

TRABAJO DE REVISIÓN

Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena

PARTICIPACIÓN DEL GEN DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO 1 EN LA PATOGÉNESIS DEL ASMA

MC. Beatriz Martínez Alfaro, Est. María Angélica Trespalcio Romero y MD. Luis Caraballo Gracia

RESUMEN

Se realizó una revisión que abarca los aspectos más importantes de la fisiología y genética del gen de la sintasa del óxido nítrico 1 así como su participación en la patogénesis del asma. El asma es una enfermedad común y compleja, caracterizada por obstrucción de las vías aéreas, hiperreactividad bronquial y en muchos casos atopia. Su causa aún no está bien definida, pero se conoce que está influenciada por factores genéticos y ambientales. Para tratar de esclarecer la fuente precisa de la enfermedad, se realizan análisis de genes candidatos y al nivel ambiental la influencia de los alérgenos de ácaros y otros factores de riesgo en el desarrollo de asma. Dentro de los genes candidatos, el gen de la sintasa del óxido nítrico 1 ha cobrado gran interés por su amplio papel en la patogénesis del asma, porque actúa como un neurotransmisor y broncodilatador que provoca una hiperrespuesta en las vías aéreas.

Palabras clave: Óxido nítrico sintasa (NOS), asma, óxido nítrico (NO), isoformas, patogénesis, neurotransmisor, hiperreactividad, multifactorial, splicing, 5' utr (un-translate region).

El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas llamadas sintasas del óxido nítrico (NOS) de la que se conocen 3 isoformas. En el humano una de estas isoformas es la nNOS, denominada también NOS neuronal o NOS1 porque abunda en tejido nervioso, de donde fue originalmente

clonada; aunque también está presente en otros tejidos como el riñón y las células del músculo esquelético.¹ Otra isoenzima es la iNOS (NOS inducible; NOS2 en el humano) denominada así porque su expresión se induce por un agente que activa el sistema inmune. La tercera isoforma es la eNOS (NOS endotelial, NOS3 en el humano), de-

nominada así porque es constitutiva de las células del endotelio vascular, aunque está presente en otros tejidos como el miocardio.^{2,3} Las isoformas de la NOS se expresan al nivel de las vías bronquiales y los genes que codifican cada una se encuentran ubicados en cromosomas distintos, así la NOS1 se halla ubicada en el cromosoma 12q24, la NOS2 en el 17q12 y la NOS3 en el 7q35-36.^{4,6} En esta revisión se describe la fisiología de la NOS1, haciendo énfasis en su participación en la patogénesis del asma.

FISIOLOGÍA Y METABOLISMO DE LA NOS1

El endotelio vascular produce y libera sustancias vasodilatadoras, dentro de estas figura el óxido nítrico (NO) (antiguamente conocido como *factor relajador derivado del endotelio* o EDRF). El NO es un gas liposoluble que se difunde y atraviesa con facilidad las membranas celulares. Es un radical libre muy inestable que reacciona rápidamente con el oxígeno para formar nitrito, esto condiciona que su función como mediador de comunicación intercelular sea de tipo paracrino y autocrino.^{3,7}

Su biosíntesis no está restringida a un tejido en particular, pero se sabe que se produce de manera abundante en el Sistema Nervioso Central y Periférico e igualmente se ha detectado en el endotelio vascular, debido a la acción que ejercen las sintetasas de óxido nítrico, especialmente la NOS1. Esta última es miembro de un grupo de enzimas que cataliza la oxidación del electrón 5 de la L-arginina para formar L-citrulina y NO; es dependiente de la vía calcio/calmodulina para ejercer su mecanismo de acción, al igual que la NOS3.^{3,8} En el cerebro controla procesos como la formación de la memoria e intensifica la respuesta ante la presencia de un estímulo dañino.⁹ En el Sistema Nervioso Periférico

la NOS1 actúa como un neurotransmisor, neuromodulador o como una molécula de transmisión de señales intracelular. Participa en la plasticidad sináptica, regulación de la expresión de genes, desarrollo, diferenciación y regeneración; desempeña un papel importante en los problemas neurodegenerativos y se comporta como un mediador de neurotoxicidad.^{10,11}

Por otro lado NOS1 está fisiológicamente ligada al asma porque actúa como un neurotransmisor broncodilatador de terminaciones nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas.¹¹ Recientemente se ha demostrado la importancia fisiológica del NOS1 en modelos murinos con asma alérgica. En este estudio los ratones carentes del gen que codifica para la NOS1 presentan hiperrespuesta al reto con metacolina en comparación con los ratones tipo silvestre.¹⁰

Más reciente Lührs y otros, demostraron que la NOS1 en el pulmón humano es expresada predominantemente en células endoteliales de los capilares de septos alveolares; lo que sugiere que el NO producido puede actuar, entre otras cosas, como regulador de la permeabilidad capilar. Este hallazgo es importante porque se ha demostrado que el NO producido endógenamente y el inhalado, están implicados en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos en el pulmón humano.¹²

ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NOS1

Las sintetasas de óxido nítrico humanas son flavocitocromos diméricos que catalizan la síntesis de NO. Poseen 2 dominios catalíticos, uno de actividad reductasa que está ubicado en la mitad de C-terminal de la enzima y presenta los sitios de unión para los cofactores NADPH, FAD y FMN, el

otro dominio de actividad oxidasa está compuesto por un grupo hemo ubicado en la mitad del N-terminal de la proteína, y determina la oxidación de la L-arginina. Ambos dominios están separados por un sitio de unión para la calmodulina (fig. 1).¹³ Por otra parte, recientes estudios realizados a partir del aislamiento de RNA total de distintos tejidos de ratas, demuestran la existencia de 3 distintas especies de mRNA de NOS1, designadas: NOS1a, que es la isoforma más abundante, encontrada especialmente en el cerebro; NOS1b solo expresada en tejido embrionario y NOS1c en el riñón.³ El mRNA de la NOS1 es expresado a altos niveles en el músculo esquelético humano, y cuando es procesado alternativamente produce una isoforma específica del músculo llamada NOS1m.¹⁴

ESTRUCTURA DEL GEN NOS1

El análisis de la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la NOS1 reveló que es un *locus* complejo formado por 29 exones y 28 intrones; abarca una región de aproximadamente 240 kb como una sola copia en el DNA genómico. Los exones tienen un tamaño promedio que varía de 59 a 2 150 nucleótidos. El exon 2 es el sitio de iniciación de la traducción y el exon 29 el sitio de terminación (fig. 2).⁶ La complejidad de este gen se debe a que durante la transcripción del RNA mensajero se generan diferentes alternativas de empalme en el primer exon con diferentes regiones 5' *Untranslated Region* (5' UTR). Recientemente *Newton* y otros describieron 9 variantes en el exon 1, ubicadas en un fragmento de 105 kb aproximadamente, es-

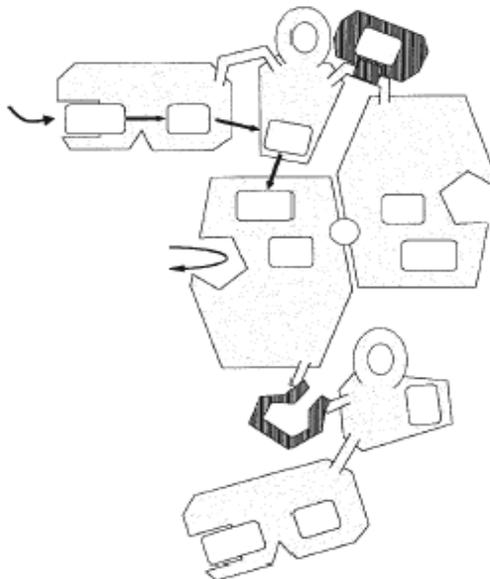


Fig. 1. Representación esquemática de los dominios C y N-terminal de las NOS y el sitio de unión a Calmodulina. Tomado de: Daff S, Noble MA, Craig DH, Rivers SL, Chapman SK, Munro AW, et al. Control of electron transfer in neuronal NO synthase. *Biochemical Society Transaction* 2001; 29: part 2: 147-152.

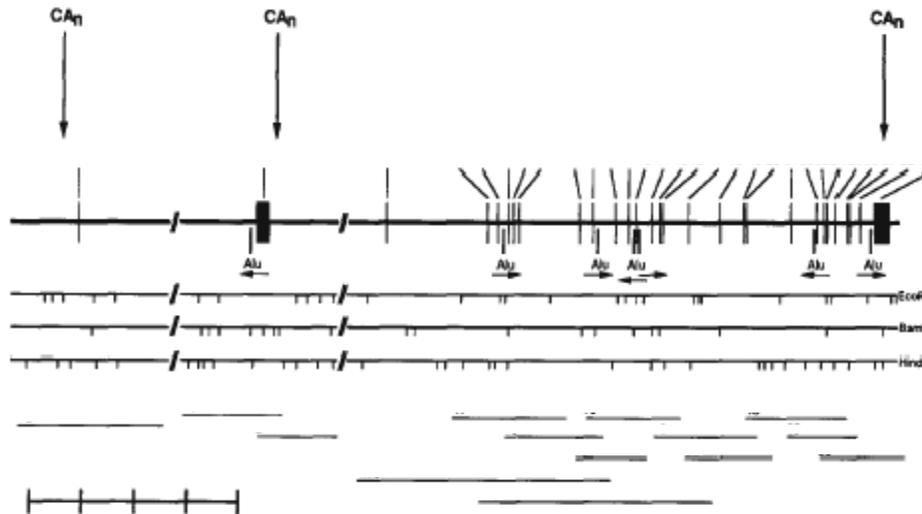


Fig. 2. Organización de NOS1. El gen está conformado por 29 exones y 28 intrones numerados en la gráfica. Las barras gruesas y oscuras representan el sitio de iniciación (exon 2) y de terminación (exon 29) de la traducción. Tomado de: Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus A, Olson SL, et al. Structural Organization of the Human Neuronal Nitric Oxide Synthase gene (NOS1). *J. Biol. Chem.* 1994; 269(52): 33082-90.

tas fueron designadas como variantes 1a hasta 1i. En un estudio más reciente los mismos investigadores describen un mecanismo de empalme alternativo que afecta la eficiencia en la traducción del gen NOS1, pero que no modifica la secuencia de la proteína.^{14,15} Estos resultados confirman que el desarrollo y la expresión tejido-específica de la NOS1 está estrechamente regulada por un patrón complejo de procesamiento alternativo, como lo había planteado Lee y otros hace varios años.¹⁶

Hasta el momento hay descritas 10 variantes alélicas en el exon 29 que corresponden a un polimorfismo repetido del dinucleótido CA. Han sido reportadas, además, 9 variantes distintas en el intron 20, en una unidad de repetición del tipo tri-nucleótido (AAT)n. Cabe anotar que estos alelos fueron descritos en pacientes asmáticos provenientes de varias poblaciones.¹⁷⁻¹⁹

PATOGÉNESIS DEL ASMA

El asma es una enfermedad multifactorial influenciada por factores genéticos y ambientales. Es caracterizada por obstrucción de las vías aéreas, hiperreactividad bronquial y en muchos casos atopia. Además es un desorden inflamatorio en el que participan distintos tipos de células que liberan gran cantidad de citoquinas y otros mediadores.²⁰

A pesar de los intensos esfuerzos de los investigadores, el asma sigue siendo un gran reto médico y científico. La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado 75 % entre 1980 y 1998. En el 2001 la *National Health Interview Survey* estimó que en EE. UU. 6,9 % de adultos y 8,9 % de niños menores de 18 años, padecen asma. La razón por la que la prevalencia ha aumentado ha sido materia de intensas especulaciones, además, los mecanismos patogénicos de la

enfermedad y la contribución de los factores genéticos también son poco entendidos.²¹ La exposición a alérgenos y otros estímulos no específicos inducen la broncoconstricción del músculo liso, con obstrucción aguda de las vías aéreas. La liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios producto de la estimulación de las células Th2 por parte de las células presentadoras de antígenos, es otro de los mecanismos observados en asma, porque esas citoquinas proinflamatorias estimulan la producción y liberación de eosinófilos en la médula ósea y su reclutamiento en el tejido pulmonar.²² Recientemente Wu y otros, mostraron la primera evidencia directa de que una reacción de brominación puede contribuir al daño del tejido pulmonar. La peroxidasa de los eosinófilos que generan esas especies reactivas, y el reclutamiento y activación de eosinófilos en el tejido pulmonar es una característica de esa enfermedad inflamatoria.²³

La evidencia del incremento de los niveles de NO en pacientes asmáticos, a pesar de que su mecanismo molecular y celular no esté aún bien entendido, son mostrados en algunos estudios; los cuales sugieren que el NO relaja la musculatura lisa, inhibe las proteínas de transmisión de señales de las células inflamatorias y contribuye a la inflamación de las vías aéreas, porque actúa como un neurotransmisor, vasodilatador y mediador inflamatorio.^{10,24}

NOS1 es un gen candidato^{25,26} atractivo para asma por varias razones: Primero, la fracción de óxido nítrico en aire exhalado (FENO) está proporcionalmente aumentada en pacientes con asma.^{27,28} Segundo, numerosos datos experimentales a partir de estudios tanto en humanos como en animales indican que los factores neurogénicos tienen importancia en el asma.^{29,30} Y tercero, NOS1 es importante en modelos asmáticos con hiperrepuesta de las vías aéreas: como lo demuestran ensayos realizados en ratones con delección de la NOS1,

los cuales tienen valores bajos de FENO, fallando la enzima para generar repuestas fuertes en las vías aéreas de dichos ratones, en comparación con los de tipo silvestre después de la sensibilización y el reto con alérgenos.^{10,31} Además, la NOS1 es en parte la responsable de la producción de gran cantidad de moco que obstruye las vías respiratorias, por tanto puede estar relacionada con enfermedades alérgicas.

CONCLUSIONES

- La NOS1 es una enzima que genera óxido nítrico como producto final en la biosíntesis del aminoácido L-arginina. Esta enzima es abundante en las vías aéreas y en neutrófilos, y está fisiológicamente ligada a asma porque actúa como un neurotransmisor broncodilatador de terminaciones nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas, además de ser en parte la responsable de la producción de gran cantidad de moco que obstruye las vías respiratorias; por tanto, está relacionada con enfermedades alérgicas y es un gen candidato importante y atractivo en estudios de asociación con asma.
- Existen muchos reportes del estudio de múltiples genes y su participación en la patogenénesis del asma, aún se hace necesaria la búsqueda de más genes con el fin de que esta información genética sea útil para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y pruebas diagnósticas, como por ejemplo la fabricación futura de drogas más eficaces y seguras para todos los pacientes asmáticos. La información genética permitirá identificar sujetos con un mayor riesgo y realizar intervenciones a tiempo; también identificará fenotipos asmáticos específicos que puedan ser tratados de forma más precisa, y además brindará una mejor comprensión de las bases fisiopatológicas de este padecimiento.

SUMMARY

A review of the most important aspects of physiology and genetics of type 1 nitric oxide synthase gene as well as its involvement in asthma pathogenesis was made. Asthma is a common and complex disease characterized by obstruction of airways, bronchial hyperreactivity and in many cases atopy. The fundamental cause of this disease is not yet well defined but it is known that genetic and environmental factors have their bearing on it. To clarify the exact origin of this disease, candidate genes, the influence of mite allergens at environmental level and other risk factors for asthma were all analyzed. Among candidate genes, type 1 nitric oxide synthase gene has aroused great interest due to its extensive role in asthma pathogenesis because it acts as a neurotransmitter and bronchodilator that provides hyperresponse in airways.

Key words: Nitric oxide synthase, asthma, nitric oxide, isoforms, pathogenesis, neurotransmitter, hyperreactivity, multifactor, splicing, 5' utr (un-translated region).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997;9:2146-52.
2. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100(10):2417-23.
3. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998;12:775-90.
4. Marsden PA, Heng H, Scherer S, Stewart R, Hall AV, Shi X, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478-88.
5. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269(9):6765-72.
6. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus A, Olson SL, et al. Structural Organization of the Human Neuronal Nitric Oxide Synthase gene (NOS1). *J Biol. Chem* 1994;269(52):33082-90.
7. Kanai AJ, Strauss HC, Truskey GA, Crews AL, Grunfeld S, Malinski T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells. measured directly with a porphyrinic microsensor. *Circ Res* 1995;77:284-93.
8. Brecht DS, Ferris CD, Synder SH. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 1991;267:10976-181.
9. Christopherson KS, Brecht DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997;100(10):2424-9.
10. De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott A, Jiao A, et al. Contribution of nitric oxide synthase 1, 2 and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J Exp Med* 1999;189:1621-30.
11. Belvisi MG, Ward JK, Mitchell JA, Barnes PJ. Nitric oxide as a Neurotransmitter in human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995;329:97.
12. Lührs H, Papadopoulos T, Schmidt H, Mendel T. Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells. *Respir Physiol* 2002;129:367-74.
13. Daff S, Noble MA, Craig DH, Rivers SL, Chapman SK, Munro AW, et al. Control of electron transfer in neuronal NO synthase. *Biochem Soc Transact* 2001;29(part 2):147-52.
14. Silvagno F, Xia H, Brecht DS. Structural Organization of the human neuronal -m, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996;271:11204-8.
15. Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, et al. Translational regulation of human neuronal nitric oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon. *J Biol Chem* 2003;278(1):636-44.
16. Lee MA, Cai L, Hübner N, Lee YA, Lindpaintner R. Tissue and development-specific expression of multiple alternatively spliced transcripts of rat neuronal nitric oxide synthase. *J Clin Immunol* 1997;100(6):1507-12.
17. Grasmann H, Drazen JM, Deykin A, Israel E, De Sanctis GT, Pillari A, et al. Simple Tandem Repeat Polymorphisms in the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene in Different Ethnic Populations. *Hum Heredity* 1999;49:139-41.

18. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, et al. Exhaled Nitric Oxide in Patients with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2043-7.
19. Grasemann H, Yandava CN, Storm Van's K, Deykin A, Pillari A, Ma J, et al. A neuronal NO synthase (NOS1) Gene Polymorphism is Associated with Asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:391-4.
20. Barnes KC. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetics analysis of asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1999;29(Suppl)4:47-51.
21. Verceli D. Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J Clin Invest* 2003;111:1815-7.
22. Heinecke JW. Eosinophil-dependent bromination in the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2000;105(10):1331-2.
23. Wu W, Samoszuk MK., Comhair SA, Thomassen MJ, Farver CF, Raed AM, et al. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *J Clin Invest* 2000;105:1455-63.
24. Sanders SP. Nitric Oxide in Asthma Pathogenic, Therapeutic, or Diagnostic? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:147-9.
25. Hakonorso H, Halapi E. Genetic analyses in asthma. Current concepts and future direction. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2(3):156-66.
26. Caraballo L. The influence of genes on the Etiology of Asthma. *ACI Int* 1999;11(5):182-9.
27. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes, PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatics patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
28. Kharitonov SA, Yates D, Springall DR, Buttery L, Polak J, Robbins RA, et al. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest* 1995;107:156S-7S.
29. Fernandes L, Ellis J, Udem B. Nitric oxide and VIP as co-transmitter of neurogenic relaxation of human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1689-90.
30. Barnes PJ. Is asthma a nervous disease? *Chest* 1995;107:119-21S.
31. De santics GT, Mehta S, kobzik L, Yandava C, Jiao AP, Huang PL, et al. Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am J Physiol* 1997;17:L883-8.

Recibido: 27 de enero de 2004. Aprobado: 22 de marzo de 2004

Dra. *Beatriz Martínez Alfaro*. Centro, San Diego, Calle de la Tablada 7-57. Cartagena, Bolivar, Colombia. Tel: 057 56 648993. Correo electrónico: bmartínez@enred.com