

Óxido nítrico en el sistema nervioso central. Neuronas nitrérgicas

M. en C. Dolores Javier Sánchez González,*,**

Dra. en C. Guadalupe Cleve Villanueva López,**

M. en C. Carlos Armando Sosa Luna,*,*** M. en C. Dairo Jesús Orjuela Henry,*,****

Dr. en C. Juan Ambrosio Ortega Rangel,*,*****

Biol. Claudia María Martínez Martínez,*,***** Dra. en C. Norma E. Herrera González**

*Departamento de Biología Celular y Tisular Escuela Médico Militar, México.

**Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México.

***Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.

****Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

*****Laboratorio de Microscopía Confocal. Instituto Nacional de la Comunicación Humana, México.

***** Candidata a Doctorado en Ciencias. Investigadora del Instituto Nacional de Psiquiatría, México.

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) se forma del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOSs) y desempeña muchas funciones biológicas. El NO se sintetiza en neuronas del sistema nervioso central donde actúa como neuromodulador en la memoria, coordinación en reactividad neuronal y flujo sanguíneo y modulación del dolor. En el sistema nervioso periférico se libera por nervios no adrenérgicos y no colinérgicos. Estos nervios median algunas formas de vasodilatación neurogénica y regulan funciones gastrointestinales respiratorias y genitourinarias. Las NOSs contienen hemo y comparten homología con la citocromo P-450 reductasa. Se conocen tres isoformas NOS, dos constitutivas: neuronal y endotelial y una inducible por estímulos inmunológicos (nNOS, eNOS e iNOS, respectivamente). El objetivo de este estudio fue explorar la expresión e inmunolocalización de nNOS en cerebros aislados de ratas Wistar macho. Encontramos expresión moderada de esta enzima en núcleos basales, mientras que en rincefalo y tractos olfatorios se encontró abundante expresión. En la corteza cerebral no se localizó esta enzima.

Palabras clave: Óxido nítrico, neuronas nitrérgicas.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO), se forma por la conversión enzimática del aminoácido

Nitric oxide in central nervous system.

Nitrergic neurons

ABSTRACT

Nitric Oxide (NO) is formed from the amino acid L-arginine by a family of enzymes, the NO synthases (NOSs), and plays a role in many physiological functions. NO is synthesized in neurons of the central nervous system, where it acts as a neuromediator with many physiological functions, including the formation of memory, coordination between neuronal activity and blood flow, and modulation of pain. In the peripheral nervous system, NO is now known to be the mediator released by a widespread network of nerves, previously recognized as nonadrenergic and noncholinergic. These nerves mediate some forms of neurogenic vasodilatation and regulate certain gastrointestinal, respiratory and genitourinary functions. NOS is a heme-containing enzyme with a sequence similarity to cytochrome P-450 reductase. Several isoforms of NOS are now known to exist, two of which are constitutive: neuronal and endotelial and one of which is inducible by immunological stimuli (nNOS, eNOS and iNOS, respectively). The aim of the study was to explore expression and immunolocalization of nNOS in brains isolated from male Wistar rats. We found moderate expression of this enzyme in basal nuclei, while in rhinencephalon and olfactory tracts it was abundant expression. In the cerebral cortex this enzyme was not located.

Key words: Nitric oxide, nitrergic neurons.

do L-arginina (isómero levógiro) a L-citrulina mediante la acción de las sintasas de NO (NOSs), aunque puede formarse a partir de nitritos y especies reactivas de nitrógeno (*Cuadro 1*) en agua oxigena-

Cuadro 1. NO y especies relacionadas.

Nombre común	Abreviatura/ Símbolo
Óxido nítrico (monóxido de nitrógeno) ^{a*}	NO
Anión nitroxil	NO ⁻
Nitrosonio ^b	NO ⁺
Dióxido de nitrógeno.	NO ₂
Peroxinitrito	ONOO ⁻
Superóxido ^c	O ₂ ⁻
Nitrito	NO ₂ ⁻
Catión nitril (nitronio)*	NO ₂ ⁺
Nitrato	NO ₃ ⁻
Nitrito + nitrato	NO _x
Nitrosotioles	RSNO
Óxido nitroso*	N ₂ O
Trióxido de dinitrógeno (anhídrido del ácido nitroso*)	N ₂ O ₃

* Tomado de Am J Respir Crit Care Med 1999; 160(1): 1-9.⁶¹^a El electrón impar no se escribe en la abreviatura de NO como NO.^b Aunque algunos agentes nitrosantes actúan como donadores de NO⁺. El NO⁺ no existe como tal en solución.^c El NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito.

Modificado de Moncada S. Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-42.

Cuadro 2. Isoformas de sintasas de óxido nítrico.

Características	NOS endotelial (eNOS) ^a (NOS tipo III, NOS-3)	NOS neuronal (nNOS) ^a (NOS tipo I, NOS-1, bNOS)	NOS inducible (iNOS) ^a (NOS Tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS)
Regulación primaria	Ca ²⁺ /calmodulina	Ca ²⁺ /calmodulina	Expresión génica
Localización subcelular	Membrana y citosol	Citosol?	Citosol y membrana
Cantidad de NO ^b producida	baja (pmolar)	baja (pmolar)	alta (μmolar)
Función	Señalización celular	Señalización celular	Citotóxica Citostática Citoprotectora

^a Abreviaturas alternativas.

Tomado de Moncada S. Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-42.

da.¹ El NO regula la vasodilatación y broncodilatación por relajamiento del músculo liso vascular y bronquial; también funciona como neurotransmisor de las terminales nerviosas nitrérgicas y como sistema de defensa contra patógenos en fagosomas de macrófagos activados.² El NO se sintetiza en neuronas del sistema nervioso central donde actúa como neuromodulador en la memoria, coordinación en reactividad neuronal y flujo sanguíneo y modulación del dolor.³ En el sistema nervioso periférico se libera por nervios no adrenérgicos y no colinérgicos. Estos nervios median algunas formas de vasodilatación neurogénica y regulan funciones gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias.⁴ El mecanismo de acción del NO está mediado por la guanilatociclase soluble y el aumento en la concentración del monofosfato de guanosina cíclico (AMPC) en células blanco. Este mecanismo de regulación funciona a concentraciones bajas de NO, aproximadamente de 0.1 μM.^{5,6} Las NOSs contienen hemo y comparten homología

con la citocromo P-450 reductasa. Existen tres isoformas NOS cada una codificada en genes diferentes, dos constitutivas y una inducible por estímulos inflamatorios (*Cuadro 2*).^{7,8} La NOS constitutiva descubierta en endotelio vascular se denominó eNOS (NOS 3) y su gen se encuentra en el cromosoma 7q35-36 y contiene 26 exones; mientras que la isoforma constitutiva neuronal se encuentra en cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico y fue denominada nNOS (NOS 1), su gen se encuentra en el cromosoma 12q24.2-3 y contiene 29 exones. La isoforma inducible es conocida como iNOS (NOS 2), y su gen se encuentra en el cromosoma 17cen-q11.2 y contiene 26 exones (*Cuadro 3*).⁹ Existe otra isoenzima; la NOS mitocondrial (mtNOS) no se sabe si está codificada en un gen independiente o es la nNOS con cambios postraduccionales que la traslocan a mitocondria, aunque también se ha encontrado eNOS e iNOS dentro de la mitocondria. Recientemente se ha publicado evidencia que la mtNOS no

Cuadro 3. Biología molecular de las isoformas de NOS humanas.

Biología molecular de las isoformas de NOS humanas			
Gen	eNOS	nNOS	iNOS
Localización	7q35-7q36	12q24.2	17cen-17q11.2
Estructura	26 exones	29 exones	27 exones
Tamaño	21 CV	160 CV	37 Kb
Péptido	1203 aa	1434 aa	1153 aa
Peso	133 KDa	160 kDa	131 kDa

Tomado de Moncada S. *Pharmacological Reviews* 1997; 49: 137-42.

es ninguna de las tres isoformas descritas.¹⁰ La eNOS también se expresa en plaquetas, epitelio ciliado y en ciertas poblaciones de neuronas en el cerebro, mientras que la nNOS se ha detectado en el epitelio respiratorio y en el músculo esquelético. En el pulmón la nNOS juega un papel muy importante en la regulación del tono bronquial.¹¹ Se han descubierto diferencias entre NOS obtenidas de tejidos diferentes en la misma especie. La descripción clásica de constitutiva e inducible no es tajante, ya que la eNOS puede estimularse en ciertas situaciones como el ejercicio, lipopolisacáridos (LPS), o el embarazo; mientras que iNOS es constitutiva en el epitelio bronquial, riñón y algunos tejidos fetales.⁹ Se sabe que durante la exposición a ozono aumenta la iNOS en pulmón y en aorta como parte de la respuesta inflamatoria. En el caso del ozono se genera además estrés oxidativo pulmonar.¹²⁻¹⁴ El exceso de NO y la presencia de superóxido (radical libre generado durante el estrés oxidativo) da lugar a peroxinitrito, un radical libre muy reactivo que afecta la expresión de enzimas, vías de señalización y altera el funcionamiento de biomoléculas en el organismo.¹⁵ Para la formación de peroxinitrito se requieren concentraciones de 1-10 μ M de NO, las cuales se alcanzan en cualquier situación que incremente la iNOS, como isquemia, infecciones, contaminación ambiental etc.¹⁶

A partir de la década de los noventa, los trabajos científicos sobre el NO en el sistema nervioso cambiaron el paradigma sobre los conceptos de neurotransmisión y neuromodulación vigentes, por el cual las neuronas deben tener sistemas para sintetizar y almacenar una sustancia, que debe liberarse de las neuronas mediante exocitosis e interactuar con receptores específicos. Sin embargo, este proceso no se aplica a la neurotransmisión del NO, ya que es un gas inorgánico distinto a los neurotransmisores clásicos como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina, melatonina, etcétera, que difunde rápidamente a través de las membranas celulares y su acción sobrepasa al espacio sináptico. Su vida media depende del ambiente químico y oscila de entre unos segundos en sangre hasta algunos minutos en tejidos normales.¹⁷

Aunque el NO puede tener diversos orígenes en el cerebro, ya que puede provenir de las células endoteliales de los capilares cerebrales (eNOS), de la microglia por inmunoestimulación (iNOS). El NO en el sistema nervioso se produce principalmente por la nNOS, que puede detectarse mediante técnicas de inmunolocalización. Se encuentra aproximadamente en 2% de las neuronas; tanto las interneuronas cortas como neuronas de vías largas, de casi todas las áreas cerebrales, con concentraciones especiales en cerebelo e hipocampo, núcleos basales y tractos olfatorios. En la corteza cerebral en la banda diagonal del área de Broca representa 2% y en el cuerpo estriado es de 5 a 10%. Existe en los cuerpos celulares y dendritas, así como en las terminaciones axónicas, lo que sugiere que el óxido nítrico no se almacena sino que se libera continuamente. La nNOS depende de la calmodulina y se activa por el incremento en la concentración intracelular de calcio; este aumento puede producirse por la conducción del potencial de acción y por la unión del neurotransmisor a su receptor. Muchos estudios han demostrado que la producción del NO aumenta por la activación de las vías sinápticas u otras situaciones, como la isquemia cerebral.¹⁷

Existen evidencias de que el NO desempeña un papel en la potenciación (PLP) y depresión (DLP), ya que ambos fenómenos disminuyen o se evitan con inhibidores de las NOS y están ausentes en ratones transgénicos en los que se ha alterado el gen de la nNOS.¹⁸

El estrés oxidativo en el sistema nervioso central aumenta en el cuerpo estriado la liberación de NO, arginina, citrulina, dopamina y glutamato en la rata, así como aumento en los niveles de lípidos peroxidados que se correlacionan con cambios motores y conductuales.¹⁹

Según los mismos datos, se propone que el NO participa en los mecanismos de muerte neuronal durante la isquemia y se ha conjeturado que podría estar implicado en la neurodegeneración que se presenta en algunas enfermedades como la enfermedad de Parkinson, la demencia senil, enfermedad de Alzheimer, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. A pesar de que se ha descrito al NO como neu-

roprotector, existen condiciones en las que participa como neurotóxico, las cuales han sido asociadas a la generación del anión peroxinitrito,¹⁹ ya que se ha observado que las ratas knock outs de nNOS (ratas que no tienen este gen) muestran mayor agresividad, el objetivo de este trabajo fue inmunolocalizar la expresión de nNOS para identificar neuronas y vías nitrérgicas en cortes de cerebro de rata normales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunohistoquímica

Para este estudio se utilizaron cuatro ratas Wistar macho de 10 semanas (250 gramos), se sacrificaron por sobredosis con pentobarbital sódico 0.5 mL intraperitoneal y se perfundieron por vía intracardiaca con etanol absoluto. Por disección, se extrajo el cerebro que se fijó por inmersión con etanol absoluto durante 48 horas y después se incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor que se montaron en portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina (1:10) (Sigma-Aldrich Co. USA), los cuales fueron desparafinados y rehidratados Declere (Cell Marque, USA). La peroxidasa endógena se inhibió por incubación con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 30% (34 mL de metanol y 6 mL de H₂O₂), (Merck, Darmstadt, Germany) durante dos horas en un vaso de Kiplin. Luego de lavar con alcohol de 96°, agua y buffer salino de fosfatos (PBS) se bloquearon los sitios libres antigénicos con suero de cabra al 3% (Santa Cruz Biotechnology, USA) en PBS/Triton 0.3% por 30 minutos. Posteriormente se decantó el exceso y se aplicó el anticuerpo primario monoclonal IgG₁ de ratón anti-nNOS (A-11: sc-5302 Santa Cruz Biotechnology, USA) que corresponde a los aminoácidos 2-300 de la enzima, a una dilución 1:50 en la solución de bloqueo. Se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Terminado este tiempo, las laminillas se lavaron dos veces en agitación de 100 rpm con PBS y se agregó el anticuerpo secundario antirratón biotinilado (Jackson Immunoresearch, USA) a una dilución 1:500 en la solución de bloqueo y se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente en agitación de 20 rpm; luego se lavaron nuevamente dos veces en agitación de 100 rpm con PBS. Después se colocaron nuevamente 30 minutos en la cámara húmeda en contacto con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC) al 0.05% del reactivo A, y 0.05% del reactivo B (Vector Laboratories) en PBS. La reacción antígeno anticuerpo fue detectada empleando una solución que contiene 40 μ l de H₂O₂ al 30% (Merck, Darmstadt, Germany), ya que es el sustrato de la enzima peroxidasa, 1 mg del cromógeno diaminobencidina (SIGMA, St. Louis, MO, USA),

que funciona como aceptor de electrones, disueltos en 1 mL de PBS. Después de 15 minutos de exposición a esta solución las laminillas se lavaron con agua corriente, se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con resina sintética (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) y cubreobjetos de 25 x 25 mm del número 1 (VWR International, USA). Posteriormente se observaron en el invertoscopio Axiovert 200 M (Carl Zeiss Germany), se tomaron fotografías digitales con la axiocam HRC (Carl Zeiss Germany). Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el software KS-300 versión 3.0 (Carl Zeiss Germany).¹³

RESULTADOS

La expresión de la nNOS se inmunolocalizó casi exclusivamente en el rinencéfalo (*Figura 1*). Las neuronas nitrérgicas se localizaron en amígdala y cuerpo estriado (*Figura 2*), mientras que las vías nitrérgicas se encontraron de manera abundante en los tractos olfatorios (*Figura 3*). No se observaron neuronas nitrérgicas en la corteza cerebral.

DISCUSIÓN

Taylor (1979) basándose en los descubrimientos de Gall, describe la existencia de cuatro cerebros:

1. El cerebro antiguo o paleoencéfalo, al que denomina "el jefe de máquinas", cuya función es regular los latidos cardíacos, la respiración, el tamaño de los vasos, etc.
2. El cerebro pequeño o cerebelo, que funciona como "el piloto automático" y se ocupa de los actos o habilidades que, ya aprendidos, se realizan "sin pensar".

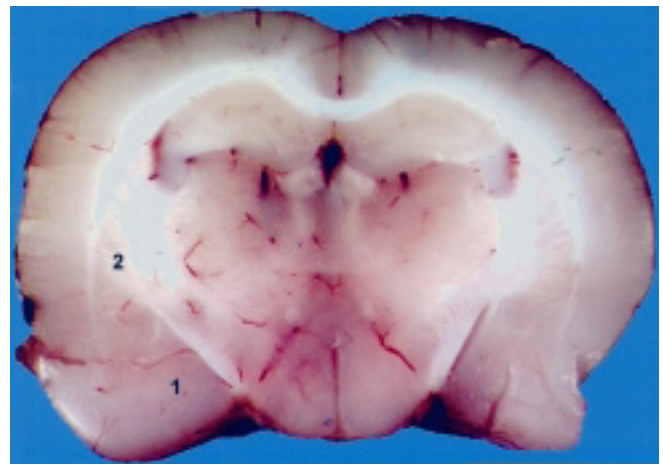


Figura 1. Corte coronal de cerebro de rata a nivel de hipocampo. Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata donde se muestra la amígdala (1) y el cuerpo estriado (2), sitios anatómicos donde se encontró abundante localización de neuronas nitrérgicas.

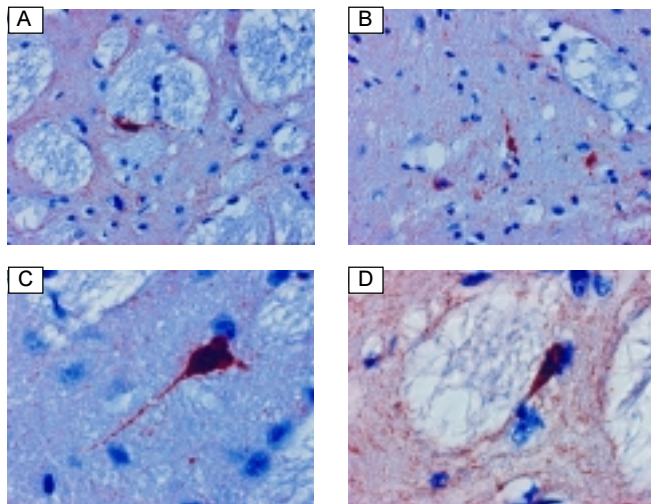


Figura 2. Inmunohistoquímica de nNOS en cortes de cerebros de rata. Neuronas nitrérgicas. En los cuadros A y B se muestran zonas de neuronas nitrérgicas representativas en amígdala y cuerpo estriado (400X). En los cuadros C y D se observan neuronas aisladas donde se localiza el núcleo, cuerpo neuronal y axón (1000X). La expresión de la nNOS se observa en color café y en azul el contraste con hematoxilina de Harris.

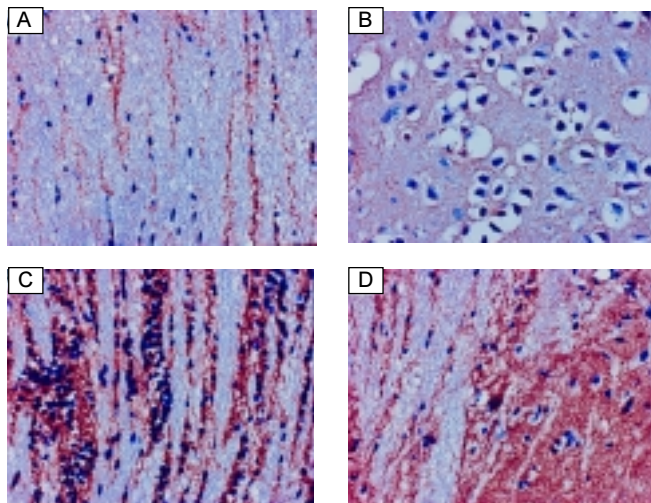


Figura 3. Inmunohistoquímica de nNOS en cortes de cerebros de rata. Vías nitrérgicas. En los cuadros A y B se muestran zonas de fibras nitrérgicas representativas en tractos olfatorios. A, corte longitudinal y B corte transversal (400X). En el cuadro C se observa un acercamiento de las zonas nitrérgicas en tractos respiratorios, y en D se observa una imagen representativa del sistema límbico (rinencéfalo) con abundante expresión de nNOS (1000X). La expresión de la nNOS se observa en color café y en azul el contraste con hematoxilina de Harris.

- 3 El cerebro nuevo o corteza cerebral, cuya función es la de ser "el capitán".
- 4 El rinencéfalo, que se relaciona con las emociones.

En ratas que no son agresivas, esta actitud puede ser inducida por la extirpación quirúrgica de los bulbos olfatorios o por lesiones electrolíticas que interrumpen en ambos lados el tracto olfatorio late-

ral, así como la comisura blanca anterior. El desarrollo de este tipo de conducta agresiva en estas ratas parecería deberse a la remoción de una actividad inhibitoria de los bulbos olfatorios sobre el núcleo central de la amígdala. Las ratas knock out de la nNOS muestran una conducta agresiva. En nuestro trabajo encontramos una expresión importante en los tractos y bulbos olfatorios, amígdala y cuerpos estriados (rinencéfalo), lo cual sugiere que las neuronas nitrérgicas regulan el comportamiento agresivo en ratas. Estos hallazgos podrían explicar algunos de los efectos del óxido nítrico en el sistema nervioso central como neuromodulador de la conducta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Politécnico Nacional (CGPI 2003-233), Fundación Gonzalo Río Arronte IAP y Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

REFERENCIAS

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-15.
2. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
3. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60-7.
4. Rand MJ. Nitrergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19: 147-69.
5. Murad F, Ishii K, Förstermann U, Gorsky L, Kerwin JF Jr., Pollock J, Heller M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoids to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990; 24: 441-8.
6. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 1991; 28: 67-73.
7. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-43.
8. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
9. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharm Rev* 1997; 49(2): 137-42.
10. Elfering S, Sarkela T, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38079-86.
11. Villanueva C, Sánchez-González DJ, Moro MA, Hernández-Pando R, Castillo-Henkel C, Mendoza R, Herrera-González N. Immunohistochemistry of nitric oxide synthases in lungs of rats exposed to ozone. *Free Rad Biol Med* 2004; 36(1): S79.
12. Mendoza R, Moro MA, Sánchez-González DJ, Castillo-Henkel C, Blanco-Tuñón JA, Cobilt-Catana R, Villanueva C. Change in markers of endothelial function produced by ozone inhalation in rats. *Free Rad Biol Med* 2004; 36(1): S98.
13. Sánchez-González DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Herrera-González N, Hernández-Pando R, Larios-Medina FJ, Cobilt-Catana R, Blanco-Tuñón JA, Pedraza-Chaverri J, Villanueva C. Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *ETAP* 2004; 17: 1-7.
14. Sánchez-González DJ, Moro MA, Hernández-Pando R, Castillo-Henkel C, Mendoza R, Herrera-González N, Pedraza-Chaverri J, Villanueva C. Peroxynitrite formation in aorta isolated

- from rats exposed to ozone. *Free Rad Biol Med* 2004; 36(1): S102.
15. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 1620-4.
16. Laskin DL, Fakhrzadeh L, Laskin JD. Nitric oxide and peroxynitrite in ozone-induced lung injury. *Adv Exp Med Biol* 2001; 500: 183-90.
17. González-Sánchez H, Roldan G. El óxido nítrico en el aprendizaje en la memoria. *Temas Selectos de Neurociencias II*. UNAM; 2001, p. 267-82.
18. Rang HP, Dale NM, Ritter JM. *Farmacología*. 4/a Edición. Madrid, España: Edit Harcourt; 2000, p. 199-205, 225-236 y 295-303.
19. Rivas-Arancibia S, Colín-Barenque L, Dorado-Martínez C, Fortoul T. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Temas Selectos de Neurociencias II*. UNAM; 2001, p. 351-74.
20. Wayne WD. *Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3a. edición. México: Edit. Limusa; 1998, p. 245-759.

Recibido: Junio 3, 2004.
Aceptado: Junio 10, 2004.