

Escuela Latinoamericana de Medicina

## ÓXIDO NÍTRICO, MUTAGÉNESIS Y CÁNCER

Lic. Daríel Díaz Arce

### RESUMEN

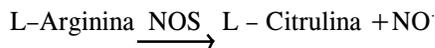
Se realizó una revisión de los posibles mecanismos generadores de mutaciones, mediados por las especies reactivas derivadas del NO (RNOS), y su relación con la carcinogénesis. Las RNOS potencialmente pueden dañar el ADN de forma directa mediante procesos de oxidación, desaminación y metilación de bases; e indirecta inhibiendo la actividad de las enzimas reparadoras. La oxidación de bases conduce fundamentalmente a transversiones y la desaminación a transiciones. La especie reactiva  $N_2O_3$  puede reaccionar con aminas biógenas generando N-nitrosaminas, reconocidos agentes alquilantes. La inhibición de las enzimas se manifiesta por la reacción de las RNOS con grupos nucleofílicos de aminoácidos críticos para la actividad enzimática. Todos estos mecanismos pudieran favorecer de una u otra forma a la ocurrencia de mutaciones en el ADN, implicadas en la activación de oncogenes o inhibición de genes supresores de tumores, o ambas, favoreciendo así el surgimiento y desarrollo tumoral.

*Palabras clave:* Óxido nítrico; cáncer; mutagénesis; p53; especies reactivas del óxido nítrico; inflamación.

El óxido nítrico (NO) es una molécula que desempeña importantes funciones en procesos fisiológicos y patológicos en humanos. Su implicación en el funcionamiento de los sistemas inmune, cardiovascular y nervioso ha sido ampliamente detallada.<sup>1-3</sup> Este gas es producido en cantidades abundantes bajo condiciones asociadas a procesos inflamatorios, reconocido factor de riesgo para el surgimiento y desarrollo del cáncer.<sup>4</sup>

Su síntesis es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuyo único

sustrato fisiológico parece ser el aminoácido L-arginina.<sup>2</sup> La presencia y elevada actividad de estas enzimas se ha reportado en algunos tipos de tumores,<sup>5,6</sup> y además correlacionada positivamente con daños al ADN.<sup>5</sup>



Todo lo anterior ha hecho enfocar múltiples investigaciones para desentrañar el verdadero papel de este gas en la carcinogénesis. En esta revisión se pretenden analizar algunas evidencias que rela-

cionan directamente al NO· con el surgimiento de tumores.

#### DESTINOS FISIOLÓGICOS DEL NO·

Una vez sintetizado el NO, su destino en los sistemas biológicos es regido por los procesos siguientes:

1. Difusión a células vecinas. La presencia de un electrón no apareado en su molécula le permite interactuar con metales de transición de algunas enzimas y así modular su actividad.<sup>7,8</sup> El coeficiente difusional de este gas depende de los lípidos y proteínas que se encuentren a su paso.<sup>9</sup>
2. Autoxidación del NO·. Generalmente se produce cuando se incrementan mucho sus concentraciones intracelulares, el cual en presencia del O<sub>2</sub> se convierte en trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).<sup>10,11</sup> Esta reacción se acelera cuando ocurre en sitios hidrofóbicos como en el interior de las membranas lipídicas o de núcleos proteicos.<sup>11,12</sup> El N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> es un agente nitrosante poderoso, con gran afinidad por sitios nucleofílicos.<sup>8</sup>
3. Reacción con superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para formar peroxinitrito (ONOO·). Esta reacción presenta una cinética de tipo difusión-limitante, por lo que se plantea que es la que rige el destino del NO en presencia del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).<sup>13,14</sup> El producto es altamente oxidante, com-

parado en algunas ocasiones con el radical OH.

#### MECANISMOS GENOTÓXICOS DEL NO·

Actualmente se considera que el NO· es capaz de generar lesiones en la secuencia primaria del ADN y otras biomoléculas, y de esta forma mediar el surgimiento y desarrollo tumoral. Los mecanismos por los cuales este gas puede producir esos daños son explicados a partir de los efectos deletéreos de las especies reactivas derivadas de él.

1. Mecanismos de daño directo al ADN por especies reactivas derivadas del NO· (RNOS).

- Formación endógena de N-nitrosaminas carcinogénicas.

Las N-nitrosaminas son compuestos químicos con potencial carcinogénico reconocido, debido a que pueden ser metabolizadas a fuertes agentes alquilantes.<sup>15</sup> Se sintetizan mediante la reacción del agente electrofílico N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> con aminas biógenas según la primera reacción representada en la figura 1.

La formación endógena de estos compuestos se ha demostrado en líneas celulares de hepatocitos inmortalizados con el virus de los simios SV 40 Tag.<sup>16</sup>

- Desaminación de bases.

Las N-nitrosaminas de aminas primarias pueden generar iones diazonium, los

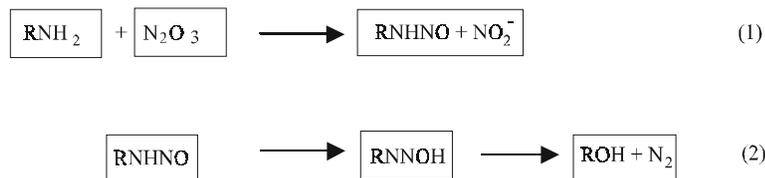


Fig. 1. Desaminación mediada por el N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

que se hidrolizan espontáneamente a alcoholes como se representa en la reacción 2 de la figura 2.

La presencia de este tipo de aminas en la estructura de las bases nitrogenadas indica que estas pueden ser desaminadas por el  $\text{NO}\cdot$  vía  $\text{N}_2\text{O}_3$ , generándose alteraciones puntuales con potencial mutagénico.<sup>17,18</sup>

Experimentos *in vitro* han aportado evidencias, las cuales sugieren que la desaminación de bases por este mecanismo parece tener un patrón de mutaciones dirigido fundamentalmente a las bases púricas, aunque también se pueden afectar las pirimidínicas.<sup>1</sup> Las mutaciones más comunes son las transiciones guanina (G) a adenina (A) y viceversa.<sup>18</sup> También es frecuente la formación de bases modificadas como la oxantina, derivada de la guanina, que puede producir entrecruzamientos inespecíficos ADN-proteínas.<sup>20,21</sup> De esta manera se afecta la integridad del ADN por 2 mecanismos diferentes: provocar inestabilidad genómica por el entrecruzamiento entre las proteínas-ADN y actuar como un sustrato suicida para enzimas reparadoras de este daño.<sup>21</sup>

Se ha observado *in vitro* una mayor frecuencia de alteraciones en simples que en dobles cadenas de oligonucleótidos, eso su-

giere que este mecanismo mutagénico se produce cuando las bases se encuentran desprotegidas en eventos celulares como la replicación y la transcripción, en los que la doble hélice se abre.<sup>18</sup>

– Oxidación de bases.

Experimentos en macrófagos activados en cultivos celulares muestran daño oxidativo y por desaminación del ADN.<sup>7</sup> El análisis del destino del NO en estas células mostró que la mayor parte pasaba a la generación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ); un fuerte agente oxidante.<sup>22</sup>

El tratamiento de plásmidos de ADN con  $\text{ONOO}\cdot$  sintético y su inserción en sistemas biológicos para su replicación y posterior análisis, mostraron un espectro de mutaciones puntuales; fundamentalmente transversiones de guanina a timina (T) y de guanina a citosina (C).<sup>23</sup>

El poder oxidante de esta especie es suficiente también como para dañar directamente al azúcar y provocar sitios sin bases en el ADN,<sup>24</sup> además de oxidar y modificar las bases generando especies difíciles de reparar.<sup>25</sup> La formación de estas lesiones ocurren con más frecuencia en simples que en dobles cadenas, siendo reparada por la formamidopirimidina-DNA glicosilasa (Fpg).

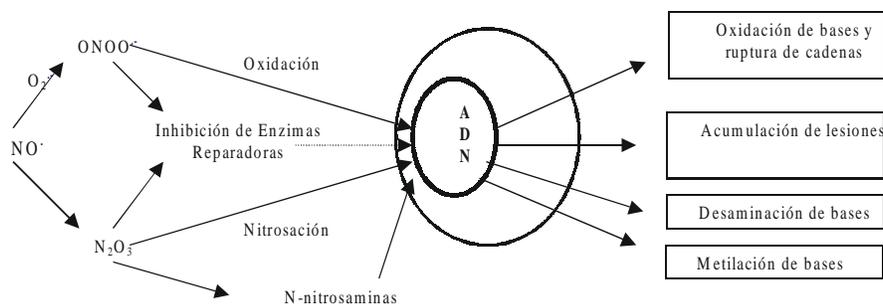


Fig. 3. Mecanismos mutagénicos del NO, mediados por sus especies reactivas (RNOS).

### *Modificación indirecta de la secuencia del ADN por las RNOS*

Algunos autores han sugerido que tanto la desaminación, oxidación y ruptura de cadenas del ADN por las RNOS requiere de concentraciones muy elevadas, situación que muy raramente se daría en humanos. Además, in vivo los antioxidantes como el ascorbato y el glutatión (GSH) son abundantes, lo que disminuye las posibilidades de acumularse RNOS a concentraciones suficientes como para producir daño al ADN directamente.<sup>26</sup> Es por ello que se han sugerido otras hipótesis.

Una hipótesis muy prometedora se basa en la inhibición de los sistemas enzimáticos reparadores de las lesiones en el ADN y de esta manera favorecer el daño indirectamente.

Las RNOS poseen una elevada afinidad por el grupo tiol (-SH) de la cisteína.<sup>27</sup> Lo anterior sugiere que aquellas enzimas con cisteínas críticas para su actividad, pueden ser inhibidas por estas especies reactivas. Otros grupos nucleofílicos como el hidroxilo (-OH) de la tirosina<sup>28</sup> y el amino (-NH<sub>2</sub>) de la lisina,<sup>13</sup> también son potencialmente modificables.

Jaiswal y otros (2001), observaron que las líneas celulares de colangiocarcinoma y colangiocitos transfectados con el gen de la NOS inducible (iNOS), eran incapaces de reparar la lesión 8-oxo-G.<sup>29</sup> Esta lesión es reparada por las enzimas Fpg y 8-oxo-guanina glicosilasa (Ogg1), enzimas que resultaron inhibidas por el NO y sus especies reactivas.<sup>30,31</sup> Estas evidencias pudieran explicar los resultados de Jaiswal y otros.<sup>29</sup>

Otras enzimas inhibidas por el NO resultaron ser las ADN alquiltransferasas reparadoras de los residuos metilados de G y T (O<sup>6</sup>-metil guanina y O<sup>4</sup>-metil timina),<sup>32</sup> y la enzima ADN ligasa.<sup>33</sup> La inhibición de esta última pudiera explicar el hecho de que cuando las células se exponen al NO, se observe un elevado número de rupturas de cadenas de ADN.<sup>22</sup>

### *El óxido nítrico en la iniciación y promoción tumoral*

Todos los mecanismos hasta ahora expuestos explican, desde diferentes puntos de vista, los efectos mutagénicos del NO (fig. 3). Estas mutaciones bien colocadas pudieran provocar la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes y de esta forma participar en diferentes etapas del proceso carcinogénico. Quizás el ejemplo más evidente de esto lo constituye el gen para la proteína p53, el cual se encuentra mutado en alrededor de 50 % de todos los tumores humanos.<sup>34</sup>

Estudios previos presentaron in vitro mutaciones de importancia biológica en el gen p53 inducidas por el NO y la metilación.<sup>35</sup> Posteriormente se demostró que en estadios iniciales del carcinoma de pulmón existe una correlación significativa entre la actividad de las NOS y las mutaciones presentes en dicho gen.<sup>5</sup>

Aunque en estos estudios no se analizó la funcionabilidad del producto génico, la hipótesis es suficiente como para plantear que el NO, en situaciones como la inflamación, puede provocar la inactivación del gen p53 y favorecer al menos de este modo el surgimiento y desarrollo tumoral.

## **SUMMARY**

A review was made on the possible mechanisms generating mutations mediated by the reactive species derived from NO (RNOS) and their connection with carcinogenesis. The RNOS may damage the DNA directly by

processes of oxidation, deamination and methylation of bases, and indirectly by inhibiting the activity of the repairing enzymes. The oxidation of bases leads mainly to transversions, whereas deamination leads to transitions. The reactive species  $N_2O_3$  may react with biogen amines generating N-nitrosamines, known as alkylating agent. The inhibition of the enzymes is manifested by the reaction of the RNOS with nucleophilic groups of critical aminoacids for the enzymatic activity. All these mechanisms may favor in one way or another the occurrence of mutations in the DNA involved in the activation of oncogens and/or inhibitors of tumor-suppressing genes, enabling this way the appearance and development of tumors.

*Key words:* Nitric oxide; cancer; mutagenesis; p53; reactive nitric oxide species; inflammation.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:879-86.
2. Weisinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:365-91.
3. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19(5):711-21.
4. Gaeta JF. Trauma and Inflammation. En: Bast RC., Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Hamilton: BC Decker; [en línea] c2000. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=books>
5. Fujimoto H, Sasaki J, Matsumoto M, Suga M, Ando Y, Iggo R, et al. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1998;89(7):696-702.
6. Eijjan AM, Piccardo I, Riveros MD, Porcella H, Jansis MA. Nitric oxide in patients with transitional bladder cancer. *J Surg Oncol* 2002;81(4):203-8.
7. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide ( $NO\cdot$ ) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288(2):F31-6.
8. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR. Biological life-time of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of  $NO$  and  $O_2$ . *Proc Natl Aca Sci USA* 2001; 98(1):355-60.
9. Porterfield M, Laskin JD, Jung SW, Malchew RP, Billack B, Smith PJS, et al. Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L904-12.
10. Espey MG, Miranda KM, Thomas D, Wink DA. Distinction between nitrosating mechanism within human cells and aqueous solution. *J Biol Chem* 2001;276(32):30085-91.
11. Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Aca Sci USA* 2002;99(9):5913-8.
12. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR. Accelerated reaction of nitric oxide with  $O_2$  within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Aca Sci USA* 1998;95:2175-9.
13. Espey MG, Thomas DD, Miranda KM, Wink DA. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. *Proc Natl Aca Sci USA* 2002;99(17):11127-32.
14. Daiber A, Frein D, Namgaladze D, Ullrich V. Oxidation and nitrosation in the nitrogen monoxide/superoxide system. *J Biol Chem* 2002;277(14):11882-8.
15. Wall BM, Dmochowski RR, Malecha M. Inducible nitric oxide synthase in the bladder of spinal cord injured patients with a chronic indwelling urinary catheter. *J Urol* 2001; 165(5):1457-61.
16. Liu RH, Jacob JR, Hotkiss JH, Tennant BC. Synthesis of nitric oxide and nitrosamine by immortalized woodchuck hepatocytes. *Carcinogenesis* 1993;14:1609-13.
17. Vangchampa V, Dong M, Gingipalli L, Dedan P. Stability of 2-deoxyxanthosine in DNA. *Nucleic Acids Res* 2003;31(3):1045-51.
18. Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitric oxide-induced deamination of cytosine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J Biol Chem* 1998;273(21):12689-95.
19. Suzuki T, Nakamura T, Yomada M, Ide H, Kanaori K, Tajima K, et al. Isolation and characterization of diazoate intermediate upon nitrous acid and nitric oxide treatment of 2'-deoxycytidine. *Biochemistry* 1999;38(22):7151-8.

20. Nakano T, Terato H, Asagoshi K, Ohyama Y, Suzuki T, Yamada M, et al. Adduct formation between oxanine and amine derivatives. *Nucleic Acids Res* 2002;(Suppl). (1):478.
21. Nakano T, Terato H, Asagoshi K, Masaoka A, Mukuta M, Yoshihito O et al. DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2003;278(27):25264-72.
22. Rojas-Walker T de, Tamir S, Ji H, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitric oxide induce oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 1995;8:473-7.
23. Tretyakova NY, Burney S, Pamir B, Wishnok JS, Dedan PL, Wogen GN, et al. ONOO<sup>-</sup> - induced DNA damage in the supF gene: correlation with mutational spectrum. *Mutat Res* 2000;447(2):287-303.
24. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):25-37.
25. Tretyakova NY, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesion at guanine nucleobases: chemical stability and recognition by Fpg DNA repair enzyme. *Chem Res Toxicol* 2000;13(7):658-64.
26. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. NO<sup>•</sup> and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the no so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 1999;31(6):651-69.
27. Jourdain D, Idem FL, Feelisch M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. *J Biol Chem* 2000;275(18):15720-6.
28. Fries D, Paxinos E, Themistocleous M, Swanber E, Griendling KK, Salvemini D, et al. Expression of nitric oxide synthase and intracellular protein tyrosine nitration in vascular smooth muscle cells. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2003;278(25):22901-7.
29. Jaiswal M, Larusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology* 2001;120(1):190-9.
30. Wink DA and Laval J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 1994;15:2125-9.
31. Jaiwal M, LaRuso NF, Nishioka N, Nakabeppu Y, Gores GJ. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res* 2001;61 (17):6388-93.
32. Laval F, Wink DA. Inhibition by nitric oxide of repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyl transferase. *Carcinogenesis* 1994;15:443-7.
33. Graziewicz M, Wink DA, Laval F. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity. Potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis* 1996;17:2501-5.
34. Oren M. Reugulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1999;274(51): 36031-4.
35. Murata J, Tada M, Iggo RD, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H. Nitric oxide as a carcinogen: análisis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide. *Mutat Res* 1997;379(2):211-8.

Recibido: 25 de marzo de 2004. Aprobado: 14 de junio de 2004.

*Lic. Dariel Díaz Arce. Departamento de Bioquímica, Km 3 ½ Carretera Panamericana, Santa Fé, Municipio Playa. Ciudad de La Habana, Cuba*