

# Casi todo sobre el óxido nítrico

Iván Pérez-Neri

## RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un mensajero que participa en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Es producido por diversos tipos celulares, puede tener efecto sobre casi cualquiera de ellos. Las principales reacciones que sufre el NO en sistemas vivos son la reacción con oxihemoglobina, interacción con los centros metálicos en algunas proteínas y su degradación por el anión superóxido. Participa en cascadas de señalización activando a guanilato ciclasa. En el sistema nervioso central, contribuye principalmente a acoplar el nivel de actividad cerebral con irrigación sanguínea, dirigir el crecimiento de las terminaciones nerviosas, además de regular la supervivencia y migración neuronales, la diferenciación de las células gliales y liberación de neurotransmisores. La formación de NO ocurre por actividad de la sintasa del NO (NOS), de la cual existen tres isoformas. El cerebro es el órgano que presenta la mayor actividad de la NOS. El principal neurotransmisor asociado con el NO es el glutamato. Se atribuyen al NO algunos efectos tanto tóxicos como protectores. La toxicidad del NO se conoce desde antes que sus efectos fisiológicos, se asocia con diversas patologías como la depresión, enfermedades neurodegenerativas, migraña, epilepsia y esclerosis múltiple. Las patologías en las que está involucrado el NO forman un conjunto muy diverso debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos en los que el NO participa y la variedad de células que lo producen y son sensibles a sus efectos.

**Palabras clave:** redox, excitotoxicidad, neuroprotección, isoenzimas.

## Almost all about nitric oxide

### ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a messenger that participates in several physiological and pathophysiological processes. It is produced by several cell types and may act on almost all of them. In living systems, its main reactions are interaction with oxyhemoglobin, with metals in proteins and its degradation by superoxide anion. It is part of signaling cascades by activating guanylate cyclase. In the central nervous system, it participates in the coupling of brain activity and blood flow, to guide nerve endings grow, to regulate neuronal migration and survival as well as glial cell differentiation and neurotransmitter release. NO is produced by NO synthase (NOS), of which three isoforms exist. The brain is the organ with the highest NOS activity. Glutamate is the main neurotransmitter associated with NO. Both toxic and protective effects are associated with NO. NO toxicity was known before its physiological function, it is associated with several pathologies including depression, neurodegenerative diseases, migraine, epilepsy and multiple sclerosis. Those pathologies involve the great amount of processes mediated by NO, all the cell types that produced it and all the cell that are responsive to this messenger.

**Key words:** redox, excitotoxicity, neuroprotection, isoenzymes

**E**l óxido nítrico (NO) es un mensajero no tradicional que ha puesto a trabajar a prácticamente al mundo entero en los años recientes. En 1988, Moncada, et al, concluyeron que el NO es el, hasta entonces,

denominado factor relajante derivado del endotelio<sup>1</sup>; en 1990, fue identificado como neurotransmisor parasimpático inhibitorio no adrenérgico no colinérgico<sup>2</sup>. Se han publicado más de 5,600 artículos sobre el NO

entre 1837 y 1987, y más de 190,000 de 1988 a la fecha. La importancia de este mensajero se debe a su participación en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

#### *Características generales del NO*

El NO es un gas incoloro producido por muchos tipos celulares, entre ellos se encuentran la glía, neuronas, células endoteliales, macrófagos, células intestinales y las de la retina<sup>3-8</sup>. Puede tener efecto sobre casi cualquier tipo celular en mamíferos<sup>9</sup>. Además de los humanos, también es producido por otros organismos como hongos, artrópodos y roedores<sup>10</sup>.

Su vida media en sistemas biológicos es de unos cuantos segundos a temperatura ambiente (alrededor de 10s<sup>8,11-14</sup>, 30 s<sup>15</sup> o hasta 50 s<sup>5,16</sup>), ya que se oxida formando nitritos y después, nitratos<sup>17-19</sup>, los cuales son los metabolitos estables de este gas.

Por ser no polar, puede difundir hacia afuera de las células que lo producen<sup>3,12,15,20-24</sup> a una velocidad de 50  $\mu\text{m}/\text{s}$ <sup>14</sup> hasta un radio de cuando menos 95  $\mu\text{m}$ <sup>8</sup>.

Al difundir, una parte del NO llega al torrente sanguíneo, en donde reacciona con la oxihemoglobina (u oximioglobina, en las células musculares) formando metahemoglobina y nitratos<sup>14,16</sup>; éste es el principal mecanismo que regula la concentración del NO *in vivo*<sup>25</sup>.

Este mensajero no es altamente reactivo a pesar de ser un radical libre, sólo reacciona con facilidad con otros radicales libres y metales de transición<sup>25</sup>. Tiene afinidad por átomos metálicos y grupos sulfhidrilo en proteínas como guanilato ciclasa, el receptor glutamatergico para NMDA, citocromo C y aconitasa, entre otras<sup>4-8,14,21,26,27</sup>.

Los eventos fisiológicos en los que participa son muchos, muy diversos reportados ampliamente en la literatura<sup>3,4,8,9,12,15,21-24,27-31</sup>. Estos efectos están mediados, al menos en parte, por la activación de guanilato ciclasa cuando el NO se une al grupo hemo de esta enzima, lo que resulta en la síntesis de GMPc, el cual activa diferentes procesos celulares<sup>5-8,11,14,22,29</sup>.

En los sistemas biológicos, el NO puede comportarse como un agente oxidante o reductor<sup>8,14</sup>. Puede perder un electrón, formando; así un catión nitrosonio, o ganar uno, convirtiéndose en anión nitroxilo. Estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS) pueden convertirse unas en otras de acuerdo con los cambios en el ambiente redox intracelular<sup>32</sup>.

Las principales reacciones que sufre el NO en sistemas vivos son tres: la reacción con oxihemoglobina, interacción con los centros metálicos en algunas proteínas y su degradación por el anión superóxido<sup>25</sup>.

#### *Efectos intracelulares e intercelulares del NO*

El NO participa en cascadas de transducción de señales mediante la activación de guanilato ciclasa. Esta enzima no se encuentra en las neuronas productoras de NO (excepto por las células granulares del cerebelo), lo que sugiere que existe una cooperación intercelular en la transmisión de estas señales<sup>8</sup>. Algunos autores consideran a la biosíntesis del NO como continuación de la señalización glutamatergica<sup>22,33</sup>.

En el sistema nervioso autónomo, el NO es el neurotransmisor de las terminales inhibitorias parasimpáticas no adrenérgicas-no colinérgicas<sup>2,3,8,9,21</sup>. Esas terminales inervan, entre otros, a tejidos gástrico y cardiaco. Pero el NO no es un neurotransmisor clásico, ya que no es liberado por exocitosis sino por difusión<sup>12,20,21,23,34</sup>, producido en el momento en que se requiere: no se almacena<sup>9,21,34</sup>.

En el sistema nervioso central (SNC), el NO contribuye principalmente a acoplar el nivel de actividad cerebral con la irrigación sanguínea al encéfalo, a dirigir crecimiento de las terminaciones nerviosas (tanto en el sistema visual como en corteza cerebral), además de regular la supervivencia y migración neuronales, así como la diferenciación de las células gliales y liberación de neurotransmisores<sup>9,12,13,21,29</sup>.

En el hipocampo, el NO participa en la potenciación a largo plazo<sup>3,8,9,21-23,34,35</sup> actuando como mensajero retrógrado al ser producido en terminales posinápticas, como respuesta a un estímulo (p. ej. glutamato), y difundir hacia las neuronas presinápticas en las que aumenta la liberación de neurotransmisores<sup>8,9,15,21-23</sup>.

El GMPc producido como respuesta a la activación de guanilato ciclasa, que media el NO, puede abrir directamente canales de calcio o activar proteincinasas de serina/treonina, lo que resulta en la regulación de diferentes procesos intracelulares<sup>9,10,21,29</sup>.

#### *Características de la sintasa del óxido nítrico*

La formación de NO se debe a una reacción catalizada por la sintasa del NO (NOS; L-arginina, NADPH: oxígeno reductasa; EC 1.14.13.39) (figura 1); ésta es una enzima homodimérica<sup>3,36</sup> que existe en al

---

*Recibido: 20 de julio 2015. Aceptado: 6 de agosto 2015.*

Departamento de Neuroquímica. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Iván Pérez-Neri, Departamento de Neuroquímica. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877. La Fama 14269 México, D.F. E-mail: ivanperezneri@hotmail.com

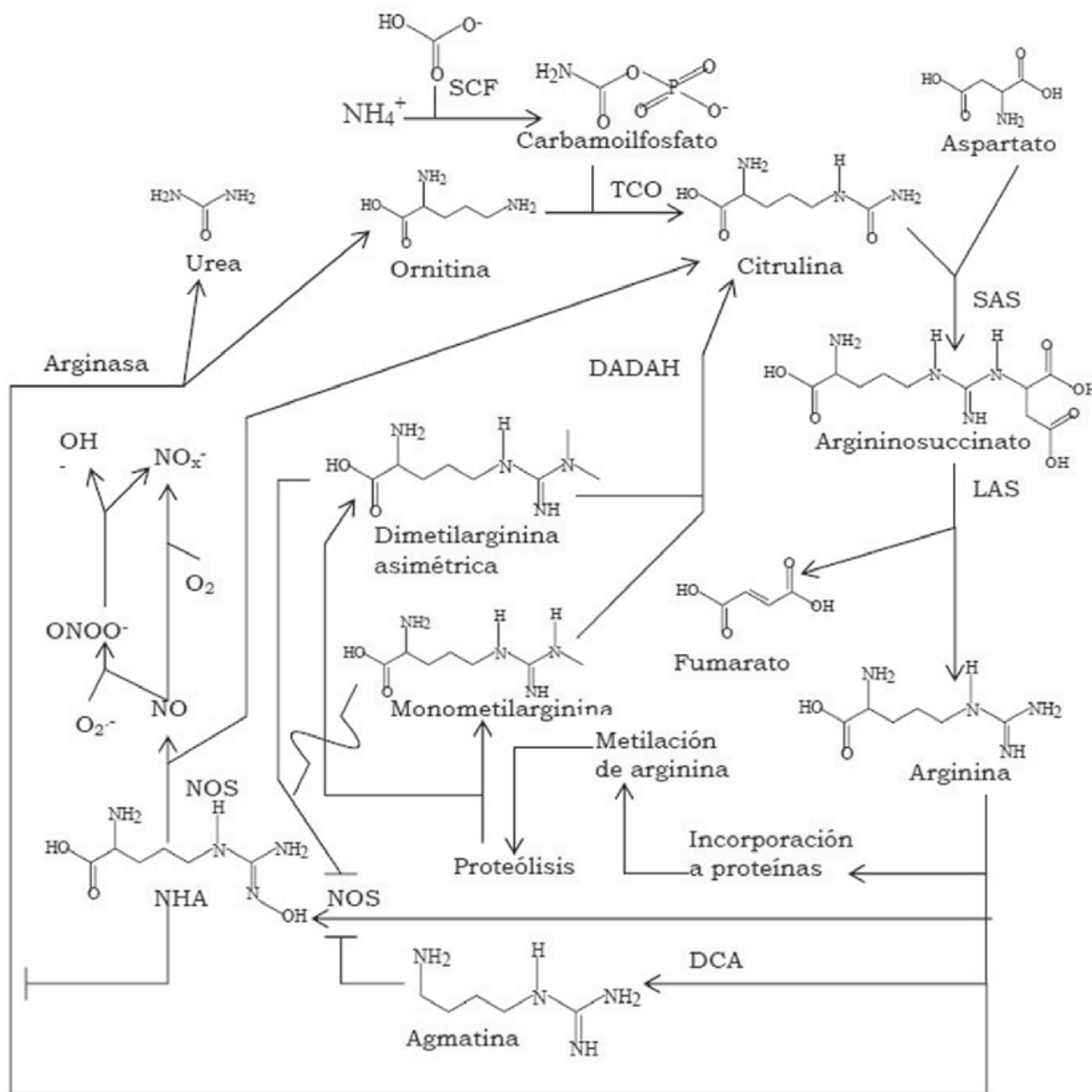
menos, tres isoformas. Las tres NOS's utilizan como sustrato 1 mol de L-arginina [ $K_m$  2-20  $\mu M$ <sup>18,37,38</sup>], además de 2 moles de  $O_2$ , y entre 1 y 2 moles de NADPH<sup>3,5,7,8,10,27,28,39-43</sup>, por cada mol de producto formado. Los cofactores requeridos para su actividad son FMN, FAD, protoporfirina IX, calcio-calmodulina y tetrahidrobiopterina<sup>3,6,8,10,15,21,22,31,42-44</sup>.

El producto de la actividad de esta enzima es una mezcla de cantidades equimolares de NO y L-citrulina

(figura 1)<sup>11,18,34,40</sup>. Los productos de la actividad de la NOS pueden detectarse en saliva, orina y aliento<sup>10</sup>; además, del líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre. El cerebro es el órgano que presenta la mayor actividad de la NOS en los humanos<sup>19</sup>.

En lo sucesivo se hablará en singular de la NOS para referirse en general a las tres isoformas de la enzima. Se especificará una isoenzima en particular sólo cuando sea necesario.

**Figura 1.** Vías metabólicas que tienen influencia directa sobre la síntesis del NO. DCA, descarboxilasa de arginina; DDAH, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa; LAS, liasa de argininosuccinato; NHA, N-hidroxiarginina; NO, óxido nítrico; NOS, sintasa del NO; SAS, sintetasa de argininosuccinato; SCF, sintetasa de carbamoilfosfato; TCO, transcarbamilasa de ornitina.



Las isoformas de la NOS que se expresan de forma constitutiva (NOS I y NOS III) dependen de calcio (al menos 80-100 nM<sup>7,10</sup>, 150 nM para el 50% de su actividad<sup>11</sup>) y calmodulina<sup>3,8,27,31,34,38,45</sup>.

La NOS *tipo I* se expresa principalmente en las neuronas, tanto en el cerebro como de la médula espinal y suprarrenal<sup>28</sup>, aunque también se encuentra en las células endoteliales<sup>27,39</sup> epiteliales en el pulmón, útero y estómago; asimismo, pueden encontrarse en el riñón, músculo esquelético, islotes pancreáticos y neutrófilos<sup>10,28,41,45</sup>. Se localiza en el citosol de estas células<sup>8,10</sup>, retículo endoplásmico<sup>38</sup> o también en la membrana neuronal asociada mediante otras proteínas con el receptor glutamatérgico para NMDA<sup>3,28,39,41</sup>.

Esta isoenzima es un homodímero de 280 kDa formado por monómeros  $\alpha$  hélice de 150-160 kDa<sup>8,34,39,45</sup>. Posee un dominio PDZ en su extremo N-terminal que permite su asociación con proteínas de membrana<sup>28,39,41</sup>. Está codificada en la región q24.2-q24.3 del cromosoma 12<sup>10,36,39</sup>, se conocen algunas variantes de procesamiento alternativo del transcrito primario de este gen<sup>28,39,41,46</sup>.

A nivel cerebral, la isoenzima tipo I se expresa sólo en algunos grupos neuronales pero no se relaciona con un sistema de neurotransmisión en particular<sup>21,34</sup>, sino que puede encontrarse junto con células glutamatérgicas, GABAérgicas, peptidérgicas, colinérgicas o células neuroendócrinas del hipotálamo<sup>21</sup>.

La isoforma inducible (NOS II) es independiente de calcio y calmodulina<sup>6,8,15,27</sup>. Se encuentra principalmente en el citosol de algunas células que participan en la respuesta inmune, como los macrófagos y los neutrófilos<sup>8,15,27,36,38,41</sup>. Está codificada en la región cen-q11.2 del cromosoma 17<sup>36,39</sup>. En el SNC, se localiza en los astrocitos y las células microgliales<sup>8,27,32,36,41,47</sup>. La expresión de esta isoenzima puede inducirse con el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el interferón (IFN)- $\gamma$ , en células como los hepatocitos y las neuronas<sup>3,10,15,22,27,33,36,39,41,45</sup>, y en prácticamente cualquier tipo celular durante una respuesta inmune<sup>9,36,38,45</sup>. Una vez que esta enzima es sintetizada *de novo* puede producir cantidades mayores de NO que las otras isoenzimas<sup>27,36</sup> y por periodos de hasta 5 días<sup>36</sup>.

La NOS III se localiza principalmente en la membrana de células endoteliales de vasos sanguíneos<sup>8,15,21,27,28,38</sup>, en el citosol de los macrófagos<sup>8</sup> y astrocitos<sup>3</sup>, células epiteliales de los túbulos renales, células intersticiales del colon canino y neuronas de varias regiones cerebrales<sup>8,10,29,39</sup> incluyendo hipocampo<sup>28,35</sup>. Está codificada en la región q35-q36 del cromosoma 7<sup>10,36,39</sup>. Tiene un peso molecular de 133-135 kDa<sup>39,45</sup> y no se conocen variantes de procesamiento alternativo del transcrito primario correspondiente a esta proteína<sup>39</sup>.

Su anclaje a la membrana celular se debe a la presencia de un sitio de miristoilación<sup>10,28,41,45</sup> en el residuo Gly2 de su extremo N-terminal, y sitios de palmitoilación en residuos Cys15 y Cys26 del mismo extremo<sup>28,39,41</sup>. Esta isoenzima se encuentra en forma particulada (90% del total de la proteína) y tiene como principales efectos fisiológicos la dilatación de los vasos sanguíneos y el bloqueo de la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y plaquetas<sup>27</sup>.

Las tres isoenzimas contienen dominios de reductasa y oxigenasa<sup>8</sup>, y producen NO a partir del grupo guanidino de arginina en una reacción estereoespecífica para el isómero L de este aminoácido.

La NOS se ha localizado por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en neuronas y endotelio vascular que irriga al cerebro<sup>3,8,35</sup>, además de las células gliales<sup>8,35</sup>. Las regiones cerebrales que más expresan esta enzima son cerebelo<sup>3,8,34,35,48-50</sup>, hipocampo<sup>3,50</sup> y bulbo olfatorio<sup>8,49</sup>; sólo el 2% de las neuronas (o menos) presentan la enzima en la corteza cerebral<sup>3,8,34,50</sup>, cuerpo estriado<sup>3,8,50</sup>, en general, región anterior del cerebro<sup>49</sup>. Los ensayos de actividad de la NOS reflejan una distribución similar: mayor actividad en el cerebelo y algunas regiones límbicas, baja actividad en estriado, hipocampo y corteza cerebral<sup>19</sup>.

Como parte de la biosíntesis del NO, la NOS cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a peróxido y superóxido<sup>32,39,45,47</sup>; este último se detecta libre cuando la NOS actúa con niveles de arginina por debajo del óptimo<sup>8,21,26,36,39,41,42,45,51</sup>, que es de 100-300  $\mu$ M<sup>3,18,6,43</sup>.

El mecanismo aceptado para la actividad de la NOS involucra el transporte de electrones desde el NADPH hasta el oxígeno unido al grupo hemo de la enzima a través de los nucleótidos de flavina (FAD y FMN, en ese orden)<sup>39,41,43</sup>. Esta transferencia ocurre desde el dominio reductasa de una subunidad hasta el dominio oxigenasa de la otra<sup>39</sup>.

El primer paso en la catálisis enzimática es la hidroxilación de L-arginina, la cual forma como intermedio a la N<sup>w</sup>-hidroxi-L-arginina (NHA, figura 1)<sup>26,31,39,41,45</sup> en una reacción que requiere de un mol de O<sub>2</sub> y uno de NADPH en presencia de tetrahidrobiopterina<sup>39,45</sup>.

El segundo paso en la biosíntesis del NO es la oxidación de NHA para formar NO y citrulina (figura 1)<sup>45</sup>.

#### *Metabolismo y transporte de arginina*

La biosíntesis de arginina comienza con la síntesis de ornitina, la cual sucede en dos etapas catalizadas por la sintetasa I de carbamoilfosfato (EC 6.3.4.16) y carbamoiltransferasa (o transcarbamilasa) de ornitina (EC 2.1.3.3, figura 1)<sup>3,46</sup>. Estas enzimas se localizan en la matriz mitocondrial y sólo se expresan juntas en los

hepatocitos periportales, las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado y colonocitos<sup>3</sup>, aunque se ha reportado una baja actividad de ambas enzimas en el cerebro de los recién nacidos<sup>3</sup>.

La transcaramilasa de ornitina<sup>8,48</sup> y la sintetasa I de carbamoilfosfato<sup>48</sup> no se expresan en el cerebro adulto, por lo que dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) y la NOS parecen ser las únicas enzimas que sintetizan citrulina en el SNC (figura 1)<sup>3,48</sup>.

La mayor parte de la ornitina que obtiene un adulto proviene de la dieta o es producida únicamente por el intestino, el cual libera citrulina a la circulación general para que esta sea captada por los riñones, entre otros tejidos, en donde las células de los túbulos proximales sintetizan arginina y la liberan al torrente sanguíneo (figura 1)<sup>3</sup>.

La conversión de citrulina en arginina es un proceso necesario para completar la ruta planteada arriba. Esto requiere de dos enzimas citosólicas que parecen expresarse en cualquier tipo celular<sup>3,38,52</sup>: la sintetasa (EC 6.3.4.5) y la liasa (EC 4.3.2.1) de arginino-succinato (figura 1)<sup>3,8,48</sup>. Ambas enzimas se localizan en algunas neuronas, pero no en las mismas, lo que sugiere que existe cooperación interneuronal en la biosíntesis de arginina en el SNC<sup>3,8,48</sup>. Del mismo modo, la NOS y la sintetasa de argininosuccinato se expresan por lo general en diferentes neuronas<sup>48</sup>, por lo que también la reutilización de citrulina para la ruta arginina-NO/citrulina es un proceso intercelular. La síntesis de arginino-succinato es la única ruta metabólica conocida en la que citrulina actúa como sustrato (figura 1)<sup>48</sup>. El argininosuccinato debe ser liberado por las células que lo producen y captado por otras células, (quizás) mediante transportadores para péptidos<sup>3</sup>, para ser convertido en arginina (figura 1). El paso limitante para la síntesis de arginina es la formación de argininosuccinato, ya que depende de la disponibilidad de aspartato (figura 1)<sup>3</sup>.

La arginina es transportada bidireccionalmente a través de la barrera hematoencefálica (BHE)<sup>18,53</sup>. En el SNC, este aminoácido se almacena principalmente en los astrocitos<sup>3</sup>; estas células cuentan con las enzimas necesarias para la síntesis de aspartato, arginino-succinato, arginina y citrulina; pueden realizar el ciclo completo citrulina-arginina-NO/citrulina, además de que expresan los transportadores que captan arginina. Todo esto favorece la acumulación de este aminoácido en los astrocitos, desde los cuales se libera por la estimulación de receptores glutamatérgicos no-NMDA para ser captado por las neuronas que producen NO<sup>3</sup>.

La arginina sintetizada en riñones o hígado del adulto<sup>3</sup> puede ser utilizada para la formación de NO y citrulina en casi cualquier tipo celular<sup>3</sup> mediante la captación de arginina a través del sistema de transportadores y<sup>+</sup>, con contribuciones menores de otros

sistemas<sup>3,36</sup>. El sistema y<sup>+</sup> se caracteriza principalmente por tener alta afinidad para aminoácidos catiónicos (arginina, lisina, ornitina y derivados metilados de arginina), ser independiente de sodio extracelular; expresarse en células endoteliales, macrófagos, células de musculatura lisa, neuronas, astrocitos, microglia, células del epitelio del plexo coroideo, entre otras; y permitir la captación mitocondrial de arginina<sup>3,38,52</sup>. La presencia de este sistema transportador en el plexo coroideo permite la captación de arginina circulante en la sangre hacia el LCR y el cerebro. Todos los aminoácidos catiónicos compiten por este sistema de transporte<sup>38,54</sup>.

Arginasa (EC 3.5.3.1) [ $K_m$  1-3 mM<sup>18</sup> o hasta 20 mM<sup>38</sup>] se expresa también en el SNC. Esta enzima participa en la regulación de la biosíntesis del NO modificando la disponibilidad del sustrato de la NOS (L-arginina, figura 1)<sup>6,55</sup>. En el SNC, arginasa puede encontrarse principalmente en las neuronas del cerebelo, corteza cerebral y bulbo olfatorio, entre otras regiones; una de sus isoformas se localiza en las células gliales<sup>3</sup>. Ambas isoenzimas parecen expresarse juntas sólo en los macrófagos<sup>3</sup>.

Otra ruta del catabolismo de arginina se debe a la actividad de la descarboxilasa de arginina (EC 4.1.1.19, figura 1), la cual es una enzima mitocondrial que se expresa en diferentes órganos incluyendo al cerebro<sup>3,38</sup>. Se ha propuesto que agmatina (el producto de la descarboxilación de arginina) puede tener funciones como mensajero sobre receptores adrenérgicos y regulador de la proliferación celular<sup>3,38</sup>, modulador del receptor glutamatérgico para NMDA<sup>3</sup> o como inhibidor competitivo de la NOS<sup>3,38</sup>.

Los residuos de arginina que hayan sido incorporados durante la síntesis de proteínas pueden ser metilados como modificación postraducciona y después ser liberados por proteólisis (figura 1)<sup>3,45</sup>. Esto genera derivados metilados de arginina, como N<sup>ω</sup>-monometil-L-arginina y N<sup>ω</sup>,N<sup>ω</sup>-dimetil-L-arginina (dimetilarginina asimétrica), los cuales son inhibidores competitivos de la NOS (figura 1)<sup>3,45,56,57</sup> y se han encontrado en regiones cerebrales como cerebelo, hipocampo, hipotálamo y bulbo olfatorio<sup>3</sup>. La enzima que degrada a estos compuestos es la DDAH (EC 3.5.3.18, figura 1), la cual se expresa en diferentes células incluyendo a los astrocitos y neuronas de algunas regiones cerebrales (principalmente en la corteza cerebral y tálamo, además del hipotálamo y cerebelo) y produce citrulina<sup>3,45</sup>. El efecto global de esta enzima es favorecer la actividad de la NOS de manera directa, por la hidrólisis de los inhibidores e indirecta por la producción de citrulina, la cual puede ser convertida en arginina aumentando así la disponibilidad del sustrato de la NOS (figura 1).

Arginina es también un activador alostérico de la sintetasa de N-acetilglutamato, una enzima hepática que cataliza la conversión de glutamato y acetil-CoA en N-acetilglutamato, el cual es un cofactor para la sintetasa I de carbamoilfosfato<sup>38</sup>. Esto completa el ciclo metabólico de arginina.

#### Regulación de la biosíntesis y los efectos del NO

En el SNC, el principal neurotransmisor asociado con la actividad de la NOS es el glutamato<sup>29</sup>, mediante el receptor tipo NMDA<sup>22,34</sup>, pero también está reportada la síntesis de NO mediada por bradicinina, norepinefrina, serotonina, vasopresina y acetilcolina<sup>5,8,10,15,42,44</sup>, entre otros.

La disponibilidad del sustrato y los cofactores de la NOS regula la actividad de esta enzima<sup>45,58</sup>. En condiciones fisiológicas, se considera que la NOS trabaja con niveles de arginina menores al óptimo, de modo que la actividad de esta enzima aumenta cuando se agrega arginina a un sistema *in vitro*<sup>3</sup> o *in vivo*<sup>19</sup> disminuye, por ejemplo, cuando se reduce la ingesta de arginina en los adultos<sup>38</sup>. Asimismo, disminuye la actividad de la NOS entre 18 y 42% en varias regiones cerebrales de animales deficientes en la transcarbamilasa de ornitina<sup>59</sup>. En el SNC, el glutamato induce la liberación de arginina por parte de las células que la producen y almacenan (astrocitos)<sup>3</sup>, favoreciendo la captación neuronal de arginina y la actividad de la NOS.

Cuando la NOS I se encuentra separada de tetrahidropterina puede mantener su función de NADPH oxidasa, e incluso en presencia de concentraciones elevadas de arginina (pero en ausencia del cofactor) puede tener esa actividad sin que se observe la formación de citrulina<sup>41</sup>.

La NOS es susceptible de ser fosforilada en residuos de serina<sup>34,36</sup> por proteincinasas como PKA, PKG, y CaMK<sup>8,28,33,34,36,45</sup>. Todas estas enzimas pueden disminuir la actividad de la NOS *in vitro*<sup>8,28,33,34,39</sup>, aunque algunos estudios reportan que la fosforilación de la NOS no afecta su actividad y otros indican que la aumenta<sup>36</sup>.

El NO regula negativamente su biosíntesis, por retroalimentación sobre la NOS, uniéndose al grupo hemo de esta enzima<sup>8,41,45</sup>. De forma indirecta, el NO regula su biosíntesis mediante S-nitrosilación del receptor glutamatérgico para NMDA, bloqueando temporalmente su activación<sup>8,27,32</sup>.

Por otro lado, el argininosuccinato podría actuar como neuromodulador sobre receptores glutamatérgicos<sup>48</sup>; en estudios *in vitro*, reduce el aumento intracelular de calcio inducido por glutamato<sup>3</sup> y podría así reducir la síntesis del NO. La producción de agmatina aumenta en los astrocitos por efecto del IFN- $\gamma$  y puede

regular negativamente la síntesis del NO, no sólo en los mismos astrocitos sino también en la microglia y neuronas<sup>3</sup>.

También la producción de metilargininas puede disminuir la actividad de la NOS<sup>3,7,22</sup>; de hecho, a nivel cerebral, estos derivados metilados se localizan principalmente en cerebelo y bulbo olfatorio, que son las regiones del encéfalo que más NO producen y que menos expresan la enzima que degrada a estos inhibidores (DDAH).

Otro mecanismo regulador de los efectos del NO es el aumento de la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc dependiente de calcio y calmodulina, la cual se activa como respuesta a las mismas concentraciones intracelulares de calcio que activan a la NOS<sup>8,21</sup>. Además de esto, el anión superóxido inhibe reversiblemente a guanilato ciclasa y estimula la actividad de la NOS<sup>8</sup>.

La expresión de la sintetasa de argininosuccinato es un punto clave en la regulación de la biosíntesis del NO ya que cataliza el paso limitante en la síntesis de arginina (figura 1), por lo que esta enzima puede favorecer o no la actividad de la NOS. La inhibición de esta enzima disminuye notablemente la formación de NO en astrocitos, aún en presencia de arginina extracelular<sup>3,38</sup>.

La NOS tipo I puede ser activada por diferentes mensajeros primarios como glutamato, noradrenalina, acetilcolina, vasopresina, oxitocina y algunas citocinas<sup>15</sup>. La expresión de esta isoforma es constitutiva pero puede inducirse por diferentes estímulos como dolor, estrés térmico, tratamiento con colchicina o litio, estimulación eléctrica del músculo esquelético, procesos infecciosos, disminución de la transmisión glutamatérgica, algunos esteroides (como estradiol y testosterona pero no los glucocorticoides), y la encefalomielitis alérgica experimental<sup>28,45</sup>. Los glucocorticoides disminuyen su expresión, al igual que el LPS y el INF- $\gamma$ <sup>28</sup>. Al ser fosforilada, esta enzima se separa de las proteínas de membrana a las que normalmente se asocia, desplazándose hacia el citosol neuronal y perdiendo su acoplamiento con el receptor glutamatérgico para NMDA<sup>33</sup>.

Las citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1, el IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , además del LPS y el péptido amiloide  $\beta$  entre otros, aumentan la biosíntesis del NO favoreciendo la expresión de la NOS II<sup>3,8,10,15,18,27,31,32,47</sup>.

La expresión de esta isoenzima puede reducirse también por efecto de otras citocinas como IL-4 e IL-10<sup>27,28,33</sup>, IL-8, el factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ <sup>10,28</sup>, además de la noradrenalina, el AMPc<sup>10,27,33</sup>, los inhibidores de cinasas de tirosina y del factor nuclear (NF)-kB<sup>28</sup>, y los glucocorticoides (en especial el cortisol y cortisona)<sup>9,15,22,28</sup>.

La NOS tipo III es constitutiva pero su expresión puede inducirse mediante hormonas<sup>15</sup> como estró-

genos<sup>28</sup>, además del ejercicio<sup>28,36</sup>, hipoxia<sup>36</sup> y estrés provocado por el flujo sobre los vasos sanguíneos<sup>28</sup>. Este último factor es capaz de estimular la actividad de la NOS III aún en ausencia de calcio extracelular y en presencia de antagonistas de calmodulina<sup>28</sup>, lo que representa un comportamiento similar al de la NOS II.

Esta isoenzima aumenta su actividad al ser fosforilada en ser1179<sup>39</sup> aunque, en otros casos, puede hacer que se separe de la membrana celular y se desplace hacia el citoplasma reduciendo así su actividad<sup>28,35,36</sup>. La hipoxia regula negativamente la expresión de la NOS III en el endotelio de la arteria pulmonar disminuyendo su transcripción y desestabilizando su ARNm, mientras que aumenta la expresión de la NOS III en endotelios no pulmonares<sup>28</sup>. El TNF- $\alpha$  desestabiliza al ARNm de esta proteína<sup>28,36</sup> sin afectar su transcripción<sup>28</sup>. También disminuye la biosíntesis del NO mediada por esta isoenzima cuando se presentan mutaciones en los sitios de miristoilación y palmitoilación, lo que evita su acoplamiento a la membrana celular<sup>28,36</sup>. La NOS III puede formar complejos que la inactivan con proteínas como caveolina-1, la cual puede ser desplazada por calmodulina revirtiendo así la inactivación<sup>29</sup>.

#### Efectos tóxicos y protectores del NO

Se le atribuyen al NO algunos efectos protectores, como el evitar la muerte celular por apoptosis, así como reducir la toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la peroxidación de lípidos<sup>14,60</sup>.

El NO evita el ensamble de la oxidasa de NADPH<sup>60</sup>, que es la principal enzima responsable del estrés oxidante durante una respuesta inmune celular. Estos efectos protectores suceden a concentraciones bajas de NO y es la elevación en dicha concentración lo que da lugar a los efectos tóxicos que se le atribuyen<sup>58</sup>, porque permite la formación de las RNOS que son las principales responsables de dichos efectos.

El NO no es neurotóxico *per se*<sup>33</sup> ya que no reacciona fácilmente con la mayoría de las biomoléculas más que con los centros metálicos de algunas proteínas<sup>14,25</sup>. Para que el NO reaccione con grupos sulfhidrilo debe ser primero oxidado formando un catión nitrosonio<sup>24,25,32</sup>, el cual forma complejos nitrosotiol que pueden transferir al nitrosilo de un tiol a otro<sup>24</sup>. Los nitrosotioles favorecen la formación de puentes disulfuro<sup>24</sup> y pueden alterar la estructura de algunas proteínas.

La toxicidad del NO se conoce desde antes que sus efectos fisiológicos. Este gas se encuentra en el humo del tabaco<sup>14</sup>, en la atmósfera como contaminante ambiental<sup>5,14</sup> y participa indirectamente en la formación de la lluvia ácida<sup>5</sup>. Es potencialmente mutagénico por su

capacidad para formar nitrosaminas<sup>9</sup>, causar rupturas en moléculas de ADN<sup>33,58</sup> e inhibir a las enzimas reparadoras del mismo<sup>58</sup>.

Las células productoras de NO son resistentes a efectos tóxicos que derivan de dicha función<sup>22,32,34,47,61,62</sup>; sin embargo, el resto de las células en un tejido son susceptibles. Esto se debe quizás a una mayor expresión de la dismutasa de superóxido (SOD) que limite la reacción entre el NO y el anión superóxido en estas células (figura 1), pero no en neuronas circundantes<sup>33,34</sup>.

En los mamíferos, la participación del NO en la excitotoxicidad mediada por el glutamato se apoya en algunas evidencias como el que un aumento de 2-5  $\mu$ M en la concentración de glutamato en el LCR puede resultar en daño neuronal<sup>63</sup>. La participación de los receptores glutamatérgicos para NMDA en estos procesos se relaciona con el aumento intracelular de calcio<sup>6,27</sup>, lo que puede estar, a su vez, relacionado con la actividad de la NOS. Además, la estimulación neuronal con 300  $\mu$ M NMDA por 24 hs provoca muerte celular *in vitro*<sup>6,64</sup> y este efecto puede ser bloqueado por la adición de arginasa al medio de cultivo<sup>6</sup>.

La participación de las células gliales en la neurotoxicidad<sup>8,27,33</sup> es en particular importante ya que estas células expresan la NOS tipo II, que es la isoenzima de mayor producción de NO, lo que favorece la presentación de efectos tóxicos en el tejido nervioso<sup>8</sup>; además, estas células también producen superóxido<sup>25</sup>, que favorece la formación de RNOS (figura 1).

Fisiológicamente, la concentración del NO se mantiene baja mediante su degradación por reducción u oxidación a nivel del complejo IV de la cadena respiratoria<sup>16,33</sup> o su reacción con la oxihemoglobina<sup>14</sup> formando nitratos y metahemoglobina<sup>45</sup>; esta regulación es importante porque la concentración del NO determina, al menos en parte, la presentación de efectos tóxicos<sup>25</sup>. Pero esto es también relativo Wink, et al<sup>60</sup> consideran que el exceso del NO puede frenar la toxicidad del peroxinitrito ya que estas dos especies pueden reaccionar entre sí formando otras menos reactivas como NO<sub>2</sub>.

El NO puede inhibir directamente, por nitrosilación en residuos de cisteína, a diversas proteínas como catepsina B, O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa y las deshidrogenasas de alcohol, aldehído y gliceraldehído 3-fosfato<sup>24</sup>, entre otras. También inhibe reversiblemente a la reductasa de ribonucleótidos<sup>14,15,21,25,27</sup> y a catalasa<sup>25</sup>. Adicionalmente, puede alterar la integridad de la BHE<sup>62</sup>.

Las funciones reductasa y oxigenasa de la NOS son independientes, por lo que la presencia de bajas concentraciones de arginina (o incluso su ausencia) reduce la función oxigenasa pero sin disminuir la reduc-

ción de oxígeno, permitiendo; así la producción simultánea de NO y superóxido<sup>41,51</sup>. Este último, al reaccionar con el NO<sup>3,5,17,24,25,27,32,41,47,51</sup> de 3-6 veces más rápido que con la SOD<sup>8,14,25,36</sup>, forma peroxinitrito [vida media de 1.9s a pH=7.4<sup>5</sup>] (figura 1).

La SOD es una de las proteínas susceptibles de ser nitrada en residuos de tirosina [Tyr35 y Tyr136 en el sitio activo de la SOD dependiente de manganeso<sup>65</sup>] mediada por peroxinitrito. Esta modificación evita que la enzima pueda unirse al anión superóxido<sup>8,65</sup>, dejándolo libre y favoreciendo así la formación de peroxinitrito<sup>8</sup>. El superóxido también puede generarse por auto-oxidación de tetrahidrobiopterina cuando ésta no se encuentra unida a la NOS<sup>41</sup>, por lo que puede formarse peroxinitrito aún en presencia de concentraciones elevadas de arginina.

El peroxinitrito es capaz de inhibir a la alquiltransferasa (que repara al ADN) y enzimas del citocromo P450<sup>16</sup>, además de oxidar sustratos como desoxirribosa formando malonildialdehído<sup>5</sup> e iniciar la peroxidación de lípidos<sup>32,33,62</sup>. El peroxinitrito también puede oxidar tioles<sup>32,42</sup> además de nitrar y nitrosar diferentes aminoácidos<sup>42</sup>, principalmente tirosina<sup>14,25,41,62,65-67</sup>, en presencia de átomos metálicos<sup>14,25</sup> y estimular la liberación de arginina por los astrocitos<sup>3</sup> favoreciendo; así la producción de NO, pero también la del mismo peroxinitrito. Este anión es sólo tóxico para las células que lo producen porque no difunde a través de la membrana celular<sup>60</sup>.

Además de los efectos directos del peroxinitrito, éste puede descomponerse formando un radical hidroxilo, el cual es también un agente oxidante (figura 1)<sup>5</sup>. El anión peroxinitrito es estable en a pH básico, pero al ser protonado en condiciones fisiológicas [pK<sub>a</sub>=6.6 a 0°C<sup>5</sup>] se descompone por dos posibles mecanismos: 70-80% se reordena formando nitratos pero ninguna especie reactiva, mientras que el resto sufre ruptura homolítica del enlace peróxido dando lugar a la formación de NO<sub>2</sub> y un radical hidroxilo (figura 1)<sup>5,32,47</sup>.

La presentación de efectos tóxicos depende también de cuál sea la RNOS formada. Mientras que el peroxinitrito es neurotóxico, el catión nitrosonio presenta un efecto protector, quizás al inactivar por nitrosación al receptor glutamatérgico para NMDA<sup>8,33</sup>. En cambio, el dióxido de nitrógeno es un fuerte oxidante [E°=0.9 V<sup>5</sup>] capaz de iniciar la peroxidación de ácidos grasos y nitrosación de aminoácidos aromáticos<sup>5</sup>.

En general, el efecto de las RNOS es la oxidación de sustratos celulares y nitración de proteínas en sus residuos de tirosina<sup>42,65</sup>. La nitrotirosina se forma de manera natural, pero su concentración aumenta de forma considerable en condiciones patológicas<sup>51</sup>. Sólo algunas proteínas son susceptibles de ser nitradas y, de

ellas, no cualquier residuo de tirosina nitrado inactivará su función<sup>51</sup>, por lo que este efecto tóxico es relativamente limitado.

Además, los efectos tóxicos del NO dependen también de la etapa de desarrollo en que se encuentren las células; las concentraciones elevadas de NO que causan muerte celular a neuronas maduras, detienen el crecimiento de las inmaduras y favorecen su diferenciación<sup>27</sup>.

A consecuencia del estrés oxidante las células pueden responder con la síntesis de moléculas como glutatión, el cual puede captar al peroxinitrito<sup>51</sup> y a otras RNOS<sup>14</sup>, y de enzimas como la SOD, la cual puede disminuir la formación del peroxinitrito<sup>21,24</sup>. La SOD reduce el daño neuronal en modelos animales de isquemia cerebral<sup>21</sup>. Paradójicamente, la presencia de la SOD dependiente de Cu y Zn favorece la nitración de otras proteínas causada por el anión peroxinitrito<sup>25,51,62</sup>, porque la nitración de tirosina requiere de la presencia de átomos metálicos como los de la SOD<sup>14,25</sup>.

#### *El NO en algunas patologías del SNC*

Además de sus efectos fisiológicos, el NO se asocia directa o indirectamente con diversas patologías como depresión<sup>55</sup>; enfermedades de Huntington<sup>8,21,32</sup>, Alzheimer<sup>3,21,62</sup> y Parkinson<sup>32,33,62</sup>; esclerosis lateral amiotrófica<sup>21,25,32,62</sup>, encefalopatía hepática<sup>3</sup>, migraña, epilepsia<sup>9</sup>, encefalitis autoinmune y viral<sup>10</sup>, y la esclerosis múltiple<sup>33,62</sup>, entre otras.

Las patologías en las que está involucrado el NO no sólo son enfermedades infecciosas o degenerativas, forman un conjunto muy diverso debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos en los que el NO participa y la variedad de células que lo producen y/o son sensibles a sus efectos.

#### REFERENCIAS

1. Moncada S, Radomski M, Palmer R. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:2495-501.
2. Bult H, Boeckxstaens G, Pelckmans P, Jordaens F, Maercke M, A. Herman. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nat* 1990; 345:346-7.
3. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:365-91.
4. Adams M, Nock B, Truong R, Cicero T. Nitric oxide control of steroidogenesis: endocrine effects of N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sci* 1991; 50:PL35-PL40.
5. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1620-4.
6. Dawson V, Dawson T, London E, Bredt D, Snyder S. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical



- cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6368-71.
7. Knowles R, Palacios M, Palmer R, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5159-62.
  8. McCaslin P, Oh S. Nitric oxide and glutamate receptors. En: Stone T ed. *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate*. Nueva York: CRC Press, 1995.
  9. Schmidt H, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78:919-25.
  10. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78:915-8.
  11. Bredt D, Snyder S. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86:9030-3.
  12. Edelman M, Gally J. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11651-2.
  13. Hess D, Patterson S, Smith D, Skene P. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 1993; 366:562-6.
  14. Wink D, Grisham M, Mitchell J, Ford P. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 1996; 268:12-31.
  15. Michal G. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. Berlin: John Wiley & Sons, 1999.
  16. Clarkson R, Norby S, Smirnov A, Boyer S, Vahidi N, Nims R, et al. Direct measurement of the accumulation and mitochondrial conversion of nitric oxide within chinese hamster ovary cells using an intracellular electron paramagnetic resonance technique. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243:496-502.
  17. Molina J, Leza J, Ortiz S, Moro M, Pérez S, Lizasoain I, et al. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of nitric oxide metabolites are increased in dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 2002; 333:151-3.
  18. Buga G, Singh R, Pervin S, Rogers N, Schmitz D, Jenkinson C, et al. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N<sup>6</sup>-hydroxy-L-arginine during high-output no production. *Am J Physiol* 1996; 271:H1988-H98.
  19. Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos P. Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem* 1996; 66:1683-90.
  20. Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, et al. Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619:301-316.
  21. Brenman J, Bredt S. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol* 1996; 269:119-129.
  22. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002-12.
  23. Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems*. 4<sup>o</sup>. Edición. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole, 2001.
  24. Stamler J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78:931-6.
  25. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 40:C1424-C37.
  26. Marletta M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78:927-30.
  27. Muñoz-Fernández M, Fresno M. The role of tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 56:307-40.
  28. Förstermann U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. En: Mayer B, ed. *Handbook of experimental pharmacology: nitric oxide*. Vol. 143. Berlin: Springer, 2000.
  29. Garthwaite J. The physiological roles of nitric oxide in the central nervous system. En: Mayer B, ed. *Handbook of experimental pharmacology: nitric oxide*. Vol. 143. Berlin: Springer, 2000.
  30. Schmidt H, Warner T, Ishii K, Sheng H, Murad F. Insulin secretion from pancreatic b cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science*. 1992; 255:721-3.
  31. White K, Marletta M. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31:6627-31.
  32. Lipton S, Choi Y, Pan Z, Lei S, Chen H, Sucher N, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodegenerative effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nat* 1993;364:626-32.
  33. Bolaños J, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land J, Clark J, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997; 68:2227-40.
  34. Snyder S. Nitric oxide and neurons. *Curr Op Neurobiol* 1992; 2:323-7.
  35. Dinerman J, Dawson T, Schell M, Snowman A, Snyder S. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4214-8.
  36. Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725-8.
  37. Hope B, Michael G, Knigge K, Vincent S. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2811-4.
  38. Wu G, Morris S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336:1-17.
  39. Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
  40. Carlberg M. Assay of neuronal nitric oxide synthase by HPLC determination of citrulline. *J Neurosci Meth* 1994; 52:165-7.
  41. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. En: Titheradge M, ed. *Methods in molecular biology: nitric oxide protocols*. Vol. 100. Totowa, NJ. Humana Press 1998.
  42. Xia Y, Dawson V, Dawson T, Snyder S, Zweier J. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6770-4.
  43. Xia Y, Zweier J. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12705-10.
  44. Bredt D, Snyder S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:682-685.
  45. Knowles R, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-58.
  46. Eliasson M, Blackshaw S, Schell M, Snyder S. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3396-401.
  47. Bolaños J, Peuchen S, Heales S, Land J, Clark J. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1994; 63:910-6.
  48. Arnt-Ramos L, O'Brien W, Vincent R. Immunohistochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain in relation to nitric oxide synthase-containing neurons. *Neuroscience* 1992;51:773-89.
  49. Chao D, Hwang P, Huang F, Bredt D. Localization of neuronal nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 1996; 268:488-96.
  50. Huang P, Dawson T, Bredt D, Snyder S, Fishman M. Targeted Disruption of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene. *Cell* 1993;75:1273-86.
  51. Crow J. Measurement and significance of free and protein-

- bound 3-nitrotyrosine, 3-chlorotyrosine, and free 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in biologic samples: a high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection. *Methods Enzymol* 1999;301:151-60.
52. Simmons W, Closs E, Cunningham J, Smith T, Kelly R. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1996; 271:11694-702.
53. McConnell H, Bianchine J. *Cerebrospinal fluid in neurology and psychiatry*. Londres: Chapman & Hall Medical, 1994.
54. Oldendorff W. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 1971;221:1629-39.
55. Elgün S, Kumbasar H. Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000; 24:227-32.
56. Abe T, Toghi H, Murata T, Isobe C, Sato C. Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 312:177-9.
57. Das I, Khan N, Puri B, Hirsch S. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett* 1996; 215:209-11.
58. Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents no-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 1999; 144:427-34.
59. Ratnakumari L, Qureshi I, Butterworth R, Marescau B, De Deyn P. Arginine-related guanidino compounds and nitric oxide synthase in the brain of ornithine transcarbamylase deficient spf mutant mouse: effect of metabolic arginine deficiency. *Neurosci Lett* 1996; 215:153-6.
60. Wink D, Vodovotz Y, Grisham M, DeGraff W, Cook J, Pacelli R, Krishna M, Mitchell L. Antioxidant effects of nitric oxide. *Methods Enzymol* 1999; 301:413-24.
61. Dawson T, Bredt D, Fotuhi M, Hwang P, Snyder S. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7797-801.
62. Heales S, Bolaños J, Stewart V, Brookes P, Land J, Clark J. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Bioch Biophys Ac* 1999;1410:215-28.
63. Shah A, Crespi F, Heidbreder C. Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value. *J Chromatogr B* 2002; 781:151-63.
64. Regan R, Renn K, Panter S. NMDA neurotoxicity in murine cortical cell cultures is not attenuated by hemoglobin or inhibition of nitric oxide synthesis. *Neurosci Lett* 1993; 153:53-6.
65. MacMillan-Crow L, Crow J, Kerby J, Beckman J, Thompson J. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11853-8.
66. Shigenaga M. Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 1999;301:27-40.
67. Huang Z, Huang P, Panahian N, Dalkara T. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994; 265:1883-5.

---

ARTÍCULO SIN CONFLICTO  
DE INTERÉS

---