

## CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR ACCIÓN DEL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO EN ANILLOS ARTERIALES DE RATA

*Pedro López Sánchez\**  
*Alejandro Suárez Sagrero\*\**  
*Gabriel Marcelín Jiménez\*\*\**  
*Bruno A. Escalante Acosta\*\**

### RESUMEN

El ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) es un compuesto derivado de plantas del género *Astragalus* y se le han descrito varios efectos después de la ingesta accidental en varias especies animales, incluyendo el ser humano, siendo los efectos tóxicos más relevantes los de tipo neurológico. Recientemente a este compuesto se le han descrito efectos cardiovasculares, principalmente hipotensión y bradicardia. El efecto directo a nivel del corazón se cree que es debido a la interferencia con el metabolismo energético del mismo, sin embargo, el componente periférico de la hipotensión no está bien descrito. Se ha reportado que este efecto se inhibe con azul de metileno, lo que parece indicar que el óxido nítrico se encuentra participando en este efecto. En el presente trabajo decidimos estudiar si el ácido 3-NPA induce vasodilatación mediante la liberación de óxido nítrico. En aorta aislada de rata se determinó la concentración de nitrito liberado por la estimulación con acetilcolina y ácido 3-nitropropiónico, en presencia y ausencia de L-NAME, L-arginina y calcio, usando nitroglicerina y nitroprusiato de sodio como controles positivos en la liberación de nitritos. Los resultados obtenidos indican que el 3-NPA induce la liberación de óxido nítrico (expresado como nitrito liberado) en mayor cantidad que acetilcolina, y a diferencia de los nitrovasodilatadores clásicos, esta liberación es inhibida por la presencia de L-NAME. Más aún, la ausencia de L-arginina y de calcio bloquean por completo la liberación de nitritos por parte de 3-NPA. Estos resultados sugieren que 3-NPA induce vasodilatación mediante la liberación de óxido nítrico por parte del endotelio, interviniendo la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva calcio dependiente.

\* Depto. de Farmacología y Fisiología, ESM-IPN.

\*\* Depto. de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV-IPN.

\*\*\* Lab. Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, SDN.

### INTRODUCCIÓN

El reino vegetal ha sido una fuente de importantes compuestos con actividad farmacológica. En algunos casos, sustancias provenientes de dicha

fuentes han demostrado ser de gran utilidad terapéutica, como es el caso de la escopolamina, atropina y morfina, por citar algunos ejemplos. En otras ocasiones la actividad medicinal y/o terapéutica de los compuestos originados en plantas es nula o limitada; sin embargo, poseen características que pueden hacerlos valiosos como herramientas experimentales. Tal es el caso de la cocaína, que al bloquear el mecanismo neuronal de recaptación de noradrenalina, permite distinguir fármacos adrenérgicos de acción indirecta o directa. Algunos de los efectos biológicos producidos por las plantas pueden originar síntomas indeseables o efectos tóxicos como los alcaloides del cornezuelo de centeno.<sup>1</sup>

Independientemente de sus efectos, el estudio de las plantas continúa siendo motivo de interés para los investigadores, considerando que aunque numerosos compuestos han sido extraídos de las plantas y algunas flores, es probable que un número aún mayor aguarde el momento de ser descubierto con algún fin terapéutico o tóxico.<sup>2</sup>

Está reportado que la ingestión de plantas del género *Astragalus*, comúnmente localizadas en Norteamérica, conduce a manifestaciones de toxicidad y a la muerte del ganado, sugiriéndose la presencia de alguna sustancia tóxica en dichos vegetales. Dentro de las sustancias provenientes de esta fuente se encontraron algunas que contienen grupos nitro, como el ácido 3-nitropropiónico (NPA).<sup>2,3</sup>

Las plantas del género *Astragalus* no constituyen la única fuente del NPA ya que este compuesto puede encontrarse en otras plantas de la familia de las leguminosas y en algunos hongos de los géneros *Aspergillus Penicillium*.<sup>4</sup>

Otros compuestos que han sido aislados del género *Astragalus* del tipo de los nitrocompuestos alifáticos como la miserotoxina, la cibarina, la hiptagina y la caraquina los cuales pueden tener efectos tóxicos. Diversos estudios demostraron que al ingerir el ganado la miserotoxina, se cataboliza a 3-nitro-1-propanol en el tracto digestivo de los rumiantes, éste es absorbido por la circulación y se metaboliza principalmente por el hígado del animal en ácido 3-nitropropiónico (NPA), siendo éste el responsable de los efectos tóxicos que se presentan al ingerir el ganado las plantas que contienen sus precursores.<sup>4-7</sup>

En 1920, Marsh y Clawson informaron de la intoxicación y muerte del ganado al consumir plantas leguminosas que crecen en las regiones del oeste de Estados Unidos. La intoxicación puede ser crónica si se consume poca cantidad de nitrocompuestos (3 a 7 mg de NO<sub>2</sub>/g de planta) y aguda cuando sobrepasa la dosis mencionada.<sup>1</sup> En 1927, Bruce reportó también casos de intoxicación, presentándose en el oeste de Canadá, Estados Unidos y el noroeste de México. Entre las plantas identificadas se encuentran los géneros *Coronilla*, *Indigofera*, *Lotus* y *Viola*.<sup>5</sup> También se encontraron hongos que contaminaban el forraje, identificándose algunos compuestos semejantes a los descritos y que podían producir intoxicaciones severas.<sup>6</sup>

El NPA presenta una actividad tóxica dependiente de la cantidad de toxina presente en la planta y la velocidad a la cual es ingerida por el animal.<sup>7</sup>

Por otra parte, la administración del NPA por vía intraperitoneal o intravenosa a conejos en varios experimentos *in vitro*, produce la liberación de nitritos que se unen casi en un 50% de la hemoglobina en esos animales. La administración de azul de metileno previene de manera importante la metahemoglobinemia. Cuando el animal consume altas dosis del nitrocompuesto, presenta debilidad, disnea, cianosis de mucosas y colapso súbito.<sup>4</sup> Si se ha ingerido una dosis letal de NPA, el animal muere en un plazo de cuatro a veinticinco horas.

El envenenamiento crónico se desarrolla lentamente, presentando depresión general, resequeamiento del pelo, seguido de deformación de las patas, ceguera parcial o total, en otras ocasiones pueden presentar ataxia; conforme la intoxicación avanza, el animal puede desarrollar hemiplejía, la respiración se dificulta y finalmente el animal muere.<sup>8</sup>

Uno de los sistemas donde afecta este nitrocompuesto es el sistema nervioso central, donde Gould, en 1985, describió lesiones cerebrales principalmente en el cuerpo estriado y secundariamente en el tálamo e hipotálamo. En ratones se observaron también lesiones en los ganglios basales. Hamilton caracterizó morfológicamente las lesiones que produce el NPA.<sup>3</sup> El daño semeja a las lesiones excitatorias neuronales inducidas por ácido kaínico, que son similares tam-

bién a las inducidas por hipoxia severa o hipoglucemia.<sup>4</sup> Éstas son, edema dendrosomático y edema neuronal en ganglios basales, hipotálamo, tálamo, núcleo amigdalóide, además de algunos núcleos cerebelosos. Estos daños fueron confirmados por otros autores,<sup>9,10</sup> describiendo casos en humanos que ingirieron caña de azúcar contaminada por hongos.<sup>4</sup>

En el ser humano el cuadro clínico de la intoxicación por NPA se caracteriza por encefalopatía aguda seguida de distonía retardada, la cual se puede presentar entre los 11 y 60 días después de la ingestión, experimentando espasmos de torción, tortícolis, gestulación facial y sacudidas incoordinadas que se confunden con la enfermedad de Huntington; estos reportes histopatológicos se han reportado también en roedores.<sup>9</sup>

El mecanismo de toxicidad del ácido NPA a nivel celular parece que interfiere con la generación de ATP. Los primeros reportes del mecanismo de acción bioquímico del daño que genera el NPA fueron proporcionados por Porter y cols.<sup>11</sup> Más tarde, Alston y cols., demostraron que el NPA es un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa, perteneciente al ciclo de Krebs,<sup>12</sup> considerándose un sustrato suicida.<sup>13</sup>

Recientemente se ha demostrado que la administración de NPA puede afectar al sistema cardiovascular. En ratas normotensas anestesiadas y en perros hipertensos renales conscientes, el NPA produce hipotensión, pero en forma paradójica el mecanismo de reflejo esperado de taquicardia no se presenta y en contraste se acompaña de braquicardia. La vasodilatación, al estar acompañada de braquicardia, puede explicar la hipotensión observada que tiene la característica de permanecer aún después de varios días de suspender la administración del nitrocompuesto. Esto sugiere que la hipotensión producida puede presentar dos componentes: el primero, un componente de vasodilatación periférica, y el segundo, de acción cardiodepresora directa.<sup>3</sup>

Dentro de la caracterización de la vasodilatación periférica, se ha descrito que el nitrocompuesto relaja, en forma de dosis dependiente, anillos de aorta de conejo precontraídos con norepinefrina, serotonina, histamina, cloruro de potasio o calcio. Adicionalmente se demostró que

el efecto relajante no es bloqueado por compuestos como atropina, propranolol o bromofeniramina, indicando un mecanismo independiente de los sistemas  $\beta$ -adrenérgico, muscarínico o histaminérgico. Además, la relajación vascular producida es independiente de la remoción del endotelio, aunque fue inhibida claramente por azul de metileno, sugiriendo la participación de la guanilato ciclasa soluble en este efecto.<sup>1</sup>

Furchgott y Zawadzki demostraron que la relajación de los vasos sanguíneos, venas y capilares por acción de acetilcolina dependía de la presencia de las células endoteliales ya que esta relajación se bloqueaba al eliminar el endotelio, por tal motivo postularon la presencia de un factor endotelial denominado "factor de relajación dependiente del endotelio" (EDRF). Actualmente se ha identificado como óxido nítrico (NO).<sup>14</sup>

El NO se produce en las células endoteliales por acción de la sintasa del óxido nítrico (NOS) sobre el sustrato natural, que es la L-arginina. Palmer y cols., demostraron que en las células endoteliales el precursor de las síntesis del NO es la L-arginina. La conversión de L-arginina a NO y L-citrulina se lleva a cabo en dos pasos: el primero consiste en la oxidación dieléctrica del sustrato L-arginina para producir un metabolito intermediario  $N^G$ -hidroxi-L-arginina, el cual, es un segundo paso se oxida nuevamente con la participación de tres electrones y forma los productos finales NO y L-citrulina. En total el proceso requiere de cinco electrones para la transformación oxidativa.<sup>15-18</sup>

El NO sintetizado por el endotelio difunde libremente hacia el músculo liso vascular y se une al átomo de hierro del grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, ejerciendo un cambio conformacional en la molécula y activándola, lo que trae como consecuencia la producción de GMPc a partir de GTP. Experimentos recientes han demostrado que el NO se libera constantemente, esto indica que el sistema cardiovascular está en un estado constante de vasodilatación y que la producción de NO está sujeta a un estricto y fino control bioquímico.<sup>15</sup>

Con estos antecedentes se decidió determinar si el ácido 3-nitropropiónico induce la relajación de anillos de aorta de rata por medio de la liberación de óxido nítrico.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas macho Wistar de 250-300 gr, las cuales se sacrificaron por dislocación cervical; se disecó la aorta torácica, manteniéndose en solución Krebs burbujeadada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%); se limpió de grasa y tejido conectivo y se cortó en anillos de 3mm de longitud; éstos se lavaron en solución Krebs burbujeadada con carbógeno, manteniéndose a 37°C en baño con agitación constante por un periodo de 45 minutos, cambiando la solución cada 15 minutos. Al final de este tiempo se dividieron los anillos arteriales en grupos iguales. La composición del Krebs fue (expresada en mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25, y glucosa 11.5; pH, 7.4.

### Determinación de nitritos

La determinación de nitritos se llevó a cabo por la reacción de Greiss, la cual se basa en una reacción de diazotización entre el nitrito y la procaína, donde se forma el grupo azo. Este último reacciona con N-1-naftil-etilendiamina, formando un compuesto colorido que se puede leer espectrofotométricamente a una longitud de onda de 548 nm. El protocolo seguido fue el siguiente: Por duplicado se colocaron 500 µl del sobrenadante de los tubos de la sección anterior y se les agregaron 20 µl de ácido tricloroacético (ATC) al 2%, 10 µl de clorhidrato de procaína al 0.04%, y 10 µl de dihidroclorato de N-1-naftil-etilendiamina al 0.02%. Después de agitar vigorosamente se dejó reposar durante diez minutos y se leyó para absorbancia a 548 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Se elaboró una curva patrón de concentraciones conocidas de nitrito de potasio (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 µM), que se sometieron al mismo tratamiento.

### Protocolo experimental

#### I. Liberación de nitritos por anillos arteriales

Los diferentes grupos de anillos de aorta se distribuyeron en los siguientes tratamientos:

1. En un tubo de ensaye se colocaron los anillos

en 1 ml de Krebs (control).

2. En otro tubo de ensaye se colocó el tejido en 1 ml de Krebs y 100 µl de acetilcolina (ACh) 10<sup>-3</sup>M, 3-NPA 10<sup>-1</sup> M o nitroprusiato de sodio (NPS) 10<sup>-4</sup> M.
3. Otro tubo de ensaye recibió el mismo número de anillos y se agregaron 100 µl de metil éster de nitro-L-arginina (L-NAME), 10<sup>-3</sup> M.
4. En un tubo más se colocó el mismo número de anillos y 100 µl de acetilcolina, 3-NPA o nitroprusiato de sodio, a la misma concentración que anteriormente más L-NAME 10<sup>-3</sup> M.

Se corrieron muestras control conteniendo los mismos compuestos pero sin tejido. Ambos grupos de muestras se incubaron a 37°C en baño con agitación constante y burbujeadada durante 30 minutos; al final de este tiempo se cuantificó la liberación de nitritos.

#### II. Determinación de la liberación de nitritos en arterias depletadas de L-arginina, con y sin endotelio

Con la técnica descrita previamente, de extracción de arteria aorta, y posteriormente al lavado con solución Krebs, se introdujo en la arteria un aplicador de madera y se giró con el fin de eliminar el endotelio. Después la aorta se cortó en anillos de 3 mm de longitud y se le trató de igual manera agregando 100 µl de ácido 3-nitropropiónico a una concentración final de 10<sup>-2</sup> M.

Finalmente, para determinar la participación del calcio en la liberación de nitritos debido a la acción del 3-NPA, se corrieron experimentos similares, sustituyendo el Krebs original por Krebs sin calcio, empleando el resto de los tratamientos de manera similar.

### Estadística

Los resultados se expresan como la media ± SE de por lo menos cinco experimentos. Las muestras se sometieron a análisis de varianza de una vía, considerándose significativa las diferencias cuando  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

Inicialmente se estudió de manera comparativa

el efecto de 3-NPA con el de ACh. Como se aprecia en la figura 1, la administración de ACh, a la concentración descrita, produjo un aumento significativo en la cantidad de nitritos liberados por las arterias en comparación con el control ( $3.45 \pm 1.12$  y  $1.962 \pm 1.07$ , respectivamente) lo cual es reflejo de la liberación de óxido nítrico (NO) que este compuesto induce. El 3-NPA también indujo un aumento en la cantidad de nitritos liberados por las arterias; sin embargo, comparando los valores del control y de acetilcolina, se puede apreciar que la cantidad liberada fue mayor ( $4.122 \pm 1.23$ ). Cuando se incubó el tejido previamente con L-NAME, un inhibidor conocido de la sintasa del óxido nítrico, se observó en los tres casos que la cantidad liberada de nitritos disminuyó apreciablemente (Fig. 3).

Al comparar el efecto farmacológico del 3-NPA con otros dos vasodilatadores cuyo mecanismo de acción es conocido, como fue el caso del nitroprusiato de sodio y la nitroglicerina que, según se sabe, liberan NO de manera espontánea causando la relajación vascular. En la figura 2 se muestran las cantidades de nitritos liberados por los anillos de arteria tratados con los dos nitrovasodilatadores. Como se aprecia, en ambos casos existe un incremento significativo en la cantidad de nitritos liberados, siendo la nitroglicerina la más potente en este sentido. Al pre-tratar los anillos con L-NAME, no existió modificación de la cantidad de nitritos liberados al ser aplicados los nitrovasodilatadores. Resulta interesante observar que, a diferencia de los anteriores nitrovasodilatadores, el incremento en la producción de nitritos, estimulada por 3-NPA, se ve significativamente disminuido por la presencia de L-NAME (Fig. 3), indicando que la liberación espontánea de óxido nítrico no es el mecanismo de acción del compuesto en estudio.

Dado que el 3-NPA aumenta la cantidad de óxido nítrico en el sistema, decidimos estudiar si este efecto se debía a la estimulación de la actividad de la óxido nítrico sintasa, y un primer abordaje consistió en depletar las arterias de los depósitos de L-arginina, el sustrato natural para la síntesis de óxido nítrico por parte de la enzima. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al depletar los depósitos de L-arginina arteriales y compararlos con los efectos obtenidos

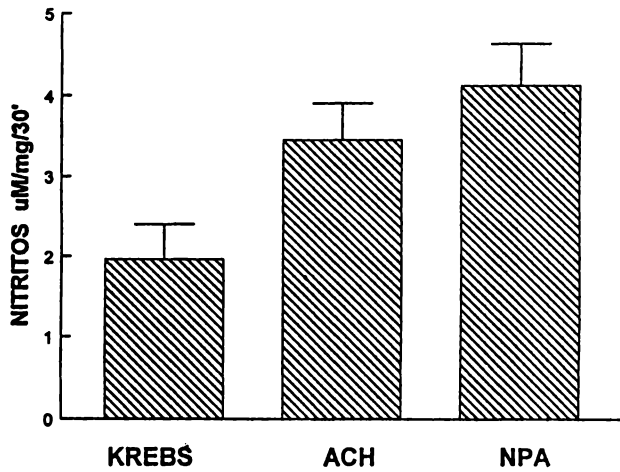
en arterias con sus depósitos normales después de la estimulación con acetilcolina y 3-NPA. Como se aprecia claramente, en las arterias no depletadas de L-arginina se obtuvieron resultados similares a los descritos previamente, es decir, se observó un aumento en la liberación de nitritos por parte de las arterias, siendo el 3-NPA el que estimuló la mayor cantidad comparándolo con el control y con ACh (Fig. 2); en cambio, en las arterias depletadas, tanto ACh como 3-NPA no son capaces de estimular la liberación de nitritos.

Como el conjunto de datos hasta el momento recopilados sugería fuertemente que en el mecanismo de liberación de NO por el 3-NPA está implicada la sintasa de NO, y dado que otro factor que regula la actividad de dicha enzima es el calcio intracelular, decidimos estudiar el papel del calcio en la acción del 3-NPA. En la figura 5 mostramos dichos resultados. Las arterias sin calcio son incapaces de secretar nitritos, al tratarlas con 3-NPA se aprecia que la cantidad de nitritos es mucho menor a la obtenida cuando se emplea Krebs con calcio, lo cual indica que el calcio juega un papel preponderante en el efecto del 3-NPA.

## DISCUSIÓN

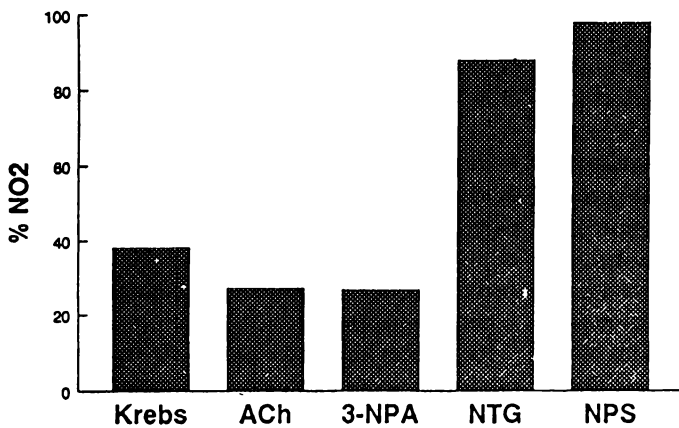
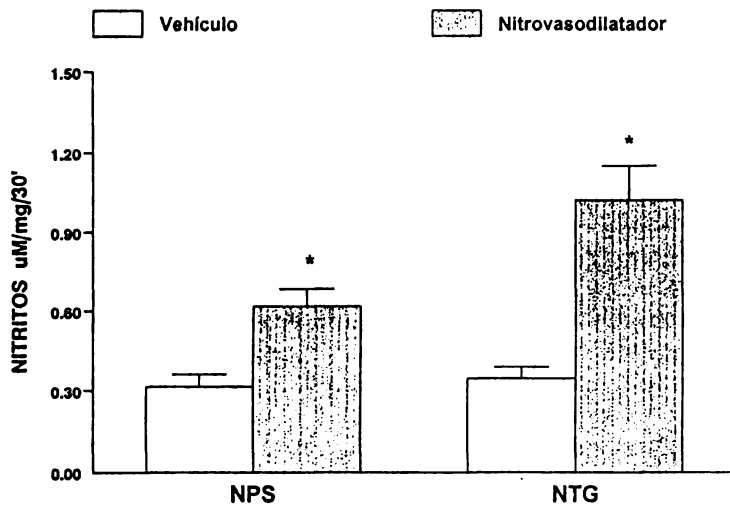
El ácido 3-nitropropiónico ha llamado la atención por sus propiedades tóxicas desde hace varios años. Existen trabajos desarrollados en torno a su toxicidad en el ganado y en seres humanos; sin embargo, la mayoría de ellos se han centrado en sus efectos sobre el sistema nervioso central, habiéndose incluso caracterizado el tipo de lesiones y las estructuras en las cuales parece ejercer su efecto.<sup>2,9,10</sup> Recientemente, Castillo y cols. describieron acciones del nitrocompuesto sobre el sistema cardiovascular.<sup>1</sup> En un reporte publicado en 1993, demostraron que el 3-NPA, en diversos modelos *in vitro* como arterias aisladas de conejo y de rata, es capaz de inducir relajación del músculo liso vascular. Por otra parte, el 3-NPA disminuye la presión arterial en perros hipertensos renales administrado por vía oral y por vía parenteral.<sup>1,3</sup>

Este efecto hipotensor parece ser explicado por un componente vascular y por acción directa sobre el miocardio.<sup>3,4</sup> La acción relajante vas-



**Fig. 1.** Producción de nitritos en aorta de rata después de la administración de vehículo (Krebs), acetilcolina (Ach)  $10^{-3}$  M o ácido 3-nitropropiónico  $10^{-1}$  M. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de cinco experimentos.

**Fig. 2.** Producción de nitritos en aorta de rata después de la administración de nitroprusiato de sodio (NPS)  $10^{-4}$  M o nitroglicerina (NTG)  $10^{-4}$  M. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de cinco experimentos. \* $=p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Porcentaje de la producción máxima de nitritos en aorta de rata después del tratamiento con vehículo, acetilcolina, ácido 3-nitropropiónico, nitroglicerina y nitroprusiato de sodio. Cada barra representa la diferencia de cinco experimentos.

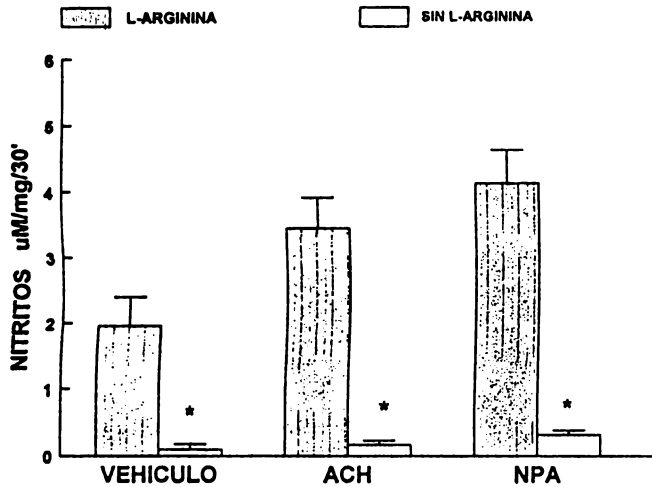


Fig. 4. Producción de nitritos en aorta de rata después de la administración de vehículo, acetilcolina y ácido 3-nitropropiónico. Previamente, se depletó a las aortas del grupo tratado de L-arginina con lavados repetidos. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de cinco experimentos.  $*=p<0.05$ .

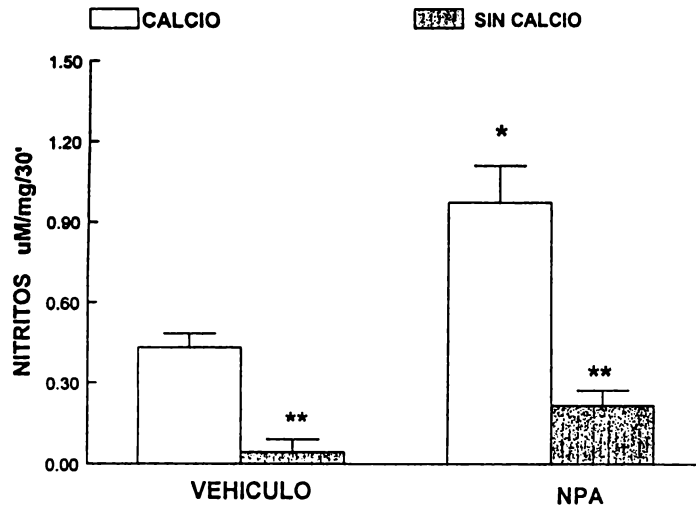


Fig. 5. Producción de nitritos en aortas de rata después de la administración de vehículo o de ácido 3-nitropropiónico. En el grupo tratado se eliminó el calcio de la solución Krebs. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de cinco experimentos.  $*=p<0.05$ ,  $**p<0.01$ .

cular del 3-NPA es susceptible de ser bloqueada con azul de metileno, indicando con ello la participación de la guanilato ciclasa soluble como intermediaria de la acción relajante, y esto, a su vez, indica de manera indirecta la probable participación del óxido nítrico en la producción del efecto relajante. La pregunta que intentamos resolver con el presente trabajo, fue determinar si el 3-NPA era capaz de estimular la vía sintética del óxido nítrico o si liberaba directamente el compuesto de manera similar a como lo hacen los nitrovasodilatadores clásicos, como nitroglicerina (NTG) y nitroprusiato de sodio (NPS).

La administración de 3-NPA en la arteria aorta de rata, es capaz de generar óxido nítrico (NO) como se demostró en los experimentos mostrados en la figura 1, en donde los nitritos son un indicador de la cantidad de óxido nítrico producido por el sistema. La administración de ACH como un control positivo muestra una producción de nitritos que es semejante, incluso ligeramente menor en nuestros experimentos, a la producida por 3-NPA. Esto indica que efectivamente el 3-NPA es capaz de inducir la liberación de óxido nítrico.

Es probable que el mecanismo responsable de

esta elevación en la cantidad de óxido nítrico generado, se deba a que el nitrocompuesto estuviese liberando el radical nitro de sus moléculas y éste fuese transformado a NO, de manera similar a como sucede con los nitrovasodilatadores conocidos, los cuales, se ha demostrado, actúan de esta manera. Cuando se administró NTG y NPS a las arterias, la cantidad de óxido nítrico liberado, expresado como la cantidad de nitritos, se incrementó significativamente de manera similar a como lo hace el 3-NPA. Sin embargo, cuando se repitieron los experimentos con los tres nitrocompuestos y ACh en presencia de L-NAME (Fig. 3), un inhibidor conocido de la enzima óxido nítrico sintasa demostró claramente que la liberación de nitritos por parte de NTG y NPS no se afecta apreciablemente, mientras que para ACh y 3-NPA la liberación de nitritos disminuye considerablemente, esto indica que, a semejanza de ACh, el 3-NPA depende de la vía enzimática de producción de óxido nítrico y parece no liberar el radical nitro de su molécula. NTG y NPS son independientes de esta vía, por lo que no se afecta su liberación de nitritos por el L-NAME.

Dado que 3-NPA parece actuar por la estimulación de la vía enzimática de producción de NO, es probable que actúe en algún nivel de esta vía. Como se demostró en los experimentos con arginina y calcio, el 3-NPA parece ser dependiente de la presencia de estos dos factores, indicando con ello que la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva es la responsable de la mediación de los efectos del 3-NPA.<sup>15,17</sup>

Cómo afecta el 3-NPA a la enzima, no está bien claro todavía; sin embargo, existen algunos datos que pudieran orientar en este sentido. Hay varios trabajos en donde se ha demostrado que el 3-NPA es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa, una enzima integrante de la cadena respiratoria (sitio II), y esto produce la caída en las reservas energéticas de la célula afectada.<sup>4,11,12</sup> Si bien esto ha sido demostrado en neuronas y células cardíacas,<sup>2,4,13</sup> es probable que en las células del endotelio suceda algo semejante. Se sabe que la concentración de calcio intracelular está altamente controlada por mecanismos de transporte, de entre los cuales uno de los más importantes es la ATPasa  $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{++}$ , obviamente dependiente de ATP. Por tanto,

surge la posibilidad de que la depleción de ATP intracelular conlleve a una inhibición de estos mecanismos reguladores del calcio, y la consecuente elevación del ion dentro de la célula estimule la óxido nítrico sintasa, induciendo una liberación de óxido nítrico, probablemente con fines homeostáticos. La demostración de estas hipótesis quedan pendientes para trabajos posteriores.

En conclusión, se puede decir que la vasodilatación inducida por 3-NPA a nivel de arteria aorta de rata está explicada por la liberación de óxido nítrico por parte del endotelio, y que dicha liberación parece estar explicada por la intervención de la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva calcio dependiente.

#### SUMMARY

3-Nitropropionic acid is a nitrocompound derived from plants of genus *Astragalus*. Several toxic effects have been described subsequent to accidental ingestion in animals and human beings; among them, neurological toxic effects are the most frequently reported. Recently, have been described cardiovascular effects after 3-NPA administration; bradycardia and systemic hypotension are the most important of these effects. It is believed that interference on energetic metabolism in cardiac cells explains direct effect on heart function; however, the mechanism responsible of peripheral vasodilation is not well explained. This effect is reversed with administration of methylene blue, indicating the possible involvement of nitric oxide (NO). In this work, we decided to determine if 3-NPA induces vasodilation mediated by nitric oxide release from endothelium. We used isolated rat aorta and measured nitrite liberation as indicator of NO release. The aorta were stimulated with acetylcholine (ACh), and 3-NPA in presence or absence of L-NAME, L-arginine and calcium; nitroglycerine and sodium nitroprussiate were used as positive controls for nitrite release. Our results indicate that 3-NPA induces nitric oxide liberation (expressed as nitrite release), in a concentration higher than that produced by ACh, and, differently to classic nitrovasodilators, this release is inhibited by L-NAME. Evenmore, the absence of L-arginine or calcium induces a complete



blockade of 3-NPA-induced nitrite release. These results suggest that 3-NPA induces vasodilation by NO production from endothelium, and this production is mediated by constitutive, calcium-dependent nitric oxide synthase.

## BIBLIOGRAFÍA

- Castillo, C. "Análisis del efecto vasodilatador del ácido 3-nitropropiónico, un nitrocompuesto alifático proveniente de especies de plantas del género *Astragalus*". Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Depto. de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV-IPN, 1993.
- Hamilton, R.F. and Gould, D.H. "Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage". *Acta Neuropathol.* (Berl), **72**:286-297; 1987.
- Castillo, C.; Valencia, Y.; Reyes, G. and Hong, E. "3-nitropropionic acid, obtained from *Astragalus* species, has vasodilator and antihypertensive properties". *Drug Develop. Res.*, **28**:183-188; 1993.
- López, P. "Caracterización del mecanismo de acción del ácido 3-nitropropiónico en el corazón de rata". Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Depto. de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV-IPN, 1995.
- Pass, M.A.; Majak, W. and Muir, A.D. "Absorption of 3-nitropropanol and 3-nitropropionic acid from the digestive system of sheep". *Toxicol. Letters*, **23**:1-7; 1984.
- Muir, A.D.; Majak, W. and Pass, M.A. "Conversion of 3-nitropropanol (Miseroroxine aglycone) to 3-nitropropionic acid in cattle and sheep". *Toxicol. Letters*, **20**:137-141; 1984.
- Alston, T.A.; Seitz, S.P. and Bright, H.J. "Conversion of 3-nitro-1-propanol (miseroroxine aglycone) to cytotoxic acrolein by alcohol dehydrogenase". *Biochem. Pharmacol.*, **30**(19): 2719-2720; 1981.
- Williams, M.C. and James, L.F. "Livestock poisoning from nitro-bearing *Astragalus*", in: *Effects of poisonous plants on livestock*. De Keeler, R.F.; Van Kampen, K.R. and James, L.F. Academic Press. N.Y., 1978.
- Ludolph, A.C.; Ludolph, A.G. and Sabri, M. "3-nitropropionic acid: Abundant xenobiotic excitotoxin linked to putaminal necrosis and tardive dystonia". *Ann. Neurol.*, **30**:253; 1991.
- Flint Beal, M; Brouillet, E. et. al. "Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid". *J. Neurosci.*, **13**(10):4181-4192; 1993.
- Porter, D.J.; Voet, J.G. and Bright, H.J. "Direct evidence for carbanions and covalent N-flavin-carbanion adducts as catalytic intermediates in the oxidation of nitroethane by D-amino acid oxidase". *J. Biol. Chem.*, **248**(12):4400-4416; 1973.
- Alston, T.A.; Mela, L. and Bright, H.J. "3-nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase". *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**(9): 3767-3771; 1977.
- Alston, T.A. "Suicide substrates for mitochondrial enzymes". *Pharmac. Ther.*, **12**:1-41; 1981.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". *Nature*, **288**:373-376; 1980.
- Sánchez, M.A. "Papel del óxido nítrico en la respuesta vascular en el riñón de ratas hipertensas por coartación de la aorta". Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Depto. de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV-IPN, 1995.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G. and Moncada, S. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium, derived relaxing factor". *Nature*, **327**(11):524-526; 1987.
- Feldam, P.L.; Griffith, O.W. and Stueh, D.J. "The surprising life of nitric oxide". *Chem. Eng. News*, **20**:26-38; 1993.
- Ignarro, L.J.; Bugo, G.N.; Wood, K.S.; Byrns, R. and Chaudhuri, G. "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide". *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**:9265-9269; 1987.