

El óxido nítrico y el cartílago articular

Francisco J. Blanco García^a, Francisco J. de Toro^b y Fausto Galdo Fernández^c

^aMédico adjunto. ^cJefe de Servicio. Laboratorio de Investigación del Cartílago. Servicio de Reumatología. Hospital Juan Canalejo. A Coruña. ^bProfesor Titular. Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidade Da Coruña. A Coruña.

En 1987 dos grupos de investigadores, uno inglés y otro norteamericano, llegaron^{1,2}, de forma independiente pero simultánea, a la conclusión de que el factor relajante derivado del endotelio (EDRF), descubierto en 1980 por Furchgott y Zawadzki, era el óxido nítrico (NO). Desde entonces esta molécula ha sido investigada ampliamente y se le han atribuido diferentes funciones: actúa como un mensajero neurológico en la erección del pene³; causa la relajación del músculo liso; inhibe la agregación de las plaquetas⁴; inhibe la adhesión de los leucocitos; interviene en la capacidad tumoricida y bactericida de los macrófagos⁵; interviene en los procesos de neurotoxicidad y neuroprotección⁶, e inhibe la proliferación celular⁷.

Su función en las enfermedades reumáticas, y concretamente en la artritis y la artrosis, ha alcanzado durante los últimos años un gran interés. En este trabajo haremos una revisión sobre los conocimientos actuales del NO y su relación con el cartílago articular humano.

El óxido nítrico

Biosíntesis y bioquímica

El óxido nítrico es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas llamadas sintetasas del óxido nítrico (NOS) (fig. 1). El NO es un radical gaseoso, es lábil y en presencia de oxígeno rápidamente se metaboliza a nitritos y nitratos. La bioquímica del NO es compleja y puede envolver a varias formas redox relacionadas. Las más importantes reacciones biológicas son las que tiene con el oxígeno, con iones metálicos y con radicales tioles libres. El NO tiene una vida media corta (t1/2

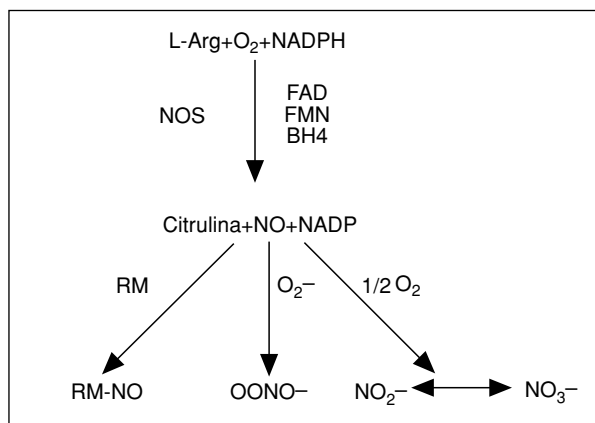


Figura 1. Biosíntesis del óxido nítrico. El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas llamadas sintetasas del óxido nítrico (NOS). En esta reacción compleja se necesita oxígeno y NADPH como sustratos y numerosos cofactores redox, entre los que se incluyen FAD, FMN, tioles reducidos y tetrahidrobiopterinas. El NO se oxida espontáneamente y da lugar a su forma inactiva, estable y definitiva, los nitritos y los nitratos (NO₂ y NO₃). Asimismo, el NO tiene gran afinidad por radicales libres como los que forman parte de otras proteínas enzimáticas (RM) o como el anión superóxido (O₂⁻) lo que le permite tener un amplio abanico de efectos biológicos.

< 15 s), sin embargo cuando el NO reacciona con los radicales libres se producen unos productos más estables (t1/2 > h) y además mantiene sus propiedades biológicas. El NO puede reaccionar también con radicales libres de oxígeno originándose peroxinitrito, que tiene efectos tóxicos sobre las células y tejidos. Finalmente, el NO estimula la ribosilación del ADP y de la enzima gliceraldehído 3 fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) en las plaquetas y otros tipos de células. Esta modificación de GAPDH inhibe la actividad de la enzima y disminuye los depósitos de energía intracelulares. El NO promueve la ADP-ribosilación de la G-actina en los neutrófilos humanos, lo que se asocia con la inhibición de la polimerización de la actina y la formación de sus fibras.

Genes del NO

El NO es sintetizado en las células de los mamíferos por una familia de tres enzimas llamadas sintetasas del óxido nítrico. Esta familia de enzimas ha

Correspondencia: Dr. F.J. Blanco García. Servicio de Reumatología. Hospital Juan Canalejo. Xubias de Arriba, 84. A Coruña.

Correo electrónico: fjblanco@ctv.es

Manuscrito recibido el 5-3-1999 y aceptado el 27-10-1999.

Rev Esp Reumatol 2000; 27: 99-106

TABLA 1. Sintetasas del óxido nítrico (NOS): isoenzimas

	Localización	Terminología	Cantidad NO producido	Duración de producción	Tipo de respuesta
Constitutiva (cNOS)	Neuronas	nNOS	Baja (pmoles)	Corta	Inmediata
Inducible (iNOS)	Endotelio	eNOS	Baja (pmoles)	Corta	Inmediata (segundos)
	Macrófagos				
	Condrocitos	iNOS	Alta (nmoles)	Larga	Retardada (horas)
	Hepatocito				

Otras localizaciones: tejido sinovial, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso del aparato digestivo, vasos sanguíneos pulmonares,

recibido diversas nomenclaturas (tabla 1). La nomenclatura utilizada inicialmente se basaba en las primeras observaciones según las cuales la síntesis del NO se producía principalmente en células no activadas, aunque se podría inducir su síntesis si se sometían a estímulos inductores. Así, se utilizó la clasificación de inducible (iNOS) localizada principalmente en los macrófagos, y constitutiva (cNOS) localizada en las neuronas (nNOS) y las células endoteliales (eNOS). Sin embargo, ahora sabemos que el grado de expresión genética de las dos formas constitutivas (nNOS y eNOS) puede ser también inducido por diferentes estímulos fisiológicos, y que la forma inducida (iNOS) funciona, asimismo, como una enzima constitutiva en determinadas condiciones fisiológicas en algunas células⁸. Por este motivo, actualmente no es totalmente aceptada la clasificación de inducible frente a constitutiva, y algunos autores prefieren la clasificación que hace referencia a cada uno de los tejidos en los que originalmente se aislaron los ADNc y las proteínas de las isoformas de la enzima: nNOS (neuronas); iNOS (macrófagos), y eNOS (endotelio)⁹.

El nNOS fue originalmente purificado y clonado en el tejido neuronal. Sin embargo, hoy sabemos que la nNOS se localiza en otros tejidos, como el músculo esquelético, donde existe una gran expresión de este gen.

El iNOS fue originalmente purificado y clonado en una línea celular macrófaga de ratón inactivada, pero actualmente se ha demostrado su presencia en múltiples tejidos y células (músculo cardíaco, hepatocitos, glía, condrocitos, etc.). La enzima inducible de los macrófagos murinos evidencia sólo un 50% de igualdad en la secuencia con respecto a la enzima neuronal. Como el NOS neuronal el NOS macrófagico tiene lugares de reconocimiento para FAD, FMN y NADPH y posee igualmente un lugar de unión a la calmodulina. El ARNm del NOS macrófagico está ausente en los macrófagos no activados o en el bazo, pero se puede detectar 2-6 h después del tratamiento con endotoxinas.

La eNOS, la última de las tres formas aisladas, fue originalmente purificada y clonada en el endotelio vascular. También se ha demostrado su presencia en el miocardio, las plaquetas y el hipocampo. Este gen codifica una proteína de 1.205 aminoácidos con una masa molecular de 133 kDa. La secuencia

de aminoácidos de la eNOS difiere en numerosos residuos de la secuencia determinada para la proteína cerebral bovina purificada, muestra entre un 50-60% de igualdad con la secuencia de las isoformas del macrófago murino y del cerebro de ratas.

Claramente, la misma isoforma puede tener diferentes funciones biológicas cuando se expresa en diferentes tejidos. Por ejemplo, el nNOS ARNm genera dos proteínas estructuralmente diferentes cuando la enzima está localizada en las neuronas o en el músculo esquelético¹⁰. Otro ejemplo de regulación específica del tejido es la que tiene lugar con la eNOS en las células endoteliales y en el miocardio¹¹. Por otra parte, la complejidad de la catálisis de NOS, reflejada por la diversidad de cofactores y cosustratos de NOS, confirma también la existencia de importantes diferencias entre los tejidos y sus mecanismos de regulación.

A pesar de estas diferencias, existen también datos relevante desde el punto de vista bioquímico que son comunes a las tres isoformas. En ellas, aproximadamente el 55% de los aminoácidos que forman la secuencia son iguales, en particular aquellas regiones de la proteína que intervienen en la reacción enzimática¹².

Regulación de las isoformas de NOS

La actividad de la enzima NOS puede ser manipulada actuando a distintos niveles de la reacción enzimática que ocasiona la síntesis de NO (tabla 1). Las diferentes formas de la enzima tienen un esquema similar de la zona catálisis, lo que afecta a la oxidación de los cinco electrones del nitrógeno terminal guanidínico del aminoácido L-arginina para formar NO y L-citrulina. En esta reacción compleja se necesita oxígeno y NADPH como sustratos y numerosos cofactores redox, entre los que se incluyen FAD, FMN, tioles reducidos y tetrahidrobiopterinas (fig. 1).

Calcio y calmodulina. En las tres formas de la enzima, la síntesis de NO depende de la capacidad de la enzima para unirse a la proteína reguladora del calcio, llamada calmodulina. Para que eNOS y nNOS se unan a la proteína calmodulina, y en consecuencia que se activen, es necesario un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Las isoformas eNOS y nNOS se vuelven totalmente

TABLA 2. Moduladores de la síntesis de óxido nítrico

I. Inhibidores de la síntesis de NO	
a)	Análogos del sustrato
	N nitro-L-arginina (L-NNA)
	N amino-L-arginina (L-NAA)
	N-metil-L-arginina (L-NMA)
b)	Ligandos de flavoproteínas
c)	Antagonistas de la CaM
d)	Quelantes del calcio
e)	Citocinas: TGFβ1-2-3; IL-4; IL-10; IL-8
f)	Otros: NO, CO, SOD
II. Estimuladores de la síntesis de NO	
1.	eNOS
a)	Ionoforos del calcio
b)	Estimulación eléctrica
d)	Acetilcolina
e)	Bradiquinina
2.	iNOS
a)	Interferón gamma
b)	LPS
c)	IL-1 β
d)	TNF-α

activas con concentraciones de Ca²⁺ mayores o iguales de 500 nM^{14,15}. Por el contrario, la calmodulina asociada a iNOS tiene una gran afinidad por el Ca²⁺, de esta forma son necesarios valores muy bajos para poder activar la enzima, y las variaciones en las concentraciones no afectan a la unión de la iNOS con la calmodulina ni, por lo tanto, al proceso de activación y desactivación de la enzima¹². De esto se deduce que la actividad de la eNOS y la nNOS está en gran parte modulada por los cambios intracitoplasmáticos de Ca²⁺, mientras que la actividad de la iNOS en células inmunoactivadas no depende de forma tan estricta de las concentraciones de calcio. Esto llevó a pensar que la nNOS y eNOS eran dependientes del calcio y la iNOS era independiente del calcio. Hoy sabemos que esto no es cierto, y que lo que existe en realidad es una diferencia en la concentración del calcio necesario para unirse a la calmodulina^{5,13}.

Cofactores de NOS. Todas las isoformas de NOS requieren la presencia de L-arginina, tetrahidrobipoterina, NADPH, FAD y FMN para la plena actividad enzimática y la consiguiente síntesis de NO. Teniendo en cuenta estas necesidades, se han sintetizado una serie de fármacos capaces de inhibir la

síntesis del NO. En el caso de la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-iminoetil-L-orнитina (L-NIO) y NG-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME), la inhibición tiene lugar porque compiten por la enzima con el verdadero sustrato de la reacción (L-arginina). Por otra parte, considerando la necesidad de una flavoproteína dependiente de NADPH, se demostró que los inhibidores de las flavoproteínas, como la difenileneiodonium (DPI), di-2-tieniliodonium (DTI) e iodoniumdifeníl (ID), inhiben también las NOS de los macrófagos y del endotelio¹⁶.

Efectos moleculares del NO

El efecto biológico del NO varía en función de cuál sea el tipo de enzima que lo sintetiza. En condiciones aeróbicas, el NO se oxida espontáneamente y da lugar a su forma inactiva, estable y definitiva los nitritos y los nitratos. Esta propiedad explica la particularidad ya descrita de los mamíferos, que excretan más nitratos de los que ingieren, especialmente si existe inflamación. La breve vida media del NO (8-10 s) limita su campo de acción en lo referente a efectos autocrinos y paracrinos. La alta afinidad por la hemoglobina aumenta aún más sus límites de acción. Sin embargo, la longevidad y el rango de sus efectos fisiológicos pueden extenderse, debido a la formación de los productos estables biológicamente activos cuando reaccionan con proteínas y otras moléculas (tablas 2 y 3)^{17,18}.

El NO presenta una alta afinidad por los átomos de hierro, pertenecientes o no a un grupo hemo asociado a una proteína¹⁹. De esta forma, la unión del NO con el grupo hemo de la enzima guanilato-ciclasa provoca su activación, aumentando los valores intracelulares del GMPc en muchos tipos de células²⁰. La unión del NO con el hierro unido a grupos sulfhidrilo, como en el caso de la aconitasa y de los complejos I y II de la cadena mitocondrial respiratoria, inhibe la fosforilación oxidativa²¹. En los macrófagos, esto da lugar a un incremento compensador del grado de glucólisis, a pesar de la habilidad del NO para inhibir la GAPDH en algunas células²². La inhibición de la GAPDH se produce por la activación de la enzima ADP-ribosil trans-

TABLA 3. Mecanismos de acción del óxido nítrico

Radical	Objetivo	Efecto fisiológico
Fe-heme	GMPc-AMPC sintetetasas Ciclooxigenasa Lipooxigenasa	Vasodilatación, inhibición plaquetas, adhesión celular, neurotransmisión
Fe-S-proteínas	Enzimas mitocondriales	Citotoxicidad
Fe-proteínas	RN reductasa	Reducción ADN
Tirosil-proteínas	RN reductasa	Reducción ADN
Tiol-proteínas	Activador plasminógeno ADP-ribosa-sintetasa	Citotoxicidad
N-terminal	ADN	Mutaciones, rotura
Superóxido		Bloqueo

ferasa, la cual origina su ADP-ribosilación, o por la nitrosilación directa de la GADPH, que produce el NO²³.

La enzima ribonucleótido reductasa es otra enzima que contiene hierro y es inhibida por el NO²⁴. La inhibición produce la pérdida de un radical tirosil en el punto activo de la enzima. Al bloquearse esta enzima, el NO altera la síntesis del ADN y la división celular. El peroxinitrito, pero no el NO, nitrosila los residuos de la tirosina en la enzima superóxido dismutasa (SOD), así como en otras proteínas que contienen cobre²⁵. El NO también es capaz de causar alteraciones genómicas. El NO puede inducir cambios en la secuencia del ADN mediante un mecanismo de deaminación de la citosina. También daña el ADN a través de reacciones de nitrosilación que producen la deaminación y causan la rotura de las cadenas del ADN²⁶.

El NO posee importantes propiedades para combinarse ávidamente con el anión superóxido O₂⁻. Aunque originalmente se creyó que este anión tenía propiedades protectoras, especialmente en respuesta a la isquemia y la reperfusión, las más recientes investigaciones sugieren que esta reacción puede generar también efectos destructivos, particularmente el anión peroxinitrito²⁷. El peroxinitrito puede descomponerse para formar el radical hidroxil-OH. La producción de estos radicales está ligada a la destrucción del tejido durante la inflamación²⁸. Durante la reacción que genera peroxinitritos, el radical libre de un anión de superóxido derivado del oxígeno (O₂⁻) inactiva el NO. Esto coincide con los efectos de la SOD, un bloqueante del superóxido (O₂⁻) que también prolonga los efectos vasorrelajantes del NO. Esta prolongación se ha atribuido a la reacción entre O₂⁻ con el NO. De modo opuesto, el NO puede ser considerado como un bloqueante del anión de superóxido, lo cual sugiere que el NO puede suministrar una barrera química a los radicales libres de citotoxicidad²⁹.

El NO reacciona en presencia de grupos tioles específicos de las proteínas para formar derivados de S-nitrosoproteínas, que tienen propiedades parecidas a las del factor relajante derivado del endotelio. El plasma humano contiene aproximadamente 7 μM S-nitrosothioles, de los cuales el 96% son S-nitrosoproteínas, y el 82% de estos últimos son parte de la albúmina-S-nitrosa sérica^{17,18}. En cambio, los valores de plasma del óxido nítrico libre son de aproximadamente 3 nM. Este abundante complejo sirve probablemente como una reserva, con la cual los valores de plasma del óxido nítrico libre –altamente reactivo y de corta duración– pueden ser regulados para el mantenimiento del tono vascular.

El óxido nítrico en la articulación

El líquido sinovial procedente de las articulaciones humanas sanas contienen valores muy bajos de

NO. Sin embargo, el líquido sinovial procedentes de pacientes con artrosis o artritis reumatoide poseen altas concentraciones de NO³⁰. Los elementos celulares que forman parte de una articulación diartroïdal humana son el condrocito del cartílago articular, el sinoviocito tipo fibroblasto, el sinoviocito tipo monocito/macrófago del tejido sinovial y las células del líquido sinovial que son principalmente células procedentes del torrente sanguíneo (células mononucleadas sanguíneas).

Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que de todas las células que se pueden encontrar en una articulación, los condrocitos son las que sintetizan y liberan los valores más altos de NO, y también son los que expresan los valores más altos de ARNm y proteína de iNOS^{31,32}. Los cultivos primarios de los condrocitos articulares humanos liberan valores bajos de NO. Sin embargo, la estimulación con la IL-1β provoca un incremento dependiente de la dosis, detectable después de 12 h y que continúa aumentándose durante las siguientes 72 h. La ciclohexamida o la actinomicina D bloquean por completo la formación del NO inducida por la IL-1, lo que significa que depende del ADN y de la síntesis de proteínas. La N-metil arginina, un inhibidor de la NOS, reduce la formación del NO inducido por la IL-1, y en un medio de cultivo como el DMEM sin el aminoácido L-arginina no hay síntesis de NO.

Los sinoviocitos y fibroblastos humanos no producen valores importantes del NO en respuesta a la estimulación con la IL-1 o cualquier otro agente que activase la actividad de la enzima NOS en los condrocitos primarios. Algunos autores han podido estimular la síntesis de NO por los sinoviocitos, pero las cantidades que se liberan son muy inferiores a las que se consiguen cuando se estimulan los condrocitos^{33,34}.

Clonación de la NOS inducible de los condrocitos

El grupo de Salvador Moncada³⁵ y el de Martin Lotz³⁶ aislaron y clonaron el gen que sintetiza la enzima NOS en los condrocitos articulares humanos. Todos los análisis sobre la NOS por los condrocitos articulares humanos dieron como resultados las características de una NOS inducible. La iNOS de los condrocitos humanos es una proteína de 1.153 aminoácidos de longitud, tiene una homología del 78% con el ADNc de la forma clonada de los macrófagos y un 88% con la proteína. Con respecto a la nNOS y la eNOS existe una homología del 50% para el ADNc y del 65% para la proteína. Esta forma de iNOS conserva también los lugares de unión para los cofactores FMN, FAD, FADH y Ca²⁺/calmodulina. La homología de la iNOS de los condrocitos articulares humanos con el iNOS de los hepatocitos es altísima, prácticamente del 100%³⁷.

El óxido nítrico en el cartílago articular normal

Como se ha mencionado anteriormente, de todos los tejidos que forman parte de una articulación, el cartílago es el tejido que tiene mayor capacidad para sintetizar NO. El cartílago articular normal no produce NO ni contiene expresión alguna de las iNOS, a menos que se estimule con citocinas proinflamatorias, como la IL-1 o el TNF- α ^{31,38}. Los condrocitos superficiales estimulados con IL-1 producen más NO que las células de capas más profundas³⁹. Sin embargo, el tejido sinovial humano tiene una escasa capacidad para sintetizar y liberar NO.

El NO producido en respuesta a la estimulación con citocinas ejerce unos determinados efectos catabólicos que cabría esperar que favoreciesen la degradación del cartílago articular. Entre estos efectos del NO en los condrocitos podemos citar: *a*) inhibición de la síntesis del colágeno y proteoglicanos⁴⁰⁻⁴²; *b*) activación de metaloproteasas⁴³; *c*) incremento de la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes (H₂O₂)⁴⁴; *d*) disminución de la expresión de IL-1 receptor antagonista⁴³; *e*) inhibición de la proliferación celular⁷, y *f*) inducción de apoptosis⁴⁴. Otras posibles acciones proinflamatorias del NO en la artritis incluyen el aumento de vasodilatación y permeabilidad, la potenciación del TNF y la IL-1 liberada por leucocitos, y la estimulación de la actividad angiogénica por los monocitos/macrófagos.

El efecto de diferentes citocinas sobre la síntesis del NO presenta unas peculiaridades específicas. Todos los factores, incluidos el TNF, IL-1, LIF y LPS, de los que se conoce su capacidad para inducir respuestas catabólicas y proinflamatorias en los condrocitos, estimulan la síntesis del NO. Por el contrario, el TGF β , que es el factor de crecimiento más potente en los condrocitos y que estimula la formación de la matriz extracelular, no induce valores detectables en la síntesis de NO^{7,31}.

A partir de estos hallazgos, se puede concluir que la síntesis del NO es parte del programa catabólico de los condrocitos.

El NO y las prostaglandinas en el cartílago articular humano

Las prostaglandinas (PG) son unos mediadores inflamatorios sintetizados por la enzima ciclooxigenasa (COX). El tejido sinovial y los condrocitos articulares humanos, sometidos a los estímulos adecuados, pueden sintetizar PG (PGE₂, prostaciclina y PGF₂ α). La IL-1, el TNF- α y el NO son los estímulos capaces de inducir la síntesis de las prostaglandinas, principalmente de la PGE₂, en los condrocitos articulares humanos (fig. 2). No se conoce la función desempeñada por las prostaglandinas en la homeostasis del cartílago y se han apuntado tan-

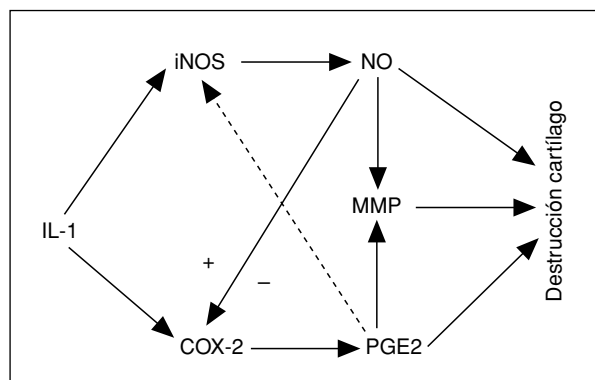


Figura 2. Conexión entre el NO y las PG en el condrocito articular humano. Las citocinas proinflamatorias como la IL-1 tienen la capacidad de inducir la expresión de las dos formas inducibles de las enzimas NOS y COX. El NO sintetizado puede aumentar la síntesis de MMP o actuar directamente sobre el cartílago favoreciendo su destrucción. Por otro lado la PGE₂ puede activar las enzimas proteolíticas MMP y actuar sobre el cartílago articular. Asimismo, el NO puede también activar. El punto de confusión se establece en la conexión entre estas dos enzimas inducibles. Unos resultados apuntan a que el NO puede activar a la enzima COX-2 e incrementar los niveles de PGE₂. Otros resultados sugieren que el NO no activa sino que inhibe a la COX-2, porque la inhibición de su síntesis incrementa los niveles de PGE₂. La PGE₂ puede tener también capacidad de inhibir a la iNOS (flecha discontinua).

to efectos catabólicos como anabólicos. La PGE₂ inhibe la proliferación de los condrocitos e inhibe la síntesis de proteoglicanos *in vitro*^{7,45}.

Se conocen dos isoformas de esta enzima en los organismos eucariotas: una constituida (COX-1) y otra inducible (COX-2)⁴⁶. Los condrocitos articulares procedentes de donantes humanos sin enfermedad articular y sin estar sometidos a ningún estímulo expresan únicamente COX-1^{47,48}. Si las células son estimuladas con citocinas como la IL-1, pueden expresar también COX-2, sin sufrir la COX-1 ningún tipo de modulación⁴⁷. Sin embargo, los condrocitos aislados de cartílagos artrósicos contienen la forma inducible sin necesitar estímulos proinflamatorios.

Como podemos ver, las enzimas que sintetizan el NO y las PG tienen dos isoformas, una inducible (iNOS, COX-2) y otra constitutiva (cNOS, COX-1). La estimulación de las formas inducidas es producida por los mismos estímulos en ambos sistemas^{50,51}. Además, una gran variedad de células (macrófagos, endotelio, condrocitos) pueden sintetizar las dos isoformas de las enzimas y liberar PG y NO⁵¹. Trabajos recientes demuestran una estrecha relación entre estos dos mecanismos enzimáticos, pero los resultados que se están obteniendo en cuanto a la conexión entre el NO y la enzima COX son contradictorios y varían dependiendo del tipo y especie celular utilizados. En los condrocitos humanos normales, el NO endógeno y exógeno aumenta la síntesis de PGE₂ (posiblemente a través de su reacción con el componente *heme*, que for-

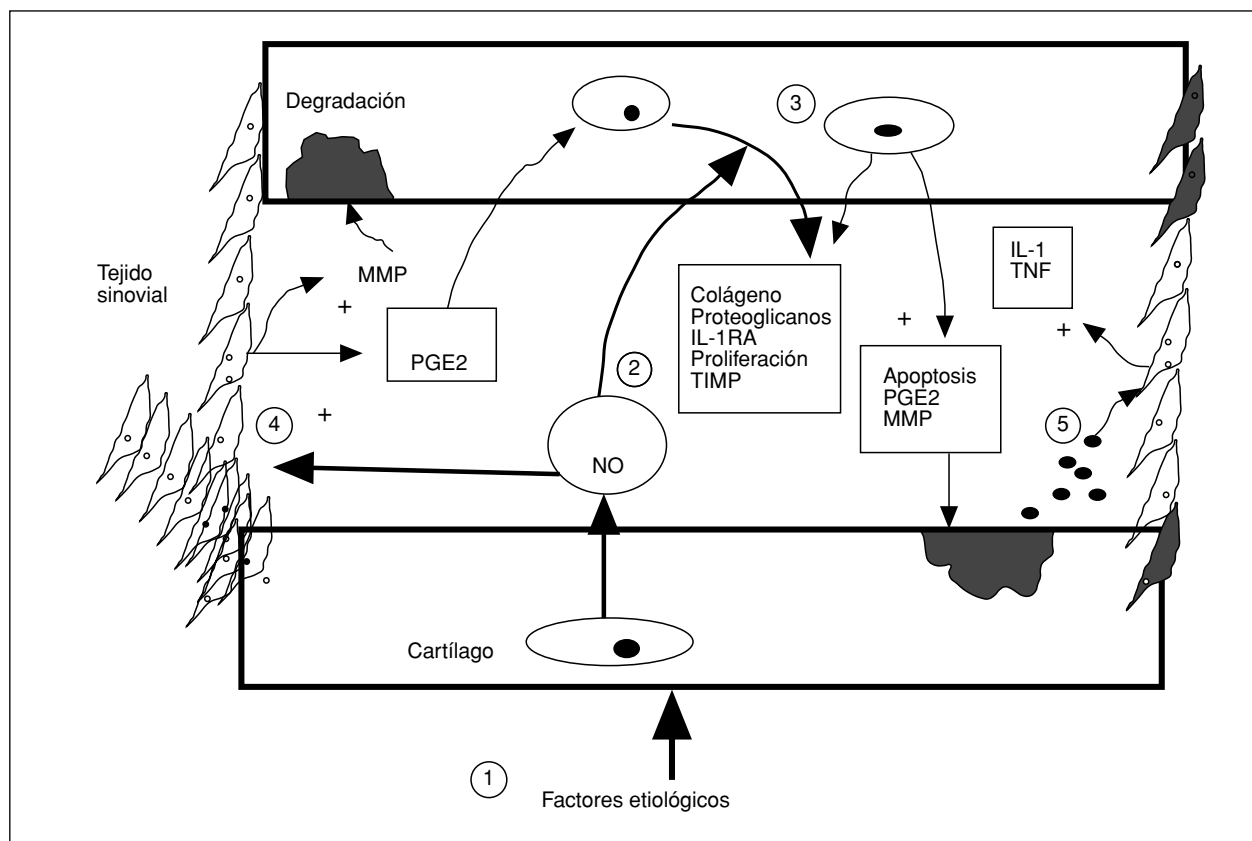


Figura 3. Fisiopatología del NO en la destrucción del cartílago articular. 1) Factores desencadenantes de la OA inducen la síntesis de NO por los condrocitos del cartílago articular. 2) Los niveles de NO se incrementan en el espacio articular, y desde aquí puede disparar sus efectos biológicos a diferentes niveles. 3) El NO puede actuar sobre el cartílago articular inhibiendo la síntesis de colágeno y proteoglicanos y estimulando la síntesis de MMP e induciendo apoptosis sobre los condrocitos. 4) El NO puede actuar sobre el tejido sinovial favoreciendo la secreción al espacio articular de factores proinflamatorios y con capacidad de destruir el cartílago como la MMP. 5) Como resultado de la destrucción del cartílago se liberan fragmentos de cartílago que también poseen capacidad de inducir la liberación de factores proinflamatorios por el tejido sinovial.

ma parte de la zona activa de la enzima) y la PGE2 no tiene efecto en la producción de NO⁷. Sin embargo, en condrocitos de OA el NO disminuye la síntesis de PGE2, y en condrocitos de OA estimulados con citocinas, la inhibición de la síntesis de NO (por una molécula que inhibe el iNOS, la L-NMMA) aumenta la producción de PGE2⁴⁹. Estos efectos sobre la estimulación e inhibición de la síntesis de PG por el NO han sido confirmados por otros autores. Posiblemente la explicación a estos resultados dispares se encuentre en la metodología utilizada. Para aclarar este punto de confusión se ha formado un comité dentro del marco de la OARSI (Sociedad Internacional para la Investigación de la OA) con la finalidad de estandarizar las condiciones de los experimentos en este campo (Dr. Pujol y Dr. Henrotin, comunicación personal).

El óxido nítrico y la artrosis

Debido a sus propiedades eminentemente destructivas del cartílago articular, el NO puede ser un im-

portante mediador de lesión articular crónica en la OA (fig. 3). En esta línea, se ha demostrado que los condrocitos artrósicos expresan iNOS (ARNm y proteína) y producen NO de forma espontánea⁵². La forma de iNOS aislada del cartílago artrósico resulta particularmente interesante a partir del momento en que sobrepasa el peso molecular de las iNOS caracterizadas previamente (150 kDa frente a 133 kDa) y su expresión no se ve inhibida por otros factores como el TGFβ o la hidrocortisona. El cartílago artrósico expresa iNOS y produce nitritos después de 72 h en cultivo, en ausencia de estímulos como IL-1 o TNF⁵². Esto indica que los estímulos existentes en la matriz extracelular del cartílago artrósico persisten durante un tiempo y son, por tanto, capaces de inducir la síntesis del NO. Además la cantidad de NO producido por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de lesión del cartílago⁵³.

Otro hallazgo que hace pensar en la influencia del NO en la artrosis es la conexión de ambos elementos con la apoptosis. Por un lado el NO es capaz

de inducir apoptosis en los condrocitos y, por otro lado, el cartílago artrósico contiene un porcentaje mayor de células en apoptosis que los cartílagos normales^{44,54}. Si el NO es el responsable de la apoptosis en la artrosis es un punto que todavía no ha sido demostrado.

Finalmente, el papel del NO en la degradación del cartílago artrósico ha quedado claramente demostrado gracias a los estudios realizados en modelos animales de artrosis. En ellos, se ha observado que la inhibición de la síntesis del NO por los tejidos de la articulación retarda la degeneración del cartílago⁵⁵.

El NO y el tratamiento de la degradación del cartílago

Como el NO liberado por los condrocitos activados tiene un poder dañino para el cartílago, representa un potencial objetivo para la intervención farmacológica en la OA y la AR. Hay evidencia que agentes utilizados actualmente en el tratamiento de las enfermedades reumáticas afecta la actividad del NO. El auronofin reduce la respuesta de la aorta de conejo al NO, mientras que los glucocorticoides y la ciclosporina inhiben la inducción de iNOS en varios tejidos. Además el MTX puede inhibir la dihidrofolato reductasa que puede interferir en la síntesis de tetrahidrobiopterina, un cofactor necesario para la actividad de NOS. Las tetraciclinas inhiben la producción de NO por los condrocitos y macrófagos. Este efecto, que es debido al descenso de la expresión de la enzima iNOS, puede contribuir a la condroprotección, actividad de las tetraciclinas en los modelos animales⁵⁶.

La inhibición de la producción de NO por los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) también ha sido demostrada⁵⁷. En macrófagos de ratón, la aspirina inhibe la producción de nitritos por al menos dos mecanismos: 1) efecto sobre la transcripción/traslación, que inhibe la enzima NOS expresión por inmunoblot, y 2) la inhibición directa de la actividad específica de la enzima, principalmente por acetilación de NOS. En condrocitos articulares humanos normales y artrósicos también se ha demostrado que la aspirina, el tenidap, el diclofenaco y el aceclofenaco inhiben la síntesis del NO^{58,59}. Sin embargo la indometacina y la dexametasona no son capaces de modificar su síntesis.

El condroitín sulfato *in vitro* tiene capacidad de inhibir la apoptosis inducida por el NO en los condrocitos articulares de conejo⁶⁰; si estos resultados se pueden extrapolar a humanos está siendo probado en nuestro laboratorio. Por otro lado, Martin Lotz ha encontrado *in vitro* que el ácido hialurónico es capaz de inhibir la apoptosis inducida por NO en condrocitos humanos (comunicación personal).

En conclusión, el NO es un factor que favorece la degradación del cartílago articular. Por este motivo, la inhibición de la síntesis de NO o el bloqueo de

sus efectos está siendo una de las armas terapéuticas que actualmente más se está investigando para prevenir la destrucción del cartílago articular y reducir la evolución de la artrosis y la artritis inflamatoria. Si los hallazgos demostrados *in vitro* tienen algún significado *in vivo* debe ser demostrado en el futuro.

Bibliografía

1. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns K, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265.
2. Palmer R, Ferige A, Moncada S. Nitric Oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524.
3. Rajfer J, Aronson W, Bush P, Dorey F, Ignarro L. Nitric oxide as a mediator of the corpus cavernosum in response to non adrenergic non colinergic transmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90.
4. Radomski M, Palmer R, Moncada S. An L-Arg/nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193.
5. Nathan C, Xie Q. Nitric Oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915.
6. Lipton S, Choi Y-B, Pan Z et al. A redox based mechanism for neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide an related nitroso compounds. *Nature* 1993; 364: 626.
7. Blanco FJ, Lotz M. IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res* 1995; 218: 319-325.
8. Guo F, De Raeve H, Rice T, Stuehr D, Thunnissen F, Erzurum S. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7809.
9. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137.
10. Silvagno F, Xia H, Bredt D. Neuronal nitric-oxide synthase- μ an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 11204.
11. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith T, Kelly R, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 22810.
12. Mitchell P, Magna H, Reeves L et al. Cloning, expression and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97: 761-768.
13. Marletta M. Nitric Oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927.
14. Schini V, Vanhoutte P. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 553.
15. Forstermann U, Pollock J, Schmidt H, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1788.
16. Stuehr D, Fasehum O, Kwon N et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* 1991; 5: 98.
17. Stamler J, Jaraki O, Osborne J et al. Nitric Oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 80: 4518.
18. Stamler J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of Nitric Oxide. *Cell* 1994; 78: 931.
19. Lancaster J, Hibbs J. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1223.

20. Ignarro L. Signal trasduction mechanism involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 485.
21. Drapier J, Hibbs J. Differentiation of murine macrophages to express non-specific cytotoxicity for tumor results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; 140: 2829.
22. Dimmeler S, Lottspeich F, Vrhne B. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992; 267: 16771.
23. Brune B, Lapetina E. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455.
24. Leproivre M, Cherais B, Yapo A, Lemaure G, Thelander L, Tenu J. Alteration of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 14143.
25. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431.
26. Wink D, Kasprzak K, Maragos C et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254: 1001.
27. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620.
28. Zhu L, Gunn C, Ischiropoulos H, Beckman J. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 446.
29. Rubanyi G, Ho E, Cantor E, Lumma W, Botelho L. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1392.
30. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219-1222.
31. Rediske J, Koehne C, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; 2: 199-206.
32. Palmer R, Andrews T, Foxwell N, Moncada S. Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 209.
33. Stefanovi-Racic M, Stadler J, Evans C. Nitric Oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1036-1044.
34. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Biliar T. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147: 3915.
35. Charles I, Palmer R, Hickery M et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419.
36. Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M. Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1208: 145.
37. Geller D, Lowenstein C, Shapiro R et al. Cloning and characterization of nitric oxide synthase in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3491.
38. Parmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 398-405.
39. Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y, Jasin H. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 261-269.
40. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu H, Rizzo C. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Co12A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* 1997; 324: 305-310.
41. Stefanovi-Racic M, Morales T, Taskiran D, McIntyre L, Evans C. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J Immunol* 1996; 156: 1213-1220.
42. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by IL-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 142-148.
43. Mural G, Jang D, Williams R. Nitric oxide activates metalloproteases enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 15-21.
44. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75-85.
45. O'Keefe R, Crabb I, Puzas J, Rosier R. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Mineral Res* 1992; 7: 397.
46. DeWitt D, Smith W. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1412-1416.
47. Blanco FJ, Guitian R, Moreno J, De Toro F, Galdo F. Effect of anti-inflammatory drugs on Cox-1 and Cox-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999 (en prensa).
48. Geng Y, Blanco FJ, Cornelissen M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human articular chondrocytes. *J Immunology* 1995; 155: 796-801.
49. Amin A, Attur M, Patel R et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99: 1231-1237.
50. Lotz M, Blanco FJ, Johannes V et al. Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol* 1994; 22 (Supl 43): 104-108.
51. Crofford L, Wilder R, Ristimaki A. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1B, phorbol ester and corticosteroids. *J Clinical Investigation* 1994; 93: 1095-1101.
52. Amin AR, Di-Cesare PE, Vyas P et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995; 182: 2097-2102.
53. Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts R, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1266-1274.
54. Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, De Toro F, Galdo F. Chondrocytes OA die by apoptosis: a possible explanation for ethipatogenesis of OA. *Arthritis Rheum* 1998; 38: 540-545.
55. Pelletier J, Jovanovic D, Fernandes J, Manning P. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1275-1286.
56. Amin A, Attur M, Thakker G et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14014-14019.
57. Amin A, Vyas P, Attur M et al. The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7926-7930.
58. Attur M, Patel R, Di Cesare P, Steiner G, Abramson S, Amin A. Regulation of nitric oxide production by salicylates and tenidap in human OA-affected cartilage, rat chondrosarcomas and bovine chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 1998; 6: 269-277.
59. Blanco FJ, Maneiro E, Hermida F, De Toro F, Galdo F. Regulation of nitric oxide production by NSAIDs 1999 (en preparación).
60. Reveliere D, Mentz F, Merle-Beral H, Chevalier X. Mechanisms of cell death of articular rabbit chondrocytes induced by nitric oxide and protecting effect of chondroitin 4/6 sulfate. *Arthritis Rheum* 1998; 41 (Supl): 50.