

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas
y Agropecuarias**

División de Ciencias Biológicas y Ambientales



**ANÁLISIS RETROSPECTIVO SOBRE LA PARTICIPACION
DEL OXIDO NITRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P r e s e n t a:

MAURICIO EMANUEL ROMERO BASURTO

GUADALAJARA, JAL.

ENERO 1997



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES


C. MAURICIO E. ROMERO BASURTO
P R E S E N T E .

0602/96

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis ("ANÁLISIS RETROSPECTIVO SOBRE LA PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL") para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis al M.C. CARLOS BEAS ZARATE.

ATENTAMENTE
" PIENSA Y TRABAJA "
Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio 25 de 1996
EL DIRECTOR


M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

C.U.C.B.A



EL SECRETARIO


OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

**DIV. DE CS.
BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES**

c.c.p. **M.C. CARLOS BEAS ZARATE.**- Director de Tesis.- pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

AEIR/SVM/achm

M. EN C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
Director de la Div. de Cs. Biol. y Amb.
C.U.C.B.A.

P R E S E N T E:

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante MAURICIO EMANUEL ROMERO BASURTO código 089379857 con el título: "ANALISIS DOCUMENTAL RETROSPECTIVO SOBRE LA PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL", consideramos ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración ésta versión final del escrito para su revisión y en su caso autorización de su impresión y la programación correspondiente de la fecha de examen de tesis y profesional respectivos.

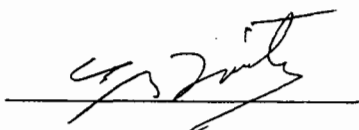
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para saludarlo afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jal., Agosto 14 de 1996.

EL DIRECTOR DE TESIS



M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

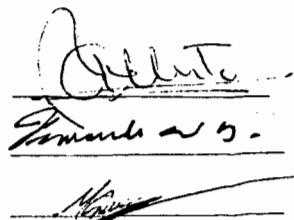


SINODALES

DR. ALBERTO MORALES VILLAGRAN

M. EN C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

M. EN C. MARIA DE LA CRUZ ARRIAGA



AGRADECIMIENTOS

Dicen que es de bien nacidos, ser agradecidos...

Con la tesis concluyo con orgullo, de manera oficial y formal la licenciatura, cosa que me resulta un gran respiro. Ahora me enfilo hacia el posgrado de mi agrado.

Para la concluida tarea, aunque nadie me lo crea, recibí mucho apoyo, y para ya no echar tanto rollo, agradezco de todo corazón:

A Dios, mi jefazo mayor;

A mis padres, Mario y Dora, por todo el cariño, educación y ayuda que me han dado; por traerme a la vida, por sus innumerables atenciones y por las llamadas de atención. A mi papá por su ejemplo de hombre que buscó la superación personal a través de la lucha, la amistad, el ingenio y la preparación académica (principalmente autodidacta), hasta alcanzar altas cumbres y aprovechar su posición para ayudar a la gente; por su ayuda para ingresar a la carrera. A mi mamá, por tantos desvelos por mí, por su ejemplo de entrega y tenacidad: de que se propone algo... ¡cuidado!
(su última misión fué recuperar el telescopio... ¡gracias Jefa!);

A todos mis hermanos, también por su cariño y ejemplo, por el tiempo compartido. Tener nueve hermanos ha sido una gran experiencia;

Al quinteto que me enroló en el manicomio (de la Garza, Larracilla, Cortés, Guerra y Castro), y a mis contemporaneos que conquistaron junto conmigo el mar de "Las Américas"; a los jefes que entonces se asentaban en Av. la Paz;

A Carlos Beas, por sus clases y especialmente por dirigir la tesis, con la paciencia y esfuerzo que esto implica;

A los del laboratorio de neuroquímica por darme ánimos, principalmente con el ejemplo perdurable de lo que es echarle ganas a la chamba; especialmente a Vero que me facilitó amablemente varios artículos;

Al Sr. Pedrero y al Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros;

A mis profesores de carrera: Elsa Moyado, Sergio Flores, Luis Burgos, Martha Savala, Daniel Ortuño, Laura Guzmán, Galina Petrovna, Sonia Navarro, Rosa Ma. Domínguez y Marisela Meneses;

A todos mis compañeros de generación, entre otras cosas por su paciencia conmigo;

A Alfonso Islas, por su apoyo y consejo; por esos ratos de discusión profunda. A los de su laboratorio en el Dermatológico, por su amistad y amabilidad, y por los ratos divertidos que saben hacer y que hacen más gusto el trabajo;

A Luis Carlos Aguilar y el INEDEC, por permitirme estar de estorbante; a Javier por sus finas atenciones;

Al Maestro Cifuentes Lemus, por el impulso académico que le dió a la escuela, incluidas las excelentes conferencias suyas y de sus amigos y colegas, y por apadrinar a la generación;

A mis sinodales, por revisar y corregir la tesis;

A mis tíos de quien recibí apoyo económico; fué un favor generoso, de esos que con toda seguridad pagaré de manera indirecta, haciendo el bien a otros durante mi desempeño profesional;

A mis amigos Damián Ginebra, Alex Sada, Eduardo Castro y el licenciado Rochín, por sus ánimos y atinados consejos sobre cuestiones técnicas y profundas sobre el trabajo; consejos que fueron útiles para la tesis, consejos a los que les seguiré sacando provecho en mi vida profesional;

A Fernando Domínguez Rufz, por ese buen consejo sobre el proyecto de mis estudios: se sigue cumpliendo;

A mis amigos y colegas científicos, Julio Sierra y Jorge Quesada; por los diálogos sobre la profesión y la ciencia; por abrirme horizontes. A Julio, especialmente por darme el impulso para no rajarme de la biología. A George, por abrirme la maceta (y eso que sigo siendo tarado y medio, ¿como estaría antes?);

A Patxi Ertze y el Liceo del Valle (mi primera escuela), por las facilidades que me dieron para terminar la tesis; especialmente a mi titular y jefe, Jaime Orozco;

A mis buenos amigos que me ayudaron con cuestiones de trámites, Paco el imitador y el Pitus;

A Paco Fernández de Miguel y a Javier, por su amabilidad al facilitarme fotocopiar tropocientosmil artículos; a Rodrigo Milanés-Rodríguez por el hospedaje que me dio en la RUP durante aquellos viajes "en busca de la bibliografía perdida";

Al Pitu, al Spider-Peje y los Merino, por facilitarme sus respectivas computadoras en la recta final de la tesis; Al Alexander, por las últimas orientaciones para esta chamba;

A todos mis amigos, por sobradas y obvias razones.

A mis Padres, con todo mi cariño

A Peri

A los Beatles: John, Paul, George
y Ringo



BIBLIOTECA GENERAL

INDICE

PREFACIO.....	1
INTRODUCCION.....	3
I. GENERALIDADES.....	5
Importancia química y biológica del ON.....	5
II. IMPORTANCIA DEL ON EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	7
II.1. Sistema inmunológico.....	7
II.2. Participación del ON en los vasos sanguíneos.....	8
II.3. Otros sitios de funcionamiento del ON.....	9
III. EL ON EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	10
III.1. ANTECEDENTES.....	10
III.2. OXIDO NITRICO SINTETASA.....	11
a) Isoformas de la ONS y sus cofactores.....	12
b) Activación de la ONS.....	14
c) Características cinéticas.....	15
d) Regulación de la ONS.....	15
e) Localización de la ONS.....	17
e.1. Las técnicas que se han utilizado.....	17
e.2. La localización de la ONS.....	17
e.3. Colocalización de la ONS con otros compuestos.....	19
f) Biosíntesis del ON.....	20
g) Otros estudios de localización.....	20
III.3. DONADORES, INHIBIDORES Y CAPTURADORES DEL ON.....	21
III.4. EFECTORES DEL ON.....	22
III.5. EL ON Y LA FUNCION SINAPTICA.....	24
III.5.1. EL ON Y LAS CORRIENTES EN LOS RECEPTORES NMDA.....	24

III.5.2. EL ON Y LA NEUROTOXICIDAD.....	25
A) Introducción.....	25
B) Tipos de receptores al glutamato.....	26
C) La neurotoxicidad y las enfermedades del SNC.....	26
D) Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad mediada por glutamato.....	27
E) Mecanismos de acumulación anormal de glu.....	28
a) Liberación de glu a partir de los almacenes vesiculares.....	29
b) Liberación de glu y lesión celular.....	29
c) Patofisiología de la excitotoxicidad a nivel de los receptores.....	30
d) Potenciación de las respuestas postsinápticas al glu.....	31
F) El papel del calcio en la toxicidad.....	31
G) El ON y la neurotoxicidad.....	33
G.1. La síntesis patológica del ON.....	33
G.1.a. Las neuronas que tienen NADPH diaforasa y la toxicidad.....	34
G.1.b. El ON provoca neurotoxicidad.....	35
G.1.c. El ON no provoca neurotoxicidad.....	37
G.1.d. El ON previene de la neurotoxicidad.....	38
III.5.3. EL ON Y LA SECRECIÓN.....	39
III.5.4. EL ON Y EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.....	39
III.5.5. EL PAPEL DEL ON EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA.....	40
Aprendizaje.....	43
CONCLUSIONES.....	44
I. El ON como molécula mensajera que desempeña un papel en el SNC.....	44
II. El ON y su participación en la excitotoxicidad neuronal.....	47
FUTURA INVESTIGACIÓN SOBRE EL ON Y SU PAPEL EN EL SNC.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



ANÁLISIS RETROSPECTIVO SOBRE LA PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

PREFACIO

Es de entenderse, que un descubrimiento que se presenta como novedoso, desencadene en el ambiente científico formado por los investigadores, una especie de euforia por ampliar y profundizar en el conocimiento del nuevo "caso científico", siempre con la viva inquietud, característica de los científicos, de esclarecer los misterios de la naturaleza, con la esperanza latente de aportar uno, o unos, de esos tan mencionados "granos de arena" que podrán aumentar el acervo cultural del conocimiento, y beneficiar tarde o pronto, alguna de las necesidades del hombre.

Es este el caso, uno más, de la actual investigación que, sobre el óxido nítrico se realiza. La especial situación que se da en este, es que la molécula hasta hace poco tiempo caracterizada con actividad biológica en el hombre, resulta estar compuesta por la sencilla cantidad de dos átomos, con características de señalización neuronal que rompen los esquemas clásicos descritos para los neurotransmisores, y con una vasta cantidad de funciones distribuidas en tipos celulares muy diversos, como no se había descrito para ninguna molécula mensajera, al mismo tiempo que se sintetiza por la enzima que se presenta como la más regulada dentro del conocimiento de la biología actual. No es entonces de tanto asombro, saber del creciente y gran número de laboratorios e investigadores dedicados al esfuerzo de profundizar en el conocimiento sobre la participación del óxido nítrico en los sistemas biológicos y en el sistema nervioso central, como un tema de especial interés para muchos de estos científicos. Los resultados obtenidos y las nuevas perspectivas que se plantean, justifican satisfactoriamente semejante dedicación. El amplio espectro de funciones del óxido nítrico en los sistemas biológicos y aún en el sistema nervioso central, lo han convertido en la esperanza que puede explicar más certeramente tópicos como la memoria, el aprendizaje y las enfermedades

neurodegenerativas.

Con el presente trabajo se pretende elaborar un documento que pueda utilizarse como fuente de consulta para el conocimiento de los aspectos básicos de la participación del óxido nítrico en el sistema nervioso central. Se trata de manera más extensa la sección del papel excitotóxico del óxido nítrico en el sistema nervioso central, no solo por interés personal del autor, sino por hacer además un intento de reforzar el documento en el apartado que puede resultar más útil para el laboratorio que atentamente prestó su ayuda al tesista que presenta éste trabajo.

El tema es novedoso y reciente. La mayor parte de la información actualmente disponible sobre el tema, viene presentada en artículos científicos especializados. Esto justifica la presente tarea y esfuerzo por elaborar un documento con carácter de compendio básico sobre los recientes conocimientos adquiridos del tema citado. La información que aquí se presenta tiene como fuente bibliográfica varios de esos artículos. Algunos se pueden considerar ya, como clásicos del tema; otros, son de investigaciones recientes; y finalmente, otros más, que se puede decir son los más valiosos, por ser revisiones extensas elaboradas por los investigadores pioneros del tema, y otras, por los actuales vanguardistas en esto, los que en algunos casos coinciden ser también de los mencionados pioneros. El documento viene a estar complementado por una carpeta que contiene todos los artículos utilizados para su elaboración. En esta, se tiene la posibilidad de ampliar la investigación documental, profundizar los conocimientos expuestos, y encontrar elementos para proponer distintas alternativas que pueden o deben seguirse en la futura investigación sobre el vasto tema, y en ocasiones controvertido, de la participación del óxido nítrico en el sistema nervioso central.

INTRODUCCIÓN

El primer hito sobre la relación del óxido nítrico (ON) en el sistema nervioso se tuvo en 1982. Takeo Deguchi (1) notó que la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en el cerebro necesitaba de arginina (arg) (la que más tarde se identificó como sustrato a partir del cual se sintetiza enzimáticamente el ON). En 1989 Moncada pensó que la función del GMPc en el cerebro se relacionaba con la formación del ON. De hecho, encontró la formación del ON en preparaciones de tejido cerebral (2).

J. Garthwaite observó la formación de una sustancia de vida corta luego del estímulo al tejido cerebral al agregar el aminoácido glutamato (glu). Más adelante se descubrió que el glu es el responsable de la liberación de ON mediante la estimulación de los receptores NMDA (3). En 1989 S. H. Snyder y D. S. Bredt investigaron el posible papel del ON en la función sináptica (4). Puesto que se demostró que el ON ejerce su acción a través del GMPc en los vasos sanguíneos, posteriormente, se encontró que en una parte del cerebro la adición de glu tiene un efecto directo sobre la formación de GMPc. J. Ferrendelli en los setentas, también observó que al adicionar glu a rebanadas de cerebelo rápidamente incrementa la concentración de GMPc (3).

Mediante el uso de preparaciones similares de cerebelo se desarrolló una técnica para medir la actividad de la enzima que sintetiza el ON, la óxido nítrico sintetasa (ONS). Puesto que la arg produce ON y citrulina en igual proporción, se cuantificó la conversión de arg radioactiva en citrulina, y de esta manera, la cantidad de citrulina es un indicador de la cantidad de ON que se produce, y por lo tanto, de la actividad de la ONS. También se encontró que la actividad de la enzima se triplica cuando se añade

glu a las rebanadas, o bien, su agonista NMDA (del que se tomó el nombre para los ya mencionados receptores). En las mismas rebanadas se confirmó que el NMDA produce aumentos prolongados en los niveles de GMPc, por lo que se decidió examinar entonces, si existía un nexo causal entre la formación de ON y la formación de GMPc. La respuesta se encontró al adicionar inhibidores de la enzima ONS, específicamente un derivado metilado de la arg, a las rebanadas de cerebelo. Así, la arg metilada bloqueó la formación de GMPc a las mismas concentraciones en que se inhibe a la enzima ONS. Garthwaite y Moncada también observaron este bloqueo de formación de GMPc (3). Estudios posteriores de este tipo, junto con otros en los que la adición de agonistas al glu producen los mismos efectos que este (síntesis de ON y elevación de los niveles de GMPc), realizados en distintas regiones del SNC, han confirmado con seguridad que el ON es mediador de la elevación de los niveles de GMPc inducidos por el glu (5,6,4).

La investigación del ON en el SNC tuvo continuación por distintos caminos. En el presente trabajo se aborda el tema, iniciando con las generalidades y características químicas de la molécula, hasta concluir con las perspectivas que posiblemente se tomen en la futura investigación sobre el ON.



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AGROPECUARIAS
CARRERA CENTRAL

I GENERALIDADES

Desde tiempo atrás se conoce que el óxido nítrico (ON) existe en bacterias, pero hasta hace pocos años no se tenía evidencia de su actividad biológica en vertebrados (7).

En 1987 se demostró la formación de ON en células endoteliales vasculares por la acción de una enzima, se caracterizó con propiedades similares a las del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (8,9), y más tarde se comprobó que se trató del mismo compuesto, cuyo efecto principal es estimular endogenamente a la Guanilato ciclasa soluble (GCs) (2,9). Es además una molécula efectora liberada por macrófagos y otras células, luego de su activación inmunológica (10). Simultáneamente, también sirve como molécula mensajera en el cerebro, de manera similar a como funciona un neurotransmisor, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (9, 11).

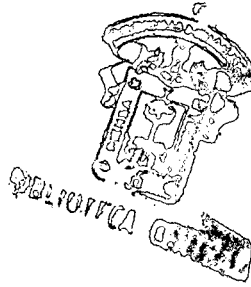
Importancia Química y Biológica del ON

El ON es un compuesto muy simple, formado por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno. No se debe confundir con el óxido nítrico, compuesto de dos átomos de nitrógeno y uno de oxígeno, que se utiliza desde hace mucho tiempo como anestésico y que es químicamente estable (3,7). Es altamente tóxico; un científico estuvo cerca de perder su vida luego de intentar inhalarlo (12).

Bajo condiciones atmosféricas el ON es un gas de solubilidad limitada en el agua (concentración máxima de aproximadamente 1 mM), pero así como el oxígeno y el bióxido de carbono, el ON puede fácilmente cruzar las membranas biológicas por difusión, por lo que su actividad no se puede regular por simples mecanismos de liberación y recaptura (12). Esto lo convierte en un posible neurotransmisor de un tipo nuevo, ya que la mayoría de estos se almacenan en vesículas y son liberados por una maquinaria específica dependiente de la concentración de calcio en la terminal nerviosa (13). Sin un aparato especial que lo libere, el ON puede difundir desde elementos pre y postsinápticos (13).

Su estructura de radical libre, que posee un electrón extra, lo hace químicamente muy reactivo (3). Es extremadamente lábil; se desconoce su vida media fisiológica, pero se calcula que existe por aproximadamente 10 segundos y se convierte en nitratos y nitritos por acción del agua y el oxígeno (3). Finalmente, cuando se superfunde sobre de un tejido, su actividad se reduce hasta en un 50% en unos cuatro segundos (12).

Aunque los blancos del compuesto no han terminado de identificarse, se sabe que por su alta reactividad se une al hierro que está formando parte de grupos hemo y al que no forma parte de estos grupos, lo que conduce a cambios conformacionales de proteínas que poseen uno de estos grupos, bien sean férricos o ferrosos (13). Algunos de los compuestos que pueden interactuar fuertemente con el ON pueden servir como marcadores moleculares específicos para determinar la ubicación del ON.

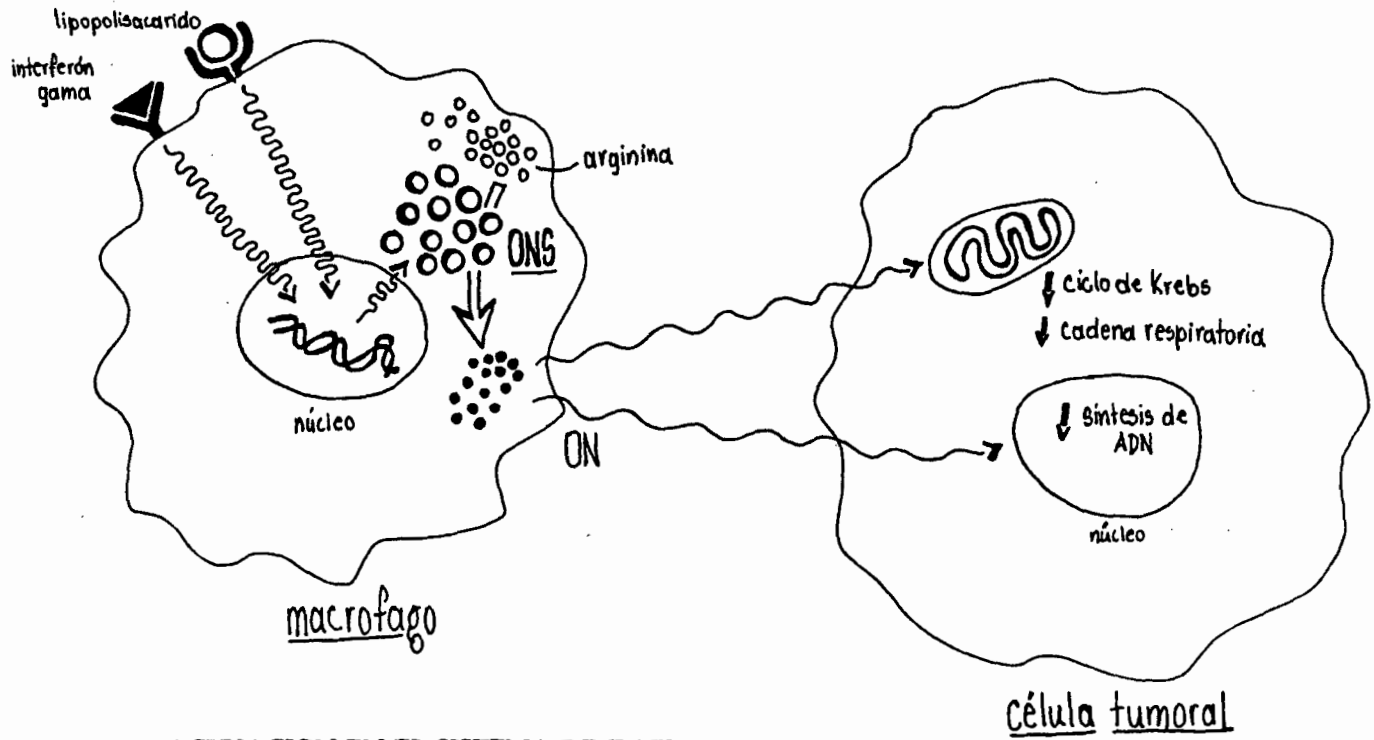


II. IMPORTANCIA DEL ON EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Se han identificado algunos sistemas en los que el ON participa desempeñando un papel importante, como el sistema inmunológico, el sistema vascular y el sistema nervioso. El papel del ON en el sistema nervioso central constituye el tema del presente trabajo, por lo que a continuación inmediata sólo se explicará brevemente el papel que el ON desempeña en otros sistemas. Resulta constructivo y de especial interés conocer su papel en los vasos sanguíneos, donde por primera vez se identificó una función fisiológica para el ON, y donde opera de una manera similar a como opera en el sistema nervioso central.

II.1. Sistema Inmunológico

La primera evidencia de que el ON se forma endógenamente proviene de estudios realizados sobre nitratos de la dieta, como fuente de nitrosaminas carcinogénicas (7). Ratas alimentadas con dietas bajas en nitratos, excretan, a pesar de esto, cantidades considerables de estos nitratos (14). Así, un paciente con excreción de grandes cantidades de nitratos urinarios resultó padecer de una diarrea infecciosa, con lo que se pensó en la posibilidad de asociar al proceso inflamatorio con la diarrea como responsable de



ACTUACION EN EL SISTEMA INMUNE

El interferón gama y el lipopolisacárido, transmiten al núcleo del macrofago señales que inducen la traducción de la enzima ONS, que convierte la arginina en ON. Este destruye las células tumorales por inhibición de reacciones fundamentales.

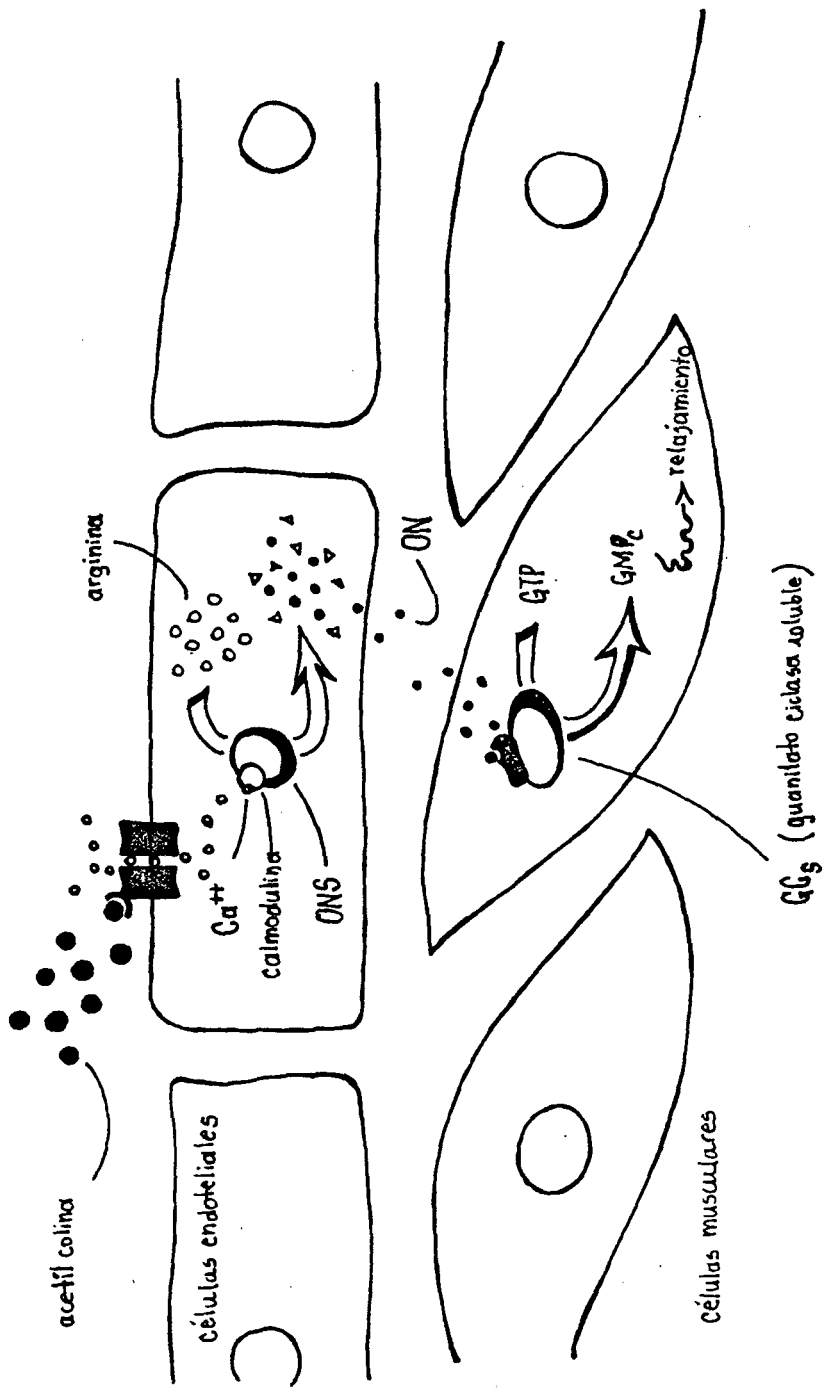
la formación de nitratos. La inyección de endotoxinas bacterianas (mismas que provocan procesos inflamatorios) estimula en cultivos aislados de macrófagos la excreción de nitratos (7, 15), lo mismo que la adición a los cultivos de interferón gamma (3). Ratones enfermos genéticamente con una deficiencia de macrófagos excretan escasos nitratos (7, 15), por lo que se asoció con más firmeza la presencia de macrófagos con la formación de nitratos.

Se descubrió que los macrófagos no producen nitratos en ausencia del aminoácido arg (15) y posteriormente a la enzima específica que transforma la arg en ON, intermediario que pronto se convierte en nitritos y nitratos (3).

Por otro lado, la capacidad de los macrófagos de destruir células tumorales y bacterianas desaparece en ausencia de arg (10). Así, Hibbs encontró un inhibidor de la enzima que bloquea tanto la formación de nitratos como la capacidad citotóxica de los macrófagos. De esta forma, cuando los macrófagos se activan por endotoxinas o células T, responden con un aumento en la conversión de arg a ON (3, 16). El interferón gama captado por receptores en la membrana del macrófago transmite una señal al núcleo de la célula que induce la producción de la enzima que sintetiza al ON. La ONS produce ON que destruye bacterias, hongos y células tumorales, en estas últimas por inhibición del ciclo de Krebs, del transporte electrónico de la fosforilación oxidativa, y de la síntesis de nuevo de ácido desoxiribonucleico (ADN) (3).

II.2. Participación del ON en los Vasos Sanguíneos

El ON participa también en la dilatación de los vasos sanguíneos, los vasos sanguíneos se dilatan por la acción de neurotransmisores, como la acetilcolina, que causa que el estrato muscular de los vasos se distienda. En efecto opuesto a este existen otros neurotransmisores como la norepinefrina, que induce la contracción del músculo y la vasoconstricción. A diferencia de los receptores de la norepinefrina que se encuentran directamente en las células musculares, los receptores para la acetilcolina se encuentran en



ACTUACION EN LOS VASOS SANGUINEOS

las células del endotelio de los vasos, revestimiento interno adyacente a la capa muscular. En ausencia de la capa endotelial, la distensión de los vasos provocada por la acetilcolina queda suprimida. La acción de la acetilcolina sobre los receptores de las células endoteliales provoca la liberación de una sustancia que difunde a la capa muscular adyacente produciéndose así una dilatación del vaso sanguíneo. A la molécula se le denominó "endothelium derived relaxing factor" (EDRF), es decir, factor relajante derivado del endotelio, y como se dijo antes, en 1987 se demostró su identidad con el ON. La dilatación del vaso sanguíneo se realiza cuando el ON se une al hierro del grupo hemo de la GCs, lo que activa a la enzima y conduce al aumento en la síntesis de GMPc. Este último estimula a una proteína cinasa la cual fosforila la cadena ligera de las fibras de miosina induciendo el cambio a la conformación estirada de estas, con la consecuente distensión de cada célula muscular (7). La nitroglicerina y los nitratos orgánicos que se convierten a ON llevan también a la distensión de los vasos sanguíneos (3, 9, 7).

Se ha propuesto que puede ser el regulador normal de la erección penil, y el principal regulador de la presión sanguínea. Tratamientos con inhibidores de la ONS provocan un rápido aumento de la presión sanguínea, aumento más notable que el que provocan las alteraciones que se deben a la norepinefrina y a la angiotensina. Los cambios en la regulación del ON podrían estar asociados a la hipertensión u otras anomalías de la presión sanguínea (3, 9, 7).

II.3. Otros sitios de funcionamiento del ON

El ON inhibe la coagulación sanguínea a través de impedir la agrupación de las plaquetas y afecta al tono del músculo liso. Las altas concentraciones de ONS en el plexo mientérico a través de la ruta gastrointestinal sugiere que el ON puede mediar el funcionamiento de estos nervios. Una de las mayores actividades del plexo mientérico es mediar el relajamiento no adrenérgico-no colinérgico (NANC) de los intestinos, un componente importante de la peristalsis. Estudios realizados durante varios años han puesto en claro que los neurotransmisores clásicos tipo aminas biogénicas no pueden explicar el relajamiento NANC. En numerosas partes del sistema gastrointestinal, los inhibidores de la ONS tales como la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) y la nitroarginina inhiben en forma potente el

relajamiento NANC. Estos efectos son contrarrestados por la arg, lo que confirma su selectividad. Así, el nitroprusiato, que genera ON, mimetiza los efectos de la estimulación NANC (7). También en la rata, el músculo anococcigeo, recibe una inervación motora noradrenérgica y otra inhibidora NANC. Cuando los nervios noradrenergicos se inhiben con guanitidina, la estimulación de campo de esta preparación produce un desarrollo rápido y una distensión poderosa. Esta respuesta la mimetizan los nitrovasodilatadores que incluyen al ON y se inhibe con la hemoglobina (Hb) de manera dependiente de calcio (Ca^{++}), lo que sugiere que el ON es el mediador de la respuesta (9).

Por tinción inmunológica, recientemente se han identificado más tipos celulares que contienen a la ONS, lo que sugiere alguna función para el ON en estos, entre los que están las del músculo esquelético, las de los islotes pancreáticos, células de riñón, y ciertas células epiteliales. Por exposición a citocinas inflamatorias, se ha detectado en el hígado, células musculares lisas, condrocitos, miocardio, y otros tipos celulares (17).

III. EL ON EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

III.1. ANTECEDENTES

Se conoce que la neurotransmisión mediada por agentes como acetilcolina (ACh), glutamato (glu), y glicina (gli) se ha asociado con altos niveles de GMPc en el cerebro y particularmente en el cerebelo. En 1974 se demostró que el glu causa acumulación de GMPc en rebanadas de cerebelo, en un proceso que requiere calcio (Ca^{++}). Las suspensiones de células del cerebelo que contienen una mezcla de distintos tipos celulares muestran también una acumulación de GMPc inducido por glu, mas no las preparaciones altamente purificadas de células de Purkinje. En 1977 se demostró que el ON estimula la GCs en homogenizados de corteza cerebral del ratón. En el mismo año se encontró que la fracción soluble del proencefalo de la rata contenía una substancia de bajo peso molecular que activa la GCs y que su acción se inhibe por hemoglobina (Hb) (18). Posteriormente, se pensó en la relación de este activador

con las nitrosaminas, que tenía actividad en el mismo sitio alostérico que estas. Se reportaron descubrimientos similares en el cerebelo de la rata. En 1982 se identificó el activador endógeno de la GCs en células de neuroblastoma como L-arg (1). Estas observaciones junto con el descubrimiento de la ruta L-arg:ON en el endotelio vascular, llevaron a la investigación de la existencia de esta ruta en el sistema nervioso central (9).

La adición de L-arg a preparaciones de sinaptoplasma de rata en la presencia de nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) condujo a la formación de ON y citrulina simultáneamente con la estimulación de la GCs (2). Ambos procesos fueron inhibidos por Hb y L-NMMA (9). Estos datos probaron que el cerebro de la rata posee ONS. Así, la estimulación de células de cerebelo de rata con N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista del glu, mostró inducir una elevación de los niveles de GMPc el cual se asoció con la liberación de un material similar al EDRF. Más aún, las células que liberaban este material en respuesta al NMDA no son las células blanco en las que los niveles de GMPc se elevan (9). Se mostró que las respuestas de GMPc a la estimulación de NMDA (4) y a kainato en rebanadas de cerebelo de rata aumentan por la L-arg y se inhiben por L-NMMA en una manera tal que por la adición de arg el proceso es reversible, mostrando que la respuesta es mediada consecuentemente por el ON. Se mostró que la administración intracerebelar de L-NMMA en ratones inhibe el aumento de GMPc inducido por NMDA, quisqualato, kainato, harmalina, y pentilene-tetrazol. Ha quedado demostrando que la ruta L-arg:ON realiza la mediación *in vivo* de los aumentos de GMPc inducido por estos compuestos (9, 5, 6).

III.2. ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA

Muchos avances en la investigación del ON se han dado por la caracterización de la ONS; al localizarla en el SNC, el papel del ON aparece más claro y evidente (19). La enzima presenta distintas

formas isoméricas. Todas estas utilizan L-arg como sustrato y sintetizan ON y citrulina de manera estequiométrica (7). Para realizar esta reacción requieren de donadores electrónicos, y algunas isoformas, de la unión de complejos moleculares que actúan a manera de cofactores.

a) Isoformas de la ONS y sus Cofactores

Hasta la fecha, varias formas de ONS han sido identificadas: una o más formas inducibles presentes en macrófagos, neutrofilos, hepatocitos y probablemente en células gliales, y por lo menos, dos formas constitutivas presentes en células endoteliales y neuronas. Cuatro isoformas han sido clonadas: una de cerebro, una endotelial, una de macrófagos y una de hepatocitos (13).

Las formas clonadas comparten aproximadamente el 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos y requieren de algunos donadores electrónicos como el adenindinucleotido de flavina (FAD), el mononucleotido de flavina (FMN), y NADPH que se encuentran unidos estrechamente en sitios potenciales y específicos, una molécula de cada uno por molécula de ONS (9, 17). Presumiblemente, son transferidos sucesivamente los electrones entre el NADPH y los dos grupos flavín como parte de la actividad catalítica. La ONS posee también una molécula de tetrahidrobiopterina estrechamente unida, así como un mol de hierro por monomero de ONS (7). La síntesis del ON se da por la oxidación de un nitrógeno del grupo terminal guanidino de la L-arg (13).

Basados en el requerimiento de NADPH para la enzima, la columna cromatográfica de afinidad a 2',5'-ADP permitió su purificación extensiva (ONS de cerebelo de rata) bajo un solo paso (20). Tiene un peso molecular monomérico de 160 kD. El citosol del cerebro bovino ha mostrado tener también ONS (7).

El ADN clonado (ADNc) completo de la ONS constitutiva se insertó en un vector de expresión y se expresó en células renales humanas. La ONS expresada presentó actividad catalítica con las propiedades correspondientes a las observadas en la ONS nativa (13).



La estructura primaria de la ONS del cerebro revelada con la ayuda de la clonación molecular, indica que la proteína posee una secuencia de unión (de configuración en alfa hélice) para la calmodulina, y otra más para fosforilación por la proteína cinasa dependiente de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Las secuencias de fosforilación por proteína cinasa C (PKC) o proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina no son lo suficientemente selectivas como para ser identificados en la ONS. De todas las proteínas de mamífero que se han secuenciado, la ONS posee una homología cercana a la P-450 citocromo reductasa (CPR). Ambas son muy similares en su carboxilo terminal; la ONS presenta 58% de homología con la CPR por 641 aminoácidos. Posee también homología con la sulfito reductasa bacteriana. Las tres son únicas en poseer sitios de unión para el NADPH, FMN, y FAD en el mismo polipéptido. En las reductasas, los grupos flavín constituyen la cadena de transporte de electrones, mismos que son lanzados entre los anillos de isoaloxazina, reacción que parece suceder de igual manera en la ONS (7, 17).

La ONS endotelial bovina y humana es una proteína de 133 kDa con similitud del 90% y del 50 y 60% en comparación con la de macrófago y cerebro, respectivamente. Posee los mismos sitios de unión a cofactores que la isoforma cerebral. Estas enzimas expresadas en distintos tipos celulares resultan en formas activas, con dependencia de Ca^{++} y producción de ON a partir de L-arg. De manera interesante la enzima endotelial posee una secuencia para la miristilación en la terminal amino. Esto puede explicarse por la localización particular de la ONS endotelial (13).

Dos isoformas inducibles distintas de la ONS han sido clonadas: la de macrófagos, y la de hepatocitos humanos. Estas formas poseen 80% de similitud en su secuencia aminoácida. Su peso es de 130 kDa. Aunque se sabe que la actividad de la ONS de macrófago es independiente de Ca^{++} -calmodulina, esta posee un sitio de unión para calmodulina. Su expresión y activación aumentó notablemente en células renales humanas con la adición de lipopolisacárido, mas no fue afectada por los liberadores de Ca^{++} . La isoforma de hepatocitos también posee un dominio de unión para el complejo Ca^{++} -calmodulina, pero

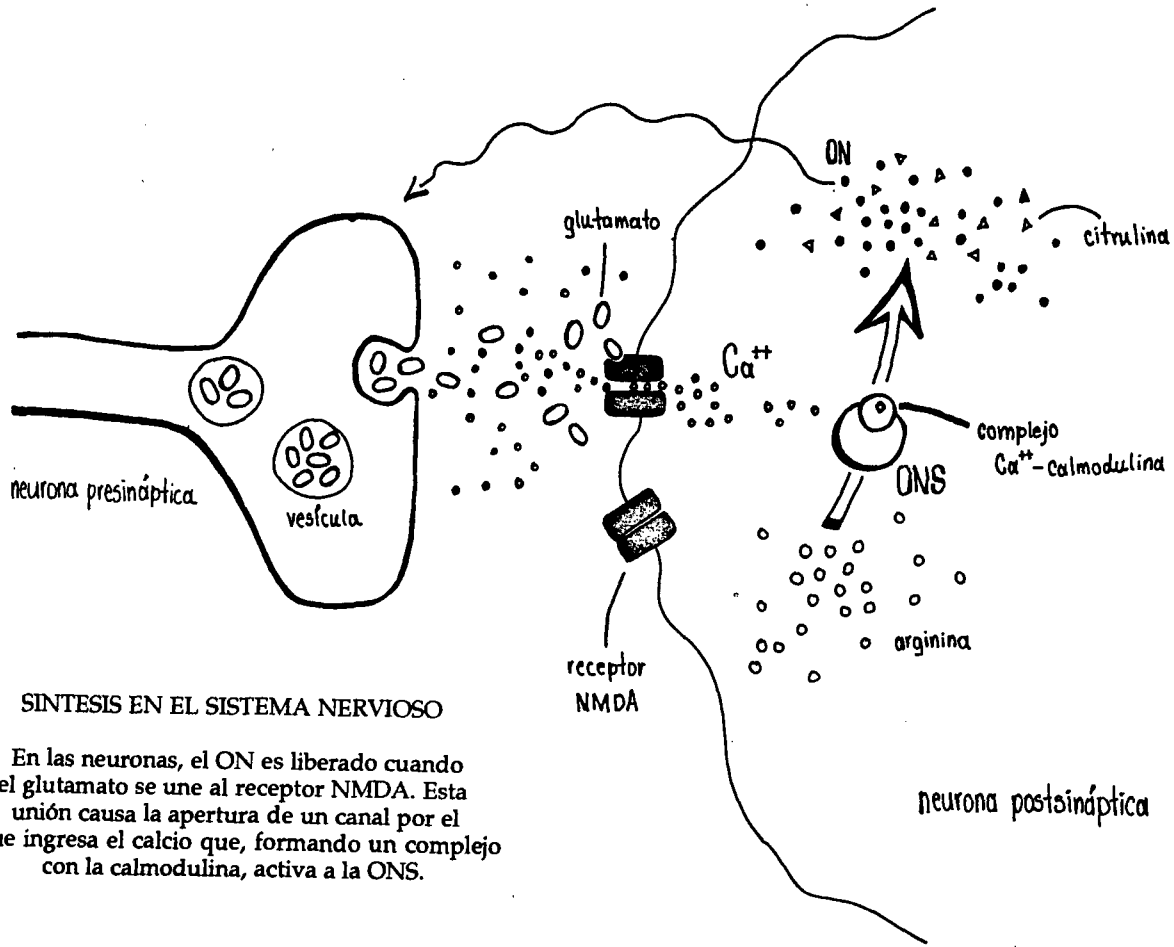
en contraste con la isoforma de macrófago, su actividad se atenúa significativamente tanto por los capturadores de Ca^{++} como por antagonistas de calmodulina (13).

b) Activación de la ONS

Conocimiento adicional sobre la formación del ON y su regulación, viene de la purificación de la ONS del cerebro y su clonación molecular. La enzima es dependiente de la concentración de Ca^{++} libre y permanece inactiva en la concentración del restante Ca^{++} libre de sinaptosomas, aproximadamente 80 nM, mientras que se activa completamente a concentraciones de aproximadamente 400 nM (9). Se encontró también que la calmodulina es un cofactor esencial para el funcionamiento de la ONS; la mitad de la estimulación máxima por calmodulina en la presencia de calcio se observó a la concentración de 10 nM (7). Se explicó así el brusco aumento que triplica la actividad de la ONS en unos segundos, registrado en rebanadas de cerebelo provocado por agonistas glutamatérgicos (12). Los receptores NMDA abren canales iónicos a Ca^{++} , que al ingresar se une a la calmodulina. Este complejo calcio-calmodulina se une a la ONS en un sitio específico y la activa (20, 13).

Probablemente la principal fuente de Ca^{++} intracelular es la hidrólisis de fosfoinosítidos (PI) inducida por neurotransmisor, lo que resulta en la liberación de Ca^{++} de almacenes intracelulares mediada por trifosfato de inositol (13). En el cerebro, el ingreso de Ca^{++} se debe principalmente a la apertura del canal de los receptores NMDA y es posible que alguna cantidad menor ingrese por los canales dependientes del voltaje (13, 17).

La expresión de la forma inducible requiere de síntesis de proteínas y se inicia con el estímulo de varias citocinas y productos microbianos (15, 10, 16, 13, 21). Luego de la inducción, el ON se produce en grandes cantidades (nanomoles) por varias horas, en contraste con la forma constitutiva que permanece activa por periodos cortos y produce menores cantidades de ON (picomoles) (13).



SINTESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO

En las neuronas, el ON es liberado cuando el glutamato se une al receptor NMDA. Esta unión causa la apertura de un canal por el que ingresa el calcio que, formando un complejo con la calmodulina, activa a la ONS.

La activación de la ONS, con su consecuente aumento en los niveles de ON y GMPc (en preparaciones de cerebelo), se ha logrado también por la utilización de radiación de campo electromagnético de frecuencia de radio tipo "burst" (22).

c) Características cinéticas

Moncada y col. (23) determinaron las características cinéticas de la ONS de cerebro de rata mediante la relación de la tasa de producción de ON y la de activación de la guanilato ciclasa. La ONS muestra una dependencia absoluta de L-arg, Ca⁺⁺ y de NADPH.

La V_{max} resultó ser de 42 pmol de ON formado en un minuto por mg de proteína. La K_m para la L-arg resultó de 8.4 μ M. Se calculó también la K_i de tres inhibidores competitivos de la L-arg, obteniendo los valores de:

0.7 μ M L-NMMA

0.4 μ M NARG

1.2 μ M N^o-iminoetil- L-ornitina

Algunas variaciones se encontraron para la ONS de tejidos distintos.

d) Regulación de la ONS

La ONS es una enzima altamente regulada. Las isoformas de la ONS deben de estar reguladas por distintos mecanismos de modificación postranscripcionales incluyendo los de fosforilación y los de metilación. La ONS cerebral purificada se puede fosforilar por una proteína cinasa dependiente de AMPc, por la proteína cinasa C (PKC), y por una proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina

(13, 17). La fosforilación que realizan estas enzimas es estequiométrica y ocurre en terminales de serina aunque de peptidos distintos (7). Los efectos de la fosforilación sobre la actividad de la ONS parecen controvertidos: se ha reportado que la PKC aumenta y disminuye la actividad de la ONS. Se ha reportado que la cinasa dependiente de AMPc no tiene efecto sobre la ONS. La fosforilación de la ONS por la cinasa II dependiente de Ca^{++} -calmodulina disminuye la actividad de la ONS, y también se ha reportado que, sobre la ONS, no tiene efecto alguno. Las aparentes discrepancias entre estos descubrimientos pueden resultar de una diferencia en los estados basales utilizados en los experimentos, incluyendo la presencia o ausencia de Ca^{++} y calmodulina en las mezclas de reacción (13).

La determinación de los efectos de la fosforilación en la actividad enzimática de la ONS se realiza mediante la expresión de ADNc en células renales (7). En los estudios de Bredt, la activación de la PKC en estas células con ésteres de forbol condujo a una rápida fosforilación de la ONS acompañada por un decremento de más del 50% de la actividad de la ONS.

Existe evidencia que indica que las isoformas de la ONS pueden ser miristiladas. Se piensa que la modificación co- o postranscripcional de proteínas por miristilación tiene asociación con membranas. Parece que las isoformas de macrófago y de cerebro se localizan principalmente en fracciones solubles, la forma endotelial lo está predominantemente en fracciones particuladas. Ninguna de las isoformas clonadas parecen poseer secuencias de señales hidrofóbicas que puedan corresponder a segmentos asociados a membrana. De cualquier manera, en la terminal aminoacídica la forma endotelial de ONS contiene una secuencia correspondiente a la N-miristil transferasa, una enzima que cataliza la miristilación. Las formas de macrófago y cerebro carecen de esta secuencia. La incubación de células endoteliales bovinas con miristato tritiado resultó en la incorporación del miristato a la ONS de estas células. Por tanto, la acilación de ácidos grasos de la ONS endotelial puede servir como un sistema de anclaje a la membrana (13, 17).

Se ha propuesto que el mismo ON puede regular a la ONS, probablemente uniéndose al grupo hemo

de la ONS (24). La aplicación directa de ON, o bien mediante liberadores de este, lleva a la inmediata inhibición de la actividad de la ONS. Los capturadores del ON bloquean este efecto. La posible unión del ON al grupo hemo de la ONS impediría el transporte electrónico que permite la actividad de la enzima. Esta sugerencia parte del conocimiento de que el ON es capaz de unirse a grupos enzimáticos que contienen hierro, y de que la unión del ON a la enzima nitroarginasa, la que contiene hierro, inhibe la actividad enzimática.

e) Localización de la ONS

Por su inestabilidad, resulta difícil localizar al ON en los tejidos; entre otras razones es por esto que se ha buscado la localización de la ONS.

e.1. Las técnicas que se han utilizado

Con la purificación y clonación de las isoformas de la enzima se ha logrado fabricar anticuerpos y antisuero que ha permitido el mapeo inmunohistoquímico de la enzima. Además se ha detectado la localización de los ARNm (mensajeros) de la ONS mediante hibridación in situ. El compuesto azul de nitrotetrasolio (ANT) se ha usado como marcador histoquímico, ya que reacciona con las neuronas que contienen ONS. Esta reacción sucede como consecuencia de la actividad redox de la ONS, que reduce al ANT a la NADPH diaforasa (13, 17).

e.2. La localización de la ONS

Estudios histoquímicos que utilizaron anticuerpos dirigidos contra la ONS han mostrado que se le encuentra abundante en el sistema nervioso central (9), principalmente en neuronas y también en el endotelio vascular, sin tener localización en la glia (9, 25). Antisuero empleado para localizar la ONS no reaccionó con la enzima de los macrófagos, por lo que su distribución permanece sin conocerse (7). Por

otra parte, preparaciones citosólicas de diferentes regiones del cerebro mostraron que las concentraciones más altas de ONS se encuentran en el cerebelo, seguido del hipotálamo y el cerebro medio, el estriado, el hipocampo, con la menor concentración encontrada en la medula oblongata (9). Se ha encontrado que el ON también se libera de los astrocitos luego de la estimulación con los compuestos bradiquinina y A23187 (9).

Utilizando la tinción por ANT se ha detectado que en la corteza cerebral y el hipocampo la ONS se encuentra en células dispersas y aisladas que son medio para las neuronas no espinosas grandes. Las células granulosas del giro dentado poseen abundante ONS, mientras que las células piramidales de las capas hipocampales no se tiñen. Otros estudios han detectado ONS en estas mismas células mediante tinción para la NADPH diaforasa, y por anticuerpos. De manera similar, en el cuerpo estriado, la ONS aparece de manera dispersa, en lo que constituye un medio para las neuronas no espinosas grandes, tanto para cuerpos celulares así como para el neuropilo. Mientras que la mayoría de las áreas presentan neuronas que contienen ONS, prominente ONS está confinada a fibras en las islas de Callajae (13).

La clonación molecular posibilitó la localización del ARNm de la ONS mediante hibridización *in situ* (7). En el cerebelo el ARNm de la ONS se presenta en mayor abundancia en la capa de células granulosas, células con receptores NMDA, mientras que la inmunoreactividad muestra que la ONS se presenta concentrada tanto en la capa granulosa como en la capa molecular, indicando que en la capa molecular se encuentra probablemente con mayor abundancia en los procesos de las células granulosas. Las células en canasta, que también tienen receptores NMDA, poseen abundante ONS, por contraste a las células de Purkinje que carecen de esta enzima. Alta hibridización también se muestra aparente en el hipocampo (giro dentado), núcleo supraóptico, y en el colliculus inferior y superior, lo que en conjunto con datos anteriores habla del SNC como el lugar de mayor producción de ON. En áreas como la corteza cerebral, el hipocampo, y el cuerpo estriado, las neuronas ONS componen únicamente del 1 al 2% de las células neuronales, las que parecen ser neuronas espinosas de medianas a largas (13, 26, 27).

Ya se han citado otros sitios de localización de la ONS fuera del SNC en la sección titulada "otros sitios de funcionamiento".

e.3. Colocalización de la ONS con otros compuestos

La tinción intensa que se presenta para la ONS en tan solo 2% de las neuronas de la corteza cerebral, el estriado y el hipocampo no concuerda con la distribución de ningún neurotransmisor conocido. En algunas áreas del cerebro hay colocalización de la ONS con algunos neurotransmisores en particular. En el cuerpo estriado, todas las neuronas teñidas por poseer ONS se tiñen también para somatostatina y neuropeptido Y, pero en otras áreas, tales como el núcleo pedunculopontina del tallo cerebral, las neuronas de ONS carecen de somatostatina y neuropeptido Y. Por contraste, en este mismo sitio todas las neuronas se tiñen para la colina acetil transferasa, mientras que las neuronas de la ONS del estriado carecen de esta enzima (7).

Las neuronas de la ONS tienen colocalización con la enzima NADPH diaforasa (NDP) (28). La tinción para la NDP muestra un precipitado azul obtenido a partir del ANT solo en la presencia de NADPH (7). En el cerebro, con excepciones limitadas, y en el sistema nervioso periférico, la localización de la NDP y del ON son idénticas. Esto es aún más llamativo en áreas del cerebro tales como la corteza cerebral. La coincidencia de la ONS y NDP no es de especie específica para la rata, y es demostrable también en el cerebro de un mono (7).

Ha quedado establecido que la actividad catalítica de la ONS responde con totalidad a tinción catalítica de la NDP (en experimentos con ONS clonada y expresada) (28). El ADNc de la ONS fue transfectado a células renales humanas, las cuales no se teñían ni para la ONS como para la NDP, mas luego de la transfección, las células se teñieron para ambas enzimas con índices idénticos a los presentados en las tinciones del cerebro y la periferia. En principio se puede también purificar la actividad catalítica de la NDP para determinar si se copurifica con la ONS. De cualquier manera,

mientras que la actividad de la NDP puede conocerse mediante diversas actividades oxido reductivas utilizando NADPH, muchas otras actividades enzimáticas pueden originar actividades presumibles de la NDP. Así entonces, múltiples fracciones de proteína proveen actividad catalítica que es distinta a la actividad intrínseca a la ONS purificada (7). En el cerebelo, la ONS se encuentra en las células granulosas y canasta que contienen GABA (26).

f) Biosíntesis del ON

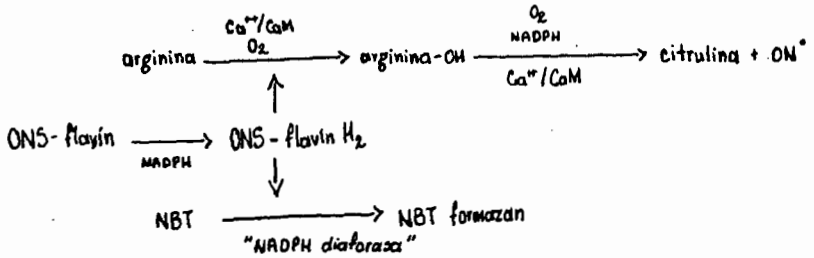
La ruta de biosíntesis del ON es una ruta complicada, porque la ONS es una enzima altamente regulada, quizá, la más regulada que se conoce actualmente en biología. La ONS oxida el grupo guanidino de la L-arg, en un proceso que utiliza cinco electrones y produce ON y citrulina en iguales cantidades (26). La síntesis del ON es dependiente de NADPH y oxígeno, y presumiblemente dos moléculas de agua resultan como coproducto. Se ha encontrado un producto intermedio en la reacción de síntesis del ON. A este se le ha llamado N omega-hidroxi-L-arginina (NOH-ARG), por tener sustituido el hidrogeno del grupo guanidino por un grupo oxidrilo, el que después es procesado, junto con el nitrógeno al que está unido, en ON. Distintas rutas se han propuesto para la biosíntesis del ON, de las cuales unas están apoyadas por más datos que otras (17).

g) Otros estudios de localización

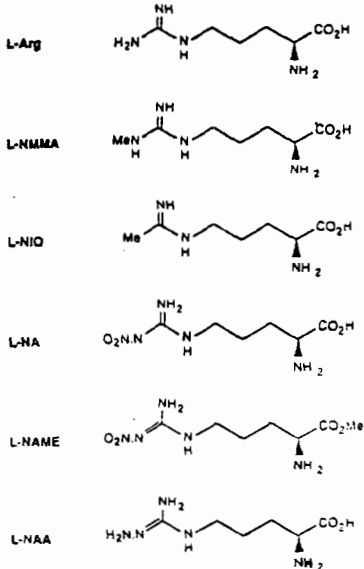
Los esfuerzos por conocer mejor la localización de la ONS y así conocer mejor el funcionamiento que el ON tiene en el SNC, han llevado a los investigadores a realizar estos estudios en distintas especies de la escala zoológica. Tal es el caso de un estudio histoquímico en el que se establece la distribución de las neuronas ONS en el SNC de la langosta (29), en el que el grupo de neuronas de mayor tinción es uno que inerva el neuropilo olfatorio. A la ONS se le ha localizado también en células de Müller y neuronas de retina de salamandras y peces (30).

TRANSPORTE ELECTRONICO EN LA BIOSINTESIS DEL ON

Inicialmente la ONS recibe electrones del NADPH en un paso independiente de la arg y del complejo calcio-calmodulina, lo que presumiblemente implica la reducción de una o ambas de las flavinas asociadas. La ONS reducida se reoxida rápidamente en la presencia de un aceptor electrónico apropiado, como el azul de nitro tetrazolio (NBT), aumentando la actividad del tipo NADPH-diaforasa. En la presencia de calcio, calmodulina y oxígeno molecular, la ONS reducida hidroxila al grupo guanidino de la arginina. La ONS oxida entonces a la hidroxarginina, rindiendo citrulina y ON.

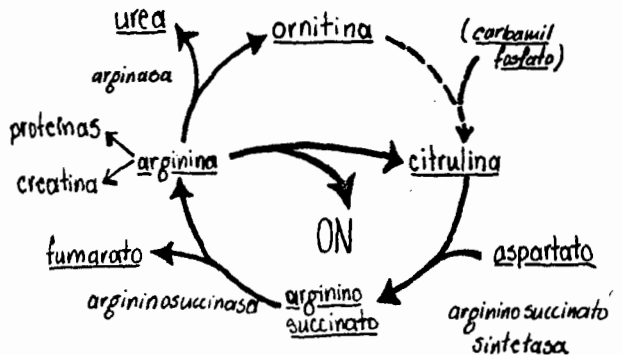


FORMULAS ESTRUCTURALES DE LA L-arginina Y DE ALGUNOS ANALOGOS QUE INHIBEN LA SINTESIS DEL ON



CICLO DE LA ARGININA EN EL SNC

Las líneas punteadas significan la ausencia de la enzima ornitina transcarbamilasa



III.3. DONADORES, INHIBIDORES Y CAPTURADORES DEL ÓXIDO NÍTRICO

Varias herramientas farmacológicas se han empleado para conocer las funciones del ON, como los nitrovasodilatadores que realizan su acción liberando ON. Este tipo de compuestos, incluyendo al nitroprusiato de sodio (NPS), hidroxilamina, dinitrato de isosorbido, 3-morfolino-sidnonimino (SIN-1), y la S-nitroso-N-penicilamina (SNAP) pueden liberar el suficiente ON que actúe como mensajero en un sistema biológico, y lo hacen en diferentes maneras: algunos son presumiblemente impermeables ante las membranas, como SIN-1 y SNAP, por lo que liberan ON en el espacio extracelular; otros como la hidroxilamina y el dinitrato de isosorbido, se piensa que liberan ON desde el interior de la célula, ya que requieren enzimas celulares como las catalasas y los citocromos para liberar ON. Es importante hacer notar que al trabajar con tejido intacto (por ejemplo, con rebanadas de cerebro) la cantidad de donador empleada debe de ser mayor, ya que se ha mostrado que la cantidad de donador necesaria para que aumenten las cantidades de GMPc en estas muestras son mucho mayores que las necesarias para hacerlo en preparaciones fraccionadas (células rotas), observaciones que muestran que el tejido intacto debe poseer mecanismos de inactivación rápida del ON. (13)

Existen además, varios inhibidores competitivos de la ONS incluyendo a los derivados de la L-arg como la N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA, L-Me-arg), N^ω-nitro-L-arginina (NARG), y la L-nitroarginina metil éster (L-NAME). Muchos de estos compuestos tienen también formas isoméricas-D que no inhiben a la ONS y pueden por tanto servir como controles (13). Otras formas se han encontrado para inhibir la actividad de la ONS. Los indazoles han probado inhibir a la ONS (31), lo mismo que un sistema generador de anión superóxido (32), anión capaz de inhibir directamente al ON. Puesto que el superóxido causa disminución de oxígeno en un sistema y la ONS requiere de este para la síntesis de ON, esta puede ser la razón para explicar la inhibición de la ONS por el anión superóxido. El transporte de L-arg y su recaptura son necesarios para la síntesis del ON. Un estudio que caracteriza este transporte (33), muestra que la adición de inhibidores de la ONS en un sistema de cultivo reducen la

síntesis del ON, sugiriendo que una manera en que lo hacen, adicional al bloqueo de la actividad enzimática, es inhibiendo el transporte de la L-arg hacia el interior celular. La hemoglobina (Hb) es otro compuesto que ha provado ser particularmente bueno en el bloqueo de la actividad del ON. El ON y otros mensajeros potenciales, como el monóxido de carbono (CO), se unen ávidamente al hierro en el grupo hemo de la Hb. Puesto que esta es una proteína larga, es incapaz de cruzar las membranas, por lo que al ser aplicada extracelularmente muestra que la acción del ON como mensajero es intercelular y no intracelular (13).

III.4. EFECTORES DEL ÓXIDO NÍTRICO

El principal efector del ON detectado hasta el momento es la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). Esta enzima es un heterodímero que contiene un grupo hemo, región responsable de la activación mediante ON. Cuando el ON se une al hierro (Fe^{++}) en el anillo porfirínico del grupo hemo, esta unión jala al Fe^{++} fuera del plano del anillo, lo que resulta en un cambio conformacional y en la activación de la enzima. Los altos niveles de GMPc resultantes pueden afectar entonces a la actividad de canales iónicos, a la actividad de la fosfodiesterasa, o activar a una proteína cinasa dependiente de GMPc (13). El flujo extracelular del GMPc depende también del ON (34). Parece que en el músculo liso de los vasos sanguíneos, como se mencionó anteriormente, el aumento de GMPc activa a una proteína cinasa dependiente de GMPc, que es en último término la que provoca la vasodilatación. Alternativamente, se ha observado que el GMPc disminuye los niveles intracelulares de Ca^{++} , lo que también puede contribuir a la vasodilatación. El monóxido de carbono, identificado recientemente como molécula potencialmente mensajera, también activa a la guanilato ciclasa, aunque con menor intensidad que el ON (13).

Probablemente no todos los aumentos de GMPc estén mediados por la activación del ON; los



resultados de elevación de los niveles de GMPc necesarios para la ecdisis en el SNC de los insectos no están mediados por la ruta del ON-GCs (35).

El ON puede combinarse con aniones superóxido para formar peroxinitrito, que finalmente se descompone en radicales libres hidróxido y nitrito, los que se piensa son los efectores tumorigénicos y bactericidas de macrófagos y neutrófilos activados. El ON puede efectuar también acciones citotóxicas uniéndose a los centros hierro-azufre de enzimas relacionadas a la cadena mitocondrial de transferencia de electrones, en el ciclo del ácido cítrico y en la síntesis del ADN (13).

El ON puede ejercer efectos estimulando la ADP-ribosilación (ADP, adenosín difosfato) de las proteínas. La ADP-ribosilación incluye la unión covalente de la ADP-ribosa a proteínas sustrato; comúnmente estas reacciones son catalizadas por ADP-ribosiltransferasas celulares. Se demostró que el NPS induce la ADP-ribosilación de una proteína de 39 kD en las plaquetas, proteína identificada más adelante como gliceraldehído 3' fosfato deshidrogenasa (GAPDH), e indican que el ON promueve la auto-ADP-ribosilación de GAPDH, en lugar de activar una ADP-ribosiltransferasa distinta. En primer término el ON estimula la S-nitrosilación de un residuo de cisteína adyacente al sitio de unión de la nicotinamida adenín dinucleótido (NAD) en la región catalítica de la GAPDH. Se piensa que la subsecuente auto-ADP-ribosilación ocurre en el residuo S-nitrosilado de cisteína. La ADP-ribosilación resulta en una disminución de la actividad de deshidrogenasa de la GAPDH. De cualquier manera, además de esta acción, aparentemente el ON también modula la actividad de las ADP-ribosiltransferasas celulares. Varios grupos han descrito la ADP-ribosilación que estimula el ON de distintas proteínas neuronales que carecen de dominios de unión a la NAD⁺, incluyendo a la transducina y otras proteínas de unión de guanosina trifosfato (GTP). Se ha propuesto que la ADP-ribosilación de estas proteínas se realiza por ADP-ribosiltransferasas distintas. De cualquier manera, parece que el ON estimula ambas ADP-ribosilaciones, la auto y la mediada por modificaciones covalentes (13, 27).

Se le ha asociado a otras actividades celulares diversas. El ON puede ser importante en la activación

de otra enzima, la ciclooxigenasa, que interviene en la síntesis de prostaglandinas (27). Se cuenta además con evidencia de que actúa como mediador de la hidrólisis de fosfatidilinositol inducida por la activación de los receptores NMDA en el cerebelo neonato de la rata (36).

III.5. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA FUNCIÓN SINÁPTICA

III.5.1. EL ON Y LAS CORRIENTES EN LOS RECEPTORES NMDA

El ON puede tener en el SNC una función neuromoduladora análoga a la de algunos neurotransmisores. Ejemplo de esa función puede ser la habilidad que le ha sido reportada de influenciar las corrientes de iones a través de los receptores-canales NMDA. Los receptores-canales tipo NMDA son el único tipo de receptores del glu que necesitan usualmente la despolarización para permitir el flujo de Ca^{++} . Por tanto, modulando los flujos de éste canal, el ON podría influenciar potencialmente varios procesos neuronales dependientes del ingreso de Ca^{++} vía los NMDA, como la transmisión sináptica, la plasticidad, la neurotoxicidad, y algunos aspectos del desarrollo (13).

Distintos donadores de ON (NPS, nitroglicerina, S-nitrosocisteína, y SIN-1) han mostrado reducir las corrientes de los NMDA. El uso de donadores diferentes es importante, puesto que se ha mostrado que el NPS puede ejercer efectos en las corrientes de los NMDA que resultan reversibles ante la aplicación de Hb, pero parecen ser efectos independientes del ON ya que no son compartidos por otros donadores de ON. Manzoni y col. demostraron que la reducción de las corrientes de los NMDA inducida por SIN-1 se da acompañada de la atenuación de los aumentos intracelulares de Ca^{++} mediados por los NMDA, fenómeno revelado por mediciones de fluorescencia del compuesto Fura-2 (37, 13). Los efectos del ON pueden ser bloqueados en este modelo por la adición simultánea de Hb. Bajo estos resultados se propuso que el ON tiene un papel de modulador retroactivo, así que según este

esquema, cuando el receptor NMDA está activado el Ca^{++} que entra activa a la ONS, lo que conduce a la reducción de las subsecuentes corrientes del NMDA (13).

Existen estudios que muestran que las corrientes de los NMDA pueden ser influenciadas por el estado redox de un sitio en el receptor NMDA. Un par de residuos de cisteína espacialmente cercanos, de los que se piensa que existen en la cara extracelular del canal, pueden formar una unión disulfuro que constituye un sitio redox en el receptor. La reducción de este sitio con agentes como el ditioneitol (DTT) aumenta el flujo de corriente a través del canal, mientras que la oxidación del sitio redox utilizando 5,5-ditio-bis-2 ácido nitrobenzónico (DNTB), disminuye el flujo de la corriente. El DNTB puede contrarrestar la potenciación de la corriente inducida por el DTT, aunque éste efecto puede prevenirse por el tratamiento con el agente irreversible alcalizador sulfhidrilo N-etilmaleimida (NEM). Tal tratamiento afecta de manera similar las corrientes de los NMDA. (13)

III.5.2. EL ON Y LA NEUROTOXICIDAD

A) Introducción

Un número creciente de estudios sugiere que los mecanismos celulares que intervienen en la señalización normal del SNC pueden transformarse por enfermedad, en factor de degeneración neuronal. La transmisión sináptica excitadora en el SNC de los mamíferos está mediada principalmente por el aminoácido L-glu. De hecho, excita a la mayor parte de las neuronas centrales y se encuentra en las terminales nerviosas en concentraciones milimolares (38). Normalmente, el aumento de los niveles de glu ocurre en el espacio sináptico. Algunos estudios demuestran que la exposición prolongada a glu destruye neuronas. Olney llama a este tipo de toxicidad como excitotoxicidad, y establece que es una acción común de los aminoácidos excitadores para con las neuronas centrales (38, 39). Este mismo establece que el glu y compuestos relacionados son los responsables de la pérdida neuronal en algunas enfermedades neurodegenerativas. Esta hipótesis se ha fortalecido considerablemente gracias al

conocimiento de los receptores y antagonistas al glu (Choi, 1988).

B) Tipos de receptores al glu

Se han caracterizado tres tipos de receptores de membrana al glu, y se han nombrado conforme al agonista farmacológico de mayor afinidad (38). Estos son el N-metil-D-aspartato (NMDA), quisqualato y kainato (38; 39), cada uno de los cuales está ligado a canales catiónicos de membrana. Existe además, un segundo tipo de receptor quisqualato (metabotrópico), ligado a un sistema de segundos mensajeros.

El NMDA es el mejor caracterizado. Este abre un canal de membrana caracterizado por alta conductancia (estado mayor alrededor de los 50 pS), dependiente de voltaje, que se inhibe por Mg^{++} , y es permeable para Ca^{++} y Na^{+} (38; 39).

C) La neurotoxicidad y las enfermedades del SNC

La neurotoxicidad mediada por glu probablemente está relacionada con dos tipos de enfermedades del SNC: el daño agudo y la degeneración neuronal crónica. Choi (1988) lo expone así:

a. Existe la evidencia de que el glu puede participar en cuatro tipos de daño agudo en el SNC:

- 1) daño agudo debido a espigas prolongadas
- 2) abastecimiento sanguíneo restringido
- 3) privación de glucosa
- 4) trauma mecánico

b. Parece atractivo considerar que el glu participa en las enfermedades a las que se les ha denominado como degenerativas por compartir características patológicas como la gradual, prematura y selectiva pérdida neuronal. El problema radica en que en la mayor parte de los casos se carece de evidencias.

Los argumentos para mantener esta perspectiva provienen de dos partes:

- 1) por un lado, dos enfermedades no comunes que involucran deficiencia enzimática están asociadas a altos niveles de un aa excitador.
- 2) por otro lado, dos enfermedades en las que la ingestión crónica de aminoácidos excitatorios es claramente la responsable de la neurodegeneración.

D) Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad mediada por glu (38)

Conociendo que el glu actúa en por lo menos tres tipos de receptores, la cuestión siguiente se centra en identificar cual o cuales son los receptores que activados pueden desencadenar la toxicidad.

Algunos datos sugieren que el receptor NMDA es particularmente importante como mediador del daño neuronal en la mayoría de las neuronas cerebrofrontales. El papel neurotóxico del glu y sus agonistas al receptor NMDA explican la protección a la toxicidad observada luego de la adición de antagonistas a este receptor.

Experimentos *in vitro* sugieren que la toxicidad por glu puede ocurrir por dos mecanismos, los que corresponden a los dos grupos de enfermedades antes expuestas.

El primer mecanismo, identificado por una crecida destrucción neuronal aguda, depende de Na^+ y Cl^- extracelular, y puede ser reproducido por otros agentes despolarizantes. La apertura de canales catiónicos conduce presumiblemente a un ingreso de Na^+ , a la despolarización de la membrana, a un segundo ingreso, ahora de Cl^- y agua, y al hinchamiento celular excitotóxico.

El segundo mecanismo, identificado por la degeneración neuronal retardada, depende de Ca^{++} extracelular, y probablemente esté mediado por los efectos citotóxicos producidos por las

concentraciones excesivas de Ca^{++} .

En ambos casos el fenómeno patológico se desencadena luego de la acumulación anormal de glu en el espacio sináptico, y de aquí el interés por conocer los mecanismos que llevan a esto.

E) Mecanismos de acumulación anormal de glu (39)

La gran paradoja de la neurotoxicidad es la cuestión de por qué o como el cerebro de los mamíferos evolucionó con tal vulnerabilidad a sus propios neurotransmisores excitadores. La concentración intracelular del glu en el tejido cerebral es de aproximadamente 10 mM por litro. Gracias a la actividad de los transportadores del glu, la mayoría del glu es intracelular. La concentración extracelular del glu en el tejido cerebral ha sido estimada aproximadamente en 0.6 μ M por litro. Se ha estimado que para causar un daño excitotóxico substancial los niveles de glu extracelular deben de alcanzar el rango de concentración entre los 2 y 5 μ M por litro. Por lo tanto, la concentración extracelular de glu es cercana a la excitotóxica y hace indispensable que esta concentración y la compartimentalización del glu estén minuciosamente reguladas para prevenir la neurotoxicidad. Por otra parte, puesto que cada célula contiene una alta concentración de glu, el potencial de toxicidad es evidentemente alto. Dada la sensibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad, un defecto en el sistema de captura del glu (o del aspartato -asp-) sería fatal. El glu y el asp son retirados del espacio extracelular por un sistema de alta afinidad de captura dependiente de sodio; el glu y el asp son retirados hacia dentro de los astrocitos y las neuronas a través de transportadores, los cuales han sido clonados recientemente. Este sistema utiliza energía derivada del gradiente de sodio presente a través de la membrana. Por lo tanto, cualquier defecto que impida a la célula mantener este gradiente de concentración puede causar la caída del sistema de captura del glu. El margen de seguridad del sistema de captura del glu se desconoce. Un soporte para la hipótesis de que los transportadores del glu son una fuente potencial de glu extracelular proviene de estudios que muestran que los transportadores pueden actuar en sentido inverso.

El glu, como otros aa, puede liberarse hacia el espacio extracelular como consecuencia de la destrucción de los astrocitos. Cuando no se puede utilizar la energía del metabolismo o cuando decae debido al agotamiento del ATP, la actividad disminuida de la bomba ATPasa Na⁺/ K⁺ puede conducir al suficiente daño como para liberar glu por la vía de los transportadores. Durante la hiponatremia puede ocurrir algo similar.

Un estudio reciente pone en duda la acción excitotóxica de la acumulación anormal de glu en el espacio intercelular (40). Ciertamente, en los estudios *in vitro* se logra el efecto tóxico, mas no en los realizados *in vivo*. Algo adicional a la acumulación anormal de glu debe de ocurrir para lograr el efecto tóxico. De cualquier manera, esta acumulación anormal contribuye a este efecto.

a) Liberación de glu a partir de los almacenes vesiculares

Otra posible fuente para la excesiva acumulación de glu es su anormal liberación a partir de los almacenes vesiculares que lo contienen. El sistema normal de neurotransmisión excitadora parece contar con un mecanismo de retroalimentación positiva como una de sus ventajas; esto significa que la liberación de glu estimula a una mayor liberación del glu. Esto se ha demostrado en el fenómeno llamado potenciación de largo término. Paralelamente, la excitotoxicidad tiene un mecanismo de autopropagación, ya que la supervivencia neuronal puede aumentar con la adición de antagonistas de glu (y de NMDA) luego de la exposición breve de las neuronas al glu.

b) Liberación del glu y lesión celular

La causa más simple del exceso de glu en el medio intercelular es la lesión celular. Si cada célula contiene 10 mM de glu por litro, con la sola muerte de una neurona, todas las neuronas vecinas quedan en riesgo, que se ve reducido solo por la habilidad de retirar el glu liberado a su alrededor. Una causa de la lesión es la excitotoxicidad misma, ya que las neuronas lesionadas liberan grandes cantidades de glu

que lesionan a otras. Además, la lesión traumática de las neuronas puede verse seguida de lesión excitotóxica a neuronas vecinas; en modelos de trauma, la muerte neuronal puede ser bloqueada por el uso de antagonistas al glu, especialmente por aquellos dirigidos en contra de los receptores NMDA, aunque los antagonistas para los receptores no-NMDA también pueden ser efectivos .

Probablemente existan varios mecanismos para la acumulación anormal de glu en el espacio extracelular. La suspensión de la energía celular puede ser uno de estos mecanismos, tanto por el deterioro de la captura mediada por los transportadores, como por la inversión de la dirección del transporte. Esta serie de eventos puede estar seguida probablemente por la lesión a algunas neuronas, y por la potenciación anormal debida al glu liberado por otras neuronas. Con la liberación de glu de neuronas lesionadas, y por la liberación fisiológica excesiva de neuronas intactas vecinas, es posible que el proceso se propague de manera autónoma, extendiendo el área del daño neuronal .

c) Patofisiología de la excitotoxicidad al nivel de los receptores

La excesiva activación de ambos tipos de receptores al glu, los NMDA y los no NMDA, puede contribuir a la degeneración neuronal excitotóxica así como a un amplio espectro de enfermedades del sistema nervioso. Las sinapsis excitadoras pueden verse aumentadas si las inhibitoras disminuyen. La sobreestimulación a los receptores no NMDA tiene también importancia para la excitotoxicidad, especialmente en el caso de daños prolongados; esta propuesta viene a estar apoyada por algunos estudios *in vitro* en los que el uso de antagonistas a ambos tipos de receptores disminuye el daño causado por isquemia, trauma, hipoglicemia, y otros mecanismos de daño.

Dado que los canales de los receptores NMDA son de dos tipos (dependientes de voltaje y a ligando), existe la capacidad de que las neuronas , para dar respuesta, integren información de distinto tipo (estímulos de distinta procedencia). Esto viene a ser un mecanismo de seguridad ya que se requiere de

dos entradas de información antes de que se admita el ingreso al Ca^{++} , mismo que activa los procesos intracelulares que pueden llevar a la degeneración celular. Aún así, este seguro solo funciona mientras que se mantenga el potencial de la membrana. Una vez que se despolariza la membrana, la apertura de los canales es segura y también el ingreso del Ca^{++} . El ion magnesio (Mg^{++}) es un bloqueador de los canales NMDA dependientes de voltaje; se mantiene unido a un sitio específico dentro del canal y la despolarización de la membrana es la que lo retira. Se ha observado en cultivos *in vitro* de hipocampo y corteza, que la excitotoxicidad es dependiente de la concentración de Mg^{++} extracelular. Así, la vulnerabilidad de las neuronas queda dependiente de la distribución de los canales dependientes de Mg^{++} y de los no dependientes de Mg^{++} . Aún se desconoce lo que regula esta distribución .

d) Potenciación de las respuestas postsinápticas al glu

A la sobreestimulación mediada por los receptores a glu, pueden darse respuestas intracelulares como la sobreestimulación de enzimas proteolíticas, la peroxidación lipídica, la formación de radicales libres (superóxido y $\cdot\text{ON}$), expresión temprana de genes, etc, fenómenos que contribuyen con la excitotoxicidad.

F) El papel del calcio en la toxicidad

Puesto que el ON puede estar asociado al segundo mecanismo de excitotoxicidad asociado al glu, mecanismo que resulta dependiente de Ca^{++} , es de importancia conocer algo sobre la función del Ca^{++} en la excitotoxicidad.

El flujo de Ca^{++} que acompaña la prolongada activación de los receptores NMDA está asociado a la degeneración de neuronas (9), y las mediciones de Ca^{++} intrasinosomal son posibles mediante una

técnica que utiliza una sustancia fluorescente (41).

Es conocido que el Ca^{++} en concentraciones mayores a las fisiológicas (normales) puede contribuir al desencadenamiento de eventos celulares en la membrana, citoplasma y núcleo que concluyen finalmente en toxicidad. Pero no parece que el Ca^{++} solo sea el causante de los efectos tóxicos. Tomando como ejemplo la elevación de los niveles de Ca^{++} intracelular a los niveles a los que lo hace el glu, con el uso de un inhibidor metabólico como el cianuro o por la despolarización de las neuronas con alta concentración de K^+ para causar el ingreso de Ca^{++} por los canales para Ca^{++} ligados a voltaje, el daño neuronal permanente causado es menor que el causado por el glu por sí solo. (35, 39). Además, los mecanismos homeostáticos para regular los niveles altos de Ca^{++} , de alguna manera alternativa tienen que presentarse restringidos, provocando una exposición prolongada, dentro de la célula, mayor a la normal. (4, 6, 39). Otro mensajero debe de dispararse, probablemente, de manera coincidente con el aumento de Ca^{++} para que se de la neurotoxicidad. Se ha reunido cierta evidencia en apoyo de que ese otro mensajero puede ser el ON.

Tanto la activación del receptor NMDA como el incremento de Ca^{++} neuronal, o ambos, pueden activar una serie de enzimas que incluye a la proteína cinasa C, a las fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, y a la ONS. Luego de la activación de la fosfolipasa A2, se genera el ácido araquidónico, sus metabolitos y el factor activador de plaquetas. Este último aumenta los niveles de concentración del Ca^{++} neuronal, aparentemente mediante la estimulación para la liberación de glu (39). El ácido araquidónico potencia las corrientes evocadas por NMDA (39), e inhibe la recaptura del glu en astrocitos y neuronas (40, 39), exacerbando más adelante la situación; durante el metabolismo del ácido araquidónico se pueden formar radicales libres de oxígeno, los que conducen a una posterior activación de la fosfolipasa A2, lo que representa una retroalimentación positiva (32, 39). Este proceso puede causar que la neurona se digiera a ella misma debido a la desactivación proteínica, a la formación de radicales libres y a la peroxidación lipídica (39).

Aún a concentraciones bajas, los iones superóxido pueden participar en la formación de productos

que pueden resultar letales para las neuronas. Otro de estos casos es el del ON. Luego de la sobreestimulación de los receptores NMDA, tanto el ON como el superóxido pueden ser producidos en altas cantidades. Bajo estas condiciones, el ON y el superóxido pueden reaccionar para formar la sustancia llamada peroxinitrito, la que conduce a la muerte celular (39).

El Ca^{++} , además de estimular enzimas del citoplasma, puede estimular también enzimas nucleares. Las concentraciones excesivas de Ca^{++} , por ejemplo, pueden activar endonucleasas llevando al resultado de la condensación de la cromatina nuclear y finalmente a la fragmentación del ADN y el rompimiento del núcleo, proceso patológico conocido como apoptosis. Los radicales libres pueden contribuir también a la fragmentación del ADN (39).

G) El ON y la neurotoxicidad

Hasta el momento, los estudios sobre la posible participación del ON en la excitotoxicidad han dado resultados variados; a estos ha seguido una controvertida exposición del tema. En algunos casos, la evidencia experimental apoya la hipótesis de que el ON es responsable de la excitotoxicidad. En otros, que su acción no afecta al evento patológico. En un tercer conjunto de casos, que su acción resulta neuroprotectora ante las condiciones celulares responsables de la excitotoxicidad. En esta sección se detallan las distintas posturas, incluido también el caso de las neuronas llamadas diaforasas, las que poseen la cualidad de resistir a la degeneración causada por la acción excitotóxica.

G.1. La síntesis patológica del ON

La identificación de la ruta L-arg:ON en el SNC (2) sugirió su posible participación en la patología del sistema nervioso central. Se sugirió que la excesiva activación de los receptores NMDA, con su consecuente entrada de Ca^{++} , contribuye a la neurotoxicidad por glu por una acrecentada producción

de ON (9), como ya se había mencionado al hablar del Ca^{++} . Datos adicionales apoyan esta propuesta, aunque también se ha sugerido que otro tipo de receptor al glu puede actuar en la síntesis del ON (42). Entre estos, algunos apuntan a que el GMPc sintetizado como consecuencia de la activación de la GCs por el ON, puede también tener un papel neurotóxico. En este caso, surge la hipótesis de que el GMPc es el mediador de los efectos excitotóxicos generados por el ON. Altos niveles de GMPc causan la destrucción de células fotorreceptoras en la retina, donde se ha comprobado por inmunocitoquímica la existencia de la ONS (9). Este efecto probablemente explique la patogénesis de algunas enfermedades de la retina de ciertos animales (43). También se ha sugerido que el GMPc tiene un papel en las crisis convulsivas, puesto que los niveles de este nucleótido aumentan en ciertas regiones cerebrales previo al establecimiento de convulsiones inducidas por drogas (44). Más aún, la superfusión de análogos al GMPc a injertos de hipocampo dispara actividad epileptiforme prolongada en células piramidales (9). Es, entonces, importante notar que los antagonistas de los receptores de aminoácidos excitadores o inhibidores de la liberación de glu tienen ambas acciones antiepilépticas y protegen al cerebro de daños isquémicos, los que se piensan mediados por un exceso en la liberación de glu (9).

Recientemente se cuentan con datos que niegan la posibilidad de que el GMPc sea mediador de la toxicidad causada por el ON. Estos datos provienen de cultivos neuronales como los que se han utilizado para el estudio de la excitotoxicidad mediada por el ON (13).

G.1.a. Las neuronas que tienen NADPH diaforasa y la toxicidad

Respecto a la actividad generada por el ON, se ha propuesto que el ON protege a las neuronas que tienen NADPH diaforasa (n-NDP), pero bien puede ser que el mismo ON sea el causante de la neurotoxicidad en otras neuronas de distinto tipo, como lo avalan algunos estudios, principalmente de cultivos neuronales primarios. Sobre los diversos resultados de la acción del ON se hablará ahora.

Una propiedad de las n-NDP es, su resistencia selectiva a la destrucción en condiciones

neurodegenerativas clínicas, tales como las de la enfermedad de Alzheimer (45), Huntington, la isquemia subsecuente y las inducidas por neurotoxinas de destrucción neuronal (7). Mientras que el 95% de las neuronas estriatales degeneran en la enfermedad de Huntington, las n-NDP sobreviven. El tratamiento de cultivos primarios de corteza cerebral con NMDA destruye 90% o más de las neuronas, pero las n-NDP sobreviven. La actividad de la ONS, misma que explica la tinción de las n-NDP, puede ser la responsable de esta resistencia. La sobreconcentración de Ca^{++} potencialmente es un mecanismo para provocar la neurotoxicidad, y el ON puede reducir los niveles intracelulares de Ca^{++} por un mecanismo no relacionado con el GMPc. La actividad de diaforasa de la ONS podría ser relevante, mientras que la inducción de una enzima similar en cultivos neuronales, la DT diaforasa, protege a las neuronas de la toxicidad oxidativa (7).

G.1.b. El ON provoca neurotoxicidad

Esta posibilidad se ha estudiado en cultivos primarios de neuronas cerebro corticales. Adicionando brevemente NMDA a los cultivos, 80% de las neuronas mueren en el transcurso de 24 hr. En este sistema, la nitroarginina y el L-NMMA previenen de la neurotoxicidad inducida por el NMDA y aminoácidos relacionados. Este efecto es revertido competitivamente por la L-arg. Más aún, la reducción de arg en el medio de cultivo por la adición de arginasa o por la utilización de un medio libre de arg, previene de la neurotoxicidad inducida por NMDA. Por otra parte, el nitroprusiato produce muerte de células dependiente de dosis, efecto paralelo a la formación de GMPc. La hemoglobina, que captura al ON, previene de los efectos neurotóxicos del nitroprusiato y del NMDA. Puede pensarse que este ON proviene tanto de las neuronas como de la microglia, que son el equivalente en el cerebro a los macrófagos. Al dañar nervios viscerales se registra una expresión aumentada de ONS (46), presumiblemente por el bloqueo del flujo de factores neurotróficos que inhiben la síntesis de ONS, lo que sugiere que en el daño excitotóxico la participación de la ONS inducible puede jugar un papel importante (7).

Adicionalmente, Izumi y col., demostraron que en rebanadas de hipocampo, los inhibidores de la ONS previenen de la muerte celular mediada por glu y NMDA. En este sistema de cultivo, este efecto es revertido por la adición excesiva de L-arg (13).

Estudios realizados por Dawson y col. (47) apoyan a los resultados anteriores. En cultivos primarios fetales de rata, corticales, estriales e hipocampales, la adición de NMDA y NPS muestran una relación de concentración-efecto tóxico y curso de tiempo similares. El efecto neurotóxico disminuye en la presencia de nitro-L-arg y en los medios libres de arg. La disminución de la neurotoxicidad debida al uso de inhibidores de la ONS es paralela a la potencia con que estos son capaces de inhibir la actividad de la enzima. La toxicidad por NMDA es prevenida también por inhibidores flavoproteínicos y de la calmodulina, concordando con el papel regulador de las flavoproteínas y de la calmodulina.

Los estudios realizados por Fujisawa y col. también apuntan en esta dirección. A diferencia de los estudios mencionados, este grupo manejó un modelo *in vivo*, sencillo en comparación con otros modelos *in vivo* que se han utilizado. En este modelo se producen lesiones corticales, bajo monitoreo fisiológico, mediante diálisis reversa de glu en ratas anestesiadas. La cuantificación del daño se hace por imágenes histológicas. El empleo de cinco agentes de conocidas cualidades anti-isquémicas, disminuye el daño neurotóxico hasta en un 30 %. El inhibidor de la liberación de glu endógeno llamado BW 1003c87 disminuyó el daño en un 50 %. Únicamente el CI-977, inhibidor similar al anterior, no produjo disminución alguna del efecto excitotóxico. Entre los agentes utilizados se encuentran el antagonista al receptor NMDA conocido como dizocilpina (MK-801), y el inhibidor de la ONS ya mencionado L-NAME (48).

Dentro de la evidencia que apoya la toxicidad del ON se encuentran los estudios que relacionan algunos tipos de daños y enfermedades con la actividad del ON. Tal es el caso de la neurotoxicidad asociada a la isquemia cerebral, la que se piensa que envuelve la estimulación por glu de los receptores NMDA. En apoyo a esto, los antagonistas al NMDA bloquean la degeneración neuronal en varios

modelos de daño isquémico (7).

Respecto a la resistencia neurotóxica presentada por las neuronas que poseen ONS, a las que se les ha llamado también neuronas diaforasas, y el papel tóxico del ON, puede especularse una explicación que armonice los hechos observados. Unas neuronas sintetizan ON que se libera para elevar los niveles de GMPc en neuronas adyacentes sin toxicidad alguna. De cualquier manera, en la presencia de altas cantidades de glu, las que pueden considerarse como tóxicas, las neuronas ONS pueden comportarse como macrófagos, liberando altas cantidades de ON para matar a las neuronas de sus alrededores (7). Como se expuso en la sección del Ca^{++} , la producción de ON en altas cantidades lleva a la producción de peroxinitrito, sustancia tóxica para las neuronas que termina por conducir las a la muerte.

Tomando en conjunto estos resultados puede establecerse que el ON es mediador de la excitotoxicidad glutamatérgica en cultivos primarios neuronales.

G.1.c. El ON no provoca neurotoxicidad

Algunos experimentos sugieren que el ON no participa en la degeneración de neuronas ya que la inhibición de su síntesis no atenúa esta degeneración. Raymond y col. (49) prepararon cultivos fetales murinos mixtos (neuronas y glia) y cortico-gliales según la metodología de Choi (1987). Los cultivos fueron expuestos a 300 μM de NMDA por 24 hr, lo que concluye con la muerte del total de las neuronas. La neurotoxicidad de los cultivos se mantuvo ante la adición de 25-125 μM de Hb. Por contraste, esta fue atenuada consistentemente por la adición del bloqueador específico de los receptores NMDA MK801. La adición de inhibidores de la ONS tales como el NA y el MMA en concentraciones de 100-1000 μM no redujo la muerte neuronal. Resultados similares se obtuvieron en cultivos preincubados con NA y MMA. Cultivos libres de arg tampoco resistieron la muerte neuronal. Los cultivos testigos sintetizan tres veces más GMPc en comparación con los cultivos expuestos al lavado equivalente. Este efecto se bloqueó consistentemente por la adición de la Hb (en las

concentraciones antes señaladas) y por 1 mM de NA o de MMA.

En otros estudios (50), la exposición de NMDA a cultivos murinos (células de rata y de ratón) neuronales, la excitotoxicidad no es atenuada por el uso del inhibidor de la ONS N^G -Nitro-L-arg, que si produce el bloqueo de la síntesis del GMPc. Por el contrario, el antagonista no competitivo del receptor NMDA bloquea tanto la síntesis del GMPc como la muerte neuronal causada por el NMDA. El empleo de medios libres de arg y de otro inhibidor de la ONS (L-NMMA) tampoco protegen de la muerte neuronal.

Estudios similares a los anteriores, pero con cultivos hipocampales, apoyan esta tesis (51). Ni la exposición al inhibidor de la ONS, N-arg, ni el uso de medios libres de arg, protegen a los cultivos de la muerte causada por la exposición al glu. En cambio, el uso del antagonista no competitivo al receptor NMDA, el MK-801, inhibe la muerte celular. En su discusión, los autores hacen notar que, a diferencia de otros cultivos, como los utilizados por Dawson y col., los cultivos por ellos utilizados se encontraban intensionalmente libres de suero. Es conocido que el suero favorece a la proliferación de los astrocitos. Esto les lleva a pensar que en sus cultivos la proliferación de astrocitos es nula. Se comprobó que en sus cultivos se produce ON, ya que se cuantificó la síntesis de GMPc y esta misma fue inhibida por la N-arg.

G.1.d. El ON previene de la neurotoxicidad

Por contraste a los resultados de la toxicidad, otros datos muestran que la producción de ON previene a las neuronas de esta toxicidad mediada por NMDA. Se mostró que la aplicación de nitroprusiato de sodio (NPS) o de nitroglicerina, previene de la toxicidad de NMDA en cultivos de neuronas corticales. Este estudio muestra que paralelamente las corrientes NMDA se reducen, así como

los niveles intracelulares de Ca^{++} . Se propone que estos cambios son los que explican el efecto protector en contra de la toxicidad mediada por NMDA. (13)

Se ha propuesto también, como posibilidad, que el ON puede contribuir a la regeneración neuronal luego del daño, aumentando el flujo sanguíneo (46).

III.5.3. EL ON Y LA SECRECIÓN

Se ha demostrado que el ON, en distintas regiones cerebrales, modula la función sináptica, alterando la liberación de los neurotransmisores a partir de las terminales nerviosas (52, 53, 54, 13), y de otras sustancias (55). Se han estudiado las modificaciones que el ON causa en la liberación de acetilcolina, dopamina y norepinefrina. En estos casos, la adición de ON mediante donadores y de grandes cantidades de L-arg, provocan que la liberación basal de estos neurotransmisores aumente en proporción mayor al doble. Se ha sugerido que la acción del ON como modulador de la liberación de neurotransmisores está mediada por la activación de la GCs (53). Por otra parte, existe evidencia de aumentos en la liberación del glu en cultivos, luego del fenómeno de potenciación de largo término, los que pueden estar mediados también por el ON (ya que el fenómeno mencionado se ha asociado al ON) (56). Probablemente el ON actúe sobre algunas proteínas encargadas de la liberación sináptica. Por el contrario, la depolarización neuronal evocada por potasio contrarresta los efectos de aumento de liberación estimulados por el ON (26).

Al menos un caso se ha encontrado en el que el efecto del ON sobre la liberación basal es inhibitorio (13).

III.5.4. EL ON Y EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Mediante estudios inmunológicos e histoquímicos, se ha encontrado ONS neuronal en distintas áreas del SNC de ratas en desarrollo, pero su papel en el desarrollo permanece aún sin claridad.

Probablemente es tóxico para las neuronas y alternativamente puede ayudar a la muerte neuronal programada que el 50% de las células neuronales de los mamíferos sufren durante el desarrollo (26).

III.5.5. PAPEL DEL ON EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

La potenciación y la depresión de largo término (PLT y DLT), son dos fenómenos celulares neuronales implicados en la plasticidad sináptica. Distintos estudios han encontrado la relación de estos con el ON. El ON puede ser el factor que explica el desencadenamiento de estos fenómenos.

Los mecanismos subyacentes en los procesos de plasticidad neuronal, como la memoria y el aprendizaje, en el SNC de mamíferos, permanecen aún en el campo de la incertidumbre, pero se piensa que envuelven cambios en la eficacia de la transmisión sináptica. Es conocido que la PLT y la DLT es dependiente en un tipo de casos de la activación de los receptores NMDA. Esta dependencia, junto con otros hechos, ha llevado a la propuesta de que en la PLT y la DLT debe de participar un mensajero transináptico que permite los cambios de la eficacia sináptica. (57)

En el caso de la PLT, ese conjunto de hechos que hacen pensar en la existencia de tal mensajero son: la activación de los receptores NMDA, la despolarización y el incremento de Ca^{++} postsinápticos que son condición para la inducción de la PLT; y la evidencia de que la PLT apoya el incremento, mediado presinápticamente, en la liberación de neurotransmisores. (57)

Distintos candidatos han sido propuestos como mensajeros de éste fenómeno. Entre ellos, el ácido araquidónico, el factor activador de plaquetas, el ON y recientemente el monóxido de carbono (CO) (57). Bajo determinadas condiciones el ON podría ser el mediador de la PLT, pero su papel permanece aún incierto, y los resultados de los estudios a este respecto han sido controvertidos en algunos casos. La mayor parte de estos estudios se han realizado en cultivos hipocampales, así como en condiciones *in vivo*, ya que el hipocampo es la región cerebral en la que mejor se ha caracterizado la PLT, como lo ha

sido el cerebelo para la DLT. (57, 13)

El estudio de Bohme y col. (1991) en la región CA1 del hipocampo en preparaciones de rebanadas, mostró que 0.1 M de nitroarginina bloquea completamente la PLT, efecto que se hace reversible al añadir L-arg, mientras que el nitroprusiato produce un incremento de duración prolongada de la eficacia sináptica la cual no es adicional (aditiva) a la PLT inducida por estimulación tetánica. Se observó el bloqueo de la PLT en la región CA1, tanto por nitroarginina, la que bloquea al ser inyectada en la célula postsináptica, como por hemoglobina, que no es tomada por la célula y presumiblemente se une al ON que libera la célula postsináptica al espacio extracelular (7). Se encontró además que el ON provoca un aumento en la liberación espontánea de transmisores a partir de cultivos de células piramidales del hipocampo, sugiriendo que el ON puede servir como un factor retrogrado en la PLT. Interesantemente, los estudios histoquímicos indican que las células piramidales de la región CA1 carecen de ONS, aunque se tiñen para la NDP, sugiriendo que pueden contener una isoforma distinta (7). Muchos otros estudios se han realizado, algunos con otras regiones cerebrales distintas al hipocampo (como el giro dentado, la corteza, etc), con resultados similares que apuntan a que el ON es mediador de la PLT (58, 59, 60, 61).

Aparentemente, el ON solo sería necesario para la inducción del fenómeno de PLT, ya que la adición de inhibidores de la ONS luego de 20 a 30 min de estimulación de alta frecuencia, no inhibe la PLT ya inducida (13).

El bloqueo de la PLT por los inhibidores de la ONS concuerda con el modelo del mensajero que se produce en la postsináptica, lo mismo que el bloqueo de este fenómeno por la adición de Hb, que concuerda con el viaje que tiene que hacer el mensajero a la presináptica. En rebanadas de hipocampo, los donadores del ON y su aplicación directa, salvo pocas excepciones no ha logrado la inducción de la PLT, probablemente por la alta labilidad del ON. Pero en cultivos si se ha logrado, cuando existe actividad presináptica. (13)

En muy pocos estudios se ha localizado a la ONS en la región CA1 del hipocampo. Se ha demostrado que el GMPc no induce la PLT. Estos, y otros resultados (62), muestran que existen aún dificultades para conocer si el ON desempeña algún papel como mensajero mediador de la PLT. (13)

La DLT es el decremento persistente de la eficacia o estrechamiento sináptico. Así como la PLT, la DLT se ha reportado para distintas regiones cerebrales. La DLT se ha estudiado preferencialmente en la corteza cerebelar, en la que se dan algunas sinapsis excitadoras mediadas por el glu.(13)

Se han caracterizado los eventos moleculares implicados en la DLT: activación de receptores de glu, aumento de Ca^{++} intracelular (ingreso vía canales ligados a voltaje) y activación de proteína(s) cinasa C (vía activación de receptores metabotrópicos), estos bajo fuerte evidencia. Se ha sugerido además, aunque esto ha dado lugar a la controversia, que la cascada de eventos generada por el ON (dentro de la que se incluye la síntesis de GMPc) y que el ingreso de Na^{+} vía receptores AMPA, también pueden intervenir en la inducción de la DLT (63). Aunque esto se ha sugerido, ante la posible acción del ON como mediador de la DLT, el conocimiento de otros hechos dificultan tal propuesta, principalmente el hecho de que en las células de Purkinje de la corteza cerebelar la detección de la ONS y del GMPc no es positiva (13).

La depresión de largo termino (DLT) en el cerebelo es evocada por la estimulación conjunta de las fibras colgantes y paralelas en la transmisión de fibra paralela-célula de Purkinje. Este sistema ha sido implicado como mecanismo celular para el aprendizaje motor cerebelar. Se demostró la liberación de ON luego de la estimulación de las fibras trepadoras y el bloqueo de la DLT mediante L-NMMA y hemoglobina. Más aún, el nitroprusiato o el GMPc son capaces de sustituir la estimulación de las fibras trepadoras evocando la DLT. En cultivos de células de Purkinje, la DLT no necesita de señalización mediante ON, y no es afectada por nitroarginina ni por hemoglobina (7). Resultados que favorecen la hipótesis de que el ON es mediador de la DLT, se tienen en distintos estudios (64, 65).

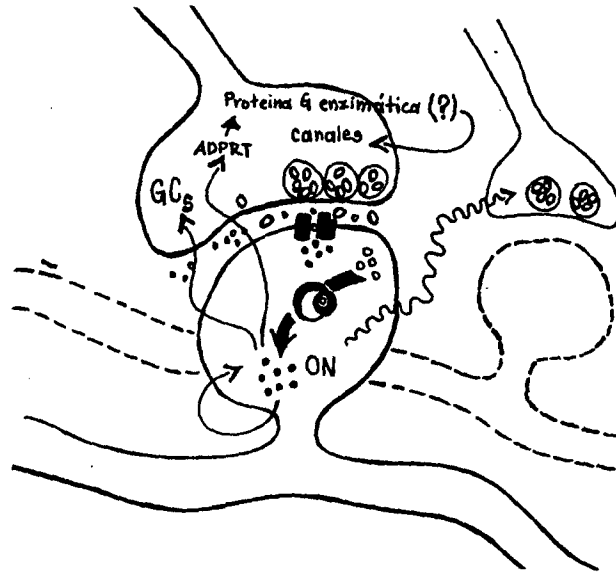
Otros estudios han mostrado que la DLT no requiere ni de ON como de GMPc (13). Un reporte extenso de experimentos realizados para conocer los mecanismos de post-activación de los receptores que conducen a la DLT en la región estriatal, no menciona participación alguna del ON como parte de estos mecanismos (66).

Aprendizaje

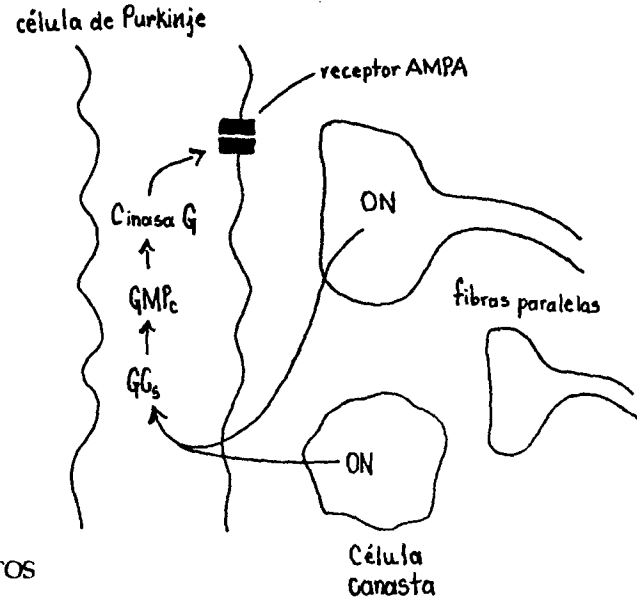
El ON puede participar en algunas formas de aprendizaje, y su asociación con los fenómenos de plasticidad, PLT y DLT, ha llevado a investigaciones que buscan dejar en claro esta posibilidad. Los resultados en este caso han sido controvertidos. En un estudio, la inhibición de la ONS con L-NAME conduce al bloqueo de dos formas distintas de aprendizaje (espacial y de condicionamiento visual) ensayadas en animales (ratas y conejos) (67), otros estudios apoyan la propuesta del papel del ON como inductor de distintas formas de aprendizaje (13), y otros, en cambio, se dirigen a descartar tal hipótesis (68, 13).

Sobre el papel del ON en la plasticidad sináptica queda mucho por conocer.

POTENCIACION DE LARGO TERMINO
(HIPOCAMPO)



DEPRESION DE LARGO TERMINO
(CEREBELO)



POSIBLE ACTUACION DEL ON EN ESTOS EVENTOS

En la PLT el ON difunde hacia la terminal presináptica donde interactúa con la guanilato ciclasa y/o con la ADP ribosil transferasa, que puede ribosilar una proteína G de unión a otra enzima, lo que altera la actividad de los canales iónicos, o la sensibilidad a calcio del proceso de liberación de neurotransmisores, lo que implica liberación de mayor cantidad de neurotransmisor durante la PLT. En la DLT, los niveles elevados de GMPc activan una ciclasa dependiente de GMPc que fosforila los receptores AMPA o moléculas asociadas, con lo que se obtiene una capacidad disminuida de respuesta postsináptica.

CONCLUSIONES

I. El ON como molécula mensajera que desempeña un papel en el SNC.

Dado que se tiene conocimiento de que el ON es sintetizado en varias especies de la escala biológica, se hace factible pensar en su presencia generalizada a lo largo de toda esta. Se han expuesto además, las numerosas y variadas funciones biológicas en las que el ON tiene alguna participación. Esto resulta indicativo de las altas ventajas que deben suponer la presencia del ON en los sistemas biológicos.

Analizando el caso específico del SNC, del que se ha reportado poseer la mayor cantidad de ONs, la idea de que el ON es una molécula altamente útil, se ve reforzada con el hecho de que su producción está asociada al sistema de liberación del glu. Si el ON sintetizado por la isoforma constitutiva de la enzima, depende de manera necesaria y principal de la liberación de un aminoácido que por su importancia, continuamente se está liberando, entonces, las funciones que dependen del ON probablemente deben ser de continua ejecución, ya que potencialmente la síntesis de ON será continua. Puesto que potencialmente las funciones que dependen del ON son de continua ejecución, se las puede calificar también como funciones básicas. La ADP-ribosilación, los aumentos intracelulares en la concentración de GMPc, la regulación de la secreción de neurotransmisores y la regulación de procesos fisiológicos dependientes de Ca^{++} , parecen ser estas funciones básicas del ON. A estas se pueden añadir, la activación de la PLT y de la DLT, aunque la evidencia experimental requiere de mayor apoyo para mantener en pie esta propuesta.

Antes del descubrimiento del ON, la explicación de las funciones de señalización sináptica dentro del SNC se cubrían con la participación de los neurotransmisores, a los que ahora podemos llamar clásicos o convencionales. Ante el nuevo caso del ON y su participación en el SNC, surge la pregunta: ¿cuales son las ventajas que ofrece el ON como molécula mensajera ante los neurotransmisores convencionales ?, o bien, ¿por qué las funciones que realiza el ON son realizadas por éste y no por los neurotransmisores convencionales ?

El ON cumple un papel similar al de los neurotransmisores convencionales, en cuanto a que es sintetizado en un sitio a partir del cual viaja hasta alcanzar un blanco en el que activa alguna función biológica. En este sentido se le ha dado el nombre de mensajero. Sin embargo, su distinción química de los neurotransmisores convencionales le hacen pertenecer, posiblemente a una nueva clase de neurotransmisores. Desde otro punto de vista, el ON se asemeja a los segundos mensajeros del cerebro, ya que sus mensajes son dependientes de otro anterior, el primer mensajero.

Los neurotransmisores convencionales son mensajeros que permiten respuestas inmediatas. Dirigidos específicamente desde una neurona presináptica hacia una postsináptica, son capaces de lograr la apertura de canales iónicos. La postsináptica, capaz de recibir un alto número de estímulos, específicamente dirigidos, provenientes de las terminales axónicas, es también capaz de integrar esa información y dar una respuesta electroquímica inmediata, que como se conoce hasta ahora, puede ser muy variada. Ciertamente, los neurotransmisores convencionales son también capaces de producir respuestas semilentas, o aún lentas y duraderas, que responden a necesidades fisiológicas de la célula (y a fin de cuentas del organismo) distintas de las primeras, que satisfacen otras necesidades. Visto como segundo mensajero, el ON quedaría ubicado dentro de este grupo de respuestas semilentas o lentas. Visto como primer mensajero, el ON tiene la capacidad de dar los dos tipos de respuestas, ya que puede alterar los flujos iónicos, dando lugar a respuestas rápidas, o bien puede dar lugar a respuestas semilentas y lentas mediante la activación de una cascada bioquímica iniciada con la unión covalente a

sus efectores.

Aunque las características químicas del ON son distintas a las de los neurotransmisores convencionales, es de notarse, que por sus efectos no merece ser clasificado como un mensajero de otro tipo. Si las propiedades y el comportamiento del ON son analizados en detalle, como se ha hecho (la bibliografía da testimonio de ello), esta molécula si merece ser clasificada en una familia distinta de neurotransmisores. El hecho de que la molécula difunda libremente a través de las membranas permite que el mensaje se dirija desde el elemento postsináptico hasta uno presináptico, o bien desde un elemento presináptico hasta otro postsináptico. Esto, junto con otras propiedades citadas en la literatura sobre el tema, ya dan respuesta a las preguntas anteriormente planteadas: hablamos de cualidades del ON que le permiten ejercer un papel que jamás podrían lograr ejercer los neurotransmisores convencionales. Pero la que probablemente sea la respuesta más definitiva para la cuestión planteada, es la que se da con el hecho de que el efecto provocado por el ON probablemente esté netamente desvinculado de la función sináptica. Es decir, una vez sintetizado, el ON alcanza su efector y provoca sus efectos con independencia de las sinapsis que se estén dando en esa neurona, la cual además, puede estar ubicada a muchas sinápsis de la neurona en la que fue sintetizado (probablemente hasta una distancia de 170 μm , lo que implica millones de sinápsis, según cálculos presentados por Garthwaite y Boulton (27).

De características similares al ON, es el monóxido de carbono (CO), una molécula sencilla, gas lábil, presentado por Snyder (69) como un posible mensajero que viene a reforzar la propuesta de abrir en la clasificación de los neurotransmisores, una nueva familia. Lo sintetiza la enzima hemo oxigenasa (HO), junto con otro coproducto que rápidamente es convertido en bilirrubina. Existen por lo menos dos tipos de HO, una inducible y otra constitutiva que se le encuentra en altas cantidades en el cerebro y en otros tejidos. La síntesis de CO requiere de la donación de electrones por parte de la (CPR). De manera similar al ON, el CO se une al hierro del grupo hemo de la guanilato ciclasa para activarla y dar inicio a la síntesis de GMPc. Se encontró que el CO es responsable de mantener los niveles endógenos de

GMPc en las neuronas olfatorias, esto en cultivos, puesto que el uso de potentes inhibidores de la HO y no de la ONS, suprime los niveles altos de GMPc en estas neuronas. Mayor evidencia de que la HO posee un papel en la neurotransmisión proviene de estudios que muestran que la localización de esta enzima es selectiva. Altas concentraciones de la forma constitutiva se encuentran en el hipocampo, tanto en las células piramidales como en la granulosas. En el cerebelo, concentraciones altas son encontradas en las capas granulosa y de Purkinje. Su distribución específica se extiende a distintas regiones cerebrales, de las que las neuronas del epitelio olfatorio y las de las capas neuronales y granulares del bulbo olfatorio, son las que poseen la mayor concentración.

II. El ON y su participación en la excitotoxicidad neuronal.

Se ha presentado evidencia de la posible acción del ON en la excitotoxicidad neuronal, proveniente de estudios *in vivo* e *in vitro*. Esta puede clasificarse en dos rutas:

- 1) la primera, dependiente de la actividad de la ONS constitutiva;
- 2) la segunda, dependiente de la actividad de la ONS inducible.

Cuando la síntesis de ON se ha realizado de manera anormal por cualquiera que sea la ruta, el mecanismo por el que causa la excitotoxicidad parece ser común, y éste puede ser también dividido en dos rutas: toxicidad por inhibición enzimática de procesos fundamentales, y por subproductos del ON.

Anteriormente se ha expuesto que los resultados de las investigaciones sobre la acción excitotóxica del ON pueden catalogarse en grupos distintos y contradictorios, pero a éste respecto, posibles soluciones se han elaborado.

Una manera en que estos resultados encuentran explicación es debida al estado químico de la molécula del ON. El estado químico del ON depende de que la molécula posea o carezca de un electrón libre, condición que puede estar influenciada por la presencia o ausencia de donadores electrónicos tales

como el ascorbato o el aminoácido cisteína. La molécula del ON es tóxica cuando posee un electrón libre, que es el caso normal de la molécula. Pero cuando pierde este electrón, la molécula queda cargada positivamente. De esta manera puede unirse a un sitio regulador del receptor NMDA, al conocido como sitio regulador redox (39). Esta unión conduce a la disminución de la actividad del receptor NMDA, y por tanto protege de la sobreestimulación debida al exceso del glu o a su prolongada presencia. En este sentido se intenta el uso terapéutico de fármacos que agonizan la acción del ion cargado positivamente, tales como la mencionada nitroglicerina. (39)

Por otra parte, estudiando con la técnica de Patch-clamp las corrientes de toda la célula, se descubre que el ON y otros agentes que lo liberan, inhiben parcialmente las corrientes de Ca^{++} a concentraciones entre los 1 μM y 1 mM (37). Estas corrientes son las que provocan el incremento en la concentración del Ca^{++} intracelular ($[Ca^{++}]_i$). A su vez, también disminuyen, aunque en menor proporción, cambios debidos a la $[Ca^{++}]_i$ producidos por el K^+ y el kainato. No parece que estos resultados sean consecuencia de la unión del ON al sitio redox de los receptores NMDA puesto que los efectos antes mencionados, provocados por el ON, persisten luego de la previa oxidación de este sitio con otros agentes. Puesto que el NPS y el ISDN no inhiben las corrientes totales de Ca^{++} (patch-clamp), se ha sugerido que el ON modula la $[Ca^{++}]_i$ alterando algún proceso homeostásico del Ca^{++} (37).

En este estudio, el 8-bromo-GMPc (agonista del GMPc), no mimetiza el efecto del ON, lo que sugiere que el efecto causado por el ON no es mediado por el GMPc. Otro estudio muestra claramente que la aplicación directa de GMPc no es tóxica para las células (13).

Otra manera en que el ON puede proteger de la neurotoxicidad es por la inhibición de su posterior síntesis. El ON puede activar un mecanismo de retro alimentación inhibidora, ya que si disminuye el $[Ca^{++}]_i$, el mecanismo de producción de ON (dependiente de Ca^{++}) queda inhibido.

Los resultados controvertidos pueden encontrar más explicación atendiendo a distintas fuentes (13):

- 1) Pueden representar la consecuencia de la no estandarización de las técnicas y las preparaciones.
- 2) Las distintas poblaciones celulares pueden tener distinta sensibilidad ante el ON.
- 3) Además, las distintas proporciones de tipos celulares en los distintos cultivos puede contribuir a las diferencias.
- 4) Los métodos y la duración de aplicación del ON, de sus donadores y de los inhibidores de la ONS, puede ser importante.
- 5) La neurotoxicidad inducida por glu puede estar mediada por múltiples rutas. El ON puede participar en esta toxicidad, pero la neurodegeneración puede proceder aún en la ausencia del ON mediante algún mecanismo paralelamente redundante.
- 6) Por sí mismo, el ON puede ejercer múltiples, e incluso acciones opuestas, dependiendo de la duración o la concentración de su aplicación.

Si bien es cierto que muchos resultados han dado lugar a la controversia, bien es cierto también que los que apoyan la participación tóxica del ON en los tejidos neuronales son abundantes.

Esta posible acción tóxica del ON puede dar explicación de la alta cantidad de sistemas que pueden regular a la ONS. Se puede hablar de dos necesidades básicas de regulación de la ONS. La primera, para evitar una sobreestimulación de sus funciones básicas, tanto por la economía energética y la homeostásis celular, como por evitar los efectos secundarios nocivos que se pueden derivar de la sobreconcentración de los productos que dependen de los efectores activados por el ON. La segunda, para evitar los efectos excitotóxicos de la sobreproducción del ON. De esta manera, resulta lógico encontrar que los mecanismos de regulación de la ONS son mecanismos que tienen una activación dependiente de los mismos factores que activan la enzima (a la ONS), como es el caso del Ca^{++} y la calmodulina, y de los productos y subproductos de la activación enzimática, como es el caso del mismo ON y del GMPc.

La ausencia de GCs en las neuronas diaforasas puede explicar que la concentración de ON recién producido sea menor en las neuronas vecinas que contienen este efector. La conversión de ON en subproductos tóxicos puede ser mayor entonces en las neuronas vecinas. Se le atribuye al Ca^{++} un papel importante en la toxicidad celular, aunque no suficiente como para dar razón del fenómeno de la excitotoxicidad. En las neuronas diaforasas, el aumento de concentración intracelular de este catión se da por la vía de apertura de los canales de los receptores NMDA. La despolarización provoca además, que los canales a Ca^{++} dependientes de voltaje se abran y la alta concentración progresa. El ON producido en las neuronas diaforasas puede actuar entonces como regulador que disminuye las corrientes de Ca^{++} de los receptores NMDA. Estos dos hechos (menor concentración de subproductos del ON y disminución de las corrientes de Ca^{++} en las neuronas diaforasas), junto con el reporte de la actividad de diaforasa de la ONS, pueden dar explicación de la sobrevivencia observada en las neuronas diaforasas.

La muerte de las neuronas vecinas puede encontrar explicación con la presencia de mayor concentración de subproductos de ON, el ingreso de Ca^{++} en cantidades no moduladas, y la ausencia de la actividad de la ONS. Para que la concentración intracelular de Ca^{++} participe en la toxicidad de estas neuronas, es necesario hablar de que ocurre en un etapa distinta, no simultánea, a la producción del ON. El ingreso de Ca^{++} se da con la apertura de los receptores NMDA que implica la despolarización. Si bien ocurre despolarización y apertura de los receptores NMDA en las neuronas vecinas a las diaforasas, tendrá que ocurrir de nueva cuenta en una etapa posterior a la síntesis de ON, ya que éste conduciría a la disminución de las corrientes de Ca^{++} , reduciendo las posibilidades de excitotoxicidad.

En el estado actual de la investigación, parece prudente atribuir un papel excitotóxico al ON, pero compartido con muchos otros mecanismos que también se encuentran asociados al daño y a la muerte celular, como los que dependen del aumento en la concentración intracelular del Ca^{++} (dentro de los que cabe sin problema la síntesis de ON dependiente de la isoforma constitutiva de la enzima). La acción bactericida y tumoricida de los macrófagos reportada como dependiente del ON sugiere el papel tóxico

que puede tener en el SNC. Puesto que la forma inducible de la ONS es independiente de Ca^{++} , y la actividad enzimática solo se ve limitada por la concentración del sustrato, esta puede ser la responsable principal de los aumentos en cantidades tóxicas del ON. Puesto que la capacidad potencial de producción de ON por parte de esta enzima es muy alta, las células nerviosas deberán de poseer mecanismos transcripcionales y postrcripcionales que aseguren la modulación de su expresión. Probablemente los astrocitos estén implicados en el desencadenamiento de la síntesis del ON en cantidades tóxicas.

FUTURA INVESTIGACIÓN SOBRE EL ON Y SU PAPEL EN EL SNC

Aunque mucho se ha logrado, mucho falta por hacer. La investigación sobre el ON ha provocado la apertura de nuevos horizontes en la manera de entender la señalización celular dentro y fuera del SNC. Pero no se tiene todavía una comprensión global sobre el funcionamiento del ON en los sistemas biológicos, puesto que los tópicos particulares permanecen aún llenos de incógnitas. Es claro que la futura investigación buscará completar la información necesaria para llegar a esta comprensión. La acción excitotóxica, los efectos de los productos sintetizados por los efectores del ON, la inducción de la potenciación y la depresión de largo término, permanecen en espera de más experimentación que permita mayor claridad. Estos últimos fenómenos, a los que se les ha asociado con la plasticidad neuronal, seguramente encontrarán claridad con investigaciones que presenten nuevos datos sobre la localización de la ONS y su colocalización con otros compuestos, y la relación de estos fenómenos con la activación de distintos receptores (70). El descubrimiento de la forma endotelial de la enzima en algunas regiones cerebrales (26) apunta hacia una posible solución de este problema. La intervención del ON en el desarrollo será seguramente otro tópico al que la investigación sea dirigida.

Precisar los mecanismos de la regulación de la ONS puede ser otro punto importante, ya que de esto depende la comprensión del fenómeno de la excitotoxicidad. Sobre este tópico es de esperar que la investigación sea abundante, ya que se ve implicado en el conocimiento de los mecanismos que explican las enfermedades neurodegenerativas. Las nitrosaminas se encuentran asociadas al cáncer, y otros subproductos del ON se han reportado como altamente tóxicos. Recientemente, el stress se ha relacionado con la síntesis del ON. Sin duda, los inhibidores de la ONS y los del ON, continuarán en la investigación dirigida hacia la terapéutica de las enfermedades a las que se les ha relacionado la participación del ON. Nuevos datos acerca de la regulación del receptor NMDA (71, 72) permitirán entender mejor el fenómeno de la regulación y la excitotoxicidad del ON, así como sus implicaciones terapéuticas (73, 74). Por el momento, el tema del ON, mundial y extenso, ha aportado ya, muchos "granos de arena", al conocimiento y comprensión de la fisiología de los sistemas biológicos, y va encontrando, caminos de aplicación en beneficio del género humano.

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00462

Autor:

Romero Basurto Mauricio Emanuel

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Contiene Folio 52 repetido con diferente informacion

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deguchi, T., and Yoshioka, M. L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *Journal of Biol. Chem*, 257: 10147-52, 1982.
2. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. Formation of NO from L-arginine in the CNS: a transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5159-62, 1989.
3. Snyder, S.H. and Bredt, D. Biological roles of NO. *Scientific American*, may: 28-35, 1992.
4. Bredt, D.S. and Snyder, S. NO mediates glu-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9030-33, 1989.
5. East, S.J. and Garthwaite, J. Nanomolar N^o-nitroarginine inhibits NMDA-induced cGMP formation in rat cerebellum. *European Journal of Pharmacology*, 184: 311-13, 1990.
6. East, S.J. and Garthwaite, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cGMP formation through the L-arg-NO pathway. *Neuroscience Letters*, 123: 17-19, 1991.
7. Bredt, D.S., and Snyder, S.H. NO, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8: 3-11, 1992.
8. Garthwaite, J., Charles, S.L., and Chess-Williams, R. Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385-88, 1988.

9. Moncada, S., Palmer, R.M.J., and Higgs, E.A. NO: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2): 109-42, 1991.
10. Hibbs, J.B., Jr., Vavrin, Z. and Taintor, R.R. L-arg is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in teget cells. *Journal of Immunology*, 138: 550-65, 1987.
11. Moncada, S. and Higgs, A. The L-arg-NO pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329(27): 2002-10, 1993.
12. Garthwaite, J. Glu, NO and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 14(2): 60-67, 1991.
13. Schuman, E.M. and Madison, D.V. NO and synaptic function. *Annual Reviews Neuroscience*, 17: 153-83, 1994.
14. Green, L.C., Tannenbaum, S.R., and Goldman, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56-58, 1981.
15. Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., and Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473-476, 1987.
16. Knowles, R.G., Merrett, M., Salter, M. and Moncada, S. Diferential induction of brain lung and liver NOS by endotoxin in the rat. *Biochemistry Journal*, 270: 833-36, 1990.
17. Griffith, O.W. and Stuehr, D.J. NOS: properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57: 707-36, 1995.
18. Deguchi, T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *Journal of Biol. Chem.*, 252: 7617-19, 1977.
19. Bredt, D.S., Hwang, P.M., and Snyder, S. H. Localization of NOS indicating a neural role for NO. *Nature*, 347: 768-70, 1990.
20. Bredt, D.S., and Snyder, S. H. Isolation of NOS, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87:682-85, 1990.
21. Simmons M.L. and Murphy, S. Cytokines regulate L-arg-dependent cGMP production in rat glial cells. *European Journal of Neuroscience*, 5:825-31, 1993.
22. Mura, M., Takayama, K. and Okada, J. Increase in NO and cGMP of rat cerebellum by radio frequency burst-type electromagnetic field radiation. *Journal of Physiology*, 461: 513-24, 1993.
23. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. Kinetic characteristics of NOS from rat brain. *Biochemical Journal*, 269: 207-10, 1990.
24. Rengasamy, A. and Johns, R.A. Regulation of NOS by NO. *Molecular Pharmacology*, 44: 124-8, 1993.
25. Murphy, S., Simmons, L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E. Reis, D.J. Minc-Golomb, D. and Schwartz, J.P. Synthesis of NO in cns glial cells. *Trends in Neuroscience*, 16(8): 323-28, 1993.
26. Zhang, J. and Snyder, S.H. NO in the nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35: 213-33, 1995.
27. Garthwaite, J. and Boulton, C.L. NO signaling in the CNS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57: 683-706, 1995.
28. Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. NOS and neuronal NADPH diaphofase

- are identical in brain and in periferial tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7797-7801, 1991.
29. Müller, U. and Bicker, G. Calcium-activated release of NO and cellular distribution of NO-synthesizing neurons in the nervous system of the locust. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7521-28, 1994.
 30. Liepe, B.A., Stone, C., Koistinaho, J. and Copenhagen, D.R. NOS in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7641-54, 1994.
 31. Babbedge, R.C., Bland-Ward, P.A., Hart, S.L. and Moore, P.K. Inhibition of rat cerebellar NOS by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Pharmac. Group, BSD, (King's College; U of L), London SW3 6LX*, 1993.
 32. Rengasamy, A. and Johns, R.A. Inhibition of NOS by a superoxide generating system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267 (3): 1024-7, 1993.
 33. Westergaard, N. Beart, P.M. and Schousboe, A. Transport of L-[³H]-arg in cultured neurons: characteristics and inhibition by NOS inhibitors. *Journal of Neurochemistry*, 63: 364-7, 1993.
 34. Luo, D., Leung, E. and Vincent, S.R. NO-dependent efflux of cGMP in rat cerebellar cortex: an in vivo microdialysis study. *The Journal of Neuroscience*, 14(1): 263-71, 1994.
 35. Ewer, J., Vente, J.D. and Truman, J.W. Neuropeptide induction of cGMP increases in the insect CNS: resolution at the level of single identifiable neurons. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7704-12, 1994.
 36. Smith, S. and Li, J. Novel action of NO as mediator of NMDA-induced phosphatidylinositol hydrolysis in neonatal rat cerebellum. *Molecular Pharmacology*, 43: 1-5, 1992.
 37. Hoyt, K.R., Tang, L.-H., Aizenman, E., and Reynolds, I.J. NO modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca⁺⁺ in cultured rat forebrain neurons. *Brain Research*, 592: 310-16, 1992.
 38. Choi, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634, 1988.
 39. Lipton, S.A. and Rosenberg, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*, 330(9): 613-622, 1994.
 40. Massieu, L., Morales-Villagrán, A., and Tapia, R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 64: 2262-72, 1995.
 41. Ashley, R.H., Brammer, M.J., and Marchbanks, R. Measurement of intrasynaptosomal free calcium by using the fluorescent indicator quin-2. *Biochem. Journal*, 219: 149-58, 1984.
 42. Marin, P., Quignard, J.-F., Lafon-Cazal, M. and Bockaert, J. Non-classical glu receptors, blocked by both NMDA and non-NMDA antagonists, stimulate NO production in neurons. *Neuropharmacology*, 32(1): 29-36, 1993.
 43. Lolley, R.N., Farber, D.B., Rayborn, M.E., and Hollyfield, J.G. Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: stimulation of an inherited disease. *Science* 196: 664-66, 1977.
 44. Ferrendelli, J.A., Blank, A.C., and Gross, R.A. Relationships between seizure activity and cyclic nucleotides levels in brain. *Brain Research*, 200: 93-103, 1980.
 45. Hyman, B.T., Marzloff, K., Wenniger, J.J., Dawson, T.M., Bredt, D.S., and Snyder, S.H. Relative sparing of NOS-containing neurons in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 32(6): 818-20, 1992.

46. Vizzard, M.A., Erdman, S.L. and Groat, W.C. Increased expression of neuronal NOS in viscera after nerve injury. *The Journal of Neuroscience*, 15(5): 4033-45, 1995.
47. Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R., and Snyder, S.H. Mechanisms of NO-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *The Journal of Neuroscience*, 13(6): 2651-61, 1993.
48. Fujisawa, H., Dawson, D., Browne, S.E., MacKay, K.B., Bullock, R., and McCulloch, J. Pharmacological modification of glutamate neurotoxicity in vivo. *Brain Research*, 629: 73-78, 1993.
49. Regan, R.F., Renn, K.E., and Panter, S.S. NMDA neurotoxicity in murine cortical cell cultures is not attenuated by hemoglobin or inhibition of NO synthesis. *Neuroscience Letters*, 153: 53-56, 1993.
50. Hewett, S.J., Corbett, J.A., McDaniel, M.L., and Choi, D.W. Inhibition of NO formation does not protect murine cortical cell cultures from NMDA neurotoxicity. *Brain Research*, 625: 337-341, 1993.
51. Pauwels, P.J. and Leysen, J.E. Blockade of NO formation does not prevent glutamate-induced neurotoxicity in neuronal cultures from rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 08845: 27-30, 1992.
52. Montague, P.R., Gancayco, C.D., Winn, M.J., Marchase, R.B. and Friedlander, M.J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*, 263: 973-77, 1994.
53. Lawrence, A.J. and Jarrott, B. NO increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. *Neuroscience Letters*, 151: 126-129, 1993.
54. Otake, K. and Ruggiero, D.A. Monoamines and NO are employed by afferents engaged in midline thalamic regulation. *The Journal of Neuroscience*, 15(3): 1891-1911, 1995.
55. Garry, M.G., Richardson, J.D. and Hargreaves, K.M. Sodium nitroprusside evokes the release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P from dorsal horn slices via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 14(7): 4329-37, 1994.
56. Ghijsen, W.E.J.M., Besselsen, E., Geukers, V., Kamphuis, W. and Lopes da Silva, F.H. Enhancement of endogenous release of glutamate and gamma-aminobutyric acid from hippocampus CA1 slices after in vivo long-term potentiation. *Journal of Neurochemistry*, 59: 482-86, 1992.
57. Zorumski, C.F. and Izumi Y. Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. *Biochemical Pharmacology*, 46(5): 777-85, 1993.
58. Böhme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A. and Blanchard, J.Ch. Possible involvement of NO in long-term potentiation. *European Journal of Pharmacology*, 199: 379-81, 1991.
59. Mizutani, A., Saito H. and Abe, K. Involvement of NO in long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Brain Research*, 605: 309-11, 1993.
60. Nowicky, A.V. and Bindman, Lynn, J. The NOS inhibitor, NMLA blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons *in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, 70(3): 1255-59, 1993.
61. Kandel, E.R., and Hawkins, R.D. The biological basis of learning and individuality. *Scientific American*, september, 1992.
62. Bannerman, D.M., Chapman, P.F., Kelly, P.A.T., Butcher, S.P. and Morris, G.M. Inhibition of NOS does not prevent the induction of long-term potentiation in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7415-25, 1994.

63. Linden, D.J. and Connor, J.A. Cellular mechanisms of long-term depression in the cerebellum. *Current Opinion in Neurobiology*, 3: 401-06, 1993.
64. Izumi, Y. and Zorumski, C.F. NO and long term synaptic depression in the rat hippocampus. *NeuroReport*, 4:1131-34, 1993.
65. Daniel, H., Hemart, N., Jaillard, D. and Crepel, F. Long-term depression requires NO and guanosine 3':5' cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience*, 5: 1079-82, 1993.
66. Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B. and Bernardi, G. Post-receptor mechanisms underlying striatal long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, 14(8): 4871-81, 1994.
67. Chapman, P.F., Atkins, C.M., Allen, M.T., Haley, J.E. and Steinmetz. Inhibition of NO synthesis impairs two different forms of learning. *NeuroReport*, 3: 567-70, 1992.
68. Bannerman, D.M., Chapman, P.F., Kelly, P.A.T., Bücher, S.P. and Morris, G.M. Inhibition of NO synthase does not impair spatial learning. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7404-14, 1994.
69. Dawson, T.M. and Snyder, S.H. Gases as biological messengers: NO and carbon monoxide in the brain. *The Journal of Neuroscience*, 14(9): 5147-59, 1994.
70. O'Connor, J.J., Rowan, M.J. and Anwyl, R. Tetanically induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: investigations of the involvement of mGlu receptors. *The Journal of Neuroscience*, 15(3): 2013-20, 1995.
71. Blackstone, C., Murphy, T.H., Moss, S.J., Baraban, J.M. and Haganir, R.L. Cyclic AMP and synaptic activity-dependent phosphorylation of AMPA-preferring glu receptors. *The Journal of Neuroscience*, 14(12): 7585-93, 1994.
72. Rosenmund, C., Feltz, A. and Westbrook, G.L. Synaptic NMDA receptor channels have a low open probability. *The Journal of Neuroscience*, 15(4): 2788-95, 1995.
73. Massieu, L., Thedinga, K.H., McVey, M., and Fagg, G.E. A comparative analysis of the neuroprotective properties of competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists in vivo: implications for the process of excitotoxic degeneration and its therapy. *Neuroscience*, 55 (4): 883-892, 1993.
74. Duvoisin, R.M., Zhang, C. and Ramonell, K. A novel metabotropic glu receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 15(4): 3075-83, 1995.