



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL.

Alfredo Saavedra Molina, Elizabeth Calderón Cortés, Erick Sierra Campos,
Christian Cortés Rojo, Francisco Javier Gaona Zamudio,
Mónica Clemente Guerrero

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Morelia, Mich. 58030

saavedra@zeus.umich.mx

PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF MITOCHONDRIAL NITRIC OXIDE

Abstract.

The important role of nitric oxide (NO[•]) in biology has been subject of many studies in past decades. Some biological properties of NO[•] are mediated through increments of cyclic GMP (cGMP); however, other NO[•] functions are cGMP-independent. NO[•] is a gas that rapidly react with hemoproteins, thiols, and superoxide anion (O₂^{•-}). Mitochondria possess hemoproteins such as cytochrome c oxidase (COX), proteins with thiols such as caspases, and it is the main producer of O₂^{•-}. Consequently, mitochondria is the main intracellular target for NO[•]. Physiological relevant concentrations of NO[•] react in a reversible manner and oxygen-concentration dependent with the active site of COX suggesting a competitive antagonism between NO[•] and O₂. This reaction redeem a critical role in the regulation of mitochondrial oxygen consumption of many cell types, tissue and organs. The interaction of NO[•] with mitochondrial thiol proteins, such as caspase-3, is reversible and pH- and redox-dependent. This reaction is important in the mitochondrial machinery that regulate apoptosis. Also, the reaction between NO[•] and O₂^{•-} is particularly rapid and the product, peroxynitrite (ONOO⁻), is a potent oxidant. The reactions of ONOO⁻ with possible mitochondrial targets are irreversible and cause mitochondrial dysfunction, oxidative damage and apoptosis. The undesirable apoptotic reactions are involved in pathogenesis such as certain types of cancer. The discovery of the mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) has open new avenues in the field of the NO[•]. mtNOS is a constitutive, active

enzyme that generates NO^\bullet in a Ca^{2+} -sensitive manner, regulate oxygen consumption, electrochemical transmembrane potential (Dy), transmembrane H^+ gradient (DpH), Ca^{2+} homeostasis and ATP synthesis. It has been reported the formation of ONOO^- , derived of the production of NO^\bullet by the *mtNOS*, that cause oxidative stress and the release of cytochrome *c* from mitochondria, an important event in apoptosis. In this review we attempt to describe the biological importance of mitochondrial nitric oxide and its pathophysiological role at the mitochondrial level.

Keywords: nitric oxide; mitochondria; nitric-oxide synthase; hypertension; free radicals; peroxynitrite.

El óxido nítrico y la cadena respiratoria

El óxido nítrico (NO^\bullet) es un radical libre diatómico, de vida media corta y sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuya reacción se muestra en la Figura 1. El NO^\bullet es importante en la fisiología de muchos organismos, ya que está implicado en diversos procesos, tales como la neurotransmisión, la vasodilatación y la respuesta inmune. Diferentes isoformas de la NOS (Fig. 2) han sido caracterizadas: la NOS_n y la NOS_e (también denominada, NOS neuronal y endotelial, respectivamente), las cuales se expresan de manera constitutiva (Tabla 1); la NOS_i (NOS inducible) es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios; y por último la NOS_{mt} (NOS mitocondrial), la cual se ha sugerido es una modificación postraduccional de la NOS_n (1). El NO^\bullet es capaz de reaccionar con metaloproteínas que contienen grupos hemo, con el oxígeno y con especies reactivas de oxígeno (ERO) (1).

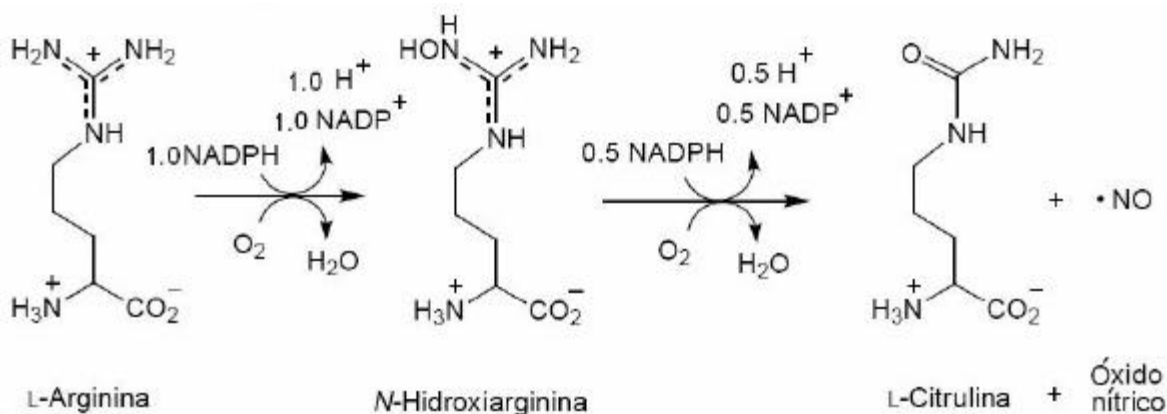


Figura 1. Reacción general catalizada por las NOSs. La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación del amino guanidino de la L-arginina para generar óxido nítrico y L-citrulina, con la formación del intermediario N^o-Hidroxi-L-arginina. En esta reacción se transfieren 5 electrones. Tomada y modificada de Ghafourifar y Saavedra-Molina (88).

La cadena respiratoria mitocondrial transporta los electrones provenientes del metabolismo oxidativo hacia un aceptor final (O_2) y acopla este proceso al bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. Este último proceso es responsable de la generación del potencial electroquímico transmembranal ($\Delta\psi$) necesario para la síntesis de ATP y la homeostasis iónica en la mitocondria.

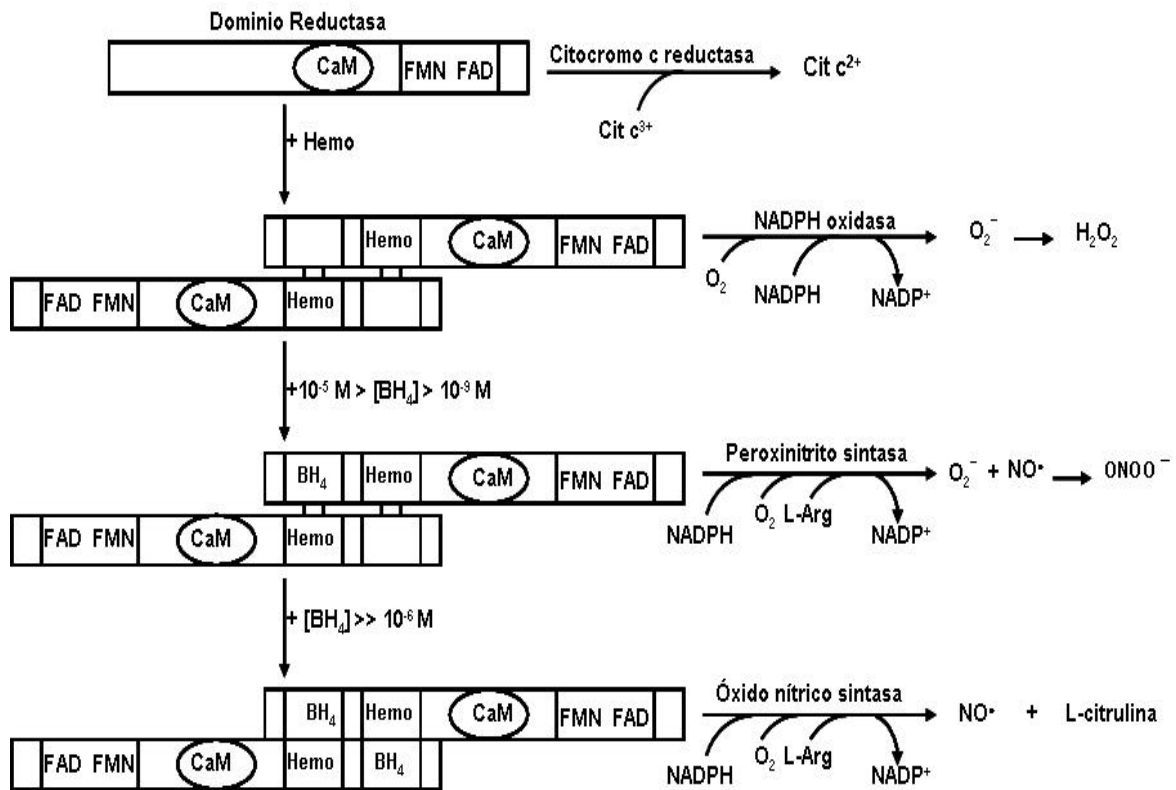


Figura 2. Transiciones estructurales del dominio oxigenasa en la óxido nítrico sintasa neuronal. El esquema muestra un modelo de activación de la NOSn por el grupo hemo y el cofactor BH_4 . La NOSn en ausencia de los cofactores hemo y BH_4 , actúa como una citocromo c reductasa (arriba). Al unir la NOSn al grupo hemo, la enzima se comporta como una NADPH oxidasa (centro). Por último, dependiendo de la disponibilidad de la BH_4 , la NOSn tiene actividad tanto de peroxinitrito sintasa, como de óxido nítrico sintasa (abajo). Tomada y modificada de Mayer y Hemmens (90).

TABLA 1. Características de las isoformas de las NOSs.

PARÁMETROS ENZIMÁTICOS Y ESTRUCTURALES	HOMODÍMEROS ACTIVOS			
	NOSn (I) neuronal	NOSe (III) endotelial	NOSi (II) inducible	NOSmt mitocondrial
Masa molecular	160 kDa	135 kDa	125-130 kDa	127 kDa
Inducibilidad	Constitutiva	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Unión de Calmodulina (CaM)	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M	$\gg 30 \times 10^{-9}$ M	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M
Cofactores	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn
Sustratos	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂
Variantes proteicas	Isoformas $\alpha, \beta, \gamma, \mu$	-----	-----	-----
Localización celular	Citosol	Membrana plasmática	Citosol	Membrana interna mitocondrial
Modificación post-traduccional	Presenta sitios de fosforilación	Presenta sitios de palmitoilación, fosforilación y miristoilación	Presenta sitios de fosforilación	Presenta sitios de fosforilación y miristoilación
Función fisiológica	Neurotransmisión	Vasodilatador	Citotoxicidad	Regulador de la citocromo oxidasa
Papel en la enfermedad	Distrofia muscular ataque, daño de isquemia-reperusión	Disfunción endotelial hipertensión	Choque tóxico inflamación	Apoptosis

Tomada y modificada de Elfering (81).

Las proteínas que componen la cadena respiratoria contienen grupos prostéticos oxidoreductores unidos de manera covalente y no covalente, entre los que se encuentran diversos grupos hemo (a, b, c₁ y c), centros hierro-azufre y átomos de cobre (Cu_A y Cu_B) (2). Por lo tanto, como se mencionó antes, el NO^{*} producido por la NOSmt es capaz de reaccionar con estos grupos prostéticos y alterar su actividad.

El blanco más sensible para el NO^{*} en la cadena respiratoria es la citocromo c oxidasa (COX o complejo IV), donde este radical se une al sitio de unión binuclear (hemo a₃/Cu_B) del oxígeno de dicho complejo (Esquema 1). La exposición a NO^{*} por períodos cortos de tiempo, y a concentraciones fisiológicas (50-100 nM), inhibe rápidamente al complejo IV mitocondrial de una manera reversible y competitiva con el oxígeno en mitocondrias de corazón (3), terminales nerviosas del cerebro (4), cultivos celulares (5) y el complejo IV aislado (6). Se ha propuesto que el probable significado fisiológico de esta interacción podría ser: a) la regulación de la producción de H₂O₂, (7,8) b) la regulación de la liberación del citocromo c durante la apoptosis (7) y c) la prevención de hipoxia en tejidos vivos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, con

lo cual se extenderían los gradientes de difusión del O_2 provenientes de los vasos sanguíneos, permitiendo que el O_2 difunda hasta células más distales (9,10).

Por el contrario, la exposición durante tiempos prolongados (de hasta 14 h.) al NO^* , promueve una inhibición progresiva de la respiración en cultivos celulares de macrófagos y que se vuelve irreversible con el transcurso del tiempo. Bajo estas condiciones, el complejo I es inhibido de manera específica y este efecto no puede ser prevenido ni por la adición de superóxido dismutasa o el atrapador de peroxinitrito (ONOO⁻): metionina, lo que en conjunto indica que el complejo I puede ser S-nitrosilado en grupos sulfhidrilo claves, aun sin la intervención aparente de especies reactivas de nitrógeno (ERN)¹ lo que en último término se refleja en la inhibición de la cadena respiratoria y la respiración celular (11) (Esquema 1).

La cadena respiratoria es la principal fuente generadora de anión superóxido (O_2^*) en mitocondrias de mamífero a nivel de los complejos I y III (12). Así, el NO^* como ya se mencionó antes, puede reaccionar fácilmente con O_2^* para formar al radical libre peroxinitrito (13). El ONOO⁻ puede a su vez reaccionar con grupos -SH de residuos de cisteína (s-nitrosilación) y grupos -OH de residuos de tirosina (nitricación). Este hecho implica que el NO^* también puede actuar a nivel de la mitocondria a través de la formación de ERN. La formación del O_2^* puede incrementarse mediante la adición de algunos inhibidores de la cadena respiratoria tales como la antimicina A, la rotenona, el cianuro y probablemente, el NO^* , que actúa de manera análoga al cianuro. De modo que, un aumento en la producción del O_2^* por alguno de estos agentes, o por disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes (durante el estrés oxidativo), junto con una producción sostenida de NO^* por parte de la NOS_{mt} o por la activación de los macrófagos (los cuales producen NO^* bajo la acción de ciertos efectores), puede dar lugar a una importante formación de ONOO⁻ (14). Mediante este mecanismo, el NO^* puede inhibir por S-nitrosilación a los complejos I y II (15), y modificar la funcionalidad del citocromo c mediante nitricación (16).

Un ejemplo de la posible interacción del NO^* y la cadena respiratoria durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, es el uso del inhibidor del complejo I, el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP). Este agente tóxico ha sido utilizado como herramienta para conocer algunos aspectos bioquímicos que participan en la muerte celular de las células dopaminérgicas durante la enfermedad de Parkinson. Los efectos tóxicos del MPTP son mediados por la formación de ERO y pueden ser evitados por el inhibidor de la NOS, el 7-nitroindazol, sugiriendo que los efectos del MPTP y del NO^* son sinérgicos y que podrían involucrar la formación del peroxinitrito (17).

En conclusión, es cada día más evidente que el NO^* tiene un importante papel fisiológico en la regulación del metabolismo energético mitocondrial de la célula, aun cuando falta por definirse de manera concreta bajo qué condiciones el NO^* lleva a cabo sus funciones, en tanto que en condiciones patológicas, el NO^* parece mediar sus efectos a través de diversas reacciones con algunas EROs para dar lugar a la formación de ERN que pueden reaccionar de manera específica e irreversible con residuos que son críticos para el funcionamiento de las enzimas de la cadena respiratoria, lo que culmina con un decaimiento en la producción de energía y de todos los procesos que dependen de ella. Sin embargo, el panorama es más complejo aún, puesto que las acciones del NO^* sobre la cadena respiratoria parecen depender

¹ Algunos ejemplos de ERN son: ONOO⁻ anión peroxinitrito, N_2O_3 trióxido de dinitrógeno, NO^- anión nitroxilo, NO^+ catión nitrosonio, NO_2 dióxido de nitrógeno, NO_2^- nitrito, NO_3^- nitrato).

de un sinnúmero de factores tales como el estado redox de la célula, la concentración de NO^\bullet , definida en función de la regulación de las diferentes isoformas de la NOS, la participación de agentes tóxicos externos que pudieran sinergizar las acciones del NO^\bullet , por solo mencionar algunos de esos factores. Todo esto hace evidente que existe un largo camino por recorrer en la investigación del NO^\bullet y su interacción con la cadena respiratoria.

Peroxinitrito (ONOO^-), el lado oscuro del NO^\bullet

La acción del ONOO^- es rápida e irreversible y no está confinada únicamente a blancos específicos de la cadena respiratoria, siendo capaz incluso de modificar enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa, entre otros blancos celulares. Se ha propuesto que este mecanismo de inhibición de la cadena respiratoria podría tener relevancia fisiopatológica en algunas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, donde se ha descrito una disminución en la actividad del complejo I y reducción de la concentración de glutatión reducido (GSH) intracelular (11), aun cuando no es claro si este

Esquema 1: Estructura y funciones mitocondriales.

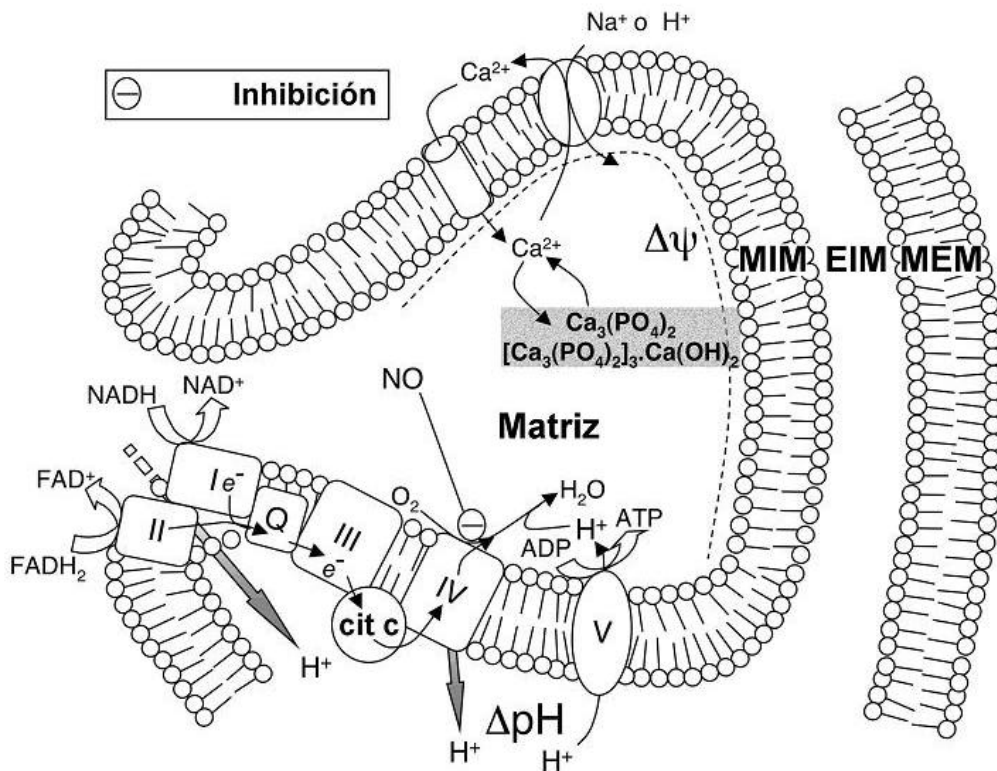
La mitocondria consiste de distintos compartimientos: La membrana externa mitocondrial (**MEM**), la membrana interna mitocondrial (**MIM**), la matriz (**Matriz**) y el espacio intermembranal (**EIM**). Estos compartimientos son diferentes en composición, electroquímica y estado redox. Los complejos de la cadena respiratoria están embebidos en la MIM. La cadena consiste de cuatro complejos (del I al IV), la coenzima Q (ubiquinona), el citocromo c (*cit c*) y la ATP sintasa, la cual se le refiere como el complejo V. El *cit c* es el único miembro de la cadena respiratoria que no está embebido dentro de la MIM. Estos complejos están funcionalmente colocados en un arreglo jerárquico electroquímico basados en sus potenciales redox. La cadena respiratoria posee un amplio espectro de potenciales redox que varía desde -280 mV (complejo I) hasta +250 mV (complejo IV). El ingreso de los electrones a la cadena por el complejo I o el II por la oxidación del NADH o el FADH_2 , respectivamente, permite que fluyan por la cadena hasta el complejo IV en donde reducen el O_2 a H_2O . Acoplado al flujo de electrones, los protones son bombeados desde la matriz al EIM. La expulsión de protones establece el potencial transmembranal ($\Delta\psi$, negativo adentro) y un gradiente electroquímico (ΔpH , alcalino adentro) a través de la membrana. La MIM es impermeable a los protones, pero reingresan a la matriz a través de la enzima ATP sintasa. El $\Delta\psi$ es también la fuerza motriz de transporte de cationes como el Ca^{2+} . Así, la mitocondria puede acumular relativamente grandes cantidades de Ca^{2+} . Sin embargo, la concentración intramitocondrial de calcio ionizado ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) se mantiene muy baja mediante al menos, dos mecanismos: a) la formación de depósitos de calcio insoluble en la matriz mitocondrial, los cuales pueden visualizarse mediante microscopia electrónica como gránulos densos a electrones. La estructura química de estos gránulos puede variar en las mitocondrias de diferentes células; sin embargo, estos gránulos generalmente consisten de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y calcio-apatita $[(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$; b) el intercambio de calcio intramitocondrial con otros cationes como H^+ o Na^+ .

El óxido nítrico compite con el O_2 por el sitio de unión en el complejo IV y el consumo de O_2 de una manera reversible. La inhibición del consumo de O_2 por el NO^\bullet disminuye el $\Delta\psi$ y el ΔpH . Tomado y modificado de Ghafourifar y Saavedra-Molina (88).

proceso tiene un papel primario en la aparición de estas enfermedades o es un fenómeno secundario a dicho proceso (13).

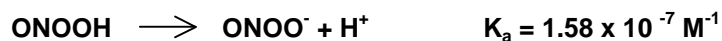
Debido a que el óxido nítrico posee un electrón desapareado, es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) y el superóxido ($O_2^{\bullet -}$). De hecho, las reacciones del NO^{\bullet} con el O_2 y con el $O_2^{\bullet -}$ están implicadas en la química de su citotoxicidad. La reacción del NO^{\bullet} con O_2 resulta en la generación de oxidantes reactivos tales como el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). Se ha propuesto que el dióxido de nitrógeno inicia la lipoperoxidación (18) y causa la ruptura de las cadenas de ADN (19).

Las especies nitrosantes como el N_2O_3 , pueden reaccionar con tioles o aminas, lo que altera proteínas, formando nitrosaminas carcinogénicas, o desaminar nitrosativamente las bases del ADN (20,21). La ecuación (1) muestra la reacción del óxido nítrico con el superóxido, la cual es extremadamente rápida (22,23).



El peroxinitrito resultante es un potente agente oxidante que tiene la capacidad de reaccionar con una gran variedad de moléculas (24). Esta reacción es mucho más rápida que la reacción del NO^\bullet con compuestos hemo ($k < 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y que es comparable a la velocidad con la cual el $\text{O}_2^{\bullet-}$ reacciona con las enzimas superóxido dismutasas. La reacción entre el NO^\bullet y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es biológicamente significativa, en al menos dos aspectos. Primero, el NO^\bullet y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ pueden antagonizar sus acciones biológicas. Se ha visto que los efectos mediados por el NO^\bullet son en ocasiones incrementados cuando se añade superóxido dismutasa a la preparación. Por ejemplo, *in vivo*, la vasodilatación inducida por el NO^\bullet puede antagonizarse por la sobreproducción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en el endotelio vascular, que causa vasoconstricción. De hecho, la generación excesiva de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se ha sugerido como una causa de hipertensión (25). Una segunda consideración son los efectos directamente atribuibles a el ONOO^- . Una forma molecular protonada de esta última especie es el ácido peroxinitroso (ONOOH), que es un poderoso oxidante que puede reaccionar con varias moléculas biológicas a través de diversos mecanismos. La adición de ONOO^- a células, tejidos celulares o fluidos corporales lleva a su rápida protonación, seguida por la merma o depleción de grupos -SH (sulfhidrilo) y antioxidantes, la oxidación de lípidos, el rompimiento de las cadenas de ADN, la nitración y la desaminación de las bases nucleotídicas, especialmente la guanina, además de la nitración de residuos aminoácil aromáticos de proteínas; también es particularmente eficiente en oxidar centros Fe/S, así como producir los productos esperados por la acción del radical hidroxilo (26,27).

Lo que hace particularmente tóxico al peroxinitrito es su gran estabilidad como un anión a pH alcalino. Este compuesto a concentraciones molares puede ser almacenado por días en el refrigerador sin cambios; su gran estabilidad le permite difundir por la célula y encontrar un blanco en tejidos adyacentes. Aunado a que el pK_a de la forma *cis*, que es la forma predominante y termodinámicamente más estable es de 6.8, significa que a pH 7.4 solo el 20% podría ser protonado a la forma ácida que corresponde al ácido peroxinitroso con sus efectos deletéreos descritos con anterioridad (27). Lo interesante es que ese 20% es la causa responsable de los efectos nocivos atribuidos al ONOO^- . Las posibles conformaciones del ONOO^- han sido propuestas en base a cálculos cuánticos y datos de espectros. Los datos cuánticos revelan un enlace entre el nitrógeno y el oxígeno peroxídico con carácter de doble enlace, por lo que alrededor del enlace se definen las conformaciones *cis* o *trans*. Para el anión peroxinitrito, la conformación *cis* es más estable que la *trans*. Hasta el momento actual, no existe un acuerdo de si la interconversión entre la forma *cis* o la *trans* es rápida o lenta, pero análisis con rayos X sugieren que el peroxinitrito cristalizado predomina en la forma *cis*. La ecuación 2 muestra las propiedades ácido-base del peroxinitrito.



Después de todo lo anterior, el ONOO^- parece ser un villano; sin embargo, también se han descrito funciones fisiológicas del ONOO^- que son benéficas. Por ejemplo: los macrófagos activados tienen la capacidad de producir simultáneamente los compuestos precursores del ONOO^- , (NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$). Se ha propuesto que el ONOO^- es la última especie citotóxica generada en la respuesta inmune (28), por tanto, tiene un papel preponderante en la lucha contra los organismos patógenos en animales y plantas. Particularmente, en plantas se ha demostrado la participación de ONOO^- y NO^\bullet en la producción de nitritos y nitratos disponibles (29a).

El óxido nítrico y su fisiopatología a nivel mitocondrial

El control de las funciones mitocondriales depende de dos variables, la concentración de óxido nítrico y el nivel de oxígeno; cada uno actúa sobre un intervalo de concentraciones y gradientes, por tanto existen puntos críticos en los cuales ambas variables se interceptan. El nivel en estado estacionario del oxígeno en órganos de mamífero es de 5-25 μM (29). Estos niveles de oxígeno están en un margen en el cual las concentraciones fisiológicas de óxido nítrico (50-100 nM) producen la inhibición del 35-45% de la respiración mitocondrial (30); bajo estas condiciones de inhibición severa de la citocromo oxidasa, participa un mecanismo de "feedback" a través de la interacción inicial entre el ubiquinol y el óxido nítrico, el cual es importante en el mantenimiento de la función mitocondrial. Así, el óxido nítrico, el anión superóxido y el anión peroxinitrito desempeñan un papel crucial en la regulación de la función mitocondrial (31). Sin embargo, no está claro si el óxido nítrico tiene una función benéfica o dañina en la mitocondria. A concentraciones semejantes a las requeridas para activar a la guanilato ciclasa, el óxido nítrico se une al sitio de unión del oxígeno en la citocromo oxidasa de manera competitiva. Así, regula el consumo de oxígeno a nivel fisiológico. Obviamente, la regulación fisiológica del consumo de oxígeno representa un efecto benéfico. Sin embargo, si la inhibición por óxido nítrico de la citocromo oxidasa es prolongada, ocasiona la generación del anión superóxido; el anión superóxido puede a su vez reaccionar con el óxido nítrico para formar el anión peroxinitrito (32), el cual inhibe irreversiblemente diferentes componentes de la cadena respiratoria. Por tanto, la presencia del anión peroxinitrito en la mitocondria produce daños celulares irreversibles.

La mitocondria desempeña un papel regulador en la disfunción celular y en las rutas de muerte celular (33,34). La disfunción mitocondrial ha sido reconocida en las enfermedades neurodegenerativas, las que se conocen como "enfermedades mitocondriales" (35,36). Las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, involucran defectos mitocondriales en los diferentes complejos de la cadena respiratoria (37,38) y mutaciones en el ADN mitocondrial (39). Estos defectos, se caracterizan por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el sistema nervioso central, debido a que el cerebro consume aproximadamente el 20% del oxígeno total del cuerpo. Por tanto, la principal ruta de disfunción mitocondrial es a través de la oxidación de los diferentes componentes mitocondriales por las ERO. Además, las neuronas son post-mitóticas, es decir, no sufren mitosis lo que no permite reparar la oxidación del ADN, las proteínas y los lípidos que fueron dañados por las ERO. Por último, a diferencia de otros órganos altamente metabólicos, el cerebro posee bajos niveles tanto en concentración como en actividad de las enzimas antioxidantes, incluyendo también los antioxidantes de bajo peso molecular (40).

Además de las ERO, hay evidencia de la participación del óxido nítrico en una variedad de enfermedades neurológicas (41-43).

La mitocondria, también produce especies reactivas de nitrógeno, debido a que se ha encontrado una enzima óxido nítrico sintasa en la membrana interna mitocondrial (NOSmt) y orientada hacia la matriz (44-46). El óxido nítrico producido por esta NOSmt inhibe el consumo de O_2 (47,48) y promueve la producción y liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en mitocondria, al favorecer la autooxidación del ubiquinol (49). En el cerebro, el H_2O_2 producido por este mecanismo, participa en la señalización celular durante la sinaptogénesis inicial y la plasticidad (50). Al igual que la reacción citoplásmica de la NOS, la reacción entre el óxido nítrico

y el anión superóxido forman el anión peroxinitrito (ONOO^-), la cual también es tres veces más rápida que la dismutación del anión superóxido, en este caso, por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) (51), lo que sugiere la formación intramitocondrial del anión ONOO^- . Además de este mecanismo indirecto, el anión ONOO^- puede ser generado directamente por la NOSmt, cuando esta última actúa como peroxinitrito sintasa, a través de la generación del anión superóxido a expensas del NADPH en una reacción alterna a la síntesis del óxido nítrico o mediante la generación del anión nitroxilo (NO^-), el cual reacciona con el oxígeno formando el anión ONOO^- (52) (ver Figura 2). La capacidad de la NOSmt para actuar como óxido nítrico sintasa o como peroxinitrito sintasa, depende de la disponibilidad y el estado de oxidación del cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4). El anión nitroxilo también puede ser formado a partir del NO^\bullet mediante la ganancia de un electrón del ubiquinol (53,54) o el citocromo c (55).

El anión ONOO^- , es un potente oxidante que reacciona con una variedad de componentes mitocondriales, a través de reacciones de oxidación o nitración. Este anión inhibe el transporte de electrones mitocondrial a través de la inactivación de la NADH deshidrogenasa (Complejo I), la succinato deshidrogenasa (Complejo II), además de inhibir a la ATP sintasa (11,56). Aunado a esto, el anión ONOO^- lleva a cabo la nitración de tirosinas en varias proteínas mitocondriales, como la aconitasa (57), la SOD-Mn (58,59) y el citocromo c (16). También el anión ONOO^- oxida los tioles y el NADH, lo cual induce la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP), provocando la salida del Ca^{2+} mitocondrial (60,61). El PTP permite el movimiento libre de un gran número de moléculas hacia dentro y fuera de la mitocondria. Por tanto, la mitocondria se colapsa y provoca la muerte celular (62).

En las neuronas, el anión ONOO^- promueve la nitración de los residuos de tirosina en los neurofilamentos, lo cual daña el flujo axonal y provoca la muerte neuronal. Además, el anión ONOO^- inhibe irreversiblemente el transportador de glutamato en las células gliales, incrementando los niveles de glutamato extraneuronal.

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central. Al unirse el glutamato a su receptor, activa una variedad de sistemas de transducción de señales, a través de calmodulina y calpaína. Sin embargo, un exceso de glutamato en las neuronas estimula la salida del Ca^{2+} (63), lo cual está involucrado en diversas enfermedades neurológicas (64).

La neurotoxicidad inducida por glutamato es prevenida con inhibidores de las NOS y con la superóxido dismutasa, lo cual indica que la formación del anión ONOO^- es crucial en la toxicidad inducida por este neurotransmisor (65,66). Por tanto, el peroxinitrito también está involucrado en las enfermedades neurodegenerativas (67,68).

Los mecanismos de defensa subcelulares contra el anión ONOO^- son así cruciales para atenuar la disfunción mitocondrial, debido a que el anión ONOO^- parece ser el principal producto de la utilización del óxido nítrico en aerobiosis (69). Si el anión ONOO^- es formado bajo estas condiciones, puede producir daño oxidativo en la mitocondria dependiendo de su sitio de generación (14). Se conocen diversos mecanismos de defensa subcelulares para prevenir el daño por ONOO^- , entre los cuales se menciona la actividad de la SOD-Mn (15), también por la regulación de la NOSmt a través de la disponibilidad del sustrato y el cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4), o la inhibición por producto (70), así como también por su reacción con el glutatión (71) incluyendo además, su reducción por la actividad de peroxinitrito reductasa

de la glutatión peroxidasa (72). Sin embargo, los cambios químicos y funcionales de algunos componentes mitocondriales pueden ayudar a definir su presencia y su función, ya que es difícil su detección.

El óxido nítrico y la presión arterial

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial, ésta es controlada por el gasto cardíaco y la resistencia periférica; sin embargo, ninguno de estos factores la controla de manera absoluta porque a su vez éstos dependen de otros factores fisiológicos (73-75). La resistencia periférica está determinada por la viscosidad de la sangre y por el calibre de los vasos de resistencia. Por su parte, el endotelio vascular es el principal regulador del tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas que controlan la relajación y la contracción del músculo liso vascular (73,76,77). Los trastornos en la regulación del tono vascular conducen a la disfunción endotelial que se asocia con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, y la diabetes mellitus entre otras (77).

La hipertensión es una elevación sostenida de la presión arterial en general y es uno de los problemas de salud con mayor impacto económico y social en el mundo, debido a la relación entre la hipertensión y las muertes por complicaciones vasculares en órganos blanco, como el corazón, el cerebro, el riñón y los vasos sanguíneos (73,75). La hipertensión arterial incrementa el trabajo a que es sometido el corazón, aumenta el riesgo de accidente vascular cerebral, ataque cardíaco, enfermedad renal, etc. (75).

En la hipertensión, la presión diastólica se encuentra de 90 a 95 mmHg y una presión sistólica mayor de 140 mmHg (74,78). En el 90% de los casos no se conocen las causas de la alta presión arterial (hipertensión esencial), aunque en una pequeña proporción pueden identificarse formas secundarias de hipertensión causadas por una serie de enfermedades tales como tumores suprarrenales, enfermedad renal u otras causas específicas (73,74).

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, da origen a una vasodilatación directa. El agente que desencadena este proceso fue conocido en un principio como el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF, por sus siglas en inglés), en donde se encontró que la acetilcolina actúa como un mensajero que estimula la liberación, por parte del endotelio, de una sustancia que constituye el verdadero vasodilatador (79).

En 1987 Palmer, Ignarro, Khan y Furchgott demostraron que las acciones biológicas del EDRF eran debidas a la liberación endógena del óxido nítrico, lo cual reveló la existencia de una vía bioquímica ubicua (80).

La formación de NO^{*} sintetizado por la óxido nítrico sintasa en células del endotelio vascular regula el tono vasodilatador que es esencial para la regulación del flujo y la presión sanguínea.

El óxido nítrico y su relación con la hipertensión

Debido a la diversidad de efectos fisiológicos que desempeña el NO[•], éste se ha considerado como una molécula biológicamente activa. Sin embargo, su producción y sus funciones están alteradas en ciertos procesos patológicos, tales como la diabetes y la hipertensión (82-84).

En condiciones como el envejecimiento y la menopausia, así como en patologías como la hipertensión, la diabetes mellitus, la aterosclerosis, el vasoespasmo y el daño por reperfusión, la activación de las células endoteliales puede llevar a la producción y liberación de factores contráctiles como los derivados de la ciclooxygenasa y los radicales libres de oxígeno. Estos efectos contrarrestan la actividad fisiológica relajante del NO[•] (76,85), produciendo un efecto patológico, ya que la reacción entre el NO[•] y el anión superóxido produce el peroxinitrito, el cual como ya se explicó antes, causa inhibición irreversible de la respiración mitocondrial y de diversos componentes mitocondriales, específicamente en los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria, así como la ATP sintasa, la aconitasa, y la creatina cinasa. De igual forma, el ONOO⁻ produce lipoperoxidación de la membrana, daño al ADN mitocondrial, así como a otros componentes celulares (15,86).

Asimismo, el efecto relajante del NO[•] también puede ser afectado por una alteración en la expresión de la enzima NOS, evento corroborado por Chou y cols., quienes mediante un análisis de Western blot y utilizando aortas de ratas hipertensas de diferente edad, encontraron que la actividad y la expresión de las NOS_e y NOS_i están alteradas en procesos como la hipertensión y el envejecimiento (82).

De igual forma, la actividad de la NOS_{mt} se alteró en la hipertensión, ya que se ha encontrado que la producción basal de NO[•] intramitocondrial está disminuida en mitocondrias de corazón, riñón y cerebro de ratas hipertensas, lo cual a llevado a pensar que el NO[•] intramitocondrial desempeña una importante función en la regulación mitocondrial durante la hipertensión (87).

Aunque es mucho lo que se sabe acerca de la química y los efectos fisiológicos de este compuesto, quedan muchas preguntas por responder. Por ejemplo en la cascada de señalización de la reacción de nitración/desnitración de proteínas; la S-nitrosilación de residuos de tirosina o de serina en proteínas para activación o desactivación enzimática; el sistema de GMP cíclico dependiente de NO[•], que representa el principal mecanismo de transducción de señales por el cual el NO[•] ejerce efectos fisiológicos en mamíferos; el sistema de señalización independiente de GMP cíclico, entre otros de suma importancia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico parcial de la CIC-UMSNH (2004) y de CONACYT (43705). ECC es becaria de la UMSNH. ESC, CCR y FJGZ son becarios de CONACYT.

REFERENCIAS

1. López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Ronn LC, Akil H y Watson SJ (2000). Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 272:129-133.
2. González-Halphen D y Vázquez-Acevedo M (2002). En: Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. (ME Vázquez Memije, MM Tuena de Gómez-Puyou Eds). México. Editorial Prado. 8:65-87.
3. Borutaitė V y Brown GC (1996). Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J* 315:295-299.
4. Cooper CE y Brown GC (1995). The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 212:404-412.
5. Brown GC, Bolaños JP, Heales SJR y Clark JB (1995). Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett* 193:201-204.
6. Brown GC y Cooper CE (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295-298.
7. Brookes P y Darley-Usmar VM (2002). Hypothesis: the mitochondrial NO signaling pathway and the transduction of nitrosative to oxidative cell signals: an alternative function for cytochrome C oxidase. *Free Radic Biol Med* 32:370-374.
8. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schopfer F y Boveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85-92.
9. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP y Lancaster JR (2001). The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:355-360.
10. Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, Doeller JE, Barone M, Patel RP, Lancaster JR, y Darley-Usmar V (2003). Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state. *J Biol Chem* 278:31603-31609.
11. Clementi E, Brown GC, Feelisch M y Moncada S (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7631-7636.
12. Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.
13. Ischiropoulos H y Beckman JS (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163-169.
14. Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V y Moncada S (1996). Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314:877-880.
15. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, y Castro L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33:1451-1464.
16. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Ischiropoulos LH, Freeman BA y Radi R (2000). Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem* 275:21409-21415.
17. Cleeter MW, Cooper JM y Schapira AH (2001). Nitric oxide enhances MPP⁺ inhibition of complex I. *FEBS Lett* 504:50-52.
18. Kikugawa K y Kogi K (1987). Oxidation products of linoleate and linoleate exposed to nitrogen dioxide. *Chem Pharm Bull* 35:344-349.
19. Gordsdorf S, Appel KE, Engholm C y Obe G (1990). Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11:37-41.
20. Wink DA, Nims RM, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook, JA, Krishna MC, DeGraff WG y Mitchell JB (1994). Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects or intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 7:519-525.
21. Goldstein S y Czapski G (1996). Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated NO solutions: The nature of the nitrosating intermediates. *J Am Chem Soc* 118:3419-3425.
22. Huie RE y Padjama S (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Commun* 18:195-199.
23. Culcasi M, Lafon-Cazal M, Pietri S y Bockaert J (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol Chem* 269:12589-12593.
24. Pryor WA y Squadrito GL (1995). The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268:L699.

25. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T y Inoue MW (1991). Does O_2^- underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10045.
26. Halliwell B y Gutteridge JM (1999). Chemistry of biologically important radicals. En: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science Publications, 3rd edition, New York. pp 73-100.
27. Beckman JS y Koppenol WH (1996). NO , O_2^- , and $ONOO^-$; the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437.
28. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA y Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.
29. Wittenberg BA y Wittenberg JB (1989). Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol* 51:857-878.
- 29a. Vanin AF, Svistunenko DA, Mikoyan VD, Serezhenkov VA, Fryers MJ, Baker NR y Cooper CE (2004). Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J Biol Chem* 279:24100-24107.
30. Boveris A, Costa LE, Cadenas E y Poderoso JJ (1999). Regulation of mitochondrial respiration by ADP, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* 301:188-198.
31. Moncada S y Erusalimsky JD (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Review Molecular Cell Biology* 3:214-220.
32. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H y Beckman JS (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842.
33. Murphy A (2000). Mitochondria in human disease. *The Biochemist* 22:29-36.
34. Brown G (2000). Energy, life, and death. *The Biochemist* 22:11-15.
35. Manfredi G y Beal MF (2000). The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 10:462-72.
36. Jordan J, Cena V y Prehn JH (2003). Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 59:129-141.
37. Parker WD Jr, Parks JK y Filey CM (1990). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurol* 40:1302-1303.
38. Janetzky B, Hauck S, Youdim MBH, Riederer P, Jellinger K y Pantucek F (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett* 169:126-128.
39. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-10778.
40. Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
41. Li XJ, Sharp AH, Li SH, Dawson TM, Snyder SH y Ross CA (1996). Huntington-associated protein (HAP1): discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:4839-4844.
42. Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, Akaike A, Kimura J (1996). Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J Neurosci Res* 43:503-510.
43. Kume T, Kouchiyama H, Kaneko S, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Shimohama S, Kihara T, Kimura J, Wada K y Koizumu S (1997). BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 756:200-204.
44. Ghafourifar P y Richter C (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418:291-296.
45. Tatoyan A y Giulivi C (1998). Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11044-11048.
46. Riobó NA, Melani M, Sanjuán N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E y Poderoso JJ (2002). The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase in brain development. *J Biol Chem* 277:42447-42455.
47. Brown GC y Cooper CE (1994). Nanomolar concentration of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295-298.
48. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F y Boveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85-92.
49. Poderoso JJ, Lisdero C, Schöpfer F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E y Boveris A (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem* 274:37709-37716.

50. Yermolaieva O, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH y Hoshi T (2000). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:448-453.
51. Beckman JS, Chen J, Crow JP y Ye YZ (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 130:371-380.
52. Kirsch M y Groot H (2002). Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *J Biol Chem* 277:13379-13388.
53. Poderoso JJ, Carreras MC, Schöpfer F, Riobó N, Boveris AD y Boveris A (1999). The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic Biol Med* 26:925-935.
54. Sharpe MA y Cooper CE (1998). Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *J Biochem* 332:9-19.
55. Zhao XJ, Sampath V y Caughey WS (1995). Cytochrome c oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 212:1054-1060.
56. Radi R, Rodríguez M, Castro L y Terrelli R (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
57. Castro LA, Robalino RL, Cayota A, Meneghini R y Radi R (1998). Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 359:215-224.
58. MacMillan-Crow LA, Crow JP y Thompson JA (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613-1622.
59. Yamasuka F, Taka H, Fujimura T y Murayama K (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-14089.
60. Packer MA y Murphy MP (1994). Peroxynitrite causes efflux from mitochondria which is prevented by cyclosporin A. *FEBS Lett* 345:237-240.
61. Packer MA, Scarlett JL, Martin SW y Murphy MP (1997). Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochem Soc Trans* 25:909-914.
62. White RJ y Reynolds IJ (1996). Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16:5688-5697.
63. Choi DW (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58:293-297.
64. Choi DW (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
65. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS y Snyder SH (1991). Nitric oxide mediate glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6368-6371.
66. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR y Snyder SH (1993). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651-2661.
67. Beckman JS (1994). Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide dependent cerebral injury. *Ann NY Acad Sci* 738:69-75.
68. Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M y Torreilles J (1999). Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev* 30:153-163.
69. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD y Richter C (1999). Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274:31185-31188.
70. Giulivi C (2003). Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 34:397-408.
71. Augusto O, Gatti RM y Radi R (1994). Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopyridone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch Biochem Biophys* 310:118-125.
72. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272:27812-27817.
73. Ganong WF (1992). Fisiología Médica. 13a ed. Edit. Manual Moderno. México. Capítulos 32-33.
74. West JB (1993). Bases fisiológicas de la práctica médica. 12a ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. Capítulos 18 y 62.
75. Secretaría de Salud. (2001). Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. 1a ed. S.S México.
76. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L y Salvetti A (1998). Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:41-47.
77. Pereida RN (2000). El endotelio vascular y la disfunción endotelial. *BEB* 20:79-84.

78. Guyton AC (1992). Tratado de fisiología médica. 8a ed. Edit. Interamericana McGraw-Hill. España. Capítulos 19 y 61.
79. Furchgott RF y Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
80. Moncada S, Higgs A y Furchgott R (1997). XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 49:137-142.
81. Elfering SL, Sarkela TM y Giulivi C (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079-38086.
82. Chou TC, Yen MH, Li CY y Ding YA (1998). Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31:643-648.
83. Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R y Saavedra-Molina A (2002). Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* 1:413-423.
84. Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A y Packer L (1998). Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med* 24:85-92.
85. Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD y Richter C (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* 10:57-65.
86. Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4003-4008.
87. Calderón-Cortés E, Sierra-Campos E, Cortés-Rojó C, Gaona-Zamudio FJ, Clemente-Guerrero M y Saavedra-Molina A (2004). Role of mitochondrial nitric oxide in rat brain during the development of hypertension. En preparación.
88. Ghafourifar P y Saavedra-Molina A (2004) Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: Nitric oxide, cell signaling, and gene expression. (E Cadenas Ed.) Marcel Dekker Inc. San Diego, CA. En Prensa.
89. Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects of the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-359.
90. Mayer B y Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22:477-481.

PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

Resumen

El importante papel del óxido nítrico (NO[•]) en biología ha sido sujeto de muchos estudios en las pasadas dos décadas. Algunas propiedades biológicas del NO[•] son mediadas a través del incremento celular en los niveles de GMP cíclico; sin embargo, existen muchas otras funciones del NO[•] que son independientes de GMP cíclico. El óxido nítrico es una molécula gaseosa que reacciona rápidamente con hemoproteínas, tioles y el anión superóxido (O₂^{•-}). La mitocondria es la principal productora celular de O₂^{•-} y posee hemoproteínas como la citocromo c oxidasa (COX), proteínas con tioles como las caspasas. Por lo tanto, las mitocondrias pueden considerarse como el principal blanco intracelular del NO[•]. Concentraciones fisiológicamente relevantes de NO[•] reaccionan en forma reversible en el sitio activo de la COX de una manera dependiente de la concentración del oxígeno, lo que sugiere un antagonismo competitivo entre el NO[•] y el O₂. Esta reacción desempeña un papel crítico en la regulación del consumo de oxígeno mitocondrial en muchas células, tejidos y órganos. La interacción del NO[•] con las proteínas mitocondriales que contienen tioles, como la caspasa-3, es también reversible, y depende del pH intramitocondrial y el estado redox. Esta reacción participa de manera muy importante en la regulación de la maquinaria mitocondrial involucrada en la apoptosis. La reacción del NO[•] con el O₂^{•-} es extremadamente rápida y su producto, el peroxinitrito (ONOO⁻), es un potente oxidante. Las reacciones del ONOO⁻ con posibles objetivos mitocondriales son irreversibles y causan un mal funcionamiento mitocondrial, daño oxidativo y apoptosis. Las reacciones de apoptosis no deseadas, están involucradas en la patogénesis de algunas enfermedades; de hecho, la

*carencia de apoptosis puede ser el principal mecanismo en algunos tipos de cáncer. Este punto de vista podría quitarnos la idea negativa que tenemos sobre el ONOO⁻ y cambiarla por una idea más positiva. El descubrimiento de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt, por sus siglas en inglés) ha abierto nuevas avenidas en el campo de investigación del NO[•]. La NOSmt es una enzima constitutiva, muy activa, que genera NO de una manera sensible al Ca²⁺, y que puede regular el consumo de oxígeno, el potencial electroquímico transmembranal (**Dy**), el gradiente transmembranal de H⁺ (**DpH**), la homeostasis del Ca²⁺ y la síntesis de ATP. Se ha reportado la formación de ONOO⁻, derivado de la producción del NO[•] por la NOSmt, causa estrés oxidativo y la liberación del citocromo c de la mitocondria, lo cual es importante para la apoptosis. En esta revisión se describe la importancia biológica que tiene el óxido nítrico mitocondrial y su papel fisiopatológico a nivel mitocondrial.*

Palabras clave: óxido nítrico; mitocondria; óxido nítrico sintasa; hipertensión; radicales libres; peroxinitrito.

Semblanza del Dr. Alfredo Saavedra Molina.



Nació en la Ciudad de Nogales, Sonora, México, en 1950. Es QFB por la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo (1973) y Doctor en Ciencias Biológicas por la Facultad de Ciencias de la UNAM (1987). Ha realizado una estancia posdoctoral en Hahnemann University, Filadelfia, EU y otra en University of North Texas Health Science Center at Fort Worth. Actualmente es Profesor Investigador Titular C del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I. Su trabajo científico se ha publicado en 17 artículos internacionales y 23 nacionales, y tiene una amplia participación en Congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido 11 tesis de posgrado y 9 de licenciatura en la Universidad Michoacana, México, donde también ha impartido 12 conferencias Institucionales y 10 cursos de licenciatura y posgrado. Es miembro regular de diferentes Sociedades Científicas, entre las que se encuentran la American Society for Cell Biology, la Nitric Oxide Society, la American Physiological Society, la Biochemical Society, la American Society for Biochemistry and Molecular Biology y la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ha recibido en dos ocasiones el premio de la International Cell Research Organization de la UNESCO.