

## **El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad** *Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity*

1. Departamento de Neuroanatomía y Biología Celular. Instituto Cajal (CSIC). Madrid  
2. Departamento de Biología Celular. Universidad de Jaén.

### **EDRF/ÓXIDO NÍTRICO**

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, da origen a una directa vasodilatación. El agente que desencadena este proceso fue en un principio conocido como el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), descubierto por Furchgott y Zawadzki<sup>1</sup> en 1980. Este factor es producido por la célula endotelial como consecuencia de estímulos fisiológicos, del estrés o de los estímulos químicos que *in vivo* puedan ejercer la acetilcolina y/o la bradiquinina sobre sus respectivos receptores en la pared endotelial.

Tras comprobarse que el EDRF influía sobre el tono vascular general y en particular en el flujo sanguíneo cerebral<sup>2,5</sup>, se demostró que este factor tenía las mismas características funcionales que el óxido nítrico (NO) o las de un compuesto estrechamente relacionado con él<sup>2,6-11</sup>, demostrándose también que el NO era producido por una familia de enzimas que se llamarían las óxido nítrico sintasas (NOS).

### **LA FAMILIA ENZIMÁTICA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA**

Diferentes son las denominaciones empleadas a la hora de identificar a las distintas isoformas enzimáticas productoras del NO y nosotros adaptaremos aquí, desde el punto de vista académico, la nomenclatura acordada en la XIV Reunión Internacional sobre la nomenclatura farmacológica del NO y compuestos relacionados<sup>12</sup>. No obstante, no dejamos de reco-

J. Rodrigo<sup>1</sup>, D. Alonso<sup>1</sup>, A.P. Fernández<sup>1</sup>, J. Serrano<sup>1</sup>, J.C. López<sup>1</sup>, J.M. R.<sup>1</sup>, P. Fernández Vizarra<sup>1</sup>, S. Castro<sup>1</sup>, M.A. Peinado<sup>2</sup>, J.A. Pedrosa<sup>2</sup>, A. Richard<sup>1</sup>, R. Martínez-Murillo<sup>1</sup>, M. Santacana<sup>1</sup>, M.L. Bentura<sup>1</sup>, L.O. Utenthal<sup>1</sup>

#### **Correspondencia:**

J. Rodrigo  
Dpto. de Neuroanatomía y Biología Celular. Instituto Cajal (CSIC)  
C/ Dr. Arce, 37  
28002 Madrid  
Tfno. 91 5854714

nocer que aunque estos acuerdos son necesarios para identificar académicamente a las distintas isoformas de la NOS, el tema entraña algunas lógicas dificultades. Somos conscientes de que este tema es bastante confuso por el momento, dadas las múltiples localizaciones celulares que puede tener una misma isoforma. A manera de ejemplo podemos indicar como la isoforma purificada y clonada en las neuronas (nNOS) se encuentra también expresada en el músculo esquelético<sup>13</sup>, en los neutrófilos, en los islotes pancreáticos, en los endotelios y epitelios del aparato respiratorio<sup>14</sup>, y en las vísceras del tracto gastrointestinal. La isoforma endotelial (eNOS) que fue purificada y clonada en las células endoteliales también puede expresarse en ciertas poblaciones neuronales del cerebro<sup>15</sup> y en las plaquetas<sup>16</sup>. Por último, en cuanto a la isoforma inducible (iNOS) que fue purificada por primera vez en los macrófagos, su expresión ha podido ser observada en células de diversos tipos, tales como las células musculares lisas y las células endoteliales<sup>17</sup> y recientemente por nosotros en un pequeño número de neuronas situadas en el hilio del hipocampo, en el cerebelo, corteza y otras áreas del cerebro de ratas adultas normales, teniendo además esta isoforma características diferentes entre las expresadas por diferentes tejidos de una misma especie<sup>18</sup>.

También la propia división de la enzima NOS en constitutiva e inducible puede ser un tanto artificial, ya que por ejemplo la isoforma eNOS puede ser inducida en ciertas situaciones tales como el ejercicio crónico<sup>19</sup> o durante la gestación. También, la isoforma nNOS puede ser inducida en ciertas situaciones desencadenadas por una intensa actividad fisiológica o por procesos patológicos; por ejemplo, podemos verla inducida durante la gestación, ya sea en los primeros días del desarrollo embrionario<sup>20-24</sup>, durante los primeros días del desarrollo postnatal cerebral en animales normales o en aquéllos que sufrieron un periodo de hipoxia durante el parto<sup>25</sup> o durante el periodo de reperfusión que sigue a una isquemia cerebral de 30 minutos en cerebros de ratas adultas<sup>26</sup>. Por otra parte la isoforma iNOS parece estar presente constitutivamente en algunos tejidos como son el epitelio bronquial humano<sup>14</sup>, en el riñón del gato<sup>18</sup> y en neuronas del hipocampo, corteza y otras áreas cerebrales de ratas adultas. Nuestra experiencia viene a confirmarse en otros tejidos, como ocurre en el riñón, donde las células que forman los túbulos colectores distales en una rata normal muestran una ligera expresión de la isoforma nNOS, que se ve incrementada en las ratas genéticamente hipertensas<sup>27</sup>. Estas mismas condiciones de inducción la hemos podido observar y describir tanto para la isoenzima nNOS como la iNOS en la corteza cerebral de ratas, inducidas biológicamente por el envejecimiento natural del cerebro<sup>28</sup>.

Por ello, cualquier intento de clasificación que se intente no se ajustaría a la realidad de los hechos, haciendo imposible el recoger bajo una misma sigla o abreviatura todo este fantástico mundo de posibilidades. No obstante, y por el momento, desde el punto de vista académico y descriptivo, es absolutamente necesario establecer un mínimo de consenso en el uso de las abreviaturas, con las que podamos identificar a estas sustancias neuroactivas de acuerdo con lo acordado por el citado comité internacional. De esta manera se ha clasificado las NOS en al menos dos isoformas, una de las cuales es constitutiva (cNOS) y la otra inducible (iNOS)<sup>2,29-35</sup>. Con la denominación cNOS identificamos a la vez a dos isoformas; una denominada endotelial (eNOS), por estar mayoritariamente presente en las células endoteliales de la pared de los vasos<sup>2,36</sup>, aunque a esta isoforma también se la reconoce, en diversos trabajos previos, bajo las abreviaturas (NOS tipo III, NOS-3, ecNOS). La otra NOS constitutiva ha sido denominada neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el cerebro, medula espinal y sistema nervioso periférico, reconociéndose también en otros trabajos con las abreviaturas (NOS tipo I, NOS-1, bNOS, ncNOS). Finalmente, la isoforma de la NOS inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios se la conoce como iNOS y también como en el caso de las anteriores en muchos trabajos se la identifica con las abreviaturas (NOS tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS). En la actualidad la presencia de las diferentes isoformas de la enzima NOS puede observarse en numerosos tejidos de mamíferos<sup>2,25,37,38</sup>, peces<sup>39</sup> e invertebrados<sup>40-45</sup>.

En las especies humana, vaca, rata y ratón, el 39% de los 1.144 residuos de iNOS del ratón están universalmente conservados, pudiendo admitirse que mientras existe un 90% de homología entre las isoformas equivalentes de la enzima NOS contenidas en las diferentes especies, esta homología llega a representar un 53% entre las isoformas de una misma especie. Sin embargo, estas homologías son bastante menores si se comparan los insectos, los crustáceos, las aves, los reptiles y las plantas, expresando así las distancias existentes en la línea evolutiva.

En estos estudios filogenéticos sobre la enzima NOS, se conoce actualmente toda la secuencia de la cNOS en *Drosophila*, la cual es similar a la cNOS descrita en las especies superiores ya citadas, siendo como en aquéllas altamente dependiente de iones de  $Ca^{2+}$  y calmodulina<sup>46</sup>. La variedad existente entre los genes de las enzimas NOS podría ser debida a polimorfismos alélicos, naturales o inducidos, o a que los genes de las NOS se pudieran organizar a partir de genes preexistentes por duplicación, reorganización y fusión<sup>47</sup>.

La localización cromosómica de los genes de las diferentes isoformas de la NOS ha sido determinada por *Southern blot*

*ting*, usando el cDNA específico de cada isoenzima e hibridando líneas celulares humanas, de rata y ratón. Estos genes forman una familia que se encuentra dispersa en tres cromosomas. El gen de la isoforma nNOS (160 Kb, 29 exones, 1.433 aminoácidos) aparece localizado en el cromosoma humano número 12 (12q 24.2)<sup>48,49</sup>, 1992; Xu y col, 1993), el gen de la isoforma de la eNOS (21-22 Kb, 26 exones, 1.203 aminoácidos) corresponde al cromosoma 7<sup>50</sup> y finalmente, el gen de la isoforma iNOS (37 Kb, 26 exones, 1.153 aminoácidos) se localiza en el cromosoma 17, estando situados en este caso los genes a cada lado del centrómero (17cen-17q 11.2)<sup>12,50</sup>.

La actividad de la cNOS ha sido detectada en varios órganos y tejidos tales como el tracto digestivo, timo, piel y músculo esquelético<sup>51</sup>. Específicamente, la cNOS actuaría tanto en la célula endotelial como en las neuronas del sistema nervioso, transformando la L-arginina en citrulina y produciendo equimolarmente el NO, siendo su actividad dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. En la célula endotelial la isoforma eNOS actuaría como transductor de agonista, estando su actividad dependiente de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> libre que modularía así la síntesis del NO y por lo tanto el tono vascular.

Las isoformas neuronal y endotelial de la NOS, aunque tienen similares propiedades, muestran claras diferencias, ya que su localización en las células que las contienen es distinta, siendo citosólica para la isoforma nNOS y asociada a membrana para la isoforma eNOS<sup>29,52</sup>. Esta última, al contener un sitio de miristoilación en su extremo N-terminal<sup>53</sup>, facilitaría su anclaje a la membrana mediante el ácido mirístico. Por esta razón se la reconoce también con el nombre de particulada<sup>31,35,54</sup>. No obstante, se ha demostrado, por mutagénesis en el sitio de miristoilación, que podría existir una eNOS también citosólica<sup>19</sup>. En este sentido es probable que las eNOS, tanto la soluble como la particulada, sean un mismo producto génico. Busconi y Mitchel<sup>55</sup> demostraron que la isoforma eNOS era también palmitoilada, que es una condición fuertemente relacionada con la condición de estar asociada a la membrana, sugiriéndose que la miristoilación era necesaria pero no suficiente para su anclaje a la membrana y que el hecho de ser palmitoilada reversiblemente podría controlar esta asociación. Las diferencias entre la nNOS y la eNOS también han sido demostradas a través de su inmunorreactividad, ya que estas isoformas reaccionan específicamente con anticuerpos específicos poli y monoclonales desarrollados para su reconocimiento<sup>56</sup>.

La isoforma nNOS ha sido localizada fundamentalmente en las células nerviosas, donde medidas bioquímicas de su actividad, llevadas a cabo en diferentes regiones del cerebro, han demostrado altas concentraciones de nNOS en el cerebelo, en

el hipotálamo, en el cerebro medio, en el estriado e hipocampo, y baja actividad en la medula oblongada<sup>57</sup>. La isoforma nNOS fue purificada en el cerebelo de rata<sup>58,59</sup> y clonada en el cerebro de rata<sup>60</sup> y humano<sup>61</sup>. La isoforma nNOS ha sido descrita como un homodímero soluble de 155 kDa<sup>58,62</sup> o también como un monómero de 150 kDa<sup>58</sup>, mostrando una homología con la citocromo P450 reductasa<sup>60</sup>. La isoforma eNOS muestra un tamaño de 135 kDa<sup>53</sup>. Estas isoformas de la enzima cNOS, tienen zonas de reconocimiento para el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), para el flavina adenina dinucleótido (FAD), el flavina mononucleótido (FMN), la calmodulina y para el grupo hemo (hierro protoporfirina IX)<sup>30,60</sup>. Todo ello hace que estas isoformas tengan semejanza con la familia de las hemoproteínas monooxigenasas y con las enzimas que actúan en el citocromo P450<sup>31,54</sup>. Las isoformas cNOS son totalmente dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina, actuando sobre la L-arginina, NADPH y el oxígeno molecular como sustratos y utilizando como cofactores los FAD y FMN<sup>2,58,59,63,64</sup>. Su actividad enzimática puede estar también controlada por fosforilización<sup>65</sup> e incrementada por otro cofactor, la tetrahidrobiopterina ( $\text{H}_4\text{B}$ )<sup>66</sup>.

La isoforma iNOS ha sido detectada en el citosol de macrófagos purificados y activados de ratón<sup>67-69</sup>, mostrando una conformación dimerica y masa molecular de 135 kDa. Recientemente, se ha descrito una isoforma de iNOS en plaquetas humanas de 200 kDa<sup>70</sup>. La iNOS también ha sido localizada en hepatocitos, células tumorales, neutrófilos, células plasmáticas, linfocitos, células mesangiales, células endoteliales y células musculares lisas de la pared vascular<sup>2,71</sup>. Esta actividad enzimática, que en un principio no fue detectada en tejidos de animales normales, sí lo fue en macrófagos de ratón de las líneas celulares RWA 264.7 y por nosotros mismos, en macrófagos de ratón de la serie J774 y en monocitos y macrófagos humanos, tras el bloqueo de su receptor  $\text{CD}_{23}$  por la inmunoglobulina IgE o por anticuerpos monoclonales contra el  $\text{CD}_{23}$ . Esta caracterización fue realizada mediante el uso de la microscopía óptica y electrónica<sup>72</sup>. En muchos casos la expresión de la isoforma iNOS es dependiente de lipopolisacáridos (endotoxinas) y citoquinas proinflamatorias<sup>51</sup>. También la isoforma iNOS puede expresarse en las células nerviosas de la corteza cerebral de ratas que han sido sometidas a hipoxia y privación de glucosa<sup>73</sup> o de cerebros que han sufrido una agresión isquémica intensa y permanente durante la edad adulta o durante el parto<sup>25</sup> o en ratas sometidas a estrés crónico<sup>74</sup>. La enzima para su completa actividad requiere NADPH, FAD y FMN y en cierta medida  $\text{H}_4\text{B}$  y glutatión<sup>67</sup>, no necesitando, a diferencia de las isoformas cNOS,  $\text{Ca}^{2+}$  ni calmodulina adicional para la síntesis de NO, estando la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina fuertemente unida a la molécula.

La iNOS también fue clonada en los macrófagos de ratón<sup>69,75-77</sup>, demostrándose que esta enzima era distinta a las dos isoformas constitutivas conocidas y siendo, además, la iNOS humana clonada a partir de condrocitos y hepatocitos.

Como caso especial se ha señalado que las células endoteliales presentan una NOS  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente y otra NOS  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente que son ambas capaces de incrementar en la célula diana, tras la producción del NO, la guanilato ciclasa soluble<sup>78</sup>, siendo por esta circunstancia el primer ejemplo de un tipo celular que puede poseer a la vez los dos tipos de NOS, la constitutiva y la inducible, lo que justificaría que en los cultivos de células endoteliales de cerebro de ratón se puedan producir grandes cantidades del NO después de ser activadas con el interferón- $\gamma$ , en combinación con cualquier inmunoadyuvante<sup>79</sup>. La isoforma NOS endotelial inducida por citoquinas es inhibida por los análogos de L-arginina, con un rango potencial idéntico a aquel observado en los macrófagos activados<sup>79</sup>. Una actividad iNOS ha sido también descrita en la célula muscular lisa de la pared vascular, dependiendo la formación de NO de  $\text{H}_4\text{B}$  pero no de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina<sup>80</sup>.

#### NADPH-DIAFORASA /NOS

La isoforma nNOS fue en un principio localizada inmunocitoquímicamente en diversas poblaciones neuronales del cerebro de rata y en neuronas distribuidas en diversos órganos de la rata, mono y humano<sup>56,58,60</sup>, conociéndose hoy en el cerebro de rata su amplia distribución<sup>37</sup>, así como su correlación con aquellas estructuras celulares que contienen cGMP, que actúa como sustancia receptora del NO<sup>81</sup>. Del mismo modo, hoy se tiene una clara información sobre la existencia de estos grupos neuronales nitrérgicos mediante el uso de la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa realizada en diversas especies<sup>82-87</sup>. Sobre la colocalización de la nNOS inmunorreactiva y la NADPH-diaforasa ha existido y existirá aún cierta controversia, porque en algunos casos ésta no se da completamente, atribuyéndose esta falta de coincidencia a los efectos que sobre la actividad NADPH-diaforasa puede ejercer la fijación con paraformaldehído<sup>88,89</sup>. Sin embargo, Terenghi y col<sup>90</sup> demostraron una buena correlación entre la actividad NADPH-diaforasa y la inmunorreactividad para la isoenzima nNOS en secciones de médula espinal fijadas con 1% de paraformaldehído.

La NADPH-diaforasa purificada aparece como una proteína simple de 150 kDa similar a la nNOS, habiendo sido esta isoforma inmunoprecipitada por un anticuerpo que reconoce a la NADPH-diaforasa<sup>83</sup>. Por otra parte, la transfección de células de riñón humano con el cDNA de la isoforma nNOS permitió la detección de la actividad tanto para la NADPH-diaforasa como para la isoforma nNOS, y además se puso en evidencia el

hecho de que ambas actividades residían en la misma proteína<sup>85</sup>. Basados en estas aportaciones se ha considerado, en estudios llevados a cabo en cerebros de primates y de rata, que la NADPH diaforasa y la nNOS son coincidentes<sup>23,60,85,86,91</sup>.

La presencia en el sistema nervioso central de la isoforma de la nNOS fue descrita ampliamente mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la observación con el microscopio óptico<sup>37</sup> y con ayuda de la microscopía electrónica<sup>92</sup>. En el sistema nervioso central, amplias zonas del telencéfalo mostraban neuronas positivas para la isoforma nNOS, especialmente en todas las áreas corticales, el núcleo medioventral endopiriforme, el claustrum, el bulbo olfativo principal y accesorio, los núcleos olfatorios anteriores y posteriores, el hipocampo precomisural, la tenia tecta, el núcleo acumbens, la stria terminalis, el caudado, el tubérculo olfatorio, las islas de Calleja, el septum, el globo pálido, la sustancia innominada, el hipocampo y la amígdala. En el diencefalo, la inmunorreactividad fue intensamente distribuida tanto en el hipotálamo como en el tálamo. En el hipotálamo numerosas neuronas positivas se localizaron en la pared del sistema periventricular neurosecretor y en los cuerpos mamilares, además de estar presentes en la eminencia media del sistema infundibular. En el mesencéfalo se mostraron neuronas positivas en el área ventro tegmental, en el núcleo interpeduncular, en el núcleo rostral linear y núcleo dorsal del rafe, en los núcleos de la sustancia gris central y peripeduncular, en la porción lateral de la sustancia negra, en el núcleo geniculado, y en el colículo superior. En el puente numerosas neuronas se describieron formando parte del núcleo pedunculopontino, del núcleo laterodorso tegmental, del núcleo parabraquial y del locus coeruleus. La médula oblongada mostraba neuronas inmunoténidas en el núcleo sensitivo principal del trigémino, en el cuerpo trapezoide, en el rafe magno, en los núcleos reticulares del puente, en el núcleo prepósito del hipogloso, en los núcleos medial y espinal del vestibular, en el núcleo dorsal coclear, en el núcleo medular reticular y en el núcleo del tracto solitario, en los núcleos gracilis y cuneato, en el núcleo dorsal del nervio vago y en los subnúcleos oral, interpolar y caudal del espinal del trigémino. En el cerebelo se mostraron esta isoenzima las neuronas estrelladas y las cestas, algunas células aisladas de Purkinje, localizadas preferentemente en las regiones paraflocular y del vermis, las neuronas grano y ocasionalmente, algunas neuronas de los núcleos cerebelosos. En otras especies como el mono<sup>93</sup> ha sido también demostrada esta amplia distribución de la isoforma nNOS.

Comparando los mapas de distribución en el cerebro de las neuronas que eran positivas para nNOS y las que mostraban actividad para NADPH-diaforasa, el tema de la correlación no está tan claro. En muchos núcleos, tal como Hope y col<sup>83</sup> seña-

laron, todas las neuronas que contenían actividad NADPH-diaforasa también fueron positivas para nNOS, haciendo posible que la actividad NADPH-diaforasa estuviera presente en neuronas activamente productoras de NO y que las técnicas tanto inmunocitoquímicas como histoquímicas dieran resultados semejantes. No obstante, también existían núcleos y neuronas concretas que sólo mostraban la inmunorreacción para nNOS y no la actividad NADPH-diaforasa, lo que nos hizo pensar en la posibilidad de que este tipo de núcleos o neuronas inmunopositivas pero careciendo de actividad NADPH-diaforasa podrían ser consideradas como neuronas silentes en cuanto a la producción de NO, al menos en el momento en que se realizó el estudio<sup>37</sup>. En la actualidad estos datos continúan confirmando en diferentes situaciones experimentales, demostrándose que existen neuronas nNOS que no muestran actividad NADPH-diaforasa, tal como ocurre en la corteza de ratas viejas o sometidas a hipoxia/isquemia-reperusión, donde hemos podido observar que aparecen un número elevado de neuronas que expresan la proteína nNOS pero que son negativas para la actividad NADPH-diaforasa<sup>26,28</sup>.

### SÍNTESIS DEL NO

Las diferentes isoformas de la NOS juegan un papel muy relevante en muchas funciones fisiológicas, dependientes todas ellas de la transformación del aminoácido L-arginina en L-citrulina, produciendo a la vez equimolarmente el NO. La L-arginina está implicada en el ciclo de la urea, permitiendo la generación de ornitina vía citrulina. Este ciclo se encuentra completo en los macrófagos activados, pero está sólo parcialmente representado en el cerebro, aunque sí podamos encontrar en él compuestos intermediarios del ciclo, como son la ornitina, la citrulina, el argininosuccinato y la L-arginina. No obstante, la enzima ornitina transcarbamilasa, que cataliza la formación de citrulina desde ornitina y carbamil fosfato está ausente en el cerebro. Este ciclo parcial de la urea en el cerebro podría estar relacionado con la resíntesis de la L-arginina desde la citrulina<sup>64</sup>. Se ha sugerido que el ácido endógeno argininosuccínico, precursor en el ciclo de la urea, puede modular la biosíntesis del NO derivado del endotelio desde la L-arginina<sup>94</sup>.

Aunque la síntesis de NO desde la L-arginina y su liberación desde las células endoteliales está bien demostrada, aún se argumenta si la actual molécula efectora es el NO, es un precursor de NO, o es un complejo intermediario que contiene NO. En efecto, parece haberse señalado que el EDRF liberado desde el endotelio de la arteria femoral del perro no puede ser identificado como NO libre, sugiriéndose que el EDRF puede ser un precursor lábil del NO<sup>36</sup>. Del mismo modo, el activador de la guanilato ciclasa, generado en cultivos de células



de neuroblastoma de ratón durante la activación de los receptores muscarínicos, no corresponde a ese originado desde el radical libre NO o hidroxilamina, aunque parece originarse desde la guanidina o la L-arginina<sup>95</sup>.

También se ha propuesto que el EDRF debería ser un compuesto que contiene NO dentro de su estructura y que debería actuar como un vasodilatador más potente que el NO mismo<sup>96</sup>. Presumiblemente correspondería a un nitrosotiol como el S-nitroso-L-cisteína<sup>96,97</sup>. Otra hipótesis propuesta indica al EDRF como un complejo nitrosil-hierro con ligandos tioles con cisteína<sup>98</sup>. Aunque no ha sido probada la espontánea liberación de NO desde el S-nitrotiol<sup>99</sup>, es concebible que los grupos NO podrían ejercer un efecto similar al NO libre. Por ejemplo, el 1-nitrosopirrolidina produce un bloqueo de los receptores excitadores similar al producido por los donadores de NO, aunque no libera radicales de NO<sup>100</sup>.

En la síntesis de NO por la acción de la NOS en células de mamíferos intervienen 5 electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1,5 moles de NADPH y 2 de dioxígeno por cada mol de NO formado. La reacción requiere además H<sub>4</sub>B, FAD, FMN, iones Ca<sup>2+</sup>, calmodulina y grupo hemo como cofactores. La reacción consiste en dos actos separados de monooxigenación, consistiendo el primer acto en la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> al sustrato, a la vez que otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg) como producto intermedio. El segundo acto cuenta con que un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el O<sub>2</sub> en forma de dioxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de O<sub>2</sub> y la excisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. Además, en esta segunda reacción un átomo de O<sub>2</sub> se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO. Esta producción de NO puede ser atenuada por diferentes inhibidores de la NOS derivados de la L-arginina<sup>101</sup>.

### INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE NO

Como inhibidores de la actividad de la NOS, hemos de señalar a dos compuestos, la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) y la N-N-dimetil-L-arginina asimétrica (L-ADMA)<sup>102</sup>, que pueden producirse a partir de residuos de arginina tras metilación durante la renovación proteica. Estos compuestos en condiciones fisiológicas se encuentran en concentraciones bajas, pero en situaciones patológicas, como es el caso de las afecciones renales, pueden llegar a tener concentraciones bastantes elevadas que pueden disminuir la síntesis de NO<sup>102</sup>. Otros inhibidores como la N-nitro-L-arginina (L-NNA), su ester la N-nitro-arginina metil ester (L-NAME) y la N-iminoetil-L-orнитina (L-NIO) pueden inhibir de manera preferente a las isoformas constitutivas de la NOS<sup>79,103</sup>, mientras que la N-

amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben la iNOS de los macrófagos de una manera selectiva<sup>30,102,104-107</sup>.

El inhibidor L-NAME parece inhibir *in vitro* la síntesis de NO por la isoforma eNOS<sup>53,108,109</sup> y la isoforma nNOS, incrementando la presión sanguínea *in vivo* de forma patente. Nosotros hemos observado que también inhibe la expresión de la isoforma iNOS en situaciones de isquemia-reperfusión<sup>26</sup>. Todos estos compuestos suelen inhibir la actividad de las enzimas NOS de manera competitiva y la exposición de estas enzimas al inhibidor L-NMMA durante un tiempo prolongado provoca una desactivación irreversible de la enzima por alquilación<sup>110</sup>. También, el inhibidor N-[3-(aminometil)-benzil]-acetamida es un inhibidor de la isoforma iNOS altamente selectivo, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>111</sup>. Otro tipo de inhibidor es el difeniliodonio<sup>112</sup>, que no tiene similitudes estructurales con la L-arginina y no actúa de manera competitiva con este sustrato sino como un inhibidor irreversible y progresivo, dependiendo su intensidad de acción de su concentración, tiempo de exposición y temperatura.

Los inhibidores de la calmodulina, tal como la trifluoropirazina, la clorpromazina y el calmidazolium, pueden inhibir las tres isoformas de la enzima NOS de manera no selectiva. También las isoformas enzimáticas de la NOS pueden ser inhibidas directamente por el propio NO<sup>113</sup>. Esta inhibición tendría como consecuencia una cierta limitación de los efectos citotóxicos del NO. El monóxido de carbono (CO) inhibe también las isoformas de la NOS purificadas. Los análogos de la L-arginina (L-hemoarginina, L-arginil-L-aspartato, L-arginina metil ester) o análogos de la citrulina (S-metil, S-etil-L-citrulina) y otros compuestos aminoácidos de bajo peso molecular pueden también inhibir la síntesis de NO.

Entre otros inhibidores de la NOS que se están usando en la actualidad, está el 7-nitroindazol (7-NI)<sup>109,114-116</sup> que reduce la concentración de NO en el hipocampo tras la isquemia transitoria llevada a cabo en el cerebro anterior. La N-acetil-3-O-metildopamina también tiene efectos inhibidores por su efecto de bloquear la síntesis de H<sub>4</sub>B, cofactor para la NOS. El uso de este inhibidor alivió el daño neuronal acaecido en el hipocampo de rata tras la isquemia<sup>117</sup>. También deben considerarse con efecto protector de la acción del NO aquellos productos que actúan inhibiendo el incremento de la guanilato ciclasa soluble, como es el preparado ILY83,583<sup>115</sup>, o las tetraciclinas, la doxiciclina y la miociclina que bloquean la actividad de la microglía y con ello la producción de iNOS<sup>118</sup>. Por último, la droga antiepiléptica, la lamotrigina, inhibe la liberación de los aminoácidos excitadores y por lo tanto la síntesis de NO, decreciendo también con su administración los niveles de cGMP sin causar una directa inhibición de la enzima NOS<sup>119</sup>.

**CARACTERÍSTICAS DEL NO**

El NO es un gas con propiedades de los radicales libres, que actúa como una molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, difundiendo por cualquier punto de la membrana de la célula productora, para actuar intercelularmente sin requerir ningún tipo de transportador de membrana. En el caso de que la diana sea la célula muscular lisa que forma la pared vascular, estimula en ella, una vez difundido a través de las membranas celulares, la guanilato ciclasa soluble para catalizar la síntesis del guanosina monofosfato cíclico (cGMP)<sup>120</sup> y con ello inducir definitivamente la relajación muscular y por ende, la vasodilatación, regulando el flujo y la presión sanguínea<sup>10,121-123</sup>.

Existen situaciones clínicas en las que la acumulación de NO puede contribuir a la aparición de ciertas condiciones fisiopatológicas. Así, por ejemplo, puede ser deseable inhibir la producción de NO, ya sea a través de las formas enzimáticas de la eNOS, caso de la isquemia cerebral o en la epilepsia, en cuyos cuadros clínicos la sobreproducción de NO por las formas enzimáticas de la NOS puede desencadenar una neurotoxicidad muy activa, o ejercer la inhibición de la isoforma iNOS, como es el caso del shock séptico o el producido en ciertas inflamaciones crónicas<sup>12</sup>. A título de orientación la potencia inhibitoria de los productos antes citados se resume en el siguiente diagrama:

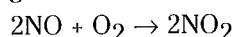
L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS
L-NA	nNOS = eNOS >> iNOS
L-NAME	nNOS = eNOS >> iNOS
L-NAA	nNOS = iNOS > eNOS
L-NIO	iNOS > eNOS = nNOS
7-NI	nNOS >> eNOS = iNOS ( <i>in vivo</i> )
	nNOS = eNOS = iNOS ( <i>in vitro</i> )
Aminoguanidina	iNOS > eNOS = nNOS

El NO es moderadamente soluble en el agua, con una concentración en una solución saturada (1 atmósfera) de 1,8 mM a 25°C, siendo mucho más soluble en solventes apolares tal como el N-hexano, tendiendo a disolverse de manera selectiva en las membranas y en las fases lipídicas de las células por ser altamente lipofílico. Usando microsensores no selectivos para NO, se han demostrado altas concentraciones de NO en zonas adyacentes a la membrana plasmática de una célula endotelial productora de NO<sup>124,125</sup>. Estos datos justifican como en la membrana celular el NO puede difundir bidireccionalmente, usando a la membrana en ocasiones como reservorio, aunque es importante señalar que el volumen total de la fase acuosa para el NO es bastante mayor que el volumen de la

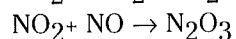
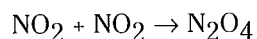
bicapa de la membrana. La constante de difusión del NO en agua es generalmente del rango de  $(2-4) \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ , valor que se incrementa significativamente con la temperatura. Se ha calculado que la difusión detectada mediante microsensores en condiciones fisiológicas idóneas a  $37^\circ\text{C}$  corresponde a  $3,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Basándonos en estos cálculos, podemos señalar, en procesos de difusión simulada del NO, que esta molécula puede perfundir sorprendentemente a largas distancias desde las células que la producen hasta el punto de interacción con las células dianas<sup>126</sup>.

El NO es una molécula no cargada que actúa como un radical libre, ya que de sus 11 electrones de valencia uno no está apareado, siendo esta molécula paramagnética, lo cual es una propiedad destacada entre sus características químicas. Entre las interacciones químicas más comunes del NO en los sistemas biológicos destaca la estabilidad que alcanza el electrón no apareado con otras especies paramagnéticas –oxígeno, superóxido, radicales peróxidos– o la formación de complejos entre el NO y un metal, dando origen en la mayoría de los casos a especies diamagnéticas estabilizadas en las que el electrón no apareado está compartido entre el NO y el metal.

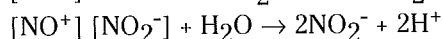
En la fase de gas, la reacción NO y O<sub>2</sub> ha sido estudiada durante muchos años, ya que el NO tiene un papel importante en la contaminación atmosférica, estando esta reacción conformada por 2 moléculas de NO y una de O<sub>2</sub> para producir 2 moléculas del dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), otro radical paramagnético:

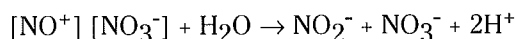


En solución acuosa, la reacción es similar. El dióxido de nitrógeno puede reaccionar con otra molécula de NO<sub>2</sub> para formar tetraóxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) o con otra de NO para formar el trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>):

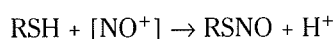


Tanto estas especies como el ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) son altamente reactivas y ellas en la fase líquida pueden ser consideradas como donadores de iones nitrosonio [NO<sup>+</sup>]. La química de la transferencia de los grupos nitrosonio es conocida como translocación e indudablemente es una de las reacciones más estudiadas de los óxidos de nitrógeno<sup>127</sup>. Se transfieren a una variedad de nucleófilos, incluyendo halógenos, nitrógeno y sulfuro. En el agua se forma el ácido nitroso y por tanto la disolución de N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> suministra nitritos y la disolución de N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> proporciona nitritos y nitratos.

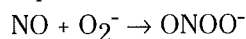




El único producto aislado de la reacción del NO con  $\text{O}_2$  en agua es el nitrito<sup>128</sup>, el cual puede indicar la formación intermedia de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , aunque esto no está completamente claro. Otras dos dianas nucleofílicas biológicamente importantes para la nitración son el nitrógeno y el sulfuro. En el caso del nitrógeno el producto es una nitrosamina que es estable, aunque estas moléculas son potentes mutágenos y cancerígenos, ya que su formación desde los óxidos de nitrógeno generados enzimáticamente ha sido relacionada con la etiología de una variedad de estados cancerosos que pueden surgir durante procesos inflamatorios prolongados<sup>129,130</sup>. Los átomos de azufre son también dianas para la nitrosilación<sup>96</sup>, como en el caso de los tioles donde se forma el S-nitrosotiol:



El NO reacciona de manera muy rápida con el superóxido para producir inicialmente el peroxinitrito:



Este anión es altamente oxidativo, capaz de oxidar tioles y las bases del DNA, además de iniciar la peroxidación de lípidos independientemente de la presencia de metales. En presencia de ciertos metales, el peroxinitrito permite formar especies  $\text{NO}_2^+$ , las cuales pueden nitrar compuestos fenólicos, incluyendo los anillos aromáticos de las proteínas<sup>131,132</sup>.

En estas condiciones fisiológicas el conjugado ácido del peroxinitrito, el ácido peroxinitroso, ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6,8$  a  $25^\circ\text{C}$ ) es altamente reactivo y posee la reactividad de los radicales hidroxilos<sup>133</sup>.

La ruptura homolítica del  $\text{ONOOH}$  generará el radical reactivo  $^{\bullet}\text{NO}_2$ , el cual puede contribuir también a la toxicidad del ácido peroxinitroso<sup>134</sup>. Sin embargo, alguna proporción de  $\text{ONOOH}$  se deprotona espontáneamente para formar el anión no reactivo nitrato<sup>135</sup>.

Basado solamente en la reacción química del NO con  $\text{O}_2^-$  esta claro que la producción de peroxinitrito y ácido peroxinitroso tendrá un efecto dañino sobre las biomoléculas, aunque la producción de nitrato puede dar lugar a una mutua limpieza de NO y  $\text{O}_2^-$ .

El NO también reaccionará con radicales peroxil. Esta reacción puede ser vista como una actividad antioxidante del NO, donde las reacciones en cadena de los radicales lipídicos son terminadas por la reacción del NO con los radicales alcoxil y peroxil. Como productos de estas reacciones se incluyen los nitrito-, nitro-, nitroso-peroxo-lípidos y lípidos nitrados. Otra potencial efecto antioxidante del NO puede ser su reacción con el propio peroxinitrito<sup>136</sup>.

Otras acciones del NO en los sistemas biológicos están relacionadas con la reacción del NO con los metales de transición, dado que muchos metales de importancia biológica muestran la órbita *d* parcialmente rellena de electrones y por lo tanto son excelentes lugares para los electrones no apareados, tal como el existente en la molécula de NO. Muchas proteínas como la hemoglobina, la mioglobina, la citocromo oxidasa, las peroxidasas, las desoxigenasas, las mioglobinas y los citocromos P450 se unen al dioxígeno como una parte integral de su función y por lo tanto hacen de ellos la diana del NO por la similitud de esta molécula con el dioxígeno.

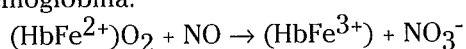
El complejo metal-nitrosilo ha sido conocido desde hace muchos años<sup>137</sup>, pero hasta hace unos pocos fue asumido que con algunas excepciones, tales como los iones nitroprúsidos, estos complejos eran poco reactivos. Sin embargo, es conocido que las características de unión de los nitrosilos metálicos pueden dirigir grandes cambios en la reactividad de los grupos nitrosilos. En condiciones biológicas estos complejos pueden liberar NO o aniones nitroxil (NO<sup>-</sup>) o actuar como agentes nitrosantes a través de la donación de NO<sup>+</sup>.

Dada su similitud al dioxígeno, el NO ha sido utilizado como sustituto para el O<sub>2</sub> en muchos metaloproteínas, ya que los complejos nitrosos de sus centros metálicos son paramagnéticos y por lo tanto la espectrometría por resonancia electrón paramagnética (EPR) puede ser usada para obtener información sobre los alrededores de estos centros. Las señales EPR son muy sensibles al tipo de metal y a su estado de oxidación, así como a la naturaleza y disposición espacial de los múltiples ligandos alrededor del centro metálico. Se han descrito los espectros EPR de los complejos NO con metaloproteínas que contienen hierro o cobre<sup>138</sup>.

En las células de los mamíferos la vida media del NO es relativamente corta (5-10 s)<sup>11</sup> y la máxima concentración del NO está en rangos micromolares. Por ello la formación de óxidos de nitrógeno más altos a partir de la reacción de NO con el O<sub>2</sub> puede resultar más dañina para las células dianas que el propio NO.

Cuando se produce el NO *in vivo* o *in vitro* está claramente admitido que su efecto biológico predominante dependerá del balance entre una variedad de diferentes y simultáneas reacciones que se produzcan. Las consecuencias de la formación de NO estarían dirigidas por i) las especies de óxidos de nitrógeno que se formen, ii) por sus relativas velocidades de formación, iii) por la naturaleza de las dianas disponibles en la vecindad y iv) por la rapidez con que reaccionan con estas especies. Todo ello hace que los modelos y vías de acción del NO muestren gran complejidad. Cuantitativamente, la reacción más importante del NO en los mamíferos es la reacción

con la oxihemoglobina. Esta reacción es una transferencia de  $O_2$  más un electrón al NO, formando el anión nitrato y la met-hemoglobina:



Esta reacción es extremadamente rápida y dada la alta concentración del grupo hemo (25 mM) en el sistema sanguíneo, hace que la síntesis *in vivo* de NO pueda dar origen a cantidades significativas de  $NO_3^-$  en la circulación. El NO reacciona también con la desoxihemoglobina para formar complejos nitrosilos, siendo esta reacción también muy rápida<sup>139</sup>. En un medio aeróbico, una vez formada el complejo nitrosil-hemoglobina, reaccionará con  $O_2$ .

### FUNCIÓN DEL NO

A la vista de todo lo anteriormente expuesto, hay una amplia gama de procesos biológicos en los que el NO puede estar implicado. Estos procesos incluyen diferentes mecanismos de activación de los factores de transcripción, la translocación de los mRNA, el metabolismo del hierro, la mutagénesis, la apoptosis, la glicólisis y el transporte de electrones mitocondriales, la acilación de proteínas, la síntesis de desoxinucleótidos, la fusión de mioblastos, la adhesión de las plaquetas y neutrófilos, la proliferación de los promotores de células mieloides, la producción de células T, de queratinocitos y células tumorales, la liberación de hormonas pituitarias, la regulación del tono bronquial y el de los esfínteres, la regulación del peristaltismo esofágico, la contracción del estómago e intestino, la del útero<sup>140</sup> y corazón, la regulación del pulmón y la erección del pene, participando en la tolerancia y toxicidad de los opioides<sup>141</sup>, en la regulación de la memoria, sueño y presión sanguínea<sup>34,37,38,92,142-145</sup>.

### NO Y SISTEMA NERVIOSO

El NO en el sistema nervioso difiere de los neurotransmisores clásicos o neuromoduladores en que i) el NO no es almacenado en vesículas, ii) no actúa con mecanismos específicos de liberación y captación, iii) no cuenta con receptores de membrana, penetrando por afinidad lipofílica directamente en la célula diana, donde regula muchos sistemas enzimáticos, iv) no es metabolizado por enzimas específicas, siendo degradado espontáneamente por oxidación o por compuestos tales como el superóxido o la oxihemoglobina, v) tiene una vida media de segundos en contra de la de los neurotransmisores clásicos, que es de milisegundos<sup>146,147</sup>, habiendo sido estimada la distancia de difusión del NO en un medio proteico en 10  $\mu m$ , que es bastante menor al diámetro de algunas células<sup>126,148</sup>.

La actividad de la isoforma nNOS está incrementada post-sinápticamente por la acción estimuladora de ciertos aminoá-

cidos tales como el glutamato<sup>64</sup>, que tras su liberación por el terminal presináptico incrementa el flujo del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la neurona, el cual activaría la NOS<sup>63</sup>. Existen evidencias indirectas de que todo este mecanismo es dependiente de glutamato, el cual tras ser liberado en el espacio intersináptico actúa sobre sus específicos subtipos del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

En el sistema nervioso central se ha demostrado que la mayoría de las células que expresan inmunorreactividad para NOS contienen una significativa cantidad del receptor NMDA R1, por lo que este tipo de receptor puede ser la pieza clave en la puesta en marcha del mecanismo citado<sup>26,149</sup>. Recientemente, estos datos inmunocitoquímicos y los obtenidos por hibridación *in situ* han sido confirmados mediante técnicas de microdiálisis<sup>150</sup>. Las dianas del NO liberado por las células nerviosas que contienen NOS corresponden a las células que están situadas en el entorno de la célula productora y que contienen la guanilato ciclasa soluble. De esta manera, el NO liberado incrementaría, por ejemplo en el cerebelo, la hidrólisis del fosfoinositol, sugiriéndose por lo tanto que el NO desempeñaría un papel de mediador<sup>151</sup>.

No obstante, grandes concentraciones de NO en el cerebro pueden ser citotóxicas para muchas células, debido a la pérdida funcional de grupos hemo e inhibición de la síntesis de DNA y de la respiración mitocondrial de la célula diana<sup>152</sup>. En cultivos de células gliales del cerebelo el NO inhibe la mitogénesis y la proliferación celular mediante inhibición de la actividad mitocondrial<sup>153</sup>. La inducción de la iNOS en cultivos de astrocitos produce la inhibición de la actividad enzimática de las enzimas relacionadas con el grupo hemo, tal como la citocromo oxidasa<sup>154</sup>. Recientemente, nosotros hemos observado nitración de estas enzimas mitocondriales, hecho que demuestra el efecto tóxico sobre la mitocondria ante un exceso de NO.

Entre las funciones del NO en el sistema nervioso podemos citar i) la autorregulación del flujo vascular tanto periférico como central, ii) la activación de las fibras parasimpáticas que innervan los vasos cerebrales<sup>155</sup>, iii) el incremento del flujo sanguíneo durante la hipercapnia, iv) la participación en los mecanismos de defensa cerebral ante las infecciones mediante la microglía, que en estas situaciones expresa grandes cantidades de la isoforma iNOS<sup>73,156</sup> y v) su participación en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria.

Concretamente, por esta última función al NO se le atribuye el carácter de neurotransmisor retrógrado, ya que este gas puede viajar desde la membrana postsináptica a la presináptica, participando en el fenómeno de potenciación de la actividad neuronal a largo plazo (LTP) que tiene lugar por ejemplo



en todos los casos de plasticidad neuronal asociada con el aprendizaje y la memoria. Este mecanismo puede ser bloqueado por inhibición de la enzima NOS con inhibidores específicos o por hemoglobina, que reduce o elimina al NO del medio<sup>157</sup>. En este sentido se ha demostrado que la administración en el pollo del inhibidor L-NNA antes de someter a este animal a un ejercicio de aprendizaje produce amnesia, mientras que la administración del substrato L-arginina durante todo el tiempo que dura la acción del inhibidor evita la aparición de la amnesia<sup>158</sup>. Estos hechos fueron confirmados en ratones "knockout" que carecen del gen de la nNOS<sup>159</sup> o en ratas<sup>160</sup>. Estas mismas circunstancias se repiten cuando se administra otro tipo de inhibidores, tal como el L-NAME<sup>161</sup>.

Concretamente, en el sistema nervioso las acciones del NO no están confinadas a la estructura anatómica de los elementos que regulan la circulación o flujo sanguíneo, sino que la capacidad de difusión del NO llega a producir efectos más amplios que los producidos a través de las uniones específicas que las células productoras del NO puedan tener con las células con las que anatómicamente establecen contacto<sup>162</sup>. En el sistema nervioso el NO es considerado parcialmente como una sustancia paracrina y parcialmente como un neurotransmisor, aunque se considera que actúa más paracrinamente<sup>162</sup>, participando en la sinaptogénesis, en los procesos sensitivos, en la transducción de estímulos, en la plasticidad neural<sup>23,24,163</sup>, en el aprendizaje, en la regulación de la ingesta y en la toma de líquidos<sup>92</sup>.

## NO Y LOS PROCESOS PATOLÓGICOS

La participación del NO en diversos procesos patológicos en el sistema nervioso está claramente establecida<sup>164-167</sup>. Tras irrumpir en el mundo científico, durante la pasada década el NO, como un importante mediador intercelular, se pudo comprobar como sus niveles altos de producción estaban asociados en muchos casos a una citotoxicidad celular no específica mediada por la activación de procesos inmunes y por lo tanto relacionada con ciertas afecciones crónicas, como son los procesos inflamatorios autoinmunes: la artritis reumatoidea, la diabetes insulino-dependiente, ciertos procesos inflamatorios intestinales y la esclerosis múltiple. Recientemente, se señala al NO como un inmunorregulador que participa en la supresión de la función de los macrófagos y linfocitos T activados e implicados en este tipo de procesos patológicos y por lo tanto regulando la severidad de los procesos patológicos<sup>168</sup>.

En relación con procesos fisiopatológicos, el NO puede participar en los relacionados con la migraña, la epilepsia, las agresiones sufridas por el cerebro en las que participan la excitotoxicidad y en las enfermedades neurodegenerativas<sup>25,26,37,73,92</sup>.

En la enfermedad de Huntington, el NO liberado desde la isoforma nNOS puede mediar en la muerte celular producida por la citotoxicidad relacionada con la alta producción de glutamato. Aunque parece admitirse que la población de interneuronas del estriado que contienen somatostatina, neuropeptido Y y nNOS sobreviven durante el desarrollo de la enfermedad de Huntington, hoy se admite que estas neuronas están seriamente dañadas durante el curso de la enfermedad, produciéndose una notable reducción en la expresión de tanto el mRNA como la proteína de nNOS<sup>169</sup>. En la enfermedad de Alzheimer, se conoce que la dimetilarginasa, enzima que destruye los inhibidores endógenos de la nNOS, está específicamente elevada en aquellas neuronas con anomalías en el citoesqueleto y sometidas al estrés oxidativo relacionado con esta enfermedad. Por el contrario, esta enzima no fue encontrada en las neuronas envejecidas tomadas como control. Parece lógico pensar que la falta de inhibición de la nNOS en las neuronas que contienen elevados niveles de dimetilarginasa puede haber contribuido al daño observado. Estos datos señalan como en la enfermedad de Alzheimer existen grandes alteraciones en regulación de la NOS<sup>170,171</sup>.

En la enfermedad de Parkinson, el estrés oxidativo puede contribuir a la muerte neuronal en la sustancia negra, según datos obtenidos de material postmortem, donde se ha demostrado que existe un incremento de los niveles de hierro y un descenso de los niveles de glutatión, contribuyendo a dañar la función mitocondrial<sup>172</sup>. Este mecanismo permite que se produzcan daños oxidativos, tal como un aumento de la peroxidación de lípidos, la nitración de proteínas y la oxidación del ADN. El NO puede estar implicado en la producción de radicales hidroxilos, como resultado de la difusión de dopamina inducida por el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) en el estriado, y tanto los ratones "knockout" que carecen de la nNOS como los tratados con 7-NI para inhibir la nNOS son relativamente resistentes a los efectos neurotóxicos del MPTP<sup>173,174</sup>. Además, se ha demostrado la producción de nitración de los residuos de tirosina en proteínas por el peroxinitrito, formando la nitrotirosina que se puede detectar inmunocitoquímicamente con anticuerpos específicos contra este compuesto. Esta inmunorreactividad se ha demostrado en los cuerpos de Lewis de las neuronas que contiene pigmentos de melanina y depósitos de material amorfo<sup>175</sup>.

En la esclerosis lateral amiotrófica, se pensó que la nitración de los neurofilamentos estaba relacionada con la patogénesis de esta enfermedad, donde se ha detectado niveles altos de 3-nitrotirosina en la médula espinal, aunque la inmunorreactividad para la nitrotirosina se localiza también en agregados neurofilamentosos de las neuronas de corteza. Se ha argumentado que la síntesis del NO en este tipo de enfermedad se

debe a la isoforma nNOS en estas neuronas y se ha propuesto que el NO puede jugar un importante papel en este tipo de patología<sup>174</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la subunidad ligera de los neurofilamentos eran particularmente susceptibles para la nitración mediada por el peroxinitrito, aunque no se apreciaron diferencias claras con los controles usados<sup>176,177</sup>.

En la esclerosis múltiple, se han dado algunas explicaciones para justificar la destrucción de la mielina y los oligodendrocitos, aunque no está aún perfectamente probado el mecanismo exacto por el cual este tipo de lesión se produce<sup>178</sup>. Sherman y col<sup>179</sup> postularon que la respuesta inmune en la esclerosis múltiple se da como consecuencia de una acción mediada por las citoquinas que incrementan en el sistema nervioso central la producción de NO por los macrófagos/microglía, por las fibras musculares lisas y por el endotelio vascular. Tres mecanismos se han propuesto para justificar el daño celular: i) el producido por una directa acción tóxica producida por el NO, ii) por la lesión debida a la acción del peroxinitrito tras su formación por la reacción del NO con el anión superóxido y iii) por la elevación del CGMP mediado por el NO, incrementando el factor TNF- $\alpha$ . Estas hipótesis se apoyan en el hecho de que los antiinflamatorios como la dexametasona y el TGF- $\beta$  disminuyen los síntomas de la esclerosis múltiple y de la encefalitis alérgica experimental, respectivamente, e inhiben la inducción de las citoquinas que median en la producción de NO por los macrófagos<sup>179</sup>.

En el sistema nervioso periférico existen varias neuronas sintetizadoras de NO que participan en la relajación muscular no adrenérgica no colinérgica (NANC), de tal manera que el NO liberado por estas fibras y cuerpos neuronales que integran este sistema nitrérgico participa en la relajación del músculo liso<sup>98,145</sup> y cardíaco y posiblemente la regulación del tono bronquial<sup>143</sup> y en la regulación del tono del músculo estriado. En el músculo liso gastrointestinal, el papel esencial del NO se demuestra por la dilatación del estómago e hipertrofia del esfínter pilórico y del músculo de la capa circular que ocurren en los ratones "knockout" que carecen de la nNOS<sup>180</sup>. Lo mismo ocurre en la regulación metabólica del hígado del gato y trucha<sup>99,181</sup>. Las neuronas nitrérgicas cardíacas influyen tanto sobre el sistema de conducción cardíaco como sobre las fibras musculares que conforman el miocardio, mediando así las influencias autónomas inotrópicamente negativas<sup>182</sup>. Similarmente, el NO que se produce en el sarcolema de las fibras rápidas del músculo esquelético disminuye su contracción. En el esófago, las fibras NANC regulan el peristaltismo, pudiendo modular el tono de la fibra muscular esquelética mediante la presencia de placas motoras que son inmunopositivas para la nNOS<sup>38,183</sup>, y participan en la transducción sensorial de los estí-

mulos mecánicos que se ejercen sobre el epitelio esofágico al paso del bolo alimenticio. Existen fibras nNOS-positivas que surgen de las fibras perivasculares y que se distribuyen libremente por ese epitelio, pudiendo corresponder al sustrato anatómico base de un posible reflejo sensitivo-motor<sup>38</sup> descrito previamente por Burnstock<sup>184</sup>.

En el pene las fibras nitrérgicas juegan un papel preponderante en la erección, a través de la rica inervación que estas fibras presentan en el seno cavernoso y en los vasos de diferente diámetro que se extienden por todo este órgano, pudiendo, claramente las alteraciones en este sistema, producir una más o menos grave disfunción<sup>185</sup>. Recientemente, hemos demostrado cómo la degeneración selectiva de las fibras nitrérgicas juega un papel importante en la impotencia ligada a la diabetes experimental<sup>144</sup>. No obstante, parece ser que la diabetes no afecta la actividad y localización de la enzima NOS en el músculo anococcígeo de la rata<sup>186</sup>.

En el sistema cardiovascular las tres isoformas del NOS tienen implicaciones en su fisiología y fisiopatología. La eNOS es importante en la regulación vascular, manteniendo una vasodilatación adecuada y protegiendo la íntima de los agregados plaquetarios y de la adhesión leucocitaria, además de inhibir la proliferación del músculo liso de la pared. La isoforma nNOS del sistema nervioso central y periférico puede también contribuir a regular la presión sanguínea. En las enfermedades asociadas a hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión, que están caracterizadas por una disfunción endotelial, se ve reducida la capacidad de vasodilatación mediada por el endotelio. El estrés oxidativo y la inactivación del NO por los aniones superóxido juegan un papel importante en estos estados patológicos. La administración de L-arginina como sustrato de NOS o H<sub>4</sub>B como cofactor puede aliviar la disfunción endotelial en varias de estas condiciones. En las lesiones cerebrovasculares, la isoforma nNOS y la iNOS juegan un papel clave en la neurodegeneración, mientras que la eNOS tiene importancia para el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral y la prevención, en cuanto sea posible, del daño neuronal. En la sepsis la iNOS está inducida en la pared vascular por las endotoxinas bacterianas y/o la citoquinas proinflamatorias, produciendo grandes cantidades de NO que actúa como un importante mediador en la vasodilatación arteriolar inducida por endotoxinas y el shock séptico<sup>187</sup>.

#### **NO Y LOS PROCESOS DE HIPOXIA/ISQUEMIA**

En relación con la participación del NO en la hipoxia/isquemia cerebral se conoce bastante bien el hecho de que el NO no sólo participa directamente en diversos mecanismos funcionales y protectores, sino también en numerosos procesos neurotóxicos<sup>188</sup>. Como agente neuroprotector, al NO se le atri-

buyen diferentes acciones fisiológicas: i) por la estimulación que produce sobre la guanilato ciclasa soluble para formar el CGMP en la célula diana<sup>2,189</sup>, produciendo la relajación de la pared vascular y con ello la vasodilatación y mejora del flujo sanguíneo<sup>190</sup>; ii) por bloquear directamente el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular mediado por el estímulo del receptor NMDA<sup>191</sup>; iii) por inactivar mediante nitrosilación a dicho receptor; y iv) por las propiedades antioxidantes que posee el NO<sup>192,193</sup>.

El efecto neuroprotector inmediato se produce por el incremento de NO sintetizado por las células endoteliales a partir de la eNOS, justo en el momento de iniciarse la hipoxia/isquemia, en un intento de evitar el daño isquémico mediante una vasodilatación de urgencia<sup>194</sup>. La subsiguiente sobreexpresión de las otras isoformas de la NOS es de gran importancia en la fisiopatología de los cuadros clínicos producidos por la hipoxia/isquemia, que pueden acarrear consecuencias neurológicas e incapacidades graves. La nNOS puede participar beneficiosa y activamente no sólo en procesos relacionados con la neurotransmisión y/o neuromodulación<sup>195</sup> y con la plasticidad neuronal después de distintos tipos de injuria acontecidos en la médula espinal<sup>196</sup>, sino también con los episodios de hipoxia cerebral sufrida por fetos a término en el momento del parto<sup>25</sup>, durante el período postnatal y durante la vida adulta<sup>196</sup>. Esta actividad neuroprotectora parece tener un papel importante en la actividad funcional del hipocampo<sup>198-200</sup> y del cerebelo<sup>201</sup>.

Como agente neurotóxico, al NO se le implica directamente en mecanismos citotóxicos e independientes de CGMP, tales como la formación de radicales libres, nitrosilación de ácidos nucleicos, roturas del ADN e inactivación de enzimas con centro ferrosulfurados que alterarían los procesos energéticos celulares<sup>202</sup>. En este sentido, la hipótesis más interesante relacionada con el efecto neurotóxico del NO es la formación de peroxinitrito como consecuencia de su interacción con el anión superóxido<sup>203</sup>. El peroxinitrito puede nitrar, directamente o a través de otras especies reactivas de nitrógeno, los residuos de tirosina en proteínas, lo cual impide las interacciones funcionales de estos residuos y pone en peligro la viabilidad celular<sup>204</sup>. Dicho efecto ha sido puesto de manifiesto por nuestro grupo, usando un anticuerpo de alta especificidad y afinidad para la nitrotirosina en proteínas<sup>28</sup>.

Concretamente, se sabe que en la patogenia de los procesos hipóxicos-isquémicos interviene la liberación de aminoácidos excitadores (AAE), particularmente la liberación de glutamato que actúa sobre los receptores NMDA, provocando un aumento del  $Ca^{2+}$  en las células diana<sup>205-207</sup>. La conexión entre la liberación de AAE y la activación de la vía L-arginina-NO por el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, que activa la nNOS, es la

clave que justifica la hipótesis de que el incremento excesivo de formación de NO podría ser responsable de la neurotoxicidad<sup>166,208-211</sup>.

Durante la hipoxia/isquemia y por diferentes mecanismos se produce un aumento en la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Así pues, en situaciones de déficit de O<sub>2</sub> el superóxido es producido por la microglía activada<sup>212</sup>, el ácido araquidónico es liberado desde la membrana celular por la fosfolipasa A2 y se producen colateralmente hidroperóxidos lipídicos y radicales libres. También en estas circunstancias se da lugar a la entrada de Ca<sup>2+</sup>, como consecuencia a la despolarización de membranas, pudiéndose convertir la xantina deshidrogenasa en oxidasa, para utilizar oxígeno como receptor de electrones y liberar también el superóxido<sup>213</sup>. Como otra fuente de ERO se ha descrito a la propia NOS, que en concentraciones subóptimas de L-arginina puede producir el superóxido y el peróxido de hidrógeno<sup>32</sup>. Por último, se admite que la disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial que se produce tras la isquemia<sup>214</sup> puede llevar a la liberación de ERO. Para todos estos procesos es necesaria la presencia de oxígeno, lo cual nos lleva a pensar que estos fenómenos se producirían a partir del período de reperfusión/reoxigenación con un tejido dañado.

Por lo tanto es lógico pensar que el aumento de producción de NO y superóxido durante la hipoxia/isquemia conlleva a un gran incremento en la formación de peroxinitrito. Anteriormente se ha demostrado que este anión se combina con tioles y ciertas moléculas con grupos -OH (glucosa, serina, etc.) para formar moléculas que donan NO. Este mecanismo puede considerarse como un proceso de detoxificación "activa", ya que las moléculas formadas tienen propiedades citoprotectoras<sup>215,216</sup>. Por eso puede decirse que en aquellas condiciones en las que se produce un agotamiento de dichas defensas, cual es el caso del estrés oxidativo causado por la producción excesiva y/o prolongada de sustancias oxidantes, incluido el propio peroxinitrito, las células quedan expuestas al efecto pernicioso combinado de estas especies reactivas. Este mecanismo explicaría la aparente desconexión que encontramos al intentar relacionar, por ejemplo, las acciones neurotóxicas de los aminoácidos excitadores cuyos canales asociados tienen dinámicas del orden de milisegundos, con los procesos graduales de degeneración neuronal y cuya evolución se desarrolla a lo largo de varios años.

Existen evidencias que nos sugieren que es el peroxinitrito el responsable de los efectos neurotóxicos del NO<sup>191,203</sup>. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales esta molécula produce la muerte neuronal. Se ha propuesto que su efecto podría originarse por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>154</sup>. Sin embargo, se ha demostrado reciente-

mente que el peroxinitrito de origen extracelular no afecta a la función mitocondrial, ya que es eficazmente destoxificado<sup>217-219</sup>. Por ello, es importante estudiar los mecanismos por los cuales el peroxinitrito produce neurotoxicidad, lo que además permitirá el diseño de estrategias neuroprotectoras, ya no sólo aumentando las defensas antioxidantes sino también actuando a un nivel más inferior en la secuencia fisiopatológica. En años anteriores y por separado, han sido estudiados estos mecanismos, utilizando como modelos biológicos las plaquetas humanas<sup>215</sup> y por nosotros mismos los macrófagos de ratón de la serie J774<sup>72</sup>. En ambos tipos de trabajo el peroxinitrito altera el mecanismo de transducción de señales que afectan a la formación de cAMP y cGMP<sup>215</sup>, produciendo depleción extracelular de grupos sulfhidrilo<sup>220</sup> y aumentando la concentración intraplaquetaria de Ca<sup>2+</sup> por su entrada a través de la membrana.

#### NO/PEROXINITRITO/NITROTIROSINA

Por último, la formación de nitrotirosina ha sido demostrada en algunos desordenes inflamatorios, lesiones arterioescleróticas y enfermedades neurodegenerativas<sup>28,178,204,221,222</sup>. Aunque la nitración de proteínas ha sido usada como índice de la producción de peroxinitrito, también puede ocurrir por otras vías que no implican el peroxinitrito, por ejemplo la formación de nitril cloruro (NOCl) por la acción de la mieloperoxidasa en procesos inflamatorios<sup>222</sup>.

La nitración de proteínas puede alterar la conformación y estructura de las proteínas, su actividad catalítica y o su susceptibilidad para su digestión<sup>223-225</sup>. Se ha demostrado también que la nitración de los anillos de tirosina de las proteínas puede disminuir la efectividad de las proteínas como sustrato de las tirosina-quinasa<sup>193,225-227</sup>. Por ello a través de la expresión de nitrotirosina de proteínas se puede valorar el efecto tóxico del NO, que participa en la interrupción de los procesos de señalización celular y que tiene carácter de lesión difícilmente reversible, aunque se ha descrito recientemente una actividad enzimática desnitrasa en algunos tejidos<sup>228</sup>.

#### NO/SISTEMA COMPLEMENTO

Actualmente, se empieza a conocer que la acción de NO sobre los vasos sanguíneos en los procesos inflamatorios no es un mecanismo sencillo de vasodilatación, sino algo más complejo que tiene sus efectos también en los factores del sistema de complemento (inhibidor de C1, el factor B, el factor H y el C4), así como en las serina-proteasas, la plasmina y miniplasmina, y tal vez en otros compuestos que hoy por hoy aún no son conocidos<sup>229</sup>. Toda esta activación e incremento de expresión de los diversos compuestos citados se ha conocido como partícipe en la secuencia de acontecimientos que se

produce durante el desarrollo de las lesiones cerebrovasculares secundarias a la hipoxia/isquemia-reperusión/reoxigenación, demostrándose también que estos mecanismos se ponen en marcha en diferentes tipos de agresiones que pueden incidir en la normal circulación cerebral<sup>230-235</sup>.

En esta línea, Collard y col<sup>236-237</sup> demostraron como se producía, durante la reoxigenación tras la hipoxia sufrida por las células endoteliales de la vena umbilical humana, la activación y depósito de las proteínas del complemento, influyendo en la translocación del factor nuclear kB y la expresión de las moléculas de adhesión celular vascular y decreciendo el nivel de CGMP dependiente del NO endotelial. Tratando estas células endoteliales sometidas a hipoxia con el inhibidor recombinante humano del complemento, se consiguió la atenuación del depósito de las proteínas del complemento, la translocación del factor nuclear kB y la expresión de las moléculas de adhesión, preservando la síntesis de CGMP dependiente de NO e inducido por la acción de la acetilcolina. Todo ello vino a demostrar como en el periodo de reoxigenación tras la hipoxia las proteínas del complemento pueden directamente influir sobre el eje NO/CGMP.

Vakeva y Meri<sup>238</sup> han demostrado que los componentes del complemento C1q, C3c, C3d, C4, C5 y C9 se depositan durante la anoxia, lo cual indica una activación del sistema complemento por las células endoteliales. Esta activación puede ser un mecanismo importante en la patogénesis de las lesiones que se producen en el SNC tras la hipoxia/reoxigenación. En esta situación Collard y col (1999) señalan que se inducen la expresión de los receptores de las proteínas del sistema complemento tipo I (CR1, CD35) en el endotelio vascular humano. Morgan y col<sup>231</sup> señalaron que el complemento es el responsable de numerosas patologías en el SNC, interviniendo en este mecanismo varias células del SNC que sintetizan el complemento y también expresan sus receptores específicos.

Lindsberg y col<sup>239</sup> señalaron que, en condiciones normales, el parénquima cerebral se encuentra virtualmente aislado de la acción de diferentes factores inmunológicos y entre ellos de las proteínas del complemento. No obstante, cuando se produce en un proceso patológico –isquemia, hemorragia cerebral o subaracnoidea, etc.– una alteración de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica se facilita la extravasación de las proteínas del complemento y con ello el desarrollo de una inflamación no neurológica que agrava el daño cerebral inicialmente producido. En este sentido discurren también las investigaciones que llevaron a cabo Mollnes y Fosse<sup>240</sup>.

Resumiendo, en los procesos de hipoxia/isquemia-reperusión cerebral se dan lugar los siguientes fenómenos:



- Un aumento de la actividad y expresión de la eNOS a los pocos minutos de producirse la hipoxia, en un intento urgente de regular por medio de una vasodilatación el flujo sanguíneo cerebral<sup>194</sup>.

- Un aumento de la actividad y expresión de la nNOS<sup>25,197,217</sup> que producirá un incremento de NO, contribuyendo a medio plazo al daño isquémico en el cerebro, que se reduce en un 40% en ratones "knockout" que carecen genéticamente de nNOS.

- Un aumento de la actividad y expresión de la isoforma iNOS, que tiene lugar después de varias horas de iniciarse el estímulo hipóxico, con la producción de niveles incontrolados de NO, contribuyendo de manera decidida al progreso de la neuropatología<sup>73</sup>. En ratones "knockout" que genéticamente no expresan iNOS el daño cerebral también está muy reducido<sup>241</sup>.

En todos estos trabajos y modelos previos hemos podido observar una relación directa entre la carencia de O<sub>2</sub> y el aumento de las isoformas nNOS e iNOS, así como con la formación de nitrotirosina.

### NO/ENVEJECIMIENTO

Finalmente es interesante señalar el papel que desempeña el NO en los procesos de envejecimiento<sup>242</sup>, considerando a este como un proceso multifactorial que afecta de forma heterogénea a todas las células que conforman los seres vivos, las cuales se ven sometidas con el paso del tiempo a un deterioro morfofuncional que pueden conducir las a la muerte<sup>243,244</sup>. Se sabe que las claves que sostienen este proceso involutivo son tanto de carácter genético como ambiental<sup>245,246</sup>, ya que aunque los seres vivos han sido diseñados para reproducirse y posteriormente extinguirse, no todos ellos lo hacen a por igual<sup>247</sup>.

Aunque ya hemos señalado ya el papel que juegan los radicales libres y particularmente el NO en el daño celular y tisular que tiene lugar tras procesos de hipoxia-reoxigenación<sup>195,221,248</sup>, también hemos de tener en cuenta que el estrés oxidativo originado por radicales libres y entre ellos el propio NO<sup>249</sup>, se incrementa en situaciones patológicas como las ya comentadas<sup>250</sup>. La presencia de estas especies reactivas en las células es consustancial con el desarrollo de sus actividades vitales y particularmente con las derivadas del metabolismo oxidativo que las células deben realizar de forma continua en las mitocondrias para generar la energía que necesitan para vivir<sup>251</sup>. Si además se consideran otras fuentes externas, que también pueden generar radicales libres, se ha estimado que las células reciben diariamente de forma espontánea unos 10.000 impactos oxidativos que dañan moléculas tan importantes como los lípidos de las membranas, las proteínas enzi-

máticas y el material genético que las constituyen<sup>252</sup>. Finalmente, las células dañadas irreversiblemente acaban progresando hacia su muerte, bien a través de mecanismos de necrosis (que normalmente ocurre durante una patología) o bien a través de los mecanismos programados de apoptosis (que es la forma fisiológica que tienen los seres vivos para eliminar células inservibles o transformadas)<sup>253</sup>. Todas estas evidencias han hecho cada vez más consistente la idea de que el envejecimiento es la consecuencia del daño causado por estas moléculas altamente reactivas a lo largo del tiempo<sup>28,254-257</sup>. Con posterioridad, las células envejecidas, normalmente inservibles e incluso potencialmente dañinas para el conjunto del organismo, programan su propia muerte con las consecuencias que de ello se derivan, en cuanto al deterioro que se produce en el órgano o tejido en el que están integradas<sup>243</sup>. Entre los radicales libres causantes del daño oxidativo caben destacar el superóxido, el hidroxilo, el peróxido de hidrógeno, el propio NO y por supuesto el peroxinitrito<sup>28,242,258,259</sup>.

En todos estos mecanismos de muerte celular desencadenados por radicales libres, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel central, ya que un aumento de sus niveles citosólicos lleva a la activación no sólo de la nNOS y eNOS, como ya se ha comentado, sino también de otras enzimas como las fosfolipasas, las endonucleasas y las proteasas tipo caspasas que son responsables de la ejecución del programa de muerte celular<sup>260</sup>.

En cualquier caso, las células presentan sistemas enzimáticos altamente específicos para inactivar las especies reactivas de oxígeno y reparar los daños que hayan podido inferir a las células. Entre estos sistemas, que han sido denominados genéricamente como defensas antiestrés oxidativo, cabe destacar las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSP), glutatión transferasa (GST), glutatión reductasa (GOR) y catalasa<sup>261</sup>. De hecho, los genes que codifican para estas enzimas así como todos aquellos implicados en regular su expresión o modificar su función, han sido denominados como gerontogenes por la relación que guardan con el proceso de envejecimiento<sup>257,262</sup>. Así, por ejemplo, se sabe que los animales más longevos dentro de su especie, presentan versiones extraordinariamente eficaces de la SOD y otras enzimas detoxificantes<sup>247,263</sup> y que determinadas patologías asociadas a envejecimiento precoz y patológico presentan déficit de estos sistemas<sup>264</sup>.

Creemos pues que con todo lo anteriormente expuesto se puede justificar perfectamente el que al NO se la haya considerado como la molécula del año 1992<sup>265</sup> y posteriormente el motivo de la concesión del premio Nobel compartido entre Furchgott, Ignarro y Murad en el año 1998, quien llegó a postular sobre esta molécula "que en campo de la investigación y aplicación del NO sólo estábamos en el principio".

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa COINCIDENTE DN8644, por la Comunidad de Madrid (0.85/0052.1/1998) y por el Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (PM98-0126-c02-01)

### BIBLIOGRAFÍA

1. FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
2. MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
3. FARACI FM. Role of nitric oxide in regulation of basilar artery tone in vivo. *Am J Physiol* 1990; 259: H1216-1221.
4. FARACI FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs microcirculation. *Am J Physiol* 1991; 261: H1038-1042.
5. FARACI FM. Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol Ther* 1992; 56: 1-22.
6. PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
7. IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
8. IGNARRO LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-560.
9. KHAN M., FURCHGOTT RF. Additional evidence that endothelium-derived-relaxing factor is nitric oxide. In: *Pharmacology*. Rand MJ, Raper J (eds.). Elsevier, Amsterdam 1987; 341-344.
10. MONCADA S, PALMER RJ, HIGGS EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715.
11. IGNARRO LJ. Nitric oxide-mediated vasorelaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 255: 1256-1264.
12. MONCADA S, HIGGS A, FURCHGOTT R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997; 49:137-142.
13. KOBZIK L, REID MB, BREDT DS, STAMLER JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372: 546-548.
14. KOBZIK L, BREDT DS, LOWENSTEIN CJ, DRAZEN J, GASTON B, SUGARBAKER D, STAMLER JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-377.
15. DINERMAN JL, DAWSON TM, SCHELL MJ, SNOWMAN A, SNYDER SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implication for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4214-4218.
16. RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197.
17. OSWALD LP, ELTOUM I, WYNN TA, SCHWARTZ B, CASPAR P, PAULIN D et al. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an

- intravascular parasite, *Schistosoma mansini*, through the production of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 999-1003.
18. MONHAUPT MG, ELZIE JL, AHN KY, CLAPP WL, WILCOX CS, KONE BC. Different expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 1994; 46: 653-665.
  19. SESSA WC, HARRISON JK, LUTHIN DR, POLLOCK JS, LINCH KR. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* 1993; 21: 934-938.
  20. GIULI G, LUZI A, POYARD M, GUELLAEN G. Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and NO synthase during ontogeny. *Dev Brain Res* 1994; 81: 268-283.
  21. KEILHOFF G, SEIDEL B, NOACK H, TISCHMEYER W, STANEK D, WOLF G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience* 1996; 75: 1193-1201.
  22. NORTHINGTON FJ, KOEHLER RC, TRAYSTMAN RJ, MARTIN LJ. Nitric oxide synthase 1 and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. *Dev Brain Res* 1996; 95: 1-14.
  23. YAN XX, RIBAK CE. Prenatal development of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity in the human hippocampal formation. *Hippocampus* 1997; 7: 215-231.
  24. SANTACANA M, UTTENTHAL LO, BENTURA ML, FERNÁNDEZ AP, SERRANO J, MARTÍNEZ DE VELASCO J et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Dev Brain Res* 1998; 111: 205-222.
  25. RODRIGO J, ALONSO D, FERNÁNDEZ AP, BENTURA ML, SANTACANA M, SERRANO J et al. Postnatal modification of cerebral expression of nitric oxide synthase in rats subjected to intrauterine hypoxia before delivery. En: *Nitric Oxide: From Discovery to the Clinic*. Moncada S, Lamas S (eds.). Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, Madrid 1998; 44.
  26. RODRIGO J, ALONSO D, FERNÁNDEZ AP, SERRANO J, RICHART A, LÓPEZ JC et al. Immunohistochemical study of the expression of N-methyl-D-aspartate receptor, neuronal and inducible nitric oxide synthase and the formation of nitrotyrosine in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation in the presence and absence of N-nitro-L-arginine methyl ester. *Brain Res* (en prensa) 2000.
  27. NAVA EM, SALAZAR FJ, BENTURA ML, UTTENTHAL LO, FERNÁNDEZ AP, SERRANO J et al. Intrarenal distribution of constitutive nitric oxide synthase and nitrotyrosine in spontaneously hypertensive rats. In: *Nitric Oxide*. Moncada S, Higgs EA (eds.) (en prensa) 2000.
  28. UTTENTHAL LO, ALONSO D, FERNÁNDEZ AP, CAMPBELL RO, MORO MA, LEZA JC et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 75-88.
  29. FÖRSTERMANN U, SCHMIDT HHHW, POLLOCK JS, SHENG H, MITCHELL JA, WARNER TD et al. Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1649-1857.
  30. STUEHR DJ, GRIFFITH OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65: 287-346.
  31. MARLETTA MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 12231-12234.
  32. KNOWLES RG, MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 240-255.
  33. MORRIS SM JR, BILLIAR TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994; 266: E829-E839.
  34. NATHAN C, XIE QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.

35. SESSA WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-143.
36. MYERS PR, MINOR RL, GUERRA R, BATES JN, HARRISON DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990; 345: 161-164.
37. RODRIGO J, SPRINGALL D, UTTENTHAL LO, BENTURA ML, ABADIA-MOLINA F, RIVEROS-MORENO V et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B* 1994; 345: 175-221.
38. RODRIGO J, UTTENTHAL LO, PEINADO MA, ESTEBAN FJ, FERNÁNDEZ AP, SERRANO J ET AL. Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst* 1998; 70: 164-179.
39. ESTEBAN FJ, PEDROSA JA, JIMENEZ A, DEL MORAL ML, RODRIGO J, PEINADO MA. Nitroergic innervation of the cat liver. *Neurosci Lett* 1998; 243: 45-48.
40. ELPHICK MR, GREEN IC, O'SHEA M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. *Brain Res* 1993; 619: 344-346.
41. ELPHICK MR, RIVEROS-MORENO V, MONCADA S. Identification of nitroergic neurons in invertebrates. *Endothelium* 1993; 1 Suppl 57S.
42. GELPERIN A. Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature* 1994; 369: 61-63.
43. WERNER-FELMAYER G, GOLDERER G, WERNER ER, GROBNER P, WACHTER H. Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*. *Biochem J* 1994; 304: 105-111.
44. MARTINEZ A, RIVEROS-MORENO V, POLAK JM, MONCADA S, SESMA P. Nitric oxide (NO) synthase-immunoreactivity in the starfish *Marthasterias gracilis*. *Cell Tissue Res* 1994; 275: 599-603.
45. MEYER W. NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the central nervous system of spiders (*Arachnida: Araneida*). *Neurosci Lett* 1994; 165: 105-108.
46. REGULSKI M, TULLY T. Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9072-9076.
47. LIU G, GROSS SS. Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* 1996 268: 311-324.
48. KISHIMOTO J, SPURR N, LIAO M, LIZHI L, EMSON P, XU W. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* 1992; 14: 802-804.
49. XU W, GORMAN P, SHEER D, BATES G, KISHIMOTO J, LIU L et al. Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS 1) to 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogene Cell Genet* 1993; 64: 62-63.
50. XU W, CHARLES IG, MONCADA S, GORMAN P, SHEER D, LIU L et al. Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* 1994; 21: 419-422.
51. SALTER M, KNOWLES RG, MONCADA S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291: 145-149.
52. MITCHELL JA, FÖRSTERMANN U, WARNER TD, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, HELLER M, MURAD F. Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1417-1423.
53. POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MITCHELL JA, WARNER TD, SCHMIDT HHHW, NAKANE M et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native

- bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10480-10484.
54. GRIFFITH OW, STUERH DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-736.
  55. BUSCONI L, MITCHELL T. Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993; 269: 8410-8413.
  56. SPRINGALL DR, RIVEROS-MORENO V, BUTTERTY L, SUBURO A, BISHOP AE, MERRET M. et al. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 1992; 98: 259-266.
  57. FÖRSTERMANN U, GORSKY LD, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, HELLER M, MURAD F. Regional distribution of EDRF-NO synthesizing enzyme(s) in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 727-732.
  58. BREDT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthase: a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
  59. KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RMJ, MONCADA S. Characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J* 1990; 269: 207-210.
  60. BREDT DS, HUANG PM, GLATT CE, LOWENSTEIN C, REED RR, SNYDER SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450. *Nature* 1991; 351: 714-718.
  61. NAKANE M, SCHMIDT HHHW, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, MURAD F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316: 175-180.
  62. SCHMIDT HHHW, MURAD F. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1372-1377.
  63. BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9030-9033.
  64. GARTHWAITE J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60-67.
  65. NAKANE M, MITCHELL J, FÖRSTERMANN U, MURAD F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1396-1402.
  66. GIOVANELLI J, CAMPOS KL, KULIMAN S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7071-7093.
  67. HEVEL JM, WHITE KA, MARLETTA MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1991; 266: 22789-22791.
  68. YUI Y, HATTORI R, KOSUGA K, EIZAWA H, HIKI K, KAWAI C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 1991; 266: 12544-12547.
  69. LYONS CR, ORLOFF GJ, CUNNINGHAM JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Bio Chem* 1992; 267: 6370-6374.
  70. CHEN LY, MEHTA JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 154-158.
  71. WRIGHT CD, MÜLSCH A, BUSSE R, OSWALD H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 813-819.
  72. RIVEROS-MORENO V, PALACIOS M, RODRIGO J, MARTINEZ-MURILLO R, MONCADA S. Characterization of inducible nitric oxide synthase in human monocytes/macrophages after ligation of the CD23 receptor. *En: The*

- Biology of Nitric Oxide, Part 5. Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA (eds.). Portland Press, London 1996; pp. 160.
73. MORO MA, DE ALBA J, LEZA JC, LORENZO P, FERNÁNDEZ AP, BENTURA ML et al. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 445-456.
  74. OLIVENZA R, MORO MA, LIZASOAIN I, LORENZO P, FERNANDEZ AP, RODRIGO J et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 2000; 74: 785-791.
  75. XIE Q-W, CHO HJ, CALAYCAY J, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-228.
  76. LOWENSTEIN DJ, ALLEY LW, RAVAL P, SNOWMAN AM, SNYDER SH, RUSSELL SW et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9730-9734.
  77. GELLER DA, LOWENSTEIN CJ, SHAPIRO RA, NUSSLER AK, DI SILVIO M, WANG SC et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3491-3495.
  78. MÜLSCH A, BASSENGE E, BUSSE R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Arch Pharmacol* 1989; 340: 767-770.
  79. GROSS BB, JAFFE EA, LEVI R, KILBOURN RG. Cytokine activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 170: 823-829.
  80. BUSSE R, MÜLSCH A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1995; 275: 87-90.
  81. DE VENTE J, HOPKINS DA, VAN ITTERSUM MM, EMSON PC, SCHMIDT HHHW, STEINBUSCH HWM. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience* 1998; 87: 207-241.
  82. REGIDOR J, POCH L. Histochemical analysis of the lizard cortex: an acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. En: *The Forebrain of Reptiles*. Schwerdtfeger WK, Smeets WJAJ (eds.). Karger, Basel 1987; pp. 77-84.
  83. HOPE BT, MICHAEL GJ, KNIGGE KM, VINCENT SR. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2811-2814.
  84. HOPE BT, VINCENT SR. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J Histochem Cytochem* 1994; 37: 653-661.
  85. DAWSON TM, BREDT DS, FOTUHI M, HUANG PM, SNYDER SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
  86. VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46: 755-784.
  87. BURNING G. Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J Comp Neurol* 1993; 334: 192-208.
  88. MATSUMOTO T, NAKANE M, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett* 1995; 155: 61-64.
  89. BUWALDA B, NYAKAS C, GAST J, LUITTEN PGM, SCHMIDT HHHW. Aldehyde fixation differentially affects distribution of diaphorase activity but not

- nitric oxide immunoreactivity in rat brain. *Brain Res Bull* 1995; 39: 467-473.
90. TERENGI G, RIVEROS-MORENO V, HUDSON LD, IBRAHIM NBN, POLAK JM. Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat. *J Neurol Sci* 1993; 118: 34-37.
  91. SOBREVIELA T, MUFSON EJ. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase/nitric oxide synthase profiles in the human hippocampal formation and perirhinal cortex. *J Comp Neurol* 1996; 358: 440-464.
  92. RODRIGO J, RIVEROS-MORENO V, BENTURA ML, UTTENTHAL LO, HIGGS EA, FERNÁNDEZ AP ET AL. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* 1997; 378: 522-534.
  93. SATOH K, ARAL R, IKEMOTO K, NARITA M, NAGAI T, OHSHIMA M et al. Distribution of nitric oxide synthase in the central nervous system of *Macaca fasciata*: subcortical regions. *Neuroscience* 1995; 66: 685-696.
  94. GOLD ME, WOOD KS, BUGA GM, BYRNS RE, IGNARRO LJ. L-arginine causes whereas L-argininosuccinic acid inhibits endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 536-543.
  95. ARROYO CM, FORRAY C, EL FAKAHANY EE, ROSEN GM. Receptor-mediated generation of an EDRF-like intermediate in a neuronal cell line detected by spin trapping techniques. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 1177-1183.
  96. WILLIAMS DLH. S-nitrosation and the reactions of S-nitroso compounds. *Chem Soc Rev* 1985; 14: 171-196.
  97. KUKREJA RC, WEI EP, KONTOS HA, BATES JN. Nitric oxide and S-nitroso-cysteine as endothelium-derived relaxing factors from acetylcholine in cerebral vessels in cats. *Stroke* 1993; 24: 2010-2015.
  98. VANIN AF. Endothelium-derived relaxing factor is a nitrosyl-iron complex with thiol ligands. *FEBS Lett* 1991; 289: 1-3.
  99. KOWALUK EA, FUNG HL. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vivo* vascular relaxation by S-nitrothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 1256-1264.
  100. MANZONI O, PREZEAU L, MARIN P, DESHANGER S, BOCKAER J, PAGY L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 1992; 8: 375-397.
  101. HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-476.
  102. VALLANCE P, LEONE A, CALVER J, MONCADA S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
  103. LAMBERT LE, FRENCH JF, WHITTEN JP, BARON BM, McDONALD IA. Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1992; 216: 131-134.
  104. KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RMJ, MONCADA S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: an induction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 89: 5159-5162.
  105. GROSS SS, STUEHR DJ, AISAKA K, JAFFE EA, LEVI R, GRIFFITH OW. Macrophage and endothelial nitric oxide synthesis: cell type selective inhibition by N<sup>G</sup>-aminoarginine, N<sup>G</sup>-nitroarginine and N<sup>G</sup>-methyl-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 96-103.



106. FUKUTTO JM, WOOD KS, BYRNS RE, IGNARRO LJ. N<sup>G</sup>-amino-L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 458-465.
107. MCCALL TS, FEELISCH M, PALMER RMJ, MONCADA S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocyte cells. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 234-238.
108. MOORE PK, AL-SWAYEH OA, CHONG NSW, EVANS R, GIBSON A. L-N<sup>G</sup>-nitro-arginine, a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vitro. *Br J Pharmacol* 1989; 99: 408-412.
109. HANDY RLC, MOORE PHK. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 1119-1126.
110. FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H, STUEHR DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-N<sup>G</sup>-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem* 1993; 36: 491-496.
111. GARVEY EP, OPLINGER JA, TANOURY GJ, SHERMAN PA, ROWLER M, MARSHALL S, HARMON MF, PAITH JE, FURFINE ES. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases: inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 1994; 269: 26669-26676.
112. STUEHR DJ, FASEHUN OA, KWON NS, GROSS SS, GONZALES JA, LEVI R ET AL. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* 1991; 5: 98-103.
113. GRISCAVAGE JM, ROGERS NE, SHERMAN MP, IGNARRO LJ. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 1993; 151: 6329-6337.
114. JIANG MH, KATU T, HADA J, HAYASHI Y. 7-Nitroindazole reduces nitric oxide concentration in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol* 1999; 380: 117-121.
115. CHALIMONIUK M, STROSZNAJDER J. NMDR receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemisphere and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-nitroindazole. *J Neurosci Res* 1998; 54: 681-690.
116. LEI D, ADACHI N, NAGARO T, ARAI T. Nitric oxide production in the CA1 field of the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. Effects of 7-nitroindazoles and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. *Stroke* 1999; 30: 669-677.
117. CHO S, VOLPE BT, HWANG O, CHOI HJ, PARK LC, CHU CK et al. Blockade of tetrahydrobiopterin synthesis protects neurons after transient forebrain ischemia in rat: a novel role for the cofactor. *J Neurosci* 1999; 19: 878-889.
118. YRJANHEIKKI J, KEINANEN R, PELLIKKA M, HÖKFELT T, KOISTINAHO J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15769-15774.
119. LIZASOAIN I, KNOWLES RG, MONCADA S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. *J Neuropharm* 1995; 64: 636-642.
120. MURAD F, ISHI K, FÖRSTERMANN U, GORSKY L, KERVIN JF JR, POLLOCK J et al. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990; 24: 441-445.
121. VANHOUTTE PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13: 658-667.
122. FURCHGOTT RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 257-270.

123. LUSCHER TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrosodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* 1991; 12: E2-E11.
124. MALINSKI T, TAHA Z, GRUNFELD S, PATTON S, KAPTURCZAK M, TOMBOULIAN F. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by peroxynitrite microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 1076-1082.
125. SHAW AW, VOSPER AJ. Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans* 1977; 8: 1239-1244.
126. LANCASTER JR Jr. Stimulation of the diffusion and reaction of endogeneously produced nitric oxide. Implications for neural nitric oxide signaling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1235-1244.
127. RIDD JH. Nitrosation, diazotisation and diamination. *Q Rev* 1961; 15: 418-441.
128. WINK DA, DARBYSHIRE JF, NIMS RW, SAAVEDRA JE, FORD PC. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol* 1993; 6: 23-27.
129. MIWA M, STUEHR DJ, MARLETTA MA, WISHNOK JR, TANNENBAUM SR. Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* 1987; 8: 955-958.
130. OHSHIMA H, BARTSCH H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutant Res* 1994; 305: 253-264.
131. ISCHIROPOULOS H, ZHU L, CHEN J, TSAI M, MARTIN JC, SMITH CD, BECKMAN JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431-437.
132. BECKMAN JS, ISCHIROPOULOS H, ZHU L, VAN DER WOERD M, SMITH C, CHEN J et al. Kinetics of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 438-445.
133. PRYOR WA, SQUADRITO GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: L699-L722.
134. ZHU L, GUNN C, BECKMAN JS. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 452-457.
135. CROW JP, SPRUELL C, CHEN J, GUNN C, ISCHIROPOULOS H, TSAI M et al. On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 14: 331-338.
136. RUBBO H, RADI R, TRUJILLO R, RALYSNARAMAN B, BARNES S, KIRK M ET AL. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075.
137. MCCLEVERTY JA. Reactions of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem Rev* 1979; 79: 53-76.
138. HENRY Y, LEPOIVRE M, DRAPIER JC, DUCROCQ C, BOUCHER JL, GUISSANI A. EPR characterization of molecular target for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; 7: 1224-1234.
139. KERWIN JF JR, LANCASTER JR, FELDMAN PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1996; 38: 4343-4463.
140. WU W, GORMAN P, SHEER D, BATES G, KISHIMOTO J, LIU L et al. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 170: 175-185.

141. CUELLAR B, FERNANDEZ AP, LIZASOAIN I, MORO MA, LORENZO P, BENTURA ML et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacology* 2000; 148: 66-73.
142. NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
143. DÍAZ DE RADA O, VILLARO AC, MONTUENGA LM, MARTINEZ A, SPRINGALL DR, POLAK JM. Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract. *Neurosci Lett* 1993; 162:121-134.
144. CELLEK S, RODRIGO J, LOBOS E, FERNANDEZ AP, SERRANO J, MONCADA S. Selective nitrenergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1804-1812.
145. JARVINEN MK, WOLLMANN WJ, POWROZEK TA, SCHULTZ JA, POWLEY TL. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. *Anat Embryol* 1999; 199: 99-112.
146. IGNARRO LJ, GOLD ME, BUGA GM, BYRNS RE, WOOD KS, CHAUDHURI G et al. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res* 1989; 64: 315-329.
147. TZENG TB, FUNG HL. Pharmacodynamic modeling of the in vitro vasodilating effects of organic mononitrates. *J Pharmacokinet Biopharm* 1992; 20: 227-251.
148. VANDERKOOIJ JM, WRIGHT WW, ERECINSKA M. Nitric oxide diffusion coefficients in solutions, proteins and membranes determined by phosphorescence. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1207: 249-254.
149. PRICE RH JR, MAYER B, BEITZ AJ. Nitric oxide synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. *Neuroreport* 1993; 4: 807-810.
150. SHINTANI F, KANBA S, NAKAKI T. Measurement by *in vivo* brain microdialysis of nitric oxide release in the rat cerebellum. *J Psychiat Neurosci* 1994; 19: 217-221.
151. SMITH SS, LI J. Novel action of nitric oxide as mediator of N-methyl-D-aspartate phosphatidyl-inositol hydrolysis in neonatal rat cerebellum. *Biol Pharmacol* 1993; 43: 1-5.
152. HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.
153. GARG UC, DEVI L, TURNDORF H, GOLDFRANK LR, BANSINATH M. Effect of nitric oxide on mitogenesis and proliferation of cerebellar glial cells. *Brain Res* 1992; 592: 208-212.
154. BOLAÑOS JP, PEUCHEN S, HEALES SJ, LAND JM, CLARK JB. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1994; 63: 905-910.
155. IRIHURA K, MAYNARD KL, LEE WS, MOSKOWITZ NA. L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO<sub>2</sub> inhalation in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* 1994; 257: H837-H843.
156. WOOD PL, CHOKSI S, BOCCHINI V. Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool. *Neuroreport* 1994; 5: 977-980.
157. SCHUMAN EM, MADISON DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991; 254: 1503-1506.
158. HOLSCHER C, ROSE SP. An inhibitor of nitric oxide synthases prevents memory formation in the chick. *Neurosci Lett* 1992; 145: 165-167.
159. O'DELL TJ, HUANG PL, DAWSON TM. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 1994; 265: 542-546.

160. BOHME GA, BON C, LAMAIRE M. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9191-9194.
161. ESTAIL LB, GRANT SJ, CICALA GA. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 46: 959-962.
162. PAAKKARI I, LINDSBERG P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 1995; 27: 369-377.
163. VAID RR, YEE BK, SHALEV U, RAWLINS JN, WEINER I, FELDON J et al. Neonatal nonhandling and in utero prenatal stress reduce the density of NADPH-diaphorase-reactive neurons in the fascia dentata and Ammon's horn of rats. *J Neurosci* 1997; 17: 5599-5609.
164. DAWSON TM, DAWSON VL. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* 1994; 99: 9-20.
165. DUKE RC, OJCIUS DM, YOUNG JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275: 80-87.
166. SZABÓ C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 1996; 41: 131-141.
167. YUN HY, DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 300-310.
168. PARKINSON JF, MITROVIC B, MERRILL JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997; 75: 174-186.
169. NORRIS PJ, WALDVOGEL HJ, FAULL RL, LOVE DR, EMSON PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 1996; 4: 1037-1047.
170. SMITH MA, VASAK M, KNIPP M, CASTELLANI RJ, PERRY G. Dimethylargininase, a nitric oxide protein, in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 898-902.
171. YEW DT, WONG HW, LI WP, LAI HW, YU WH. Nitric oxide synthase in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1999; 89: 675-686.
172. HORTELANO S, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, HIRSCH T, SUSIN SA et al. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997; 410: 373-377.
173. JENNER P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 1: 24-34.
174. WONG NK, STRONG MJ. Nitric oxide synthase expression in cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Cell Biol* 1998; 77: 338-343.
175. GOOD PF, HSU A, WERNER P, PERL DP, OLANOW CW. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 338-342.
176. STRONG MJ, SOPPER, MM, CROW, JP, STRONG WL, BECKMAN JS. Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 157-164.
177. STRONG MJ. Neurofilament metabolism in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1999; 169: 170-177.
178. BAGASRA O, MICHAELIS FH, ZHENG YM, BOBROSKI LE, SPITIN SV, FU ZF et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12041-12045.
179. SHERMAN MP, GRISCAVAGE JM, IGNARRO LJ. Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis. *Med Hypothesis* 1992; 39: 143-146.

180. HUANG PL, DAWSON TM, BREDT DS, SNYDER SH, FISHMAN MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 75: 1273-1286.
181. ESTEBAN FJ, JIMENEZ A, BARROSO JB, PEDROSA JA, DEL MORAL ML, RODRIGO J et al. The innervation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteingene product 9.5 and neuronal nitric oxide synthase immunoreactivities. *J Anat* 1998; 193: 241-249.
182. BALLIGAND JL, KELLY BA, MARSDEN PA, SMITH TW, MICHEL T. Control of cardiac muscle cell function by an endogeneous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 347-351.
183. WÖRL J, MAYER B, NEUHUBER WL. Nitrgic innervation of the rat esophagus: focus on motor end plates. *J Auton Nerv Syst* 1994; 45: 78-84.
184. BURNSTOCK G. Co-tranmission. The fifth Heymans Memorial Lecture. *Arch Int Pharmacol Ther* 1990; 304: 7-33.
185. BURNET AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol* 1997; 157: 320-324.
186. WAY KJ, YOUNG HM, REID JJ. Diabetes does not alter the activity and localization of nitric oxide synthase in the rat anococcygeous muscle. *J Auton Nerv Syst* 1999; 76: 39-44.
187. LI H, FÖRSTERMANN U. Nitric oxide in pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-254.
188. SANCESARIO G, IANNONE M, MORELLO M, NISTICO G, BERNARDI G. Nitric oxide inhibition aggravates ischemic damage of hippocampal but not of NADPH neurons in gerbils. *Stroke* 1994; 25: 436-444.
189. GARTHWAITE G, GARTHWAITE J. Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1988; 26: 321-326.
190. FARACI FM, BRIAN JE. Nitric oxide and cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25: 692-703.
191. ZHANG J, SNYDER SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 213-233.
192. HOGG N, KALYANARAMAN B, JOSEPH J, STRUCK A, PARTHASARATHY S. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS Lett* 1993; 334: 170-174.
193. WINK DA, HANBAUER I, KRISHNA MC, DEGRAFF W, GAMSON J, MITCHELL JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 9813-9817.
194. ZHANG ZG, CHOPP M, ZALOGA C, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U. Cerebral endothelial nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 2016-2022.
195. DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 1996; 10: 179-190.
196. ZHANG X, VERGE V, WIESENFELD-HALLIN Z, JU G, BREDT D, SNYDER SH. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 1993; 335: 563-575.
197. ZHANG ZG, CHOPP M, GAUTAM S, ZALOGA C, ZHANG RL, SCHMIDT HHHW et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1994; 654: 85-95.
198. IZUMI Y, BENZ AM, CLIFFORD DB, ZORUMSKI CF. Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1992; 135: 227-230.

160. BOHME GA, BON C, LAMAIRE M. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9191-9194.
161. ESTAIL LB, GRANT SJ, CICALA GA. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 46: 959-962.
162. PAAKKARI I, LINDSBERG P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 1995; 27: 369-377.
163. VAID RR, YEE BK, SHALEV U, RAWLINS JN, WEINER I, FELDON J *et al*. Neonatal nonhandling and in utero prenatal stress reduce the density of NADPH-diaphorase-reactive neurons in the fascia dentata and Ammon's horn of rats. *J Neurosci* 1997; 17: 5599-5609.
164. DAWSON TM, DAWSON VL. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* 1994; 99: 9-20.
165. DUKE RC, OJCIUS DM, YOUNG JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275: 80-87.
166. SZABÓ C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 1996; 41: 131-141.
167. YUN HY, DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 300-310.
168. PARKINSON JF, MITROVIC B, MERRILL JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997; 75: 174-186.
169. NORRIS PJ, WALDVOGEL HJ, FAULL RL, LOVE DR, EMSON PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 1996; 4: 1037-1047.
170. SMITH MA, VASAK M, KNIPP M, CASTELLANI RJ, PERRY G. Dimethylargininase, a nitric oxide protein, in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 898-902.
171. YEW DT, WONG HW, LI WP, LAI HW, YU WH. Nitric oxide synthase in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1999; 89: 675-686.
172. HORTELANO S, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, HIRSCH T, SUSIN SA *et al*. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997; 410: 373-377.
173. JENNER P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 1: 24-34.
174. WONG NK, STRONG MJ. Nitric oxide synthase expression in cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Cell Biol* 1998; 77: 338-343.
175. GOOD PF, HSU A, WERNER P, PERL DP, OLANOW CW. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 338-342.
176. STRONG MJ, SOPPER, MM, CROW, JP, STRONG WL, BECKMAN JS. Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 157-164.
177. STRONG MJ. Neurofilament metabolism in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1999; 169: 170-177.
178. BAGASRA O, MICHAELIS FH, ZHENG YM, BOBROSKI LE, SPISTIN SV, FU ZF *et al*. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12041-12045.
179. SHERMAN MP, GRISCAVAGE JM, IGNARRO LJ. Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis. *Med Hypothesis* 1992; 39: 143-146.

180. HUANG PL, DAWSON TM, BREDT DS, SNYDER SH, FISHMAN MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 75: 1273-1286.
181. ESTEBAN FJ, JIMENEZ A, BARROSO JB, PEDROSA JA, DEL MORAL ML, RODRIGO J et al. The innervation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteingene product 9.5 and neuronal nitric oxide synthase immunoreactivities. *J Anat* 1998; 193: 241-249.
182. BALLIGAND JL, KELLY BA, MARSDEN PA, SMITH TW, MICHEL T. Control of cardiac muscle cell function by an endogeneous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 347-351.
183. WÖRL J, MAYER B, NEUHUBER WL. Nitrergic innervation of the rat esophagus: focus on motor end plates. *J Auton Nerv Syst* 1994; 45: 78-84.
184. BURNSTOCK G. Co-transmission. The fifth Heymans Memorial Lecture. *Arch Int Pharmacol Ther* 1990; 304: 7-33.
185. BURNET AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol* 1997; 157: 320-324.
186. WAY KJ, YOUNG HM, REID JJ. Diabetes does not alter the activity and localization of nitric oxide synthase in the rat anococcygeous muscle. *J Auton Nerv Syst* 1999; 76: 39-44.
187. LI H, FÖRSTERMANN U. Nitric oxide in pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-254.
188. SANCESARIO G, IANNONE M, MORELLO M, NISTICO G, BERNARDI G. Nitric oxide inhibition aggravates ischemic damage of hippocampal but not of NADPH neurons in gerbils. *Stroke* 1994; 25: 436-444.
189. GARTHWAITE G, GARTHWAITE J. Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1988; 26: 321-326.
190. FARACI FM, BRIAN JE. Nitric oxide and cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25: 692-703.
191. ZHANG J, SNYDER SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 213-233.
192. HOGG N, KALYANARAMAN B, JOSEPH J, STRUCK A, PARTHASARATHY S. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide. *FEBS Lett* 1993; 334: 170-174.
193. WINK DA, HANBAUER I, KRISHNA MC, DEGRAFF W, GAMSON J, MITCHELL JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 9813-9817.
194. ZHANG ZG, CHOPP M, ZALOGA C, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U. Cerebral endothelial nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 2016-2022.
195. DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 1996; 10: 179-190.
196. ZHANG X, VERGE V, WIESENFELD-HALLIN Z, JU G, BREDT D, SNYDER SH. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 1993; 335: 563-575.
197. ZHANG ZG, CHOPP M, GAUTAM S, ZALOGA C, ZHANG RL, SCHMIDT HHHW et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1994; 654: 85-95.
198. IZUMI Y, BENZ AM, CLIFFORD DB, ZORUMSKI CF. Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1992; 135: 227-230.

199. HAWKINS RD, ZHUO M, ARANCIO O. Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J Neurobiol* 1994; 25: 652-665.
200. ARANCIO O, KIEBLER M, LEE CJ, LEV-RAM V, TSIEN RY, KANDEL ER *et al*. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 1996; 87: 1025-1035.
201. BOXAL AR, GARTHWAITE J. Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 2209-2212.
202. GROSS SS, WOLIN MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
203. LIPTON SA, CHOI YB, PAN ZH, LEI SZ, CHEN HS, SUCHER NJ *et al*. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626-632.
204. BECKMAN JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 836-844.
205. OLNEY JW, LABRUYERE J, WANG G, WOZNIK DF, PRICE MT, SESSA MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 1991; 254: 1515-1518.
206. NOWICKI JP, DUVAL D, POIGNET H, SCATTON B. Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1991; 204: 339-340.
207. KIEDROWSKI L, COSTA E, WROBLEWSKI JT. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1992; 58: 535-541.
208. SZABÓ C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996; 6: 74-88.
209. STRIJBOS PJLM. Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 1993; 12: 223-243.
210. FOSMAN LJ, LIU P, NAGELE RG, YIN K, WONG PY-K. Augmentation of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem Res* 1998; 23: 141-148.
211. MARTIN LJ, AL-ABDULLA NA, BRAMBRINK AM, KIRSCH JR, SIEBER FE, PORTERA-CALLIAU C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998; 46: 281-309.
212. COLTON CA, GILBERT DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987; 341: 65-68.
213. HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623.
214. ALLEN SP, STONE D. Mitochondrial function in ischemia/reperfusion in the heart. En: *Mitochondria, DNA, Proteins and Disease*. Darley-Usmar VM, Schapiro AHV (eds). Portland Press, London 1994; pp. 143-155.
215. MORO MA, DARLEY-USMAR V, GOODWIN DA, READ NG, ZAMORA-PINO R, FELISCH M *et al*. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6702-6706.
216. VILLA LM, SALAS E, DARLEY-USMAR VM, RADOMSKI MW, MONCADA S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12383-12387.
217. LIZASOAIN I. NO and brain ischaemia. En: *Nitric Oxide: From Discovery to the Clinic*. Moncada S, Lamas S (eds.). Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, Madrid 1998; 70.



218. LIZASOAIN I, MORO MA, KNOWLES RG, DARLEY-USMAR V, MONCADA S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on respiration by brain mitochondria which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 1996; 314: 877-880.
219. MORO MA, LIZASOAIN I, KNOWLES NG, DARLEY-USMAR V, MONCADA S. Distinct effects of nitric oxide and peroxynitrite on brain mitochondria. Fourth International Meeting; Biology of Nitric Oxide. Amelia Island, Florida (USA) 1995.
220. MORO MA, DARLEY-USMAR VM, BROWN A, RADOMSKI MW, MONCADA S. The effects of peroxynitrite on human platelets. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 125P.
221. BECKMAN JS, CHEN J, CROW JP, YE YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 1994; 103: 371-380.
222. EISERICH JP, HRISTOVA M, CROSS CE, JONES AD, FREEMAN BA, HALLIWELL B et al. VLIET A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.
223. CASTRO L, RODRÍGUEZ M, RADI R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 29409-29415.
224. BERLETT BS, FIRGNET B, YIM MB, CHOCK PB, STADTMAN ER. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1776-1780.
225. GOW AJ, DURAN D, MALCOLM S, ISCHIROPOULOS H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996; 385: 63-66.
226. MARTIN BL, WU D, JAKES S, GRAVES DJ. Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1990; 265: 7108-7111.
227. KONG SK, YIM MB, STADTMAN ER, CHOCK PB. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH<sub>2</sub> peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3377-3382.
228. KAMISAKI Y, WADA K, BRIAN K, BANABANLI B, DAVIS K, MARTIN E et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11584-11589.
229. VASTAG M, SKOPAL J, KRAMER J, KOLEV K, VOKO Z, CSONKA E et al. Endothelial cells cultured from human brain microvessels produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor, and C4. *Immunobiology* 1998; 199: 5-13.
230. HEIDEMAN M. The role of complement in trauma. *Acta Chir Scand Suppl* 1985; 523: 233-244.
231. MORGAN BP, GASQUE P, SINGHRAN SK, PIDDLESDEN SJ. Role of complement in inflammation and injury in the nervous system. *Exp Clin Immunogen* 1997; 14: 19-23.
232. MAKRIDES SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 59-87.
233. HUANG J, KIM LJ, MEALEY R, MARSH HC JR, ZHANG Y, TENNER AJ et al. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science* 1999; 285: 595-599.
234. SRIRAMARAO P, DI SCIPIO RG. Deposition of complement C3 and factor H in tissue traumatized by burn injury. *Neuropharmacology* 1999; 42: 195-202.
235. YASOJIMA K, MCGEER EG, MCGEER PL. Complement regulators C1 inhibitor and CD59 do not significantly inhibit complement activation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1999; 833: 297-301.

236. COLLARD CD, AGAH A, STAHL GL. Complement activation following reoxygenation of hypoxic human endothelial cells: role of intracellular reactive oxygen species, NF-kappaB and new protein synthesis. *Immunopharmacology* 1998; 39: 39-50.
237. COLLARD CD, AGAH A, REENSTRA W, BURAS J, STAHL GL. Endothelial nuclear factor-kappaB translocation and vascular cell adhesion molecule-1 induction by complement: inhibition with antihuman C5 therapy or cGMP analogues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2623-2629.
238. VAKEVA A, MERI S. Complement activation and regulator expression after anoxic injury of human endothelial cells. *APMIS* 1998; 106: 1149-1156.
239. LINDSBERG PJ, OHMAN J, LEHTO T, LINDSBERG ML, PAETAU A, WUORIMAN T *et al*. Complement activation in the central nervous system following blood-brain barrier damage in man. *Ann Neurol* 1996; 40: 587-596.
240. MOLLNES TE, FOSSE E. The complement system in trauma-related and ischemic tissue damage: a brief review. *Shock* 1994; 2: 301-310.
241. IADECOLA C, ZHANG F, CASEY R, NAGAYAMA M, ROSS ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurochem* 1997; 17: 9157-9164.
242. McCANN SM. The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp Gerontol* 1997; 32: 431-440.
243. WARNER HR. Aging and regulation of apoptosis. *Curr Top Cell Regul* 1997; 35: 107-121.
244. PEINADO MA. Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 1-7.
245. NAGLEY P, WEI YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet* 1998; 14: 513-517.
246. JAZWINSKI SM. Genetics of longevity. *Exp Gerontol* 1998; 33: 773-783.
247. ROSE MR. Can human aging be postponed? *Sci Am* 1999; 281: 106-111.
248. CASTILLO J, DAVALOS A, NOYA M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349: 79-83.
249. McCANN SM, LICINIO J, WONG ML, YU WH, KARANTH S, RETTORRI V. The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp. Gerontol* 1998; 33: 813-826.
250. KNIGHT JA. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27: 1-25.
251. BRAECKMAN BP, HOUTHOOFD K, DE VREES A, VANFLETEREN JR. Apparent uncoupling of energy reduction and consumption in long-lived cell mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 1999; 9: 493-496.
252. FLOYD RA, CARNEY JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: 22-27.
253. FELDMANN G. Apoptosis or programmed cell death. *Ann Pathol* 1995; 15: 92-109.
254. WEI YH. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1998; 22: 55-67.
255. WEI YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 53-56.
256. BRAECKMAN BP, VANFLETEREN JR. Stress-inducible mechanisms of life-span extension in yeast, eubacteria and metazoas. *Trends Microbiol* 1999; 7: 270-271.
257. LY DH, LOCKHART DJ, LERNER RA, SCHULTZ PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 2000; 287: 2486-2492.

EL ÓXIDO NÍTRICO: SÍNTESIS, NEUROPROTECCIÓN Y NEUROTOXICIDAD

258. HERCE-PAGLIAI C, KOTECHA S, SHUKER DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998; 2: 324-336.
259. HOGG N. Free radicals. *Sem Reprod Endocrinol* 1998; 16: 24124-24128.
260. SIESJÖ BK, HU B, KRISTIAN T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 19-26.
261. YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.
262. ROSE MR. Genetics of aging in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 1999; 5: 577-585.
263. VANFLETEREN JR, BRAECKMAN BP. Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 487-502.
264. LIU CS, WU HM, KAO SH, WEI YH. Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin Neuropharm* 1998; 21: 62-64.
265. CULOTA MG, KOSHLAND ED Jr. No news is good news. *Science* 1992; 258: 1862-1865.