

ACTUALIZACION POR TEMAS

Oxido nítrico: ¿otra forma de comunicación neuronal?

Esther Talavera-Cuevas*
Alejandro Reyes-Lezama **

Summary

Nitric Oxide (NO) is an extremely reactive gas, produced by internal combustion engines. This molecule is one of the components of smog and acid rain, and is responsible for the destruction of the ozone layer. Initially, this molecule was found in bacteria, and only recently this compound was found in mammalian cells. Research in different fields has implicated the presence of NO in three biological systems: in the vascular system by regulating the vascular tone; in the immune system where leukocytes release NO to destroy infected cells; and in the last two years, this molecule has been postulated as a neural messenger in the brain.

Early research dealing with the vasodilation mechanism hinted that the action of vasodilating substances (such as acetylcholine and bradykinin) was exerted on the layer of smooth muscle cells that form the blood vessels. However, further investigations showed that the inner layer of blood vessels, made up of endothelial cells, was essential for the relaxing action of these substances. Therefore, it was concluded that acetylcholine was not acting directly upon the smooth muscle, but on the inner epithelium, and some substance produced by this layer exerted its effect on the smooth muscle causing the relaxation. Thus, this substance was called endothelial-derived relaxing factor (EDRF).

Subsequent research identified the EDRF as nitric oxide.

In the brain, the production of NO in neurons has been associated with glutamatergic NMDA receptors. The activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor induces the influx of Ca⁺⁺. The intracellular calcium binds to the protein calmodulin (CAM) and forms a complex. This complex activates the enzyme nitric oxide synthase (NOS) producing NO and citrulline. The substrate of this reaction is the amino acid Arginine. The NO produced diffuses to the synaptic cleft, and can act as a retrograde messenger by reaching the presynaptic terminal. Once there, it binds to iron in heme group of the enzyme guanylate cyclase (GC), increasing the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP).

Immunohistochemical studies using antibodies raised against NOS have allowed the identification of the neurons producing NO in the rat brain. The distribution of these neurons comprises the olfactory bulb, cerebellum, amygdala, hippocampus, hypothalamus, striatum, cortex, spinal cord and pituitary. The pattern of distribution of NO producing cells in the brain did not seem to coincide with the distribution of any of the known neurotransmitters. However, the distribution of

NOS coincided with the cells that contain the enzyme NADPH-diaphorase. These cells called diaphorasic are very resistant in certain neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Huntington's disease and vascular strokes.

The possible role of NO as a retrograde messenger in the processes of memory and learning and its participation in all the other vital functions, make the elucidation of its metabolic pathways a subject of utmost importance.

Resumen

El óxido nítrico (ON), es un gas altamente reactivo, producido por los motores de combustión interna que contribuye a la formación del smog y de la lluvia ácida, además de participar en la destrucción de la capa de ozono. Hace algunos años se encontró como una de las moléculas constituyentes de las bacterias, pero hasta finales de la década pasada se demuestra que las células de los mamíferos pueden sintetizar ON.

Los trabajos realizados en diferentes áreas de la investigación, han demostrado que el ON es una molécula mensajera que interviene en la regulación del tono vascular, así como en la respuesta inmune, ya que al ser producido por los macrófagos, regula sus acciones bactericidas y de destrucción de las células tumorales. En los últimos dos años se ha sugerido que el sistema nervioso tiene funciones muy parecidas a las de un neurotransmisor.

El descubrimiento del ON como mensajero químico se debe primordialmente a trabajos relacionados con la investigación de los mecanismos que regulan el tono vascular en el organismo. Hasta antes de los 80 se pensaba que la relajación producida por las sustancias vasodilatadoras (como la acetilcolina, la bradiquinina, etc.) se debía a que éstas actuaban directamente sobre el músculo liso de los vasos sanguíneos. Sin embargo, este concepto cambió cuando se demostró que la capa de células endoteliales que cubren al vaso en su cara interna, son necesarias para obtener la respuesta de relajación inducida por los vasodilatadores. Esto llevó a postular, que en el endotelio, existe una sustancia que se libera, y por difusión llega hasta la capa muscular de los vasos sanguíneos produciendo la relajación, por lo que se le dió el nombre de Factor Relajante del Endotelio (FRDE). Las investigaciones posteriores estuvieron dedicadas al aislamiento e identificación química de esta sustancia. Finalmente se concluyó que dicho factor y el óxido nítrico, son una misma sustancia ya que presentan las mismas características: producen vasodilatación, estimulan la síntesis de Monofosfato de Guanosina Cíclico (GMPc), su acción es inhibida por hemoglobina u otras proteínas con grupos hemo (Fe⁺⁺), así como tiempos de acción corta, entre 4 y 6 segundos. Además no existe diferencia en cuanto a su actividad biológica, estabilidad y susceptibilidad a inhibidores o potenciadores del efecto relajante.

* Departamento de Neurofisiología. División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calzada México-Xochimilco 101, Tlalpan, 14370 Mxico, D.F.

** Departamento de Neuroquímica. División de Investigaciones Clínicas. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calzada México-Xochimilco 101, Tlalpan, 14370 México, D.F.

Este hallazgo fue el inicio de una serie de investigaciones realizadas por varios grupos, enfocadas al estudio de la ruta biosintética del óxido nítrico en los diferentes sistemas: vascular, inmune y nervioso.

En el sistema nervioso se ha encontrado que el ON se sintetiza en grupos neuronales que presentan receptores glutamatérgicos para N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Se sabe que al estimular este receptor se incrementa la concentración de Ca^{++} intracelular. Este incremento en el Ca^{++} , favorece la formación del complejo $Ca^{++}/$ Calmodulina, que es un activador de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS). El resultado de este proceso es la producción de ON y citrulina a partir del aminoácido L-arginina.

El óxido nítrico producido en el citoplasma de la célula postsináptica, se difunde a través de la membrana en dirección retrógrada hacia la neurona presináptica, es por esto que se le ha denominado el mensajero retrógrado. Una vez que se ha difundido en el citoplasma de la célula presináptica; se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa (GC) y activa la síntesis de GMPc produciendo un incremento en la concentración de este nucleótido.

Por estudios inmunohistoquímicos, se han identificado en el cerebro de la rata los núcleos celulares en donde se sintetiza el ON. Este análisis se ha realizado mediante la detección de la ONS con anticuerpos específicos obtenidos contra esta enzima. Los sitios en donde se encuentra la ONS son: bulbos olfatorios, cerebelo, núcleos amigdalinos, hipocampo, hipotálamo, estriado, corteza, médula espinal y pituitaria.

Las células capaces de sintetizar ON presentan también una fuerte reacción histoquímica para la enzima NADPH-diaforasa. Esta enzima al igual que la ONS, puede sintetizar ON a partir de la L-arginina. Por estudios patológicos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas tales como la Corea de Huntington, la Enfermedad de Alzheimer o la embolia cerebral se ha observado que mueren las neuronas que no sintetizan ON.

Por otra parte, se ha postulado que el ON podría jugar un importante papel en los procesos de aprendizaje, en algunos de los cuales se sabe que la activación de los receptores tipo NMDA es fundamental.

En la actualidad el óxido nítrico, es considerado como una nueva clase de mensajero celular dentro de varios sistemas en el organismo, que se difunde con rapidez a través de la membrana, permitiendo ejercer sus efectos en múltiples células cercanas.

La posibilidad de que esta molécula participe como mensajero retrógrado en los mecanismos de aprendizaje y memoria, así como en diferentes patologías cerebrales y sea el responsable de la destrucción potencial de las células cancerígenas, hace especialmente interesante el estudio de las rutas metabólicas en las cuales participa.

Introducción

En el sistema nervioso central (SNC), las células neuronales se comunican entre sí mediante diversas sustancias a las que se les ha dado el nombre de neurotransmisores o neuromoduladores. Estas moléculas se liberan de la presinapsis en forma unidireccional, como respuesta de la neurona a la llegada de un impulso nervioso. Al interactuar con su receptor específico, modifican la excitabilidad de la célula postsináptica, en donde ejercen su efecto. Entre estos mensajeros químicos encontramos a los llamados neurotransmisores clásicos que son: la acetilcolina, las catecolaminas, la serotonina, el GABA, los aminoácidos excitadores tales como, el ácido glutámico, el ácido aspártico, la glicina; así como a los neuropéptidos. El descubrimiento de cada una de éstas moléculas, nos ha dado información que ha creado nuevas expectativas sobre el co-

nocimiento de los mecanismos que regulan la comunicación neuronal.

En la actualidad, nos encontramos ante el hallazgo de una clase diferente de mensajero neuronal, que puede modificar los conceptos sobre el funcionamiento de la comunicación unidireccional de las neuronas. Nos referimos al OXIDO NITRICO (ON).

Este compuesto altamente reactivo, fue en principio, conocido como un gas que se produce por los motores de combustión interna, que contribuye a la formación del esmog, la lluvia ácida y la destrucción de la capa de ozono. Es difícil pensar que una molécula así, sea la responsable de una gran variedad de respuestas fisiológicas en el organismo.

Sus propiedades altamente reactivas lo hacen interactuar con rapidez con tomos o moléculas que contienen electrones no apareados. Tal es el caso del oxígeno (O_2), del anión superóxido (O_2^-), así como de varios metales como el cobre (Cu^{++}), el magnesio (Mg^{++}) y el hierro (Fe^{++}). Esto es de especial interés si consideramos que en los seres vivos existen una gran variedad de metaloproteínas con funciones metabólicas claves, como la hemoglobina.

Una serie de descubrimientos realizados en líneas de investigación diferentes, han mostrado que el óxido nítrico tiene una amplia gama de funciones importantes en el organismo. Se ha encontrado que actúa como una molécula mensajera en la respuesta de por lo menos tres sistemas: a los leucocitos les confiere la capacidad de destruir bacterias y células tumorales; en los vasos sanguíneos actúa como un factor que induce la relajación endotelial; y más recientemente se le ha encontrado como un constituyente neuronal con funciones muy parecidas a las de un neurotransmisor (6,7,30).

Identificación del óxido nítrico

Las primeras evidencias para la identificación y función fisiológica del ON, se llevaron a cabo en investigaciones enfocadas al estudio de los mecanismos, mediante los cuales, los neurotransmisores regulan el tono vascular. Hasta antes de los 80 se pensaba que la relajación producida por las sustancias vasodilatadoras, como la acetilcolina o la bradiquinina, se debía a que éstas actuaban directamente en la capa muscular de los vasos sanguíneos. En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que esta idea era errónea, ya que al separar la capa interna del vaso sanguíneo, constituida por células endoteliales, el efecto de relajación producido por las sustancias vasodilatadoras no se observaba. Cuando esta capa se restituía con células endoteliales en cultivo, el efecto relajante se volvía a presentar. Estos experimentos indicaron, que en el endotelio, existe una sustancia que se libera, y por difusión llega hasta la capa muscular de los vasos sanguíneos produciendo la relajación, por lo que se le dio el nombre de Factor Relajante del Endotelio (FRDE) (18).

Además se demostró, que este mismo efecto se produce en las venas, las arterias y los microvasos, y se presenta en respuesta a la presencia de una variedad de

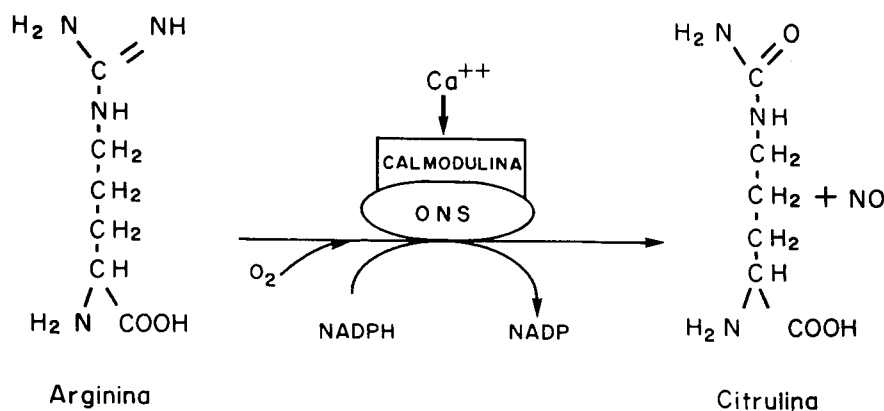


Figura 1. Síntesis de óxido nítrico. La enzima óxido nítrico sintetasa (ONS), convierte L-arginina y O_2 en citrulina y óxido nítrico (NO). La enzima ONS, es activada por el complejo Ca^{++} /Calmodulina (Ca^{++} /CaM), y emplea como donador de electrones a la molécula NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido).

sustancias como los nucleótidos de adenina, la trombina, la sustancia P y el ionóforo de calcio A23187 (7).

Sin embargo, algunos fármacos como los nitritos que son los más antiguos vasodilatadores conocidos, (por ejemplo la nitroglicerina), ejercen también un efecto relajante en el vaso sanguíneo, pero por un mecanismo independiente del endotelio (17).

Murad y col. en 1978 descubrieron que el efecto producido por estos nitritos, en realidad se debía a uno de sus metabolitos: el ON, cuyas propiedades relajantes eran muy similares a las del FRDE (13,38), es decir, ambos compuestos presentaban las mismas características: vasodilatación, incremento en la producción de Monofosfato de Guanocina cíclico (GMPc), su acción era inhibida por hemoglobina u otras proteínas con grupo hemo (Fe^{++}), así como tiempos de acción corta, entre 4 y 6 segundos.

Todas estas similitudes entre el ON y el FRDE, llevaron a sugerir a Furchgott que eran una misma sustancia. El grupo de Moncada en 1987, trabajando con células endoteliales en cultivo, determinaron que no existía diferencia entre ambos compuestos en cuanto a su actividad biológica, estabilidad y susceptibilidad a inhibidores o potenciadores del efecto relajante, concluyendo entonces que el FRDE era en realidad OXÍDO NITRICO (42).

Desde 1977, en el sistema nervioso central se conocía que al exponer homogenados de corteza cerebral de ratón en presencia de óxido nítrico exógeno o nitrosaminas (compuestos carcinogénicos), se activa a la Guanilato Ciclasa (GC) -la enzima que sintetiza al GMPc-, y que este efecto es inhibido por hemoglobina (34). Ese mismo año, Deguchi y col. 1977 (10) reportaron que la fracción soluble de cerebro anterior de rata contenía una sustancia endógena de peso molecular bajo, que activaba también a la GC y su acción era inhibida por hemoglobina, como sucedía en el sistema vascular con el óxido nítrico. Propusieron entonces que dicha sustancia estaba relacionada con las nitrosaminas (11). En 1982, este mismo grupo encontró que el aminoácido L-arginina en células de neuro-

blastoma era el activador endógeno de la GC (12). Sin embargo, en esta época no se conocía nada sobre la relación de la L-arginina con el ON. Es hasta que Palmer y col. en 1988 (41) determinan, en células endoteliales que a partir de la L-arginina se sintetiza el ON y la citrulina, y es en este momento cuando este hallazgo adquiere mayor importancia. Posteriormente Knowles y col. en 1989 (27), encuentran que la formación de ON en el SNC sigue la misma ruta biosintética.

Síntesis

Otras evidencias sobre la síntesis endógena del ON se dieron a partir de estudios nutricionales sobre los nitratos como fuente de algunas sustancias carcinogénicas como las nitrosaminas. En principio se observó, que pese a proporcionar a ratas y humanos una dieta baja en nitratos el nivel de excreción urinaria de estas sustancias no disminuía, demostrándose que en el organismo se generan nitratos, como producto de alguna vía metabólica (22,23,52). Por otro lado, al estimular cultivos primarios de macrófagos, con endotoxinas (como ocurriría en el caso de un proceso inflamatorio en el organismo), se observó un incremento en los niveles de nitratos en el medio de cultivo, siendo la L-arginina la fuente productora de éstos (24).

Como se mencionó antes, los trabajos de Palmer y col. (1988) (41) demostraron que la L-arginina es la molécula precursora a partir de la cual, se sintetizan en forma estequiométrica, el óxido nítrico y la citrulina (fig. 1).

Para que la síntesis de estas moléculas se lleve a cabo, es necesaria la acción de una enzima que catalice esta reacción. La enzima en cuestión es la óxido nítrico sintetasa (ONS), la cual ha sido purificada (5) y clonada (2) a partir de tejido cerebelar de rata. Esta enzima es una proteína con un peso molecular de alrededor de 150 Kilodaltones, y contiene dentro de su estructura molecular, sitios que son potencialmente regulables por varios activadores. Uno de estos sitios es

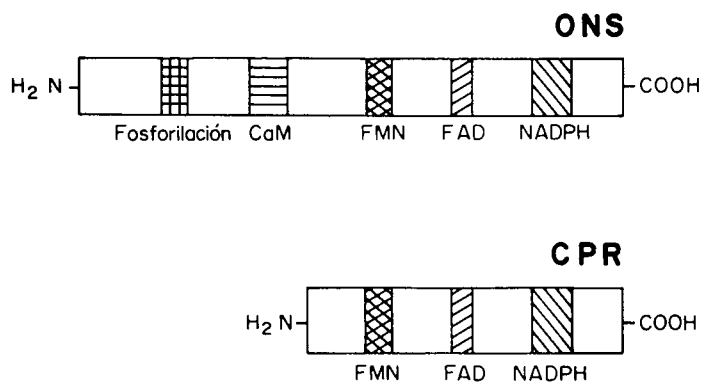


Figura 2. Esquema representativo de la similitud de sitios de reconocimiento, para diferentes moduladores en la secuencia de aminoácidos de la óxido nítrico sintetasa (ONS) y la enzima citocromo P-450 reductasa (CPR). CaM (calmodulina), FMN (mononucleótido de flavina), FAD (dinucleótido de flavina y adenina) y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido).

el aminoácido serina (colocado en la posición 473), que puede ser fosforilado por la Proteína Cinasa A (PCA), la Proteína Cinasa C (PCC) o la Proteína Cinasa dependiente de Ca⁺⁺/Calmodulina II (PCCAM). Estas proteínas cinasas (proteínas que donan grupos fosfatos) actúan probablemente como inhibidores endógenos de dicha enzima (39). La ONS presenta además otros sitios de regulación para los cofactores, FAD y FMN, emplea además NADPH como donador de electrones (7,36,41,44) (fig. 2).

La reacción enzimática que cataliza la ONS puede ser inhibida de manera endógena por fosforilación y por sustancias exógenas análogas de la L-arginina tales como N-monometil-L-arginina (L-NMMA), dimetilarginina asimétrica (DMAA) y dimetilarginina simétrica (DMAS) (21,34,44,49) (fig. 3).

Mediante estudios bioquímicos se ha encontrado que la actividad de la óxido-nítrico-sintetasa es heterogénea en los diferentes tejidos en donde se ha medido. Se ha sugerido que existen al menos dos isoformas de esta enzima: una se localiza en las neuronas y en los vasos sanguíneos y se expresa en forma constitutiva (se le denomina así porque siempre esta siendo sintetizada por la célula), además es citosólica, Ca⁺⁺/CAM dependiente, y libera ON en respuesta a la estimulación de su receptor; la otra isoforma, que se encuentra en macrófagos y fibroblastos, se sintetiza cuando estas células reciben una señal molecular específica, es también citosólica y su actividad es independiente de Ca⁺⁺ liberando ON por largos periodos. Además su inducción es inhibida por glucocorticoides (16,25,45).

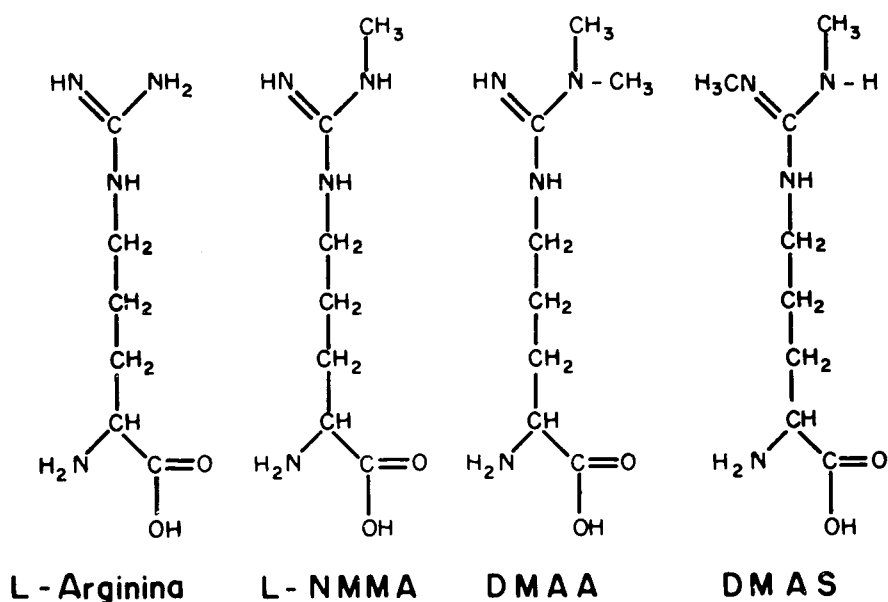


Figura 3. Inhibidores sintéticos de la ONS, análogos de la L-arginina. L-NMMA (N-monometil-L-arginina), ADMA (dimetilarginina asimétrica), SDMA (dimetilarginina simétrica).

Cuando se obtiene la secuencia de aminoácidos de una nueva proteína siempre resulta interesante compararla con la estructura de otras proteínas conocidas, ya que de esta manera se puede obtener información sobre su funcionamiento en el organismo. Bredt y col (1991) (2), al comparar la secuencia de aminoácidos de la óxido nítrico sintetasa con la de otras proteínas de mamíferos conocidas, encontraron que la región carboxilo-terminal de la ONS es muy similar a la enzima citocromo P-450 reductasa(CPR). La función de ésta última es la de donar un electrón a las enzimas que contienen al citocromo P-450 que metabolizan una amplia variedad de fármacos en las células hepáticas. Ambas enzimas, la ONS y la CPR, poseen sitios de reconocimiento para los cofactores FMN, FAD y emplean NADPH como donador de electrones. Esta enzima ha sido localizada también en células neuronales que contienen catecolaminas como neurotransmisor (fig. 2).

Mecanismo de acción propuesto para el óxido nítrico en el SNC

En 1989, dos grupos de investigación en diferentes partes del mundo llegaron a un mismo descubrimiento con respecto a los mecanismos de acción del ON en el sistema nervioso. Por un lado, Brendt y Snyder (4) en Estados Unidos y Garthwaite y col. (19 y 20) en Inglaterra, al analizar la conversión de la L-arginina en óxido nítrico y citrulina en rebanadas de cerebelo de rata observaron que la estimulación de la ONS, aumentaba 300 % la producción de óxido nítrico, en respuesta a la estimulación de los receptores glutamatérgicos para N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Se sabe que al estimular este receptor se genera una corriente entrante de Ca^{++} que incrementa la concentración de este ión en la terminal postsináptica (31). El Ca^{++} al unirse a la proteína calmodulina (CAM) forma el complejo Ca^{++}/CAM , que a su vez modula a la ONS, sintetizando entonces a partir de L-arginina, óxido nítrico y citrulina (5,35,36,37) (figs. 1 y 4).

El óxido nítrico producido en la postsinapsis se difunde a través del espacio sináptico, viaja en forma retrógrada y actúa en la terminal presináptica. En esta región el ON por su alta reactividad se une al grupo hemo (Fe^{++}) del sitio regulatorio de la enzima guanilato-ciclasa e incrementa el nivel de GMPc. Era de llamar la atención que el óxido nítrico únicamente incrementaba los niveles de GMPc en la presinapsis, no así en su sitio original de síntesis. Este efecto se explicó tiempo después debido a que se determinó que los niveles de Ca^{++} fisiológicos, esenciales para la acción de la enzima ONS, inhiben a la GC. Se ha propuesto que este sea un mecanismo de control que permite que sólo se produzca GMPc en las células estimuladas por el ON (27,32,40).

La estrecha relación entre el óxido nítrico y los receptores a NMDA ha sido de gran interés en los últimos años. Se sabe que en el hipocampo se lleva a cabo un fenómeno denominado Potenciación a Largo Plazo (PLP), que los investigadores han relacionado con procesos de memoria y aprendizaje. Estos procesos neuronales se pueden deber a aumentos o disminuciones prolongados en la transmisión sináptica, después de la estimulación continua de ciertas neuronas. Así, en las neuronas del hipocampo, cuando se registra en las terminales postsinápticas la acción del transmisor presináptico, de alguna forma aún no muy bien conocida, en la postsinapsis se genera una señal que viaja de forma retrógrada y que estimula nuevamente la liberación del transmisor en la presinapsis. El mensaje retrógrado cierra el circuito de retroalimentación, haciendo que la respuesta neuronal sea continua. Esta señal retrógrada muy bien podría ser el óxido nítrico. Varios investigadores han estudiado la potenciación a largo plazo en neuronas del hipocampo y han observado una inhibición de ésta por la acción de antagonistas de la ONS (1,46).

Por otro lado, en algunos casos de lesión cerebral, así como de ciertas enfermedades neurodegenerativas, gran cantidad de neuronas mueren debido al fenómeno llamado citotoxicidad. Aunque es sabido que

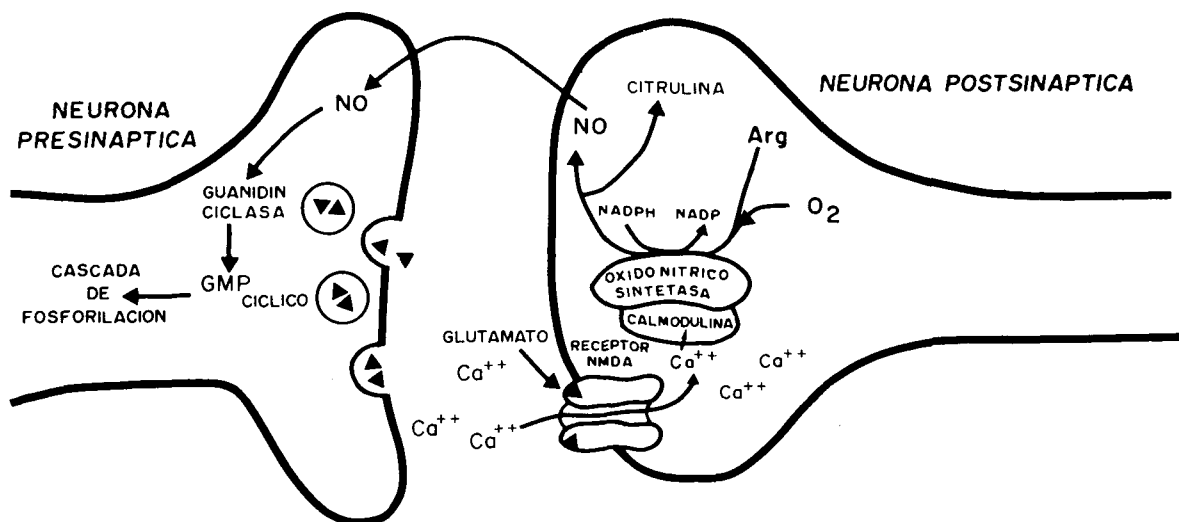


Figura 4. Mecanismo de síntesis y acción del óxido nítrico en el sistema nervioso central.

la citotoxicidad requiere la activación de los receptores a NMDA, y por consiguiente de la entrada de Ca^{++} en la neurona; los mecanismos por los cuales la célula muere, aún son desconocidos. Dawson y col. (1991) (9) al emplear cultivos celulares como modelo de estudio de muerte neuronal, observaron que la activación del receptor a NMDA genera entrada de Ca^{++} que produce un incremento de óxido nítrico. Esta molécula quizá produce la muerte celular por su unión no sólo a la unidad reguladora de la guanilato ciclasa, sino que también se une a metaloproteínas claves en el metabolismo neuronal.

Distribución regional del óxido nítrico

Debido a su inestabilidad es difícil localizar al óxido nítrico directamente en los tejidos. Para determinar las regiones en donde esta molécula se sintetiza, Bredt y col. (1990) (3) obtuvieron un anticuerpo específico contra la óxido nítrico sintetasa y determinaron la localización de esta enzima por métodos inmunohistoquímicos en el cerebro de la rata. Estos investigadores encontraron que la ONS se distribuye en poblaciones neuronales discretas en varias regiones cerebrales, pero también se dieron cuenta que la localización de estas células no coincide con la de ningún otro neurotransmisor conocido. Es el grupo de Vincent y col. en 1991, quienes determinan que la distribución de la ONS es muy similar a la de las neuronas que presentan actividad para la enzima NADPH diaforasa (NDP) (26).

Estas células fueron detectadas inicialmente por Thomas y Pearse en 1961 (47). Ellos reportaron que en el cerebro de la rata existe un tipo de neuronas que cuando se tiñen con el colorante azul de nitrotetrazoleo, y se les añade el cofactor enzimático NADPH, se tornan azules. Es a partir de éstos hallazgos que se empieza a estudiar a éstas células, a las que se les denomina "diaforásicas". Aunque no se conocía su función, presentaban características muy importantes como la de ser resistentes a la citotoxicidad, a la hipoxia, y sobrevivir a los procesos neurodegenerativos que se presentan en las 19 enfermedades de Huntington y Alzheimer (14,15,28,29,48).

Es hasta que los grupos de Vincent y de Snyder se dan cuenta que estas neuronas diaforásicas se colocan con las neuronas que contienen óxido nítrico sintetasa cuando proponen que éstas células sintetizan ON. Estudios posteriores demostraron que ambas enzimas eran similares en cuanto a la utilización de NADPH como donador de electrones y la producción de óxido nítrico. De esta forma se pudo demostrar que en regiones en donde el anticuerpo contra ONS presenta inmunoreactividad, se encuentra presente también la enzima (NDP) como encargada de la producción de óxido nítrico, (8,26,50,51). La colocación de ambas enzimas ha permitido identificar las regiones donde se encuentran células responsables de la producción de óxido nítrico en el SNC con son: los bulbos olfatorios, el cerebelo, el hipocampo, el estriado, la corteza, el hipotálamo, el cerebro medio, la médula y la glándula pituitaria.

La inmunoreactividad a ONS también es evidente en numerosos sistemas neurales periféricos como son

el plexo mientérico del tracto intestinal, la retina, las células cromafines de la glándula adrenal y en las capas endoteliales de los vasos sanguíneos. Así como en otros órganos examinados tales como: el hígado, el corazón, el pulmón, el bazo, el riñón, el timo, el tejido cavernoso del pene y en las glándulas salivales. No se han observado células inmunorreactivas para ONS en el parénquima, los fibroblastos, así como en grasa, o en células musculares o epiteliales de estos órganos. Es así que la formación de óxido nítrico y su función a través del organismo, parecen estar selectivamente asociadas con neuronas, de las regiones antes mencionadas, y el endotelio de los vasos sanguíneos.

Por estudios patológicos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas se sabe que las neuronas diaforásicas, se encuentran en el centro de las regiones dañadas. Así, en el cerebro de pacientes con la Enfermedad de Huntington se ha observado que en el núcleo caudado, donde se presenta muerte celular, sólo sobreviven las neuronas que tienen actividad de la enzima NDP, y por consiguiente, producen óxido nítrico. Este mismo fenómeno se ha observado en la Enfermedad de Alzheimer o en la embolia cerebral. Se ha propuesto que la muerte celular en estos padecimientos neuronales pueda deberse a la citotoxicidad producida por el óxido nítrico (29,48).

Conclusión

Es realmente sorprendente la rapidez con la que se han dilucidado muchas de las características bioquímicas y funcionales del óxido nítrico. Probablemente, los estudios realizados en las diferentes áreas de investigación hayan permitido que este avance fuera tan rápido.

En la actualidad el óxido nítrico es considerado como una nueva clase de mensajero celular dentro de varios sistemas en el organismo. Sus características químicas como son: peso molecular bajo y carga electroneutra permiten su rápida difusión a través de la membrana celular en ausencia de cualquier otro mecanismo acarreador, lo cual hace del ON una molécula mensajera particularmente atractiva en el sistema nervioso. Esto permite a la señal generada en una célula, ejercer sus efectos en múltiples células cercanas. Su alta reactividad tiene como única limitante su corto tiempo de vida que esta estimado entre 1 y 6 segundos.

La posibilidad de que esta molécula participe como mensajero retrógrado en los mecanismos de aprendizaje y memoria, así como en diferentes patologías como la de la embolia cerebral, la Corea de Huntington o la Enfermedad de Alzheimer y sea la responsable de la destrucción de células potencialmente cancerígenas, hace especialmente interesante el estudio de las rutas metabólicas en las cuales participa. El reciente descubrimiento sobre la localización de la enzima citocromo P-450 reductasa en las neuronas catecolaminérgicas del SNC, como la responsable de la producción de monóxido de carbono (CO), que presenta características similares a las del óxido nítrico (peso molecular bajo, rápida difusión a través de la membrana, direccionalidad retrógrada y regulación de la actividad de la GC), hacen evidente la existencia de

una nueva familia de mensajeros químicos involucrados en la comunicación neuronal.

Agradecimientos

Agradecemos a la Fis. Marcela Sánchez por su valioso trabajo de traducción y al Sr. Raúl Cardoso por su excelente labor fotográfica y de ilustración.

REFERENCIAS

1. BOHME G A, STUTZMAN J M, DOBLE A, BLANCHARD J C: Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 199; 379-381, 1991.
2. BREDT D, HWANG P, GLATT C H, LOWENSTEIN C H, REED R, SNYDER S: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351: 714-718, 1991.
3. BREDT D S, HWANG P M, SNYDER S H: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347: 768-770, 1990b.
4. BREDT D S, SNYDER S H: Nitric oxide mediated glutamatergic enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 9030-9033, 1989.
5. BREDT D S, SNYDER S H: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 682-685, 1990a.
6. BREDT S D, SNYDER S H: Nitric oxide a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8: 3-11, 1992.
7. BUSSE R, MULSCH A: Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, 265: 133-136, 1990.
8. DAWSON T, BREDT S D, FOTUHI M, HWANG P M, SNYDER S H: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 7797-7801, 1991a.
9. DAWSON V L, DAWSON T M, LONDON E D, BREDT D S, SNYDER S H: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 6368-6371, 1991b.
10. DEGUCHI T: Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem*, 252: 7617-7619, 1977.
11. DEGUCHI T, SAITO M, KONO M: Blokada by N-methylhydroxylamine of activation of guanylate cyclase and elevations of guanosine 3',5'-monophosphate levels in nervous tissue. *Biochem Biophys Acta*, 544: 8-19, 1978.
12. DEGUCHI T, YOSHIOKA M: L-Arginina identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 257: 10147-10151, 1982.
13. FEELISCH M, NOVACK A E: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 139: 1930, 1987.
14. FERRANTE R J, KOWALL N W, BEAL M F, RICHARDSON E P, BIRD E D, MARTIN J B: Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science*, 230: 561-563, 1985.
15. FLINT BEAL M, NEIL W, KOWALL D, DAVID W, MICHEAL F, MAZUREK F: Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, 321: 168-171, 1986.
16. FORSTERMANN U, SCHMIDT H, POLLOCK J, SHENG H, MITCHELL J, WARNER T, NAKANE M, MURAD F: Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochemical Pharmacology*, 42: 1849-1857, 1991.
17. FURCHGOTT R, ZAWADZKI J: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.
18. FURCHGOTT R F: The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 24: 175-197, 1984.
19. GARTHWAITE J, GARTHWAITE G, PALMER R M J, MONCADA S: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol*, 172: 413-416, 1989.
20. GARTHWAITE J, SOUTHAM E, ANDERTON M: A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem*, 53: 1952-1954, 1989.
21. GILLESPIE J S, LIU X, MARTIN W: The effects of L-arginine and N-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol*, 98: 1080-1082, 1989.
22. GREEN L C, TANNENBAUM S R, GOLDMAN R: Nitrate synthesis in the germline and conventional rat. *Science*, 212: 56-58, 1981a.
23. GREEN L C, WAGNER D A, RUIZ DE LUZURIAGA K, IFTAN N, YOUNG V, TANNENBAUM S R: Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 7764-7768, 1981b.
24. HIBBS J B, TAINTOR R R, VAVRIN Z: Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine diaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235: 473-476, 1987.
25. HIKI K, YUI Y, HATTORI R, EIZAWA H, KOSUGA K, KAWAI C H: Three regulation mechanisms of nitric oxide synthase. *Eur J Pharm*, 206: 163-164, 1991.
26. HOPE B T, MICHAEL G J, KNIGGE K M, VINCENT S R: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 2811-2814, 1991.
27. KNOWLES R G, PALACIOS M, PALMER R M, MONCADA S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 5159-5162, 1989.
28. KOH J, PETERS S, CHOI D W: Neurons containing NADPH diaphorase are selectively resistant to quinolinic toxicity. *Science*, 234: 73-78, 1986.
29. KOWALL N W, BEAL F B: Cortical somatostatin, neuropeptide Y and NADPH diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 23: 105-114, 1988.
30. LANCASTER J R: Nitric oxide in cells. *American Scientist*, 80: 248-259, 1992.
31. MAC DEMONTE A B, MEYER M L, WESTBROOK G L, SMITH S J, BAKER J L: NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature*, 321: 519-522, 1986.
32. MAYER B M, KLATT P, BOHME E, SCHMIDT K: Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by Ca²⁺. *J Neurochem*, 59: 2024-2029, 1992.
33. Miki N, Yasunori K, Kuriyama K: Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm*, 75: 851-856, 1977.
34. MONCADA S: The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand*, 145: 201-227, 1992.
35. MONCADA S, KNOWLES G: Kinetics of nitric oxide synthase: a reply. *Biochemical J*, 271: 564, 1990b.
36. MONCADA S, PALMER R M: The L-arginine:nitric oxide pathway in vessel wall. En: S Moncada, E A Higgs (Eds). *Nitric oxide from L-arginine: Bioregulatory System*. Elsevier, Amsterdam, 19-33, 1990a.
37. MONCADA S, PALMER R M J, HIGGS A: Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharm Rev*, 43: 109-142, 1991.
38. MURAD F, MITTAL C K, ARNOLD W P, KATSUKI S, KIMURA H: Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 145-158, 1978.
39. NAKANE M, MITCHELL J, FORSTERMANN U, MURAD F: Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity

- of nitric oxide synthase. *Bioch and Biophys Res Comm*, 180: 1396-1402, 1991.
40. OLSON D R, BRECKENRIDGE B M: Calcium ion effects on guanylate cyclase of brain. *Life Sci*, 18: 935-940, 1976.
 41. PALMER R, ASHTON D, MONCADA S: Vascularendothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666, 1988.
 42. PALMER R, FERRIGE A, MONCADA S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
 43. PALMER R M, MONCADA S: A novel citrullin-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 158: 348-352, 1989.
 44. RAMAGOPAL M V, LEIGHTON H J: Effects of NG-monomethyl-L-arginine on field stimulation-induced decreases in cytosolic Ca⁺⁺ levels and relaxation in the rat anococcygeus muscle. *Eur J Pharmacol*, 174: 297-299, 1989.
 45. SALTER M, KNOWLES R G, MONCADA S: Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca⁺⁺-dependent and Ca⁺⁺-independent nitric oxide synthases. *Fed Eur Bioch Soc*, 291: 145-149, 1991.
 45. SHIBUKI K, OKADA D: Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, 349: 326-328, 1991.
 47. THOMAS E, PEARSE A: The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie*, 2: 266-282, 1961.
 48. UEMURA Y, KOWALL N W, BEAL F M: Selective sparing of NADPH-Diaphorase somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum. *Ann Neuro*, 27: 620-625, 1990.
 49. VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis. *Lancet*, 339: 572-575, 1992.
 50. VINCENT R S, HOPE B T: Neurons that say NO. *Trens in Neurosciences*, 15: 108-113, 1992.
 51. VINCENT R S, KIMURA H: Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain *Neuroscience*, 46: 755-787, 1992.
 52. WAGNER D A, SCHULTZ D S, DEEN W M, YOUNG V R, TANNENBAUM S R: Metabolic fate of an oral dose of 15N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res*, 43: 1921-1925, 1983.