

El Óxido Nítrico como nuevo Sistema en la Farmacología del Estrés

Pedro Angulo Herrera; Juan A. Espinoza Blanco; Diego Díaz Coahila
y Víctor E. Fernández Anhuamán*

RESUMEN

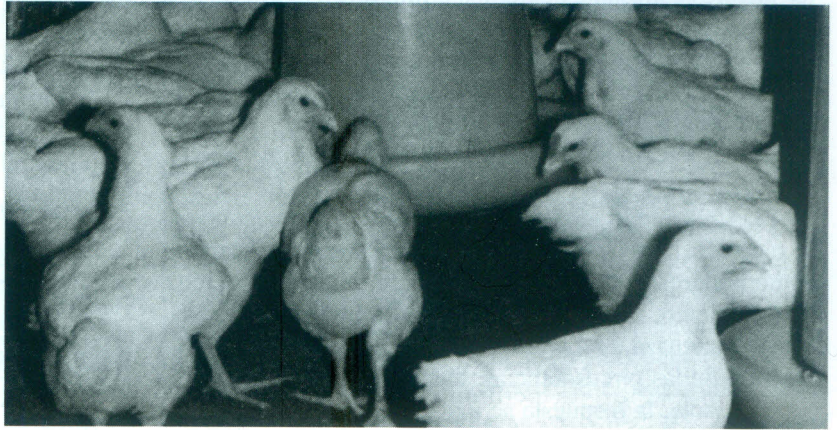
El propósito de esta publicación es presentar evidencias científicas publicadas que confirman que el óxido nítrico (NO) participa activamente en la reacción del estrés y en los mecanismos genéticos de la adaptación. El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la sintasa de óxido nítrico (NOS) y participa en un gran número de procesos fisiológicos: transmisión de la señal en el cerebro, regulación del sistema cardiovascular, inmune, gastrointestinal y urogenital. Desde 1990, muchas evidencias indican que el NO participa en la regulación del aparato genético; y ahora existen muchos datos que muestran que los factores estresantes ambientales aumentan la producción de NO, lo cual sugiere que el incremento de la producción de NO es la respuesta del organismo a la reacción del estrés. Malyshev y Manuklina, en base al postulado de Meerson, definen al sistema de generación del NO como un nuevo sistema, nitroérgico, limitante del estrés en los humanos y animales, con las siguientes características: 1) se induce por el estrés, 2) es capaz de limitar la reacción de estrés, 3) tiene la capacidad de aumentar la resistencia a los factores ambientales, 4) la capacidad del NO de aumentar y de los inhibidores de la NOS a disminuir la resistencia al estrés y la adaptación de los organismos; y 5) capacidad para aumentar su actividad en el proceso de adaptación. Este nuevo escenario nos permite visionar un futuro promisorio en la investigación y desarrollo de medicamentos a base de plantas medicinales con propiedades de modular el sistema generador del NO; al mismo tiempo que hacemos las siguientes reflexiones: 1) ¿se puede utilizar al NO como un indicador del estrés?, si así fuera, 2) ¿se puede desarrollar alguna técnica apropiada para esta determinación? y, 3) ¿seremos capaces de percibir esta nueva oportunidad terapéutica para un mejor aprovechamiento de las plantas medicinales y los productos naturales?

Palabras clave: óxido nítrico y estrés, estrés y adaptación, óxido nítrico y plantas medicinales.

* Laboratorio de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM.

* Mayor información: panguloh@unmsm.edu.pe

Este artículo es el octavo de una Serie sobre el Rol del Óxido Nítrico en el Estrés de Pollos de Carne y su Impacto en Avicultura.



SUMMARY

The intention of this publication is to present published scientific evidences that confirm that the nitric oxide (NO) actively participates in stress and the adaptation. NO is synthesized in the organism from L-arginine by the enzyme NO-synthase. NO participates in a great number of physiological processes: signal transmission in the brain, regulation of cardiovascular, immune, gastrointestinal and urogenital systems. From the early 1990s very important proofs have appeared indicating that NO is involved in the regulation of genetic apparatus; and there is a lot of information that show that the stressful environmental factors increase the production of NO, it can be suggested that the increased NO production is a response of the organism to stress reaction. Malyshev and Manuklina, on the basis of Meerson's postulate, define to the system of generation of NO as a newly recognized the NO-ergic stress-limiting system in the human beings and animals, with the following characteristics: 1) stress-inducibility, 2) capability to limit the stress reaction, 3) capability to increase the resistance to environmental factors, 4) capability of NO to increase and NO-synthase inhibitors to decrease the resistance to stress and adaptability of the organism, and 5) capability to increase its activity in the process of adaptation. This information allows us visionar a promissory future in the search of medicines from medicinal plants capable of modulating the generating system of NO. Finally, we do the following reflections: 1) is it possible to use to NO as an indicator of the stress?, if this way out, 2) is it possible to develop some technology adapted for this determination? And, 3) will we be capable of taking advantage of this new therapeutic opportunity for the medicinal plants and the natural products?

Key words: stress and nitric oxide, stress and adaptation, nitric oxide and medicinal plants.

Todos los organismos vivos responden a los cambios del medio ambiente en varias formas e incrementando la resistencia del organismo al estrés; es decir, el desarrollo de la adaptación. El estrés es la respuesta del organismo, por la cual las funciones de todos los sistemas, (cardiovascular, inmune, respiratorio, digestivo, sensorial, y nervioso), son modificados para responder al cambio percibido. Los humanos, así como los animales, pueden experimentar factores estresantes externos e internos. Dentro de los externos se incluye las condiciones fisiológicas adversas como el dolor, temperatura (calor, frío), condiciones psicológicas estresantes (de trabajo, relaciones de abuso). Los factores internos pueden ser físicos (infecciones, inflamaciones) o psicológicos (temor por algo malo que pueda ocurrir).

El estrés puede ser agudo o crónico. El estrés agudo es la reacción inmediata a la amenaza (situación percibida como peligrosa). Por ejemplo, el ruido, la aglomeración, el aislamiento, el hambre, el peligro, la infección, imaginar una amenaza o recordar un evento desagradable. En la mayoría de las circunstancias, cuando desaparece el factor estresante, la respuesta se inactiva y los niveles de las hormonas del estrés se normalizan (relax). Sin embargo, si los estímulos estresantes continúan la situación se vuelve crónica, por ejemplo trabajar continuamente bajo presión, problemas permanentes en las relaciones, la soledad, problemas financieros permanentes.

La reacción al estrés se caracteriza por respuestas en la conducta, como alerta, supresión del apetito sexual y alimenticio, el incremento en la producción y liberación de las hormonas del estrés: glucocorticoides, catecolaminas, prolactina, hormona del crecimiento, etc. La intensidad de la reacción de estrés se determina por la relación entre la activación del "sistema del estrés" por la respuesta del organismo al estímulo estresante y la activación de los "sistemas limitantes del estrés", los cuales pueden disminuir la activación excesiva del sistema de estrés y, por lo tanto, el efecto perjudicial de las hormonas del estrés.

La formación de efectos protectivos de adaptación es provisto por la activación del aparato genético y los cambios en el metabolismo celular junto con los cambios en el funcionamiento de todos los sistemas del organismo: nervioso, endocrino, cardiovascular, respiratorio, muscular, etc. Por lo tanto, el rol más importante en el desarrollo de la adaptación pertenece a los factores universales que controlan los sistemas fisiológicos y la expresión genética.

De acuerdo al conocimiento actual, un regulador universal es el óxido nítrico (NO) ⁽¹⁾. El NO es sintetizado en el organismo a partir de la L-arginina por la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) (EC 1.14.13.39). Hay tres isoformas de la NOS que producen NO, la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS) ⁽²⁾. La producción de NO por la nNOS es Ca⁺²-dependiente, y es estimulado por la activación de los receptores del NMDA los cuales permiten el influjo de Ca⁺² ⁽³⁾. En NO producido activa la guanil ciclasa soluble para catalizar la producción del segundo mensajero GMPc el cual, entre otros eventos, activa la transcripción genética ⁽⁴⁾.

NO y el sistema simpático

Se ha implicado a la nNOS como la fuente de NO que inhibe al sistema nervioso simpático. Una inyección intracerebro ventricular (i.c.v.) de 7-nitroindazol (7-NI), un inhibidor selectivo de la nNOS, potenció los efectos, excitatorios del simpático, del glutamato ⁽⁵⁾. Este rol central de la nNOS también se encontró en conejos conscientes, a los cuales se les administró inyecciones i.c.v. de inhibidores de la nNOS, como consecuencia aumentó la presión arterial, la actividad nerviosa simpática, y los niveles plasmáticos de catecolaminas ⁽⁶⁾.

Experimentos en ratas conscientes usando inyecciones i.c.v. de sustancias farmacológicas sugieren que la producción central de NO puede mantener la presión arterial inhibiendo la liberación de angiotensina II y/o prostaglandinas ⁽⁷⁾.

En suma, estos estudios indican un rol para el NO en disminuir el flujo del simpático a la periferie.

Es importante mencionar, que un sistema debe estar estimulado antes que los efectos del sistema NO pueda ser demostrado. En efecto, los resultados de un gran número de estudios sugieren que el sistema NO central tiene efectos potentes durante periodos de actividad simpática aumentada, pero no durante niveles basales de actividad.

La evidencia bibliográfica sugiere un rol inhibitorio del NO en el funcionamiento del simpático.

NO y el estrés psicológico y físico

Se ha demostrado que el estrés psicológico, con la activación del sistema nervioso simpático, activa las neuronas productoras de NO en el cerebro. Se ha reportado un incremento en mRNA y proteína de la nNOS en el núcleo paraventricular (PVN) en ratas sometidas a estrés por inmovilización ^(8,9). El rol inhibitorio del NO durante el estrés ha sido demostrado en experimentos en los que la microinyección de molsidomina (donador de NO), en el PVN de ratas conscientes disminuye la presión arterial aumentada, la frecuencia cardiaca y la liberación de norepinefrina hipotálamica durante el estrés inducido por movimientos bruscos (zacudidas) en ratas, pero no en ratas no estresadas ⁽¹⁰⁾.

Estos resultados, también, proveen evidencia de que los efectos del NO son más pronunciados en sistemas estimulados.

La disrupción genética de la nNOS en ratones resultó en animales con un aumento en su conducta agresiva ⁽¹¹⁾. Los mismos resultados se encontraron en ratones que recibieron inyecciones parenterales de 7-NI tres veces al día por 4 días ⁽¹²⁾. Estos resultados son consistentes con el rol del NO en regular el flujo del simpático del cerebro, la actitud agresiva estaría acompañada por la activación del sistema nervioso simpático.

El estrés físico (restricción, rotación, hipertermia, endotoxina, etc.) reducen la secreción gástrica. Inyecciones i.c.v. de L-NAME (inhibidor de la NOS) revierte la inhibición inducida por el estrés, lo que demuestra que el NO participa en este evento ⁽¹³⁾. Microinyecciones de inhibidores de la NOS han provisto la evidencia que la inhibición ocurre a través de los efectos en las neuronas en el

núcleo motor dorsal del vago en la médula ⁽¹⁴⁾, la fuente principal de inervación del estómago. Además, la inmunoreactividad para la nNOS en el núcleo motor dorsal aumento por efecto de la hipertermia ⁽¹³⁾.

Se concluye que el sistema NO central autonómico es de re-establecer la homeostasis en desbalances como la deshidratación, hipertensión, y el estrés.

NO y el sistema neuroendocrino

El NO se localiza en áreas cerebrales, incluyendo el PVN y el núcleo supraóptico (SON) en el hipotálamo ⁽¹⁵⁾. Este núcleo es la mayor fuente de neuronas que contienen la hormona que libera la corticotropina (CRH) ⁽¹⁶⁾. En respuesta a la estimulación por la liberación de la CRH (principalmente de las neuronas en el PVN la pituitaria anterior secreta la hormona adrenocorticotropina (ACTH) en el sistema portal hipofiseal. Durante una respuesta al estrés, la ACTH actúa en la corteza adrenal para estimular la producción y secreción de glucocorticoides ⁽¹⁶⁾.

Numerosos factores pueden influenciar la secreción de ACTH. Esos factores pueden actuar directamente a nivel de la pituitaria o en las neuronas CRN del hipotálamo. Por ejemplo, las citocinas interleucina-1 (IL-1), IL-1b, IL-2, y IL-2b incrementa la secreción de CRH, *in vitro* e *in vivo* ⁽¹⁷⁾. Así también, neurotransmisores como la acetilcolina, norepinefrina, y prostaglandinas, las neurohormonas como la oxitocina y vasopresina, son capaces de influenciar en la secreción de CRH ⁽¹⁷⁾.

In vivo, inyecciones intravenosas (iv) de IL-1b aumentan las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona; este aumento en CRH es atenuado por el pretratamiento con L-NAME, lo cual indica un rol modulador del NO en la liberación de CRH ⁽¹⁷⁾.

Así como las interleucinas, varios neurotransmisores y neurohormonas son capaces de regular la secreción de CRH ⁽¹⁸⁾. Por ejemplo, el carbachol, un agonista del receptor muscarínico, incrementa la liberación de CRH inducida por IL-2b; la administración de NMMA bloquea la potenciación de la liberación de CRH inducida por IL-2b ⁽¹⁹⁾. Ratas inyectadas iv con oxitocina o arginina-vasopresina aumentan la liberación de CRH; este aumento es inhibido con el pretratamiento con L-NAME ⁽¹⁷⁾.

Estos resultados sugieren que, *in vitro* e *in vivo*, la liberación de CRH es regulada por una interacción compleja entre varios factores endógenos, varios de los cuales pueden estar regulada por el NO.

NO y el sistema inmune

Hay una gran cantidad de literatura que involucra al NO en la respuesta neuroinmunológica al estrés. Las citocinas centrales y periféricas, y el NO central, parece que están muy relacionados en regular la respuesta hipotalámica-pituitaria-adrenal (HPA, 20, 21). Posiblemente, en condiciones de estimulación inmune moderada, el NO liberado de los macrófagos puede regular la activación del eje HPA para disminuir los efectos fisiológicos adversos debido al estrés. La observación de que la administración de L-NAME aumenta el incremento inducido por citocina en ACTH apoya esta afirmación ^(17, 22).

En las exposiciones breves al estrés de moderada intensidad, la liberación de las hormonas del estrés resulta en una potenciación del funcionamiento del organismo y una movilización total. Sin embargo, si la reacción de estrés es intensa o prolongada y está acompañada por una considerable liberación de hormonas, las células se exponen a la oxidación por radicales libres, una sobrecarga de calcio intracelular, supresión de la producción de energía, disminución en la síntesis de proteínas y, desnaturalización de la estructura proteica. Lo cual ejerce una acción nociva en los tejidos y órganos, a partir de lo cual, la reacción de estrés se transforma de un proceso de adaptación a una causa de varias enfermedades.

El NO difunde fácilmente a través de las membranas, no se almacena en vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis después de la despolarización de la membrana. La acción del NO finaliza principalmente por la reacción con su blanco. Entonces, el control de la síntesis del NO, es la principal forma para regular la acción del NO. Grandes avances se vienen haciendo para entender la regulación de la actividad de la NOS y los blancos celulares y moleculares en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

NO y Hsp70

Recientemente, se ha encontrado que el NO activa la síntesis de las proteínas protectoras del estrés (Hsp70) ^(23, 24). Esto significa que la activación de las Hsp70 dependiente del NO puede constituir un importante mecanismo antiestrés en la defensa celular. Las Hsp70 participan en la recuperación de las proteínas dañadas por el estrés ⁽²⁵⁾.

Todos los datos presentados aquí permiten formular la hipótesis que el NO contribuye a la regulación de la reacción del estrés a través de la limitación de su activación y sus efectos perjudiciales para el organismo. Si esta hipótesis es correcta, entonces, un incremento en los niveles de NO limitarían la sobreactivación del sistema de estrés, y viceversa, una disminución en la producción de NO, podría potenciar los efectos dañinos de los factores estresantes ambientales.

Los experimentos de Malyshev y Manuklina confirman la hipótesis anterior ⁽²⁶⁾. Estos científicos, basados en el postulado de Meerson, definen al sistema de generación del NO como un nuevo sistema limitante del estrés en los humanos y animales; y se sustentan en las siguientes características de sistema nitroérgico limitante del estrés: 1) se induce por el estrés, 2) es capaz de limitar la reacción de estrés, 3) tiene la capacidad de aumentar la resistencia a los factores ambientales, 4) la capacidad del NO de aumentar y de los inhibidores de la NOS a disminuir la resistencia al estrés y la adaptación de los organismos; y 5) capacidad para aumentar su actividad en el proceso de adaptación.

OPORTUNIDAD PARA EL PERÚ Y LAS PLANTAS MEDICINALES

El rol del NO en la reacción del estrés y en los mecanismos genéticos de la adaptación apertura un futuro

promisorio en la investigación y desarrollo de sustancias que tengan la propiedad de modular el sistema generador del NO, y se conviertan en candidatas a ser medicamentos. La disminución de la producción del NO es causa de varias enfermedades y patologías como aterosclerosis, isquemia cardíaca, trombosis, diabetes, hipertensión estenosis esfinter pilórica, etc., en las cuales está presente el estrés (27). Pero también, la sobreproducción del NO produce disminución en la presión sanguínea y desórdenes en la respuesta vasoconstrictora, característica del shock de origen diverso (28). La aplicación de métodos de adaptación que favorecen un incremento en la producción de NO puede ser un medio eficiente de prevención y tratamiento de enfermedades asociadas con la deficiencia o la sobreproducción de NO; del mismo modo, modificando la producción de NO puede ser útil para mejorar la respuesta adaptativa en el deporte, el espacio y la aviación.

En un trabajo realizado por nosotros, que tuvo por objetivo determinar el efecto del extracto acuoso de las hojas de coca (*Erythroxylum coca*), administrado por vía intramuscular, sobre los niveles elevados de NO en pollos de carne criados en condiciones no controladas (estrés), se encontró que el extracto acuoso de coca disminuye significativamente los niveles elevados de NO (29), y su efecto se aprecia a concentraciones muy bajas como de 40 mg de polvo de hojas por kg de peso (40 mg/kg) del animal. Si consideramos que la concentración de los principios activos en el polvo de las hojas es (aproximadamente) del 10%, entonces estamos tratando con una dosis de 4 mg/kg, lo cual es (significativamente) mucho menor en comparación con el inhibidor de la NOS L-NAME usado a la dosis de 150 mg/kg. Este resultado es muy alentador.

El Perú con su biodiversidad muy conocida debe responder a este reto (30), los profesionales estamos convocados a aprovechar esta gran oportunidad que nos presenta el NO como nuevo sistema limitante del estrés.

REFLEXIONES FINALES

Finalmente, hacemos las siguientes reflexiones: 1) ¿se puede utilizar al NO como un indicador del estrés?, si así fuera, 2) ¿se puede desarrollar alguna técnica apropiada para esta determinación? y, 3) ¿seremos capaces de aprovechar esta nueva oportunidad terapéutica para las plantas medicinales y los productos naturales?

Bibliografía

- Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, 22: 477-481, 1997.
- Forstermann H, Closs EI, Pollock M, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131, 1994.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slice. *Eur J Pharmacol*, 172: 413-416, 1989.
- Peunova N, Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature*, 364: 450-453, 1993.
- Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Neuronal nitric oxide reduces reduce sympathetic excitability by modulation of central glutamate effects in pigs. *Circ Res*, 80: 565-571, 1997.
- Matsumura K, Abe L, Tsuchihashi T, Fujishima M. Central nitric oxide attenuates the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Am J Physiol*, 274: R1142-R1149, 1998.

- Liu H, Terrel ML, Summy-Long JY, Kadekaro M. Brain Ang II and prostaglandins mediate the pressor response after central blockade of nitric oxide synthase. *Brain Res*, 785: 317-328, 1998.
- Calza L, Giardino L, Ceccatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport*, 4: 627-630, 1993.
- Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, Nakayama Y. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res*, 720: 159-171, 1996.
- Hashiguchi H, Ye SH, Ross-Cisneros F, Alexander N. Central nitric oxide donors attenuate cardiovascular and central norepinephrine responses to stress. *Am J Physiol*, 272: R1447-R1453, 1997.
- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*, 378: 383-386, 1995.
- Demas GE, Eliasson MJL, Dawson TM, Dawson VL, Kriegsfeld LJ, Nelson RJ, Snyder SH. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases aggressive behavior in mice. *Mol Med*, 3: 610-616, 1997.
- Espugues JV, Barrachina MD, Beltrán B, Calatayud S, Whittle BJR, Moncada S. Inhibition of gastric acid secretion by stress: a protective reflex mediated by cerebral nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14839-14844, 1996.
- Travagli RA, Gillis RA. Nitric oxide-mediated excitatory effect on neurons of dorsal motor nucleus of vagus. *Am J Physiol*, 266: G154-G160, 1994.
- Yamada K, Emson P, Hokfelt T. Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat*, 10: 295-316, 1996.
- Owens MJ, Nemeroff CB. Physiology and pharmacology of corticotropin releasing factor. *Pharmacol Rev*, 43: 425-473, 1991.
- Rivier C, Shen GH. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1b, vasopresin, and oxytocin. *J Neurosci*, 14: 1985-1993, 1994.
- Sharp BM, Matta SG. Prostaglandins mediate the adrenocorticotropin response to tumor necrosis factor in rats. *Endocrinology*, 132: 269-274, 1993.
- Karanth S, Lyson K, McCann SM. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor from incubated hypothalami. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 3383-3387, 1993.
- Kim CK, Rivier C. Influence of nitric oxide synthase inhibitors on the ACTH and cytokine responses to peripheral immune signals. *J Neuroendocrinol*, 10: 353-362, 1998.
- Yang W, Oskin O, Krukoff TL. Immune stress activates putative nitric oxide-producing neurons in rat brain: cumulative effects with restraint. *J Comp Neurol*, 405: 380-387, 1999.
- Rivier C. Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne interleukin-1b: Role of vasopresin, prostaglandins, and α 1-adrenergic receptors. *Endocrinol*, 136: 3597-3603, 1995.
- Malyshev IY, Malugin AV, Golubeva LY, Zenina T, Manukhina EB, Mikoyan VD, Vanin AF. Nitric oxide donors induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett*, 391: 21-23, 1996.
- Malyshev IY, Bayda LA, Trifonov AI, Larionov NP, Kubrina LD, Mikoyan VD, Vanin AF, Manukhina EB. Cross-talk between nitric oxide and HSP70 in the antihypertensive effect of adaptation to heat. *Physiol Res*, 49: 99-105, 2000.
- Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92: 2177-2186, 2002.
- Malyshev IY, Manukhina EB. Stress, adaptation and nitric oxide. *Biochemistry*, 63: 992-1006, 1998.
- Gross SS, Wolin MS. Nitric-oxide - Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 57: 737-769, 1995.
- Wink DA, Mitchell JB. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cut o protective mechanism of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 25:434-456, 1998.
- Vergara Almonacid LF. Efecto de la coca (*Erythroxylum coca*) sobre los niveles elevados de óxido nítrico en pollos de carne. Tesis de Titulación. Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Peruana Los Andes, Huancayo. 60p, 2005.
- Angulo Herrera P. El bosque tropical como fuente de nuevos medicamentos. En: *La Medicina Tradicional en el Desarrollo de Fitomedicamentos, el Enfoque Etnofarmacológico*. Lima: Editorial de Mar, pp. 73-110, 1997.

Agradecimientos:

La preparación de esta revisión ha sido financiada por PHARMASCIENS SAC (MY)