial renal.

Retroalimentación túbulo glomerular

Es el mecanismo homeostático mediante el cual el aumento o disminución en la liberación de CINa en la mácula densa produce contracción o dilatación de las arteriolas aferentes para mantener la carga filtrada. El aumento en la liberación de CINa a la mácula densa estimula el intercambiador apical de Na^+/H^+ , aumenta el pH_i y activa la nNOS con producción de NO. El NO bloquea la respuesta de la RTG mediante activación de proteínas cinasas GMPc , dependientes en células de

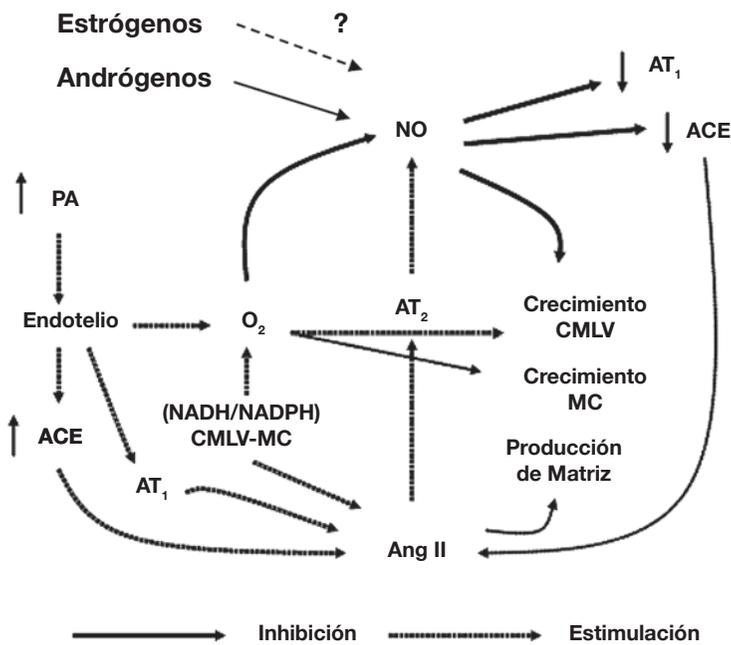


Figura 28-1. Representación esquemática de la fisiopatología de la interacción entre la Ang II y el NO (modificado de Raji L. *Hypertension* 2001;37:767-773).

la mácula densa. El bloqueo del intercambio luminal Na^+/H^+ previene el aumento del pH en las células de la mácula densa y aumenta la TFG, similar a la inhibición selectiva de nNOS. El aumento del pH_i sin aumento del ClNa luminal también induce la producción de NO. El NO modula la capacidad de respuesta de la RTG, al menos parcialmente, porque contrarresta la vasoconstricción. La nNOS es la responsable de la reposición de la RTG y de la hemodinamia glomerular luego de los cambios sostenidos en el consumo de sal.

NO Y DIFERENCIA DE SEXO

Existen evidencias contradictorias sobre los efectos de los andrógenos y los estrógenos sobre el NO (fig. 28-1). Algunos estudios muestran una diferencia de sexo en el sistema de NO en jóvenes adultos (mujeres premenopáusicas y hombres de la misma edad) donde habría mayores niveles de NO.⁷ En animales, habría mayores niveles de NOS constitutivas (eNOS y nNOS) en riñones de ratas hembras que en los de los machos.⁸ Esta diferencia de sexo en NO se debería en parte al estrógeno el cual tiene potentes y múltiples acciones para estimular la producción de la eNOS y nNOS, presentes en la vasculatura y el riñón. El tratamiento con estrógenos en mujeres posmenopáusicas eleva los metabolitos séricos del NO: nitritos y nitratos.⁹ Además, las acciones antioxidantes del estrógeno podrían prolongar la vida media activa del NO.¹⁰ Estudios en ratones sin receptores de estrógenos, o con sus agonistas y antagonistas selectivos, sugieren que el receptor del estrógeno alfa estimula liberación de NO-endotelio dependiente.¹¹ Los andrógenos presentan acciones variables sobre la producción de NO, con inhibición de la vasodilatación dependiente de NO por la testosterona en algunas partes de la circula-

ción y con efectos de estimulación en otras. Tanto células endoteliales como CMLV expresan receptores de andrógenos cuya estimulación aumentaría la producción de NO.¹² Existe, además, la posibilidad de que algunas acciones de los andrógenos sean mediadas por los estrógenos, tema que necesita más investigaciones.

Bibliografía sugerida

1. Ebrahimian, T.; Mathieu, E.; Silvestre, J. y Boulanger, C. Intraluminal pressure increases vascular neuronal nitric oxide synthase expression. *J Hypertens* 2003; 21: 937-942.
2. JooTuron, C.M.; Peral de Bruno, M.P. y col. Internal mammary artery grafts reactivity in hypertensive patients: role of stretching in extraendothelial nitric oxide. *Clin Exp Hypertens* 2007; 29:327-344.
3. Vallance, P.; Leone, A. y col. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
4. Wang, X.L. y Wang, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 241-251.
5. Rodríguez-Mañas, L.; El-Assar, M. y col. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell* 2009; 8: 226-238.
6. Govers, R. y Rabelink, T.J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F193-F206.
7. Forte, P.; Kneale, B.J. y col. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension* 1998; 32:730-734.
8. Neugarten, J.; Ding, Q. y col. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1240-1246.
9. Imthurn, B.; Rosselli, M. y col. Differential effects of hormone-replacement therapy on endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol valerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:388-394.

10. Holden, D.P.; Cartwright, J.E.; Nussey, S.S. y Whitley, G.S. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003, 108: 1575-1580.
11. Harris, H. Estrogen receptor beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 2007, 21:1-13.
12. Yu, J.; Eto, M. y col. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb 1 in human aortic endothelial cells: a possible involvement of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 353:764-769.