

186

Reg



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL OXIDO NITRICO COMO MEDIADOR DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS INDUCIDA POR EL ACIDO QUINOLINICO EN SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DANIEL SANTAMARIA DEL ANGEL



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "El óxido nítrico como mediador de la peroxidación de lípidos inducida por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata".

realizado por Daniel Santamaría del Angel.

con número de cuenta 8729459-4 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. Abel Santamaría del Angel.

Propietario

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña.

Suplente

Dra. María Eugenia Consebat Bonaparte.

Suplente

Biol. Julio Prisco Sagredo.

Consejo Departamental de Biología

COORDINADOR

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez", bajo la supervisión del M. en C. Abel Santamaría del Angel, y del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

A María Esther, quien supo trascender en su papel de madre y se convirtió en amiga. Gracias por tu amor, tu apoyo incondicional y por enseñarme el verdadero sentido de la vida.

A Abel, gracias por compartir conmigo este que es nuestro triunfo, gracias también por tu ejemplo y tus enseñanzas, pero gracias sobre todo por ser antes que mi hermano, mi amigo.

A Eduardo, gracias a ti por trazar el camino por el cual me fue mas fácil caminar y por el cual aprendí a mejorar cada día.

A América, cuya pequeña presencia siempre me acompaña.

A Sonia, gracias por todo tu apoyo.

A Minerva, una parte importante de mi familia.

A Roberto, Mariana y Vicky, mi segunda familia.

A mi papá, gracias por tus consejos y tu apoyo.

A Camilo, gracias por haber creído en mi y haberme dado la oportunidad de entrar al difícil mundo de la ciencia.

A Mireya, una parte muy importante de mi vida, gracias por que de alguna manera siempre has estado apoyandome en todo, contigo he compartido mis exitos y mis fracasos, me has visto crecer. Gracias por que se que cuento contigo a pesar de todo y todos. Parte de este trabajo te lo debo a ti.

A mis amigos, Claudia, Citlali, Jorge, Gisela y a todos aquellos que no puedo mencionar en un espacio tan breve.

A Mitzy, de quien aprendí lo que es la fortaleza.

A mis sinodales Dra. Ma. Luisa Fanjúl, Dra. Ma. Eugenia Gonsébat y Biol. Julio Prieto, cuyo ejemplo influyó significativamente en mi formación académica y como persona.

A todos mis profesores de la carrera así como a mis compañeros de generación.

Este trabajo es en memoria de Josefina, Dora, Pedro y Vicente, los pilares de mi familia. Su recuerdo siempre me acompaña.

I N D I C E

I.-Resumen.....	3
II.-Introducción.....	4
III.-Antecedentes.....	6
1.-Bioquímica de Oxido Nítrico.....	7
1.1.-Síntesis Enzimática.....	7
1.2.-Inhibidores de la Oxido Nítrico Sintetasa.....	10
1.3.-Donadores de Oxido Nítrico.....	12
2.-Activación de la GCS mediada por NO en respuesta a la activación de receptores glutamatérgicos.....	15
3.-Neurotoxicidad del Glutamato.....	19
3.1.-Tipos de Receptores Glutamatérgicos.....	19
3.2.-Daño Neuronal.....	22
3.3.-Acido Quinolínico y los receptores NMDA.....	23
3.4.-Relacion entre los receptores para NMDA y la Síntesis del Oxido Nítrico.....	29
4.-Peroxidación de lípidos por radicales libres.....	30
5.-El Oxido Nítrico y sus diferentes formas Redox Activadas.....	33
5.1.-Oxido Nítrico y el Estrés Oxidativo.....	35
6.-Planteamiento General.....	39
IV.-OBJETIVOS.....	41
V.-METODO.....	42
VI.-RESULTADOS.....	48
VII.-DISCUSION.....	53
VIII.-CONCLUSIONES.....	59
IX.-APENDICE.....	60
X.-REFERENCIAS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS.

NO-	Oxido Nítrico.
GCS-	Guanilato Ciclasa Soluble.
AMPC-	Adenín Monofosfato cíclico.
GMPC-	Guanilil Monofosfato cíclico.
EDRF-	Factor Relajante Derivado de Endotelios.
O2- -	Radical Superóxido.
Hb-	Hemoglobina.
NOS-	Oxido Nítrico Sintetasa.
NADPH-	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato Reducido.
Glu-	Glutamato.
L-NMMA-	L-NG-Monometil-Arginina.
L-NDMA-	L-NG-Dimetil-Arginina.
L-NA-	L-NG-Nitro-Arginina.
L-NAME-	L-NG-Nitro-Arginina Metil Ester.
L-NAA-	L-NG-Amino-Arginina.
NMDA-	N-metil-D-aspartato.
NP-	Nitroprusiato de Sodio.
SNAP-	S-Nitroso-N-Acetil-Penicilamina.
DA-	Dopamina.
SNC-	Sistema Nervioso Central.
Ach-	Acetilcolina.
Gly-	Glicina.
KA-	Kainato.
ATP-	Adenosín Trifosfato.
AMPA-	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-ácido propiónico.
RNA _m -	Acido Ribonucléico mensajero.
APV-	2-Amino-5-fosfonovalerato.
APH-	2-Amino-7-heptanoato.
QUIN-	Acido Quinolínico.
NAD-	Dinucleotido de Nicotinamida.
MAO-	Monoamino Oxidasa.
O2-	Oxígeno molecular.
H2O2-	Peróxido de Hidrógeno.
OH.-	Radical Hidroxilo.
PUFA-	Acidos Grasos Polinsaturados.
LOOH-	Hidroperóxidos Lipídicos.
GSH-Px-	Glutación peroxidasa.
SOD-	Superóxido dismutasa.
DNA-	Acido Desoxirribonucléico.
ONOOH-	Radical Peroxinitrito.

RESUMEN

El ácido quinolínico es un potente agonista endógeno de los receptores glutamatérgicos para NMDA. La neurotoxicidad del QUIN está parcialmente mediada por la peroxidación de lípidos, y ésta es un proceso que involucra la formación de radicales libres. Por su parte el NO es un radical libre que se ha visto asociado a la peroxidación de lípidos mediante la formación del radical peroxinitrito por la reacción del NO con el radical Superóxido. Además la síntesis del NO esta mediada por la activación de los receptores NMDA. Para determinar si la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN es mediada por el NO, se decidió probar el efecto de dos inhibidores de la NOS a diferentes concentraciones (0, 100, 200, y 400 μ M), sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN a la concentración de 100 μ M, en terminales sinápticas de cerebro de rata. En paralelo se probó el efecto de un donador de NO, el nitroprusiato de sodio a una concentración de 100 μ M, y de una molécula que es subproducto de la disociación del donador, que es el Ferricianuro de Potasio a la misma concentración, así como el efecto de un inhibidor competitivo de los receptores NMDA, que es el APV a una concentración de 25mM.

Se encontró que los inhibidores de la NOS previenen la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN y que el donador de NO promueve la peroxidación de lípidos en ausencia de QUIN, pero en presencia del QUIN, el Nitroprusiato de Sodio la inhibe. Por su parte el Ferricianuro de Potasio promueve la peroxidación pero de una manera menor que el nitroprusiato, lo cual nos dice que la diferencia entre uno y otro esta dada por el NO. Por último, el inhibidor de los receptores para NMDA previno de la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN.

I N T R O D U C C I O N

El QUIN es un metabolito del aminoácido L-Triptofano, que presenta un efecto neuroexcitatorio debido a que es un potente agonista de los receptores para NMDA.

Se ha demostrado que la neurotoxicidad del QUIN esta parcialmente mediada por un aumento en el estrés oxidativo y la producción de radicales libres, mecanismo que a su vez incrementa la peroxidación de lípidos. Recientemente se ha demostrado que las concentraciones de QUIN aumentan en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con procesos infecciosos, inflamatorios, isquemia, SIDA, y trauma cerebral.

En la actualidad, el NO es considerado como un mensajero celular, teniendo como función producir el relajamiento del endotelio de los vasos capilares. También se ha asociado a procesos de aprendizaje y potenciación a largo plazo y en la génesis de la apoptosis.

Recientemente se ha descrito que la activación de los receptores para NMDA da como resultado el incremento de los niveles de calcio intracelular, desencadenando una serie de eventos entre los que destaca una activación de la NOS y la producción de NO, el cual, por su característica de radical libre, su alta reactividad con otros radicales libres como el Superóxido para formar especies químicas reactivas que pueden a su vez producir peroxidación de lípidos, lo hace un buen candidato para mediar la toxicidad del QUIN.

Se ha sintetizado compuestos que son análogos estructurales

de la L-arginina, sustrato principal de la NOS. Estos compuestos tienen la capacidad de inhibir la síntesis del NO.

Por otro lado, existen también compuestos donadores de NO que pueden liberarlo espontáneamente, o bien pueden necesitar de una catálisis enzimática para liberar NO como uno de sus productos. Ambos tipos de compuestos, tanto donadores como inhibidores, son una herramienta farmacológica muy útil en el estudio de los procesos en los cuales se ve involucrado el NO.

El objetivo del presente trabajo es el evaluar el efecto de la manipulación farmacológica de los niveles de NO, sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN, y tratar de explicar de esta manera como es que participa el NO en los procesos neurotóxicos asociados al QUIN.

A N T E C E D E N T E S

Hasta mediados de los 70's , se creía que el Oxido Nítrico (NO, por sus siglas en ingles), no jugaba ningún papel en la fisiología de los mamíferos. Las bacterias liberan y descomponen NO como parte del ciclo del Nitrógeno, por lo que los mamíferos se ven expuestos al NO en el aire contaminado de las ciudades. Sin embargo, nada sugería que los mamíferos sintetizaran NO como parte de su metabolismo basal o que tuvieran un sistema de reconocimiento de señales para el mismo, por el cual se diera una comunicación intercelular. Esta idea comenzó a cambiar a mediados de los años 70's, cuando se descubrió que el NO podía activar la Guanilato Ciclasa soluble (GCS) (Katsuki y col, 1977). Por otro lado, se descubrió que una serie de fármacos, ahora conocidos como nitrovasodilatadores, podían activar a la isoenzima soluble de la GC e incrementar de esta forma la producción de GMPC, pudiendo explicarse este hecho por la producción de NO (Katsuki y col, 1977).

Subsecuentemente, se descubrió que la GCS contiene un grupo hemo, y que la unión del NO al grupo hemo induce su activación (Bates 1992).

1.-Bioquímica del Oxido Nítrico.

1.1.-Síntesis enzimática

La síntesis del NO a partir del aminoácido L-arginina, es llevada a cabo por la enzima Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) (Moncada y col, 1989).

Recientemente, se ha encontrado que existen dos tipos de NOS, una de las cuales es constitutiva, citosólica, dependiente de calcio/Calmodulina, y que libera NO por períodos cortos en respuesta a la entrada de calcio mediada por receptores. El NO liberado por esta enzima actúa por un mecanismo de transducción que involucra múltiples respuestas fisiológicas (Knowles y col. 1989, Chetkovich y col. 1993). La otra enzima NOS es inducida después de la activación de macrófagos, células endoteliales y algunas otras células a través de las citocinas y, una vez expresada, sintetiza NO por períodos largos. Además, esta enzima es citosólica, independiente de calcio, requiere tetrahidrobiopterina así como de otros cofactores para su activación, y su inducción es inhibida por glucocorticoides (Moncada 1989). Hasta hace poco tiempo, el único papel fisiológico propuesto para el NO sintetizado por esta NOS, era el de ser una molécula citotóxica que destruye microorganismos y células tumorales. Al parecer, sin embargo, la liberación del NO por vía de dicha enzima tiene otras consecuencias biológicas, que incluyen la vasodilatación y el daño tisular (Moncada, 1991).

La biosíntesis del NO, a partir de la L-arginina se muestra

en la Figura 1 en donde se pueden observar algunos de los pasos de la síntesis del NO.

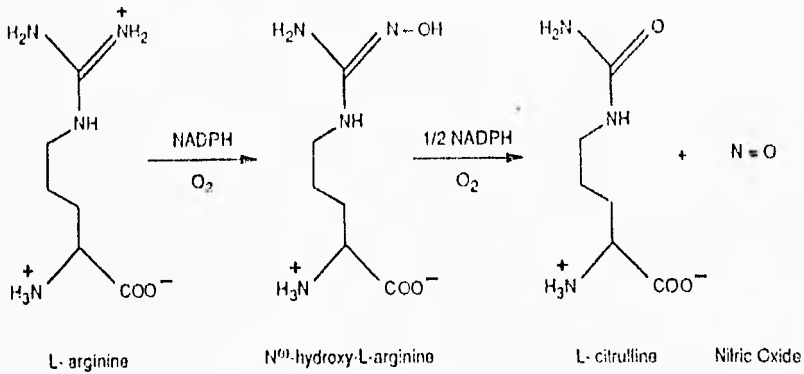


Fig. 1. Vía de síntesis del Oxido Nítrico a partir del aminoácido L-Arginina tomado de Dawson T. y Snyder S.H. (1994): Gases as Biological Messengers: Nitric Oxide and Carbon Monoxide in the brain. J. Neurosci. 14 (9):5147-5159.

El primer intermediario, la N^{G} -hidroxy-L-arginina, es un sustrato activo para la NOS, y ha sido detectada dentro de los productos de la conversión de la L-arginina por la enzima (Bates, 1992). Todas las formas de NOS, utilizan a la arginina como sustrato, y forman citrulina estequiométricamente con el NO y requieren dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADPH) como donador de electrones. Mientras que la NOS cerebral y la

endotelial son estimuladas por calcio, la que se encuentra en los macrófagos no lo requiere (Mayer y col, 1991). La NOS parece ser una enzima altamente regulada, la enzima purificada es fosforilada por una protein cinasa dependiente de AMPc, una protein cinasa C y una protein cinasa II dependiente de calcio/calmodulina, esta fosforilación ocurre en la serina estructural (Bredt y col, 1991).

Recientemente se ha reportado que los receptores para aminoácidos excitadores juegan un papel importante en la síntesis de NO (Kiedrowski y col, 1992; Garthwaite y col, 1989; Price y col, 1993), el cual será discutido posteriormente.

Las células productoras de NO responden a una o más hormonas, con un incremento en la concentración de calcio citoplasmático. Dicho incremento activa a la NOS para sintetizar NO a partir de la L-arginina (Nomura y Kitamura, 1993). En algunas otras células, la producción de NO ocurre por un mecanismo independiente de calcio, a través de una isoenzima de la NOS.

El NO difunde hacia las células blanco (en este caso a las células del músculo liso vascular), en donde se une a la GCS y activa la producción de GMPc. En estas células, el incremento de GMPc altera la cascada de reacciones envueltas en la contracción muscular, lo cual conduce a un estado de relajación endotelial (Knowles y col, 1989).

Algunas células pueden contener también otras enzimas que son blanco del NO, en adición a la GCS, que actúan en vías metabólicas como la ADP-ribosilación de proteínas (Brune y Lapetina, 1989; McCall y col, 1989).

El GMPc actúa como segundo mensajero en muchos tipos celulares y puede ser encontrado en casi todas las células. La GCS también puede ser encontrada en muchos tipos celulares (Knowles y col, 1989).

1.2.-Inhibidores de la NOS

Los análogos de la L-arginina presentan un potente efecto inhibidor de la NOS el cual es reversible. El primero de éstos en ser empleado fue la L-N^G-metil-arginina (LNMA o LNMA), en la cual, un grupo metil está presente en uno de los dos nitrógenos guanidino de la L-arginina. Este compuesto ocupa el sitio activo de la NOS, pero es pobremente convertido a NO, y por lo tanto, actúa como un inhibidor competitivo de la arginina (Moncada y col, 1989). La N^G-dimetil-L-arginina, (la cual puede tener ambos grupos metilo en un solo nitrógeno o en cada uno de los nitrógenos guanidino), la N^G-Nitro-L-arginina (LNNA), el Metil ester de N^G-Nitro-L-arginina (L-NAME), la N^G-Amino-L-arginina (L-NAA), y muchos otros análogos relacionados, han sido empleados para inhibir la producción de NO (Moncada y col, 1989). Las fórmulas estructurales de estos inhibidores de la NOS se muestran en la figura 2.

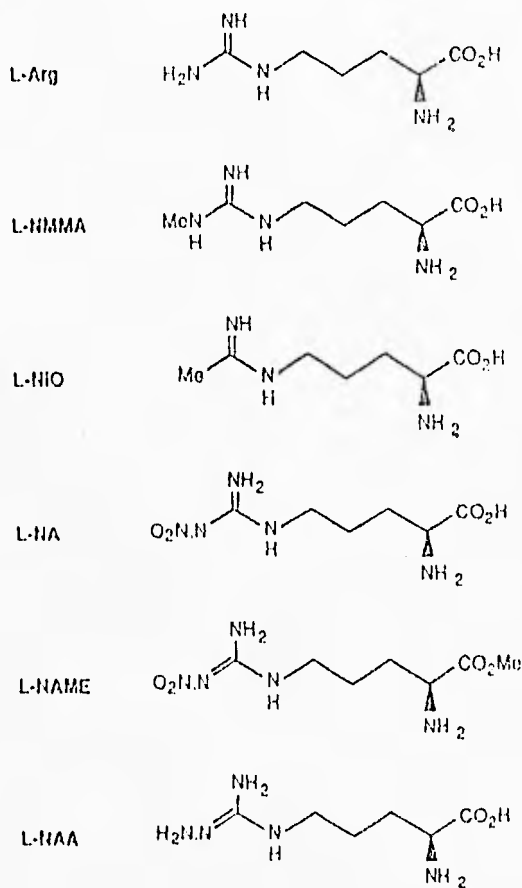


Fig. 2. Estructura química de los distintos inhibidores de la Oxido Nítrico Sintetasa. Tomado de Moncada y col. (1991): Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2):109-142.

1.3.-Donadores de NO

El NO es formado enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina, por acción de la enzima NOS. A diferencia de los segundos mensajeros convencionales, los cuales actúan dentro de las células en las cuales fueron sintetizados, el NO puede difundir a través de las membranas y actuar en las células vecinas (Southam y Garthwaite, 1991a). El mecanismo activador de la formación de NO en el cerebro es la activación de los receptores glutamatérgicos, especialmente los del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Garthwaite, 1991). Dicho mecanismo involucra la entrada de calcio (Garthwaite, 1991), seguida por la activación de la NOS dependiente de calcio/calmodulina (Brendt y Snyder, 1990). Evidencias recientes sugieren que el NO puede ser formado presinápticamente en ciertas vías, probablemente en respuesta a potenciales de acción que regulan la entrada de calcio (Southam y Garthwaite, 1991b).

Existen muchos compuestos, (conocidos como nitrovasodilatadores) que liberan NO (Feelisch y Noack, 1987), y que representan la vía más efectiva de generación de NO exógeno en tejidos y células.

No obstante se conoce que los nitrovasodilatadores, a través del NO, pueden activar a la GCS (Deguchi, 1977), hay relativamente poca información acerca de su eficacia y potencia, o de los rangos de concentraciones que son necesarios para reproducir los efectos del NO generado endógenamente.

Dentro de los nitrovasodilatadores mejor conocidos estan el Nitroprusiato de Sodio (NP), la S-Nitroso-N-Acetylpenicilamina (SNAP) y la Hidroxilamina, (compuesto considerado por algunos autores como el posible precursor fisiológico del NO a partir de la L-arginina (Southam y Garthwaite, 1991a)). Todos estos agentes inducen la formación de NO, y la consecuente formación de GMPC de forma dosis-dependiente. El NP también ha sido utilizado para incrementar el flujo sanguíneo y reducir el daño cerebral en la isquemia focal (Zhang e Idecola, 1993; Zhang y col, 1994).

Se ha observado que el NP promueve la liberación de dopamina en cuerpo estriado de rata (Zhu y Luo, 1992) pudiendo deberse a la pérdida del tejido o bien, a la pérdida de fibras GABAérgicas en la vía nigro estriatal (Carrasco, 1986).

Dentro de los compuestos donadores del NO, encontramos a los S-nitrosotioles (dentro de los que se encuentra la SNAP), los cuales necesitan que la liberación del NO sea catalizada por los tejidos (Kowaluk y Fung, 1990), por lo cual representan una ventaja en su empleo en los estudios in vivo. En la figura 3 se muestran las fórmulas de los principales donadores de NO.

2.-Activación de la GCS mediada por NO en respuesta a la estimulación de receptores Glutamatérgicos

La activación de la GCS por la estimulación de los receptores NMDA (Garthwaite y col, 1989a; Bredt y Snyder, 1989) y por la estimulación por Kainato (KA), un agonista de los receptores a glutamato no-NMDA (Garthwaite y col, 1989), en cerebelo, es inhibida por L-NMMA administrada por vía intracerebelar, se incrementa de una manera reversible al aplicar L-arginina, mostrando que esta respuesta está mediada por NO. Más recientemente, se ha encontrado que la L-NMMA administrada intracerebelarmente en ratones, inhibe el incremento de GMPC inducido por NMDA, Quisqualato, Kainato, Harmalina y Pentilinetetrazol (Wood y col, 1990), mostrando que la ruta L-arginina:NO regula el incremento de GMPC inducido por estos compuestos agonistas glutamatérgicos in vivo.

Destaca el hecho de que niveles fisiológicos de calcio, los cuáles son esenciales para la acción de la NOS, inhiben la GCS cerebral (Olson y col, 1976; Knowles y col, 1989), lo cuál podría representar un mecanismo de control mediante el cual la GCS no fuese activada en aquellas células que han sido estimuladas para producir NO, y solo ser activada en las células efectoras (Knowles y col, 1989). El mecanismo general de acción del NO en el SNC se muestra en la figura 4.

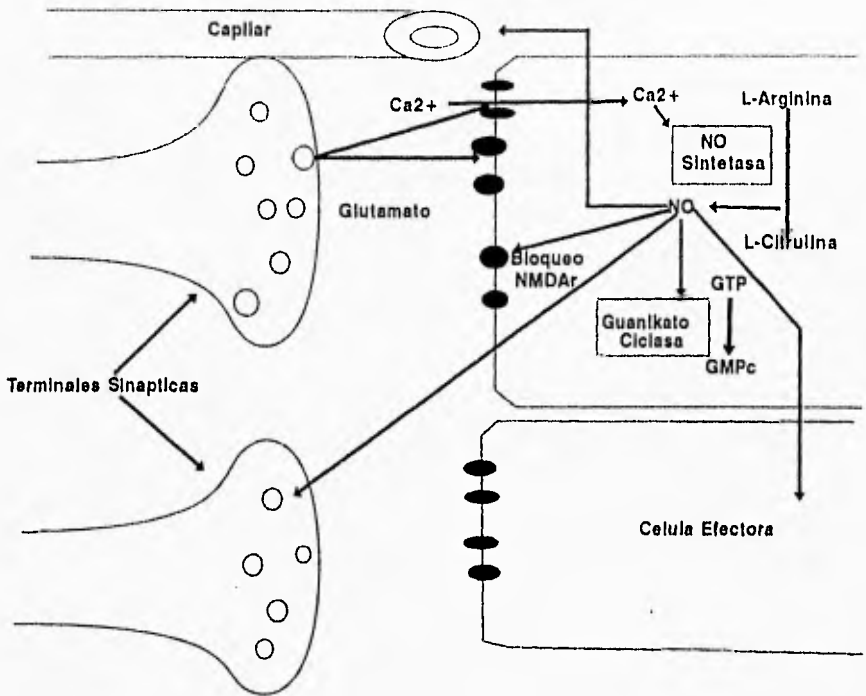


Fig. 4. Mecanismo de acción general de el Oxido Nítrico en el Sistema Nervioso Central. Modificación del esquema tomado de Bates, J. (1992): The Study of Biological Nitric Oxide. Neuro Protocols. 1(2):99-173.

La NOS cerebral es inhibida competitivamente por L-NMMA y por L-NA (Knowles y col, 1990). La NOS cerebral requiere del NADPH como cofactor. Esta enzima, purificada a partir de cerebelo de rata, es un monómero dependiente de Calmodulina (Bredt y Snyder, 1990).

Preparaciones de citosol de diferentes regiones de cerebro, muestran que la mayor concentración de NOS se encontró en cerebelo, seguido por el hipotálamo y mesencéfalo, cuerpo estriado, e hipocampo, con la menor actividad encontrada en la médula oblongata (Forstermann y col, 1990). El óxido nítrico también que es liberado por los astrocitos después de la estimulación con bradikina y con el ionóforo de calcio A23187 (Murphy y col, 1990).

Se ha sugerido que las células granulares son las principales neuronas en el cerebelo que liberan NO en respuesta a agonistas exógenos para los receptores NMDA en este tejido (Garthwaite y Garthwaite, 1987; Garthwaite, 1990).

La función biológica del NO en el cerebro juega un papel activo en los efectos excitatorios a corto plazo producidos por aminoácidos excitadores, así como efectos a largo plazo en el desarrollo del cerebro, aprendizaje y memoria. Más aún, esta ruta regula los efectos biológicos de otros neurotransmisores cuyas acciones están asociadas con incrementos en los niveles de GMPc (Drummond, 1984).

La ruta L-arginina:NO podría también jugar un papel importante en patologías del SNC (Moncada y col, 1989). La entrada de calcio que acompaña a la activación prolongada del

receptor NMDA está asociada a la degeneración neuronal (Rothman y Olney, 1987; Choi, 1988; Garthwaite, 1989b), sugiriendo que la excesiva activación del receptor NMDA, y el consecuente incremento en la concentración intracelular de calcio, contribuyen a la neurotoxicidad del Glu por un aumento en la producción de NO.

Este efecto puede explicar la patogénesis de algunas enfermedades de la retina (Lolley y col, 1977). El GMPc parece también tener una participación importante en algunas enfermedades neurodegenerativas, debido a que los niveles de este nucleótido se incrementan en muchas regiones del cerebro antes del inicio de crisis convulsivas inducidas por algunos fármacos (Ferrendelli y col, 1980). Más aún, la superfusión con análogos del GMPc dentro de injertos de hipocampo, desencadena la actividad epileptiforme prolongada en las células piramidales (Freedman y col, 1979). Cabe mencionar que tanto los antagonistas de los receptores para aminoácidos excitadores, así como los agentes inhibidores de la liberación de Glu, tienen ambas actividades antiepiléptica, y protegen al cerebro contra el daño isquémico, el cual parece estar mediado por una liberación excesiva de Glu (Meldrum, 1990).

3.-Neurotoxicidad del Glutamato.

La transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso central de los mamíferos, es mediada principalmente por el L-Glutamato. De hecho, el Glu excita virtualmente todas las neuronas centrales y está presente en las terminales nerviosas en concentraciones apreciables (Curtis y Johnson, 1974).

Lucas y Newhouse (1957), mostraron que la exposición prolongada al glu puede destruir neuronas retinales. Por su parte, Olney, en 1971, demostró que esta toxicidad, que posteriormente fue llamada excitotoxicidad, no es privativa del Glu o de las neuronas retinales, sino que es un mecanismo común de los aminoácidos excitadores en las células nerviosas centrales. Con base en estos resultados, se postuló que el Glu, o sus compuestos relacionados, podían causar la pérdida de neuronas típica de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

3.1.-Tipos de receptores Glutamatérgicos.

Actualmente se sabe que existen cuatro tipos de receptores glutamatérgicos, cada uno es comunmente conocido por sus agonistas específicos: Los receptores para N-Metil-D-Aspartato (NMDA), los receptores para ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-ácido propionico (AMPA) y los receptores para Kainato, dentro de los receptores ionotrópicos, y un receptor metabotrópico para quisqualato (Coyle y Puttfarcken, 1993).

El receptor mejor caracterizado, es el complejo receptor NMDA que consiste de un canal con alta permeabilidad a Na^+ y Ca^{++} . Este receptor tiene múltiples sitios reguladores, incluyendo sitios de unión de Gly, Zn^{++} , poliaminas y fenciclidina, los cuales modifican alostericamente la apertura del canal mediada por glutamato (Coyle y Puttfarcken, 1993). Los receptores para NMDA están ampliamente distribuidos en el cerebro y la médula espinal, con una densidad particularmente alta en el hipocampo y la corteza cerebral (Coyle y Puttfarcken, 1993). El receptor tiene asociado un canal iónico compuesto por dos subunidades protéicas distintas, conocidas como NMDAr1 y NMDAr2, cada una de las cuales contiene alrededor de 1000 residuos de aminoácidos. El receptor NMDAr1 puede existir en 7 diferentes isoformas. Por otro lado, se sabe que hay cuatro diferentes genes que codifican para cuatro variantes del receptor NMDAr2 (a,b,c y d) (Coyle y Puttfarcken, 1993).

Todavía no es claro como varias subunidades NMDAr1 y NMDAr2 están presentes en cada receptor NMDA funcional (Coyle y Puttfarcken, 1993). El Glu y sus agonistas relacionados se unen a los diferentes sitios activos del receptor, promoviendo la apertura del canal iónico de alta conductancia, el cual permite la entrada de Na^+ , K^+ y Ca^{++} dentro de las células diana.

La glicina es un coagonista de los receptores para NMDA, si el sitio de reconocimiento para la glicina no se encuentra ocupado, el receptor no puede ser activado. Estos receptores pueden ser modulados también por poliaminas tales como la espermina y la espermidina, así como por el pH. En la célula diana con potencial de reposo normal, el L-glutamato es incapaz

de activar al receptor NMDA, debido a que el canal iónico se encuentra bloqueado por Mg^{++} , y este bloqueo es removido únicamente cuando la célula blanco es parcialmente despolarizada a través de la activación de otros impulsos sinápticos (Coyle y Puttfarcken, 1993).

La acción del glutamato en el receptor NMDA puede ser antagonizada selectivamente de tres formas: a) competitivamente, por fármacos como el 2-amino-5-phosphonovalerato (APV) y el 2-amino-7-heptanoato (APH) (Watkins y Olverman, 1987), b) no competitivamente, por fármacos que se unen al sitio de reconocimiento para fenciclidina, MK-801, dextrorfan o ketamina (Kempt y col, 1987), y c) bloqueando la unión del coagonista (Gly) por kinureninas. En la figura 5 se muestran las generalidades de los receptores glutamatérgicos.

La neurotoxicidad de los aminoácidos excitadores presenta cierta selectividad celular con patrones distintivos de pérdida neuronal, dependientes de las distintas rutas de administración (Coyle y col, 1981). Diferentes subpoblaciones neuronales pueden diferir en su vulnerabilidad intrínseca al daño, reflejando entre otras cosas, diferencias en la densidad postsináptica de los receptores (Choi 1988).

Un caso específico puede ser el de una subpoblación de neuronas frontales que contienen somatostatina y la enzima NADPH-diaforasa, las cuales parecen ser resistentes al daño mediado por los receptores para quinolínico (Beal y col, 1986; Koh y col, 1986).

Más recientemente se ha visto que existe una relación entre las neuronas que contienen NADPH-Diaforasa y las neuronas que contienen NOS. Hope y colaboradores (1991) descubrieron que la NADPH-diaforasa es una NOS (Hope y col, 1991; Matsumoto y col, 1992; Kitchener y col, 1993).

3.3.-Acido Quinolínico y los receptores NMDA.

El ácido quinolínico (QUIN) es un aminoácido heterocíclico (ácido 2,3-piridin dicarboxílico), con un potente efecto neuroexcitatorio. El QUIN es conocido como un metabolito del triptofano en mamíferos, es precursor del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) en la vía de la Kinurenina (Schwarcz y col, 1984). Figura 6.

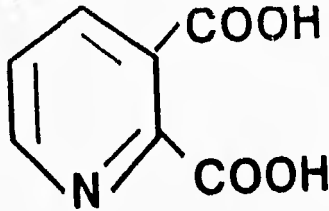


Fig. 6. Estructura Química del Acido Quinolínico.

El primer reporte de la presencia del QUIN en el cerebro fue realizado por Lombardi en 1983, mediante un método de espectrofotometría de masas, encontrando valores en cerebro de rata de 12 pmol/mg de proteína o 2.1 nmol/g de tejido. Aunque la administración de triptofano a las ratas puede aumentar el contenido cerebral de QUIN en una forma dosis dependiente, este aumento es compensado por la formación del antagonista endógeno de los receptores para NMDA, el ácido kinurénico (KYNA), en una proporción de 3 a 1, con respecto al QUIN por la misma vía (Russi y col., 1991).

La concentración de QUIN se incrementa durante los procesos de envejecimiento en ratas (Moroni y col, 1984). Se ha demostrado que el QUIN puede incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Rothe y col., 1993), aunque no está claro si este efecto involucra la activación de los receptores NMDA, cambios en la osmolaridad extracelular, o bien, un efecto sobre el pH.

La especulación inicial causada por el descubrimiento del

QUIN, descansaba en el hecho de que es un agonista selectivo de los receptores NMDA. El primer reporte de la actividad excitatoria del QUIN, resultó de experimentos en la corteza cerebral de ratas anestesiadas (Stone y Perkins, 1981), en los cuales se demostró que el QUIN no solamente podía excitar a las neuronas con una potencia similar a la del NMDA, sino que también dicha excitación podía ser contrarrestada por un antagonista de los receptores NMDA, el APV (Perkins y col, 1981).

Las neuronas en diferentes partes de SNC, muestran una sensibilidad diferencial al NMDA y al QUIN; por ejemplo, las neuronas hipocámpales son excitadas de una manera similar por el QUIN y el NMDA, mientras que en células de Purkinje del cerebelo solo un tercio de las neuronas que son sensibles al NMDA son sensibles también al QUIN (Perkins y Stone, 1983b). La explicación a estos descubrimientos radica en que existen dos poblaciones distintas de receptores NMDA en el SNC. La primera población de receptores conocidos como NMDA1, está situada en la médula espinal y cerebelo, son activados preferencialmente por NMDA y no por QUIN. El otro tipo de receptores conocidos como NMDA2, se encuentra distribuido en la neocorteza, hipocampo y cuerpo estriado, tiene un sitio de unión para NMDA y para QUIN (Perkins y Stone, 1983b).

Ganong y Cotman, en 1986, reportaron que el APV antagoniza el efecto del NMDA y del QUIN, sin afectar el efecto de KA o de Quisqualato, en preparaciones de hipocampo in vitro. Tanto el NMDA como el QUIN inducen despolarizaciones periódicas que aparentemente incrementan la resistencia de la membrana. Estas despolarizaciones parecen estar mediadas por una entrada de

calcio a las neuronas, mismas que pueden ser prevenidas adicionando al medio con un bloqueador de canales de calcio como el cobalto (Peet y col, 1986). La entrada excesiva de calcio produce la activación de proteasas, lipasas, generación de radicales libres e impide la fosforilación oxidativa mitocondrial (Choi, 1988; Cheung 1986).

Los efectos neurotóxicos del NMDA estan mediados primeramente vía receptores, en la superficie celular postsináptica, ésto debido a que cambios en las poblaciones de las neuronas aferentes parecen no tener efecto en la potencia del NMDA como agonista NMDA (Bruyn y Stoof, 1990). Esto sugiere que las terminales presinápticas pueden tener un papel esencial en la actividad neurotóxica del QUIN, ya que éste puede promover la liberación de agentes neurotóxicos secundarios de las terminales nerviosas; o bien, los efectos postsinápticos pueden ser dependientes de los efectos de los factores liberados presinápticamente (Stone, 1993).

El factor inicial de la neurodegeneración asociada a la activación de los receptores NMDA es la acumulación intracelular de calcio, el cual activa proteasas, fosfolipasas, así como a la NOS e inicia una cadena de eventos que involucran la peroxidación de lípidos y producción de radicales libres, causando la muerte neuronal (Stone, 1993; Rios y Santamaría, 1991). En la figura 7 se muestran los mecanismos neurotóxicos del Glutamato.

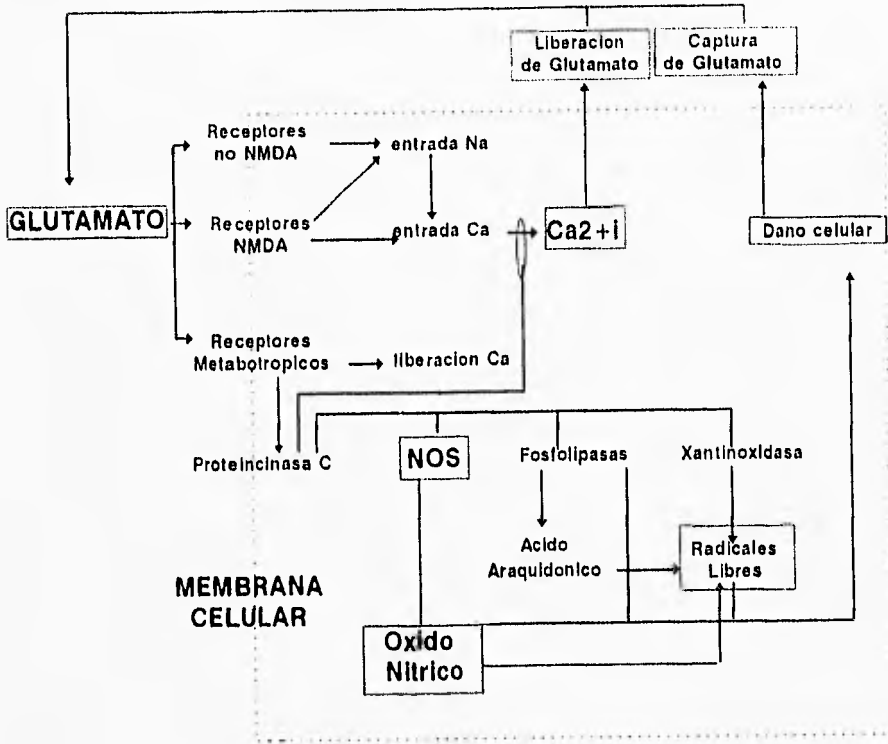


Fig. 7. Mecanismos neurotóxicos y de daño celular del Glutamato.

Las áreas del cerebro más sensibles a esta neurotoxicidad son el hipocampo y el cuerpo estriado, las cuales son también las

más sensibles a los efectos excitatorios del QUIN (Schwarcz y Kohler, 1983).

Otro descubrimiento importante fue reportado por Ríos y Santamaría en 1991, encontrando que el QUIN promueve la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro completo de rata. La lipoperoxidación está relacionada con la formación de radicales libres, así como con el daño celular, es posible que la toxicidad del QUIN esté mediada por esta ruta.

3.4.-Relación entre los receptores NMDA y la síntesis de Oxido Nítrico.

Se ha visto, por análisis cuantitativos y por procedimientos de hibridización in situ, que la mayoría de las neuronas que contienen NOS en corteza cerebral, cuerpo estriado y mesencéfalo, también contienen una cantidad significativamente mayor del RNAm que codifica para la subunidad NMDAR1 del receptor que las células de las mismas regiones que no sintetizan NO, encontrándose que se expresa más que en las que no sintetizan NO (Price y col, 1993).

La activación de los receptores glutamatérgicos, induce la entrada de calcio a la célula, lo cual puede ser traducido en la activación de la NOS dependiente de calcio/calmodulina, dando como resultado una producción de NO y, subsecuentemente, la formación de GMPC, el cual es utilizado como mensajero dentro de la célula (Southam y Garthwaite, 1991c; Kiedrowski y col, 1992).

Lo anterior no solo se da por la activación de los receptores NMDA (Rowley y col. 1993), sino también por la

activación de otros receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Garthwaite y col, 1989, Puttfarcken y col, 1992), aunque su relación no es del todo clara, y no tenga la relevancia que tiene la activación del receptor NMDA para la síntesis de NO.

Por otro lado, se ha observado que la producción de NO modula a los receptores NMDA mediante la reacción de los grupos sulfhidrilo libres en el receptor, para formar uno ó más S-nitrosotioles en presencia del NO. Si los grupos tioles cercanos reaccionan de esta manera, pueden formar puentes disulfuro, los cuales constituyen el sitio redox modulador del receptor, resultando en un bloqueo persistente de la respuesta de los receptores NMDA. Estos puentes disulfuro son espontáneamente destruidos (Lei y col., 1992; Manzoni y Bockaert, 1993).

4.-Peroxidación de Lípidos por Radicales Libres

Un radical libre es una molécula o especie iónica que contiene por lo menos un electrón desapareado (Symons, 1991). La reactividad de un radical está determinada por la fuerza con la cuál el electrón desapareado necesita participar en un enlace covalente.

Antes de confirmar el papel de un radical libre en el daño biomolecular de tejidos específicos, se deben de cumplir tres requisitos:

a) Debe haber una fuente definida de radicales libres en el tejido.

b) Debe de haber evidencia de que los sistemas atrapadores

de radicales libres son deficientes.

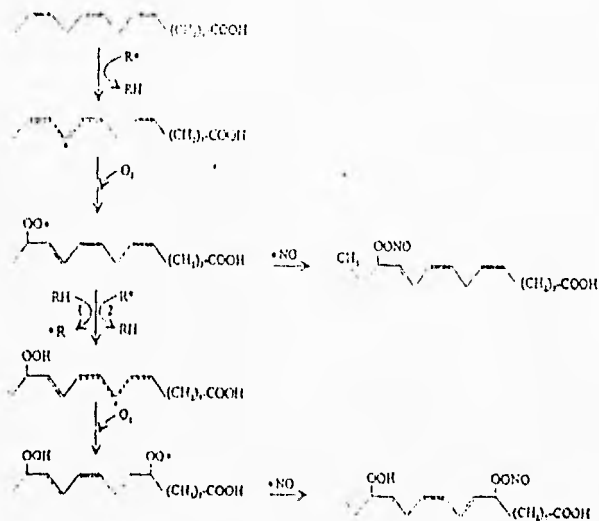
c) Debe haber evidencia biomolecular de que el radical libre fue el que indujo el daño.

(Dreosti, 1991).

El incremento en la generación de radicales libres puede ocurrir extra, intracelularmente o de ambas maneras. La disminución de la generación también puede ocurrir extracelular o intracelularmente (Dreosti 1991).

Los ácidos grasos poli-insaturados son constituyentes esenciales de las membranas. Pueden ser blanco de la oxidación producida por oxígeno molecular, debido a una cadena de procesos oxidativos llamados peroxidación de lípidos. La peroxidación puede iniciarse por ionización o radiaciones UV, o por reacciones mediadas por fierro o por otros metales en transición. El fierro puede también aumentar la peroxidación, catalizando el rompimiento de peróxidos lipídicos, produciendo una cadena de reacciones secundarias (Aust y col, 1985, Halliwell y Gutteridge, 1985; Kanner y col 1985). Complejos con fierro de bajo peso molecular y productos derivados del grupo hemo pueden catalizar estas reacciones.

En la figura 8, se muestran dichas reacciones incluyendo la iniciación y la propagación. Los peróxidos lipídicos no son muy estables y se rompen a productos que incluyen al malondialdehído, otros aldehídos e hidrocarburos gaseosos (Esterbauer, 1985).



Other $\bullet NO$ -derived products

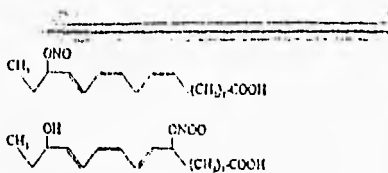


Fig. 8. Se muestra el proceso de peroxidación de lípidos, tomado de Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.C. (1985): Free Radicals in Biology and Medicine. Claredon Press, Oxford.

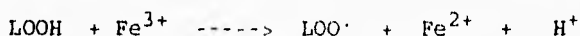
La fase de iniciación involucra la abstracción de hidrógeno. El radical $\bullet OH$ es capaz de llevarla a cabo y lo hace incluso en la peroxidación inducida por radiación (Dreosti, 1991). A pesar

de que el mecanismo no es completamente claro, parece que la iniciación real depende de la peroxidación catalizada por fierro, lo cual ocurre en su mayoría como resultado del rompimiento de hidroperóxidos preexistentes. (Aust y col, 1985; Minnoti y Aust, 1987). Este proceso está presente en preparaciones de lípidos aislados. Únicamente pequeñas concentraciones de Fe²⁺, son necesarias para que predomine este mecanismo. El Fe²⁺ puede descomponer peróxidos lipídicos de la siguiente manera:



(Aust, 1985).

La reacción equivalente con Fe³⁺ es la siguiente:



(Aust, 1985).

Dicha reacción parece ser un poco menos factible, a pesar de que el Fe³⁺ es activo en algunos sistemas peroxidantes (Aust y col, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1985).

5.-El Oxido Nítrico y sus diferentes formas redox activadas

La química del monóxido de nitrógeno involucra un arreglo de formas redox interrelacionadas como son: el catión nitrosonio (NO⁺), el óxido nítrico (NO[·]), y el anión nitroxilo (NO⁻). Este arreglo es reminiscencia de las formas redox del oxígeno (Stamler y col, 1992).

Un aspecto fundamental para entender la bioquímica del NO es el establecimiento de las propiedades y reactividad de las diferentes formas redox activadas.

El NO[·] tiene un electrón desapareado en su último orbital. La extracción de dicho electrón da como resultado al catión NO⁺, así como la adición de un electrón a este orbital resulta en la formación del anión NO⁻ (Stamler y col, 1992).

El óxido nítrico tiene reacciones importantes con las diferentes formas redox activadas del oxígeno así como con iones de metales en transición. El NO[·] participa también en reacciones con otros radicales libres, por ejemplo, el óxido nítrico, el cual inactiva al radical tiroxilo de la ribonucleótido reductasa (Stamler y col, 1992).

La vida media biológica del óxido nítrico generalmente es de pocos segundos, dependiendo de la concentración inicial del mismo. El óxido nítrico reacciona rápidamente con el O₂⁻. en solución acuosa ($k=3.7 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para formar al radical peroxinitrito (OONO⁻) (Stamler y col, 1992).

El NO forma complejos con iones de metales de transición, incluyendo a aquellos que se encuentran comunmente en las metaloproteínas, así como con los grupos hemo que se encuentran en la Hemoglobina (Hb) y en la GCS, regulando su actividad. El NO también forma complejos con otros elementos como el azufre contenido en el centro de las proteínas, como las que se encuentran involucradas en la transferencia mitocondrial de electrones, o con el azufre estructural de los aminoácidos como la cisteína, tal como ocurre en el caso de los receptores NMDA (Lafon-Cazal, 1993).

En el caso del catión NO⁺, su química está caracterizada por reacciones de adición y sustitución con nucleófilos, como son las bases ricas en electrones y los compuestos aromáticos. La

nitrosación en fase acuosa puede ocurrir en los centros ricos en azufre, nitrógeno, oxígeno, y carbono de moléculas orgánicas, involucrando al NO^+ o moléculas relacionadas. Hay evidencia química de que el NO^+ existe en condiciones ácidas en fase acuosa, en donde reacciona con distintos compuestos para formar tionitritos (RS-NO), nitrosaminas (RNH-NO), alquil y aril nitratos (RO-NO) y diversos óxidos de nitrógeno (Stamler y col, 1992). En sistemas biológicos, existen numerosos centros nucleofílicos que son potencialmente susceptibles de ser nitrosados, tales como son amidas, carboxilos e hidroxilos (Stamler y col, 1992).

Por otro lado, el NO^- se convierte rápidamente en N_2O a través de una reacción de dimerización y una de deshidratación, además de poder reaccionar con el Fe^{3+} de una manera similar al óxido nítrico (Stamler y col, 1992).

5.1-Oxido Nítrico y Estrés Oxidativo.

En los últimos años, las investigaciones se han orientado a analizar los eventos bioquímicos que ocurren entre la activación de los receptores NMDA y la muerte celular. La entrada de calcio a través del receptor NMDA es un punto clave (Lafon-Casal y Ben-Ari, 1991; Choi, 1980a; Mayer, 1989). Recientemente, se ha demostrado que un gran número de radicales libres son sintetizados después de un incremento en el calcio intracelular inducido por la activación de los receptores NMDA: el NO es sintetizado por una NOS dependiente de calcio/calmodulina (Brendt, 1992), y el O_2^- es producido por un mecanismo dependiente de calcio (Lafon-Casal, 1993). Se ha observado que

el altamente tóxico radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) puede ser formado in vivo por la descomposición de O_2^- . catalizada por metales, (Halliwell, 1985), o por acción del ión peroxinitrito (ONOO^-), que es el producto resultante de la interacción de NO con O_2^- . (Beckman, 1990). En la figura 9 se muestra los procesos mediados por los receptores de glutamato que contribuyen en el estrés oxidativo.

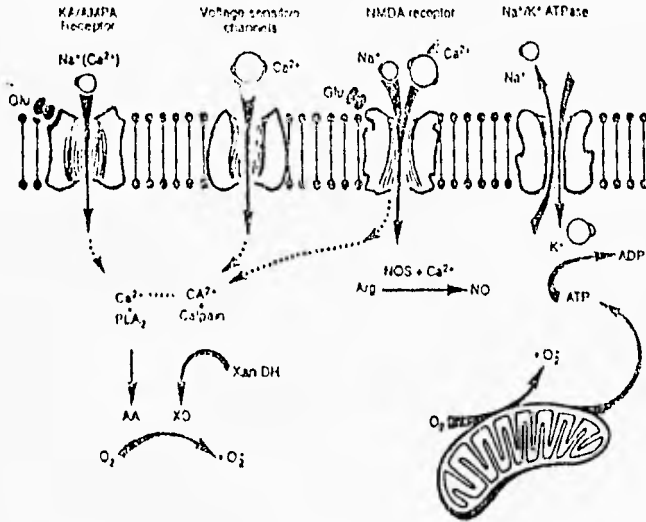


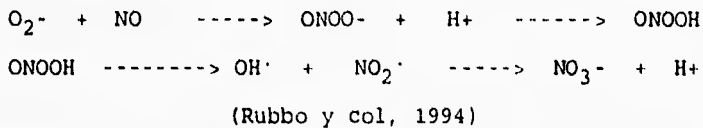
Fig. 9. Representación esquemática de los procesos mediados por receptores de glutamato, que contribuyen al estrés oxidativo. Tomado de Coyle, J., y Puttfarcken, P. (1993): *Science*, 262:689-694.

Recientemente, se ha visto que ambos radicales (NO y

Superóxido) pueden ser formados simultáneamente en el SNC (Hogg, 1993). Lo anterior es importante ya que se puede generar el radical peroxinitrito (ONOO⁻), el cuál es un oxidante poderoso capaz de transformarse a NO₂ y OH[·]. Esta reacción puede ocurrir tanto en fase gaseosa como en condiciones fisiológicas. El radical peroxinitrito es capaz de iniciar la peroxidación de lípidos oxidando los grupos sulfhídrido en proteínas y promoviendo la nitratación de los residuos de tirosina. Este mecanismo no requiere de la presencia de peroxidos lipídicos preexistentes (Hogg, 1993).

La vida media del NO oscila entre 4 y 50 segundos, (Beckman, 1989). El NO al tener un electrón desapareado y ser paramagnético, reacciona rápidamente con O₂⁻. para formar ONOO⁻. En soluciones alcalinas, el ONOO⁻ es estable, pero tiene un pka de 6.6 a 0 grados C, y decae rápidamente una vez protonado.

Estas reacciones estan representadas de la siguiente manera:



En la fase gaseosa, la descomposición del ácido peroxinitroso para formar OH[·] y del dióxido de nitrógeno (NO₂[·]), es importante en la formación del smog y la lluvia ácida. No obstante, el OH[·] y el NO₂[·] pueden recombinarse para formar ácido nítrico. La descomposición del ONOO⁻ genera un fuerte estrés oxidativo capaz de iniciar muchas reacciones que implican la acción del OH[·] (Beckman, 1990).

6.-Planteamiento General

El QUIN es un potente agonista endógeno de los receptores NMDA, y a través de la activación de este receptor es capaz de inducir la peroxidación de lípidos. Se ha propuesto que esta inducción está mediada por la entrada de calcio al interior de la célula lo que desencadena una serie de eventos tóxicos como son la activación de proteasas, fosfolipasas, formación de radicales libres y la activación de la NOS.

Por su parte, la activación de la NOS da como resultado un aumento de los niveles de NO. La propuesta del presente trabajo es que el NO, al encontrarse en un medio en el cual el radical superóxido esta presente, como son los sinaptosomas, puede reaccionar con esta última especie para formar al radical peroxinitrito, el cual, al protonarse, se disocia dando como resultado al NO₂ y el radical hidroxilo, contribuyendo activamente a la peroxidación de lípidos y aumentando el estrés oxidativo inducida por el ácido quinolínico.

Tanto inhibidores de la síntesis de NO como antagonistas del receptor NMDA pueden prevenir la peroxidación de lípidos inducida en los sinaptosomas de cerebro completo de rata. Este planteamiento se esquematiza en la figura 10.

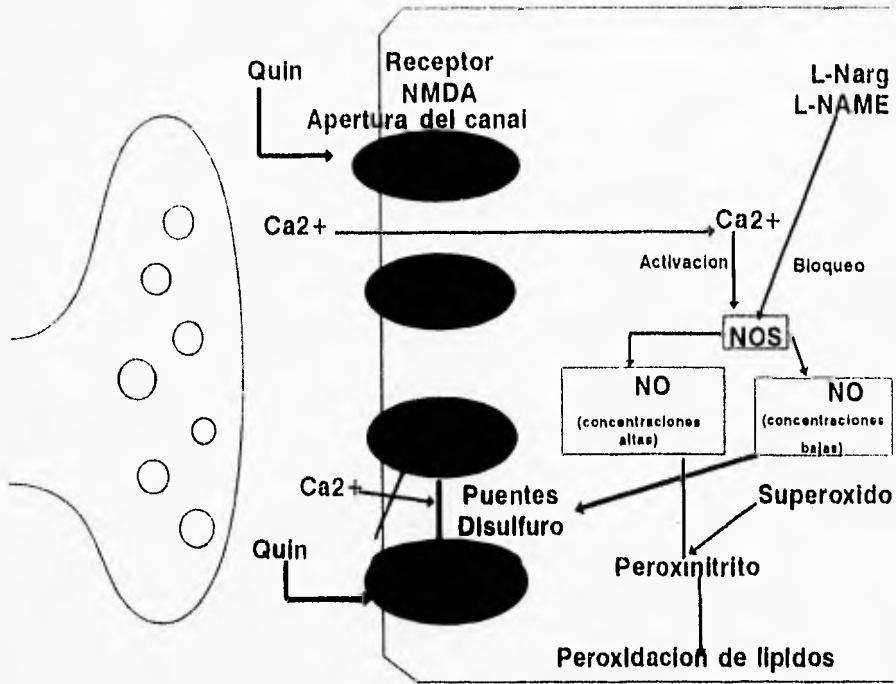


Fig.10. Esquema del planteamiento general del presente trabajo.

O B J E T I V O S .

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del óxido nítrico en la peroxidación de lípidos inducida por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de un donador del óxido nítrico, el nitroprusiato de sodio, en la peroxidación de lípidos.

Analizar el efecto de diferentes bloqueadores de la óxido nítrico sintetasa y un antagonista de los receptores NMDA, sobre la peroxidación de lípidos inducida por el ácido quinolínico.

M E T O D O

ANIMALES

Para el presente trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-300g.

REACTIVOS

Para éste trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- sulfato ferroso (FeSO_4) SIGMA
- ácido quinolínico (QUIN) SIGMA
- nitroprusiato de sodio (NP) SIGMA
- ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) SIGMA
- APV SIGMA
- Sacarosa SIGMA
- L-Nitro Arginina Metil Ester (L-NAME) RBI
- L-Nitro Arginina (L-NARG) RBI
- metanol BECKMAN
- cloroformo BECKMAN
- reactivo de folin fenol SIGMA
- Albúmina SIGMA
- Quinina SIGMA
- Acido Sulfúrico MERCK
- Sulfato de Cobre SIGMA
- Hidróxido de Sodio MERCK
- Carbonato de Sodio MERCK
- Tartrato de Sodio y Potasio MERCK.

DISECCION Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se obtuvieron los cerebros, los cuales fueron colocados en solución salina al 0.9%. Una vez separados del cerebelo, los cerebros se homogenizaron en una solución de Sacarosa 0.32M.

El homogenado se centrifugó en una centrifuga Beckman modelo J-21C a 4 500 rpm. durante 10 minutos (1 500g) . Se desecha el botón que contiene la fracción nuclear. El sobrenadante con las mitocondrias, mielina y sinaptosomas, se centrifugó a 9 500 rpm. durante 20 minutos (1 000g). Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 5ml de la solución de sacarosa 0.32M. El resuspendido se colocó sobre un colchón de 20ml de sacarosa 0.8M para después ser centrifugado en una ultracentrifuga Sorvall modelo OTD55B para realizar una separación por gradiente. La ultracentrifugación fue a 9 000 rpm. durante 27 minutos a temperatura de 4 grados centígrados. Se obtuvieron tres bandas en el gradiente: la primera de mielina, la segunda conteniendo a los sinaptosomas y una tercera con la fracción mitocondrial. Se recuperó la segunda banda con una pipeta Pasteur y se diluyó en 30ml de la solución de sacarosa 0.32M.

Se llevó a cabo una última centrifugación a 14 000 rpm. durante 15 minutos al final de la cual se resuspendió el botón con la fracción sinaptosomal en 9ml de solución salina al 0.9% a pH 7.4.

TRATAMIENTOS

Se tomarón alicuotas de 970 μ l, las cuales se colocaron en tubos de ensayo. El resto de la muestra se almacenó en congelación para realizar una determinación de proteínas por el método de Lowry, el cuál será descrito en detalle posteriormente.

Se administraron distintos tratamientos a las muestras de forma independiente con un número de repeticiones de 5-20, de la siguiente manera:

a) blanco (970 μ l de sol. salina 0.9% pH 7.4 + 30 μ l de H₂O desionizada).

b) tratamiento control (970 μ l de homogenado + 30 μ l H₂O).

c) tratamiento control positivo de peroxidación (970 μ l de homogenado + 10 μ l sol. de Sulfato ferroso 200 μ M + 20 μ l H₂O).

d) tratamiento con QUIN (10 μ l de una sol. 10mM + 970 μ l de homogenado + 20 μ l de H₂O).

e) tratamiento con NP (10 μ l de una sol. 10mM + homogenado + H₂O).

f) tratamiento con ferrocianuro (10 μ l de sol. 10mM + homogenado + H₂O).

g) tratamiento con QUIN (QUIN + 10 μ l de sol. de APV 25mM + homogenado + H₂O).

h) tratamiento con QUIN + NP + homogenado + H₂O).

i) tratamiento con QUIN + 10 μ l de L-NAME (a las dosis de 10, 20 y 40mM) + homogenado + H₂O.

j) tratamiento con QUIN + 10 μ l de L-NARG (a las dosis de 10, 20 y 40 mM) + homogenado + H₂O.

Una vez adicionados los tratamientos al tejido, todos los tubos fueron agitados en vórtex durante 10 segundos.

Todos los tubos con los distintos tratamientos, se incubaron en baño con agitación a 37 grados centígrados, durante 60 min.

TECNICA DE MEDICION DE PRODUCTOS LIPIDICOS FLUORESCENTES

Al término de la incubación, a cada tubo se le adicionaron 3ml de una mezcla de cloroformo:metanol (3:1, v:v), se agitaron en vórtex por 15 segundos, y se dejaron reposar en oscuridad a 4 grados centígrados durante 30 min.

Se calibró el espectrofotómetro de luminiscencia modelo LS50B Perkin Elmer con una sol. estándar de quinina a una concentración de $0.1\mu\text{g/ml}$ disuelta en ácido sulfúrico al 0.05M, ajustando a 14 unidades de fluorescencia, con un slit de 15nm y con una longitud de onda de emisión de 430nm y de excitación de 370nm.

En celdas de cuarzo, se colocaron $800\mu\text{l}$ de la muestra y se adicionaron $100\mu\text{l}$ de metanol. Se colocaron las alícuotas dentro del espectrofotómetro y se leyeron los productos lipídicos fluorescentes. Una vez hecho lo anterior con todas las muestras, se procedió a hacer la corrección por mg de proteína medida por el método de Lowry.

METODO DE LOWRY

El método de Lowry para la determinación de proteínas consiste en realizar una curva de calibración con albúmina a las siguientes concentraciones: 0, 25, 50 y 100 μ g/ml.

Se diluyeron las alícuotas de tejido en una proporción de 1:20 (50 μ l de la muestra y se le agregan 950 μ l de agua), se tomaron 0.4ml de la muestra diluida y se les agregan 2ml de la siguiente mezcla:

49ml de Carbonato de Sodio disuelto en Hidróxido de Sodio al 0.1N.

+0.5ml de tartrato de Sodio y Potasio al 2%.

+0.5ml de Sulfato de Cobre al 1%.

Las muestras se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se dejaron incubar a temperatura ambiente. 10 minutos después se agregaron 200 μ l del reactivo Folin fenol (1:1, v:v), a cada tubo, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se les dejó reposar durante 30 minutos, al cabo de los cuales se determinó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de luz visible Beckman modelo DU-6 a una longitud de onda de 550nm.

Los valores de absorbancia fueron interpolados en la curva de albúmina para obtener la concentración de proteína por ml de homogenado.

Una vez que se obtuvieron los datos de peroxidación de lípidos y la concentración de proteína por ensayo, se realizó la corrección y se expresaron los resultados en unidades de fluorescencia por mg de proteína.

ESTADISTICA

A los resultados se les aplicó una prueba de Tukey para tratamientos independientes con número de repeticiones diferentes, después de un análisis de varianza de una vía.

RESULTADOS

-Efecto del nitroprusiato de sodio sobre la peroxidación de lípidos en sinaptosomas de cerebro completo de rata.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos con la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados se encuentran expresados como unidades de fluorescencia por mg de proteína (U.F./mg prot.).

La administración del QUIN a una concentración de $100\mu\text{M}$, incrementó la peroxidación de lípidos en los sinaptosomas en un 156% con respecto del control. Este incremento fue completamente prevenido con la adición de un antagonista competitivo de los receptores para NMDA, el APV, a una concentración de $250\mu\text{M}$, no encontrándose diferencias significativas al compararla contra el control.

La administración de NP a una concentración de $100\mu\text{M}$, incrementó la peroxidación de lípidos en sinaptosomas en un 222% con respecto del control, y de un 26% con respecto de QUIN, aunque esta última diferencia no fue estadísticamente significativa.

En un lote adicional incubado en paralelo se probó el efecto de un producto de la disociación del NP, el Ferrocianuro. El NP, al disociarse, da como resultado, en relación estequiométrica, al NO y al $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_5^-$, por lo cual, se decidió probar el efecto de una forma molecular parecida a éste último, sobre la peroxidación de lípidos en los sinaptosomas, para lo cual, se utilizó el ferrocianuro de potasio. Los resultados

obtenidos muestran que el ferrocianuro también promovió la peroxidación de lípidos en un 129% con respecto del control, y un 70% por debajo de la peroxidación producida por el NP, siendo esta diferencia significativa.

En otro lote adicional, se coadministraron el QUIN y el NP, con la finalidad de investigar la posible interacción de ambos fármacos y su efecto en la peroxidación de lípidos. Los resultados encontrados muestran una disminución de la peroxidación lipídica hasta niveles basales, no habiendo una diferencia significativa con respecto del control, pero si con respecto del lote tratado con QUIN y al lote tratado con NP.

EFFECTO DE DOS INHIBIDORES DE LA NOS SOBRE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS EN SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA

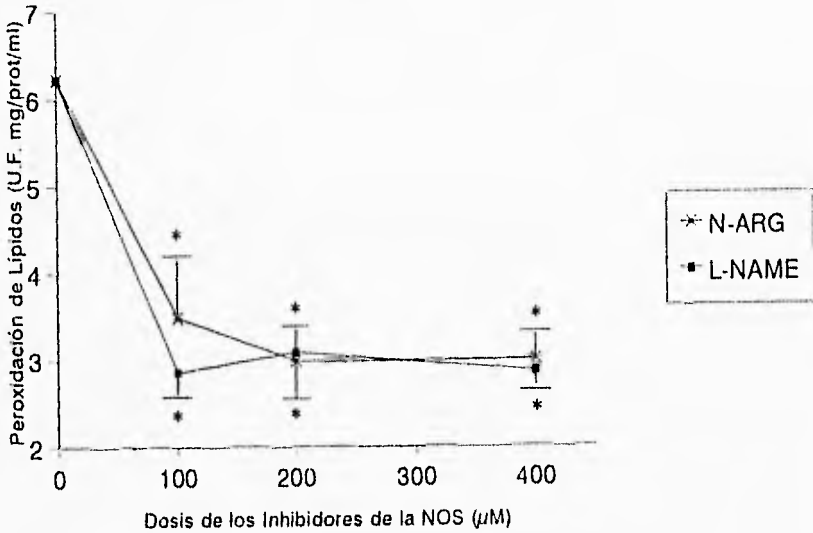


Fig. 11. Gráfica donde se muestra el efecto del nitroprusiato de sodio sobre la peroxidación de lípidos inducida por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata. Los resultados están expresados en unidades de fluorescencia por mg de proteína. + $p < 0.01$ con respecto del control, * $p < 0.01$ con respecto del tratamiento con QUIN; prueba de Tukey para tratamientos independientes, $n = 5-20$.

-Efecto de dos inhibidores de la Oxido Nítrico Sintetasa sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en sinaptosomas de cerebro completo de rata.

En la figura 12, se muestra el efecto de la adición de dos inhibidores de la NOS (la L-NAME y la L-NARG) sobre la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en sinaptosomas de cerebro completo de rata.

Tres diferentes dosis de cada inhibidor fueron administradas en presencia del QUIN a concentraciones de 100, 200 y 400 μ M, con la finalidad de evaluar una posible dependencia de la concentración.

En presencia de concentraciones crecientes de la L-NARG, se observó una prevención de la peroxidación de lípidos casi hasta niveles basales con las tres dosis, no encontrándose una diferencia significativa contra el control en ninguna de las dosis, ni tampoco un efecto dependiente de las concentraciones.

Por su parte, con la L-NAME, a las mismas concentraciones que la L-NARG, la peroxidación de lípidos disminuyó en casi un 100% con respecto al QUIN. Tampoco se encontraron diferencias significativas con respecto del control, ni una dependencia de la concentración.

En ambos casos, los inhibidores de la NOS protegieron significativamente contra la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en sinaptosomas de cerebro completo de rata, sin mostrar un efecto dependiente de la concentración.

PEROXIDACION DE LIPIDOS EN SINAPTOSOMAS DE CEREBRO DE RATA

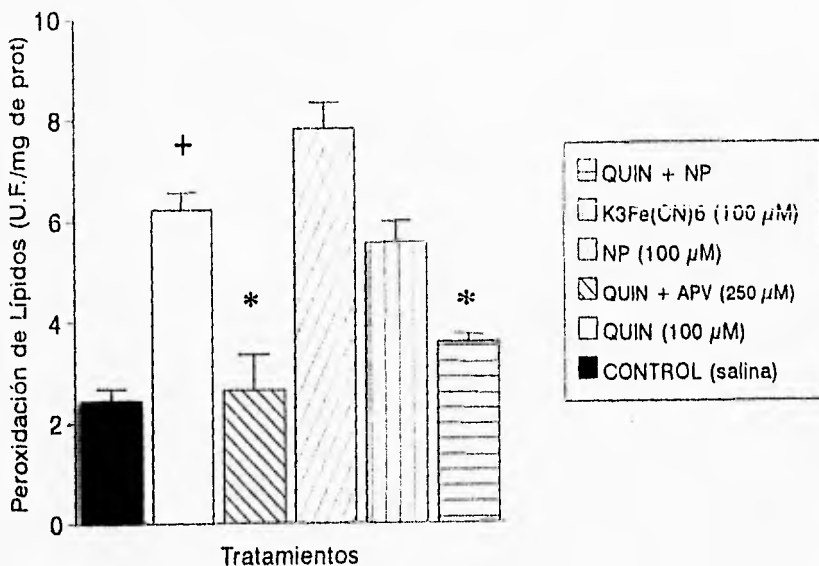


Fig. 12. Efecto de dos inhibidores de la Oxido Nítrico Sintetasa sobre la peroxidación de lípidos inducida por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata. Los resultados estan expresados en unidades de fluorescencia por mg de proteína. * $p < 0.01$ con respecto del control. Prueba de Tukey para tratamientos independientes, $n = 8-10$.

D I S C U S I O N .

En reportes previos realizados por Ríos y Santamaría (1993), se observó que el QUIN promueve la peroxidación de lípidos debido a la activación de los receptores NMDA, por un mecanismo que supone la entrada y acumulación de calcio en el interior de las neuronas, con lo cual se desencadena una serie de eventos como son la activación de proteasas, fosfolipasas, formación de radicales libres, liberación de segundos mensajeros, entre otros eventos involucrados en la promoción de la peroxidación de lípidos (Stone, 1993).

Uno más de los eventos que se desencadenan con la entrada de calcio al interior de la neurona es la activación de la NOS (Kiedrowski y col, 1992). Este proceso dá como resultado un incremento en los niveles de NO, el cual repercute en numerosos eventos tales como la activación de la GCS cerebral, aumentando así los niveles de GMPc y promoviendo, una serie de procesos mediados por segundos mensajeros (Hu y col, 1993).

El NO es una molécula con múltiples funciones reportadas (Moncada, 1991), alcanzando su biofase al difundir y actuar sobre numerosas células blanco. Por ser un gas, difunde muy fácilmente desde las células que lo sintetizan hasta el lugar donde actúa.

Por otra parte, se sabe que la NOS es una NADPH-diaforasa (Matsumoto y col, 1993; Hope y col, 1991). Las células que contienen a la NOS, sintetizan más del RNAm que codifica para una de las subunidades del receptor NMDA (Price y col, 1993).

Recientemente se descubrió que las células que sintetizan NO son resistentes a la toxicidad mediada por la activación de los receptores NMDA, debido presumiblemente al bloqueo de la entrada de calcio en concentraciones tóxicas, al interior de la célula (Ikeda y col, 1993).

Existe mucha evidencia de que el NO reacciona con el radical superóxido, generando al radical peroxinitrito, el cual, al protonarse, se disocia en dióxido de nitrógeno y en radical hidroxilo. El radical peroxinitrito puede causar daño oxidativo a proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA, organelos y sistemas celulares, también reacciona con los centros metálicos de algunas biomoléculas, produciendo la formación de radicales libres mucho más reactivos (Rubbo y col, 1994).

La formación del NO y del $O_2^{\cdot-}$, de manera simultánea (Lafon-Cazal y col, 1993) en sistemas complejos como los sinaptosomas (en los cuales encontramos una fuente muy importante de superóxido) y en las mitocondrias (las cuales además son una importante fuente de protones). Los protones de estos sistemas, son tomados por el peroxinitrito, y una vez protonado, se genera el dióxido de nitrógeno y el radical OH^{\cdot} . A su vez, el OH^{\cdot} formado de esta manera, inicia la cadena de reacciones que se muestran en la figura 13.

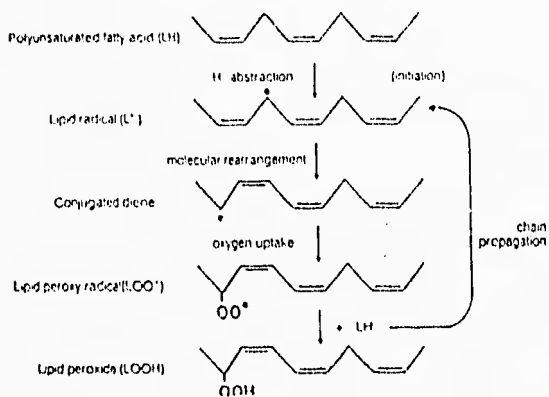
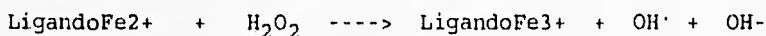


Fig.13. Mecanismos de reacción propuestos y características estructurales de los productos de la oxidación de lípidos dependiente del Oxido Nítrico. Tomado de Rubbo, H. y col. (1994): Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation. J. Biol. Chem. 26066-26091.

El primer paso de la peroxidación generada por radicales

libre, es la abstracción de un hidrógeno del ácido graso polinsaturado a nivel de la membrana celular, formandose un radical libre. Esta molécula sufre un reacomodo en su estructura para formar un dieno conjugado, que al reaccionar con el oxígeno molecular, forma al radical lipoperóxido. El lipoperóxido a su vez, abstrae un hidrógeno de otro ácido graso polinsaturado, provocando una reacción en cadena autocatalítica, con la consecuente formación de hidroperóxidos lipídicos altamente reactivos (Rubbo y col, 1994). Todo lo anterior puede ayudar a explicar el por que del aumento en la peroxidación de lípidos inducida por el NP. El NO producido por el donador reacciona rápidamente con el radical superóxido para formar al radical peroxinitrito y desencadenar así la serie de reacciones descritas anteriormente.

Por otra parte, el ferrocianuro resultante de la disociación del NP, también puede promover la peroxidación de lípidos, lo cual puede ser explicado parcialmente por el fierro que se encuentra en la estructura del compuesto. El fierro lleva a cabo una reacción de Fenton, en la cual reacciona con el peróxido de hidrógeno del medio, dando como resultado Fe^{3+} , OH^{\cdot} y OH^{-} , en la siguiente reacción:



La peroxidación de lípidos inducida por el QUIN fue completamente prevenida por un antagonista competitivo de los receptores para NMDA, proponiendo que la peroxidación de lípidos debida al QUIN está mediada por la activación de los receptores NMDA.

Lo anterior, aunado a reportes donde se ve que el NO modula endógenamente al receptor NMDA, explica parcialmente el porque de la disminución de la lipoperoxidación en el lote que fue tratado con QUIN y NP. El NO es sintetizado por la NOS en respuesta a la entrada de calcio mediada por la apertura de canales iónicos asociados al receptor NMDA. El QUIN activa al receptor y permite la entrada de calcio al interior de la célula, con lo cual se activa la síntesis de NO. El NO producido podría difundir hasta el receptor, reaccionando con los grupos tiol de los aminoácidos estructurales del canal como la cisteína; esta reacción promovería la formación de puentes disulfuro, produciendo así un bloqueo relativamente persistente del canal. Estos puentes disulfuro se modifican espontáneamente cuando las condiciones de estrés oxidativo vuelven a niveles basales; es decir, cuando el NO se retira del medio (Manzoni y col, 1993).

Para que la formación de puentes disulfuro se dé como mecanismo de regulación endógena de los receptores NMDA, éstos últimos deben encontrarse activados, y por lo tanto, el canal iónico debe estar abierto (Manzoni y col, 1993). Por otro lado, se ha visto que el NO tiene un papel protector en eventos patológicos asociados con una producción excesiva de especies derivadas del oxígeno parcialmente reducidas (Rubbo y col, 1994).

Más aún, se ha reportado la completa inhibición de la peroxidación de lípidos, explicada no tanto por un mecanismo de captura de radicales libres por el ONOO⁻ o por el ONOOH, sino por una reacción de neutralización del NO mediada por especies de radicales lipídicos, terminando así con la cadena de propagación

de radicales (Rubbo y col, 1994). La dirección que puede tomar el NO como factor promotor o inhibidor de la peroxidación de lípidos depende de múltiples factores tales como las tasas relativas de producción y permanencia en los estados y concentraciones del NO y del $O_2^{\cdot-}$, los sitios anatómicos y celulares de la producción de NO y $O_2^{\cdot-}$ y los mecanismos operativos dominantes de daño oxidativo en los tejidos en el momento de producción del NO y del $O_2^{\cdot-}$, la disponibilidad de protones, concentración de NO y $O_2^{\cdot-}$, y la relación ONOO⁻:ONOOH, entre otros (Rubbo y col, 1994). Se ha reportado que a concentraciones submicromolares, el NO puede inhibir significativamente la reactividad del ONOO⁻ (Rubbo y col, 1994).

El NO, al reaccionar con los grupos tiol del receptor NMDA activado, disminuye su concentración libre en el medio, lo cual podría explicar parcialmente la disminución en la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN que es mediada por el NO producido extracelularmente. Para confirmar si el NO media la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN en sinaptosomas, se decidió probar dos inhibidores de la NOS, el L-NAME y la L-NARG. Ambos inhibidores previnieron la peroxidación de lípidos, presumiblemente al disminuir los niveles de NO, lo cual podría repercutir de dos formas en la peroxidación lipídica: la primera es que al disminuir la concentración de NO, el poco que se forma reacciona con los hidroperóxidos lipídicos impidiendo que se propague la cadena peroxidante. Por otro lado, es probable que al inhibir completamente a la enzima que sintetiza al NO, no exista un estrés oxidativo mediado por NO, y la peroxidación de lípidos no ocurra.

C O N C L U S I O N E S

-La peroxidación de lípidos inducida por el Acido Quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata es parcialmente mediada por el Oxido Nítrico.

-El papel del Oxido Nítrico en la peroxidación de lípidos, parece estar determinada por varios factores como son: la concentración del NO, la disponibilidad de protones en el medio, la concentración de Superóxido, así como la relación entre las concentraciones de Oxido Nítrico y Superóxido con la formación del radical Peroxinitrito.

-El Oxido Nítrico presenta un carácter dual en la peroxidación de lípidos, por un lado, puede inhibir la peroxidación de lípidos al estar en concentraciones submicromolares, y por el otro lado puede promover la lipoperoxidación al estar en concentraciones micromolares.

-Los inhibidores de la síntesis de Oxido Nítrico, L-Nitro arginina y L-Nitro arginina metil ester, previenen la peroxidación de lípidos inducida por el Acido Quinolínico en sinaptosomas de cerebro de rata.

A P E N D I C E

RADICALES LIBRES

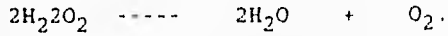
Algunas fuentes de electrones son electrodos negativos, aniones o moléculas con potenciales de ionización bajos, ciertas especies fotoexcitables, radicales ionizantes y complejos de metales en transición ricos en electrones. Dentro de los mejores aceptores de electrones encontramos a los electrodos positivos, cationes o moléculas con alta afinidad electrónica o complejos de metales en transición pobres en electrones (Symons, 1991).

-Radicales libres como mediadores del daño tisular.

La regulación de la reactividad de los radicales libres es esencial para la supervivencia de organismos aeróbicos. La modulación de la reactividad involucra procesos complejos de interacción entre la generación de radicales libres y numerosos sistemas enzimáticos y no enzimáticos, localizados en microambientes celulares tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, que controlan a estas especies químicas reactivas (Del Maestro, 1980; Dormandy, 1978).

La reducción de un electrón del O_2 , llamada vía univalente, predomina en sistemas biológicos, y la completa reducción del oxígeno involucra la adición de 4 electrones y 4 protones a cada molécula de oxígeno. Los resultantes intermediarios son el radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH). Estos intermediarios son sumamente reactivos (Del Maestro, 1991).

El peróxido de hidrógeno, el producto divalente de la reducción de O_2 , es descompuesto a H_2O por una catalasa de la siguiente manera:



(Del Maestro, 1991)

y por una variedad de peroxidasas, como se muestra a continuación:



(Del Maestro, 1991)

Las actividades celulares y subcelulares de estas enzimas en los tejidos no son estáticas; son moduladas por muchos factores tales como:

a) edad

b) diferenciación celular

c) alteraciones en la generación intracelular de O_2^- y H_2O_2 ,

d) disponibilidad local de los metales constitutivos,

e) concentración local de numerosos agentes inmunomoduladores llamados limfocinas (Del Maestro 1991).

La mayor región hidrofóbica en las células es su membrana lipídica, las cuales contienen ácidos grasos polinsaturados (PUFA). La peroxidación de lípidos puede ser iniciada por radicales libres, resultando en una reacción en cadena, propagando la acción del radical sobre los lípidos, con lo cual se pueden liberar hidroperóxidos lipídicos (Gardner, 1983).

Por su parte, los hidroperóxidos son sustrato para la glutatión peroxidasa (GSH-Px), pero esta enzima soluble no es capaz de reducir hidroperóxidos lipídicos localizados en microambientes hidrofóbicos (Grossman y Wendel, 1984).

El complemento de dicha enzima, es la acción de fosfolipasas específicas, las cuales pueden remover hidroperóxidos lipídicos de las membranas con la subsecuente, reducción por la acción de la GSH-Px (Ursini y col, 1982).

La reactividad de un radical libre específico generado, combinada con el microambiente bioquímico específico donde fue generado, determina el daño biomolecular, y subsecuentemente el daño celular sufrido por un organismo. Cada medio intracelular tiene mecanismos atrapadores, localizados en microregiones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, los cuales, en conjunción con otros mecanismos, son capaces de modular la reactividad de los radicales libres en los microambientes de cada organelo.

-Sistemas de daño por oxidación en tejidos

Numerosos sistemas de daño por oxidación en tejidos han sido propuestos para jugar un gran papel en el metabolismo normal y en estados patológicos.

No obstante que estos sistemas son claramente interdependientes, pueden considerarse bajo numerosas categorías específicas.

-Radical Superóxido anión

El radical anión superóxido tiene la capacidad de actuar como agente reductor, donando su electrón desapareado, o como agente oxidante en cuyo caso es reducido a H_2O_2 (Fee y Valentino, 1977). La reactividad del O_2^- con compuestos biológicos en solución acuosa, a pH fisiológico, es limitada por su tasa constante de dismutación $k=2 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Así pues, la tasa de dismutación espontánea es rápida, y la presencia de la superóxido dismutasa (SOD) incrementa esta tasa intracelularmente (Fridovich, 1978).

En microambientes en los cuales la concentración de SOD es baja, pueden ocurrir reacciones que tienen tasas que compiten con la dismutación espontánea.

Una gama de compuestos biológicos, incluyendo metales en transición (Halliwell, 1978) y quinonas (Ts'o y col, 1977), pueden ser reducidos por el O_2^- ; y además éste puede oxidar catecolaminas (Jewett y col; 1986), ascorbato (Winterbourn, 1981), y otros compuestos biológicos (Fee y Valentine, 1977).

Se ha sugerido que el O_2^- , puede ser reactivo en microregiones celulares hidrofóbicas como una base, y a pH bajo, el HO_2^- (su forma protonada), puede tener un papel oxidante en las membranas reaccionando con ácidos grasos y otros compuestos hidrofóbicos (Weiss, 1986).

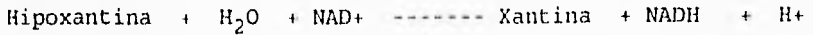
La habilidad del O_2^- . de cruzar las membranas plasmáticas vía la unión con aniones, es un mecanismo por el cual el O_2^- . generado extracelularmente, puede penetrar membranas celulares localizando blancos intracelulares (Lynch y Fridovich, 1978).

Además, el O_2^- . tiene la capacidad de difundir relativamente largas distancias; ésto, aunado a su habilidad para reducir metales en transición estratégicamente localizados cerca o dentro de macromoléculas importantes (como el DNA), puede resultar en una selectividad de daño a macromoléculas (Chevion, 1989, Sammuni y col, 1981).

Existen diversas fuentes de producción de O_2^- ., tales como las mitocondrias, numerosas enzimas intracelulares, el oxígeno molecular reducido a O_2^- . (Parks y col, 1986) y la autooxidación de numerosos compuestos intracelulares, (incluyendo catecolaminas, flavinas y ferredoxinas), que resultan en la liberación de O_2^- . (Jewett y col, 1986; Boveris, 1987; Misra y Fridovich, 1971).

La Xantina oxidasa es la enzima vinculada al control oxidativo más estudiada (Parks y col, 1986). De gran interés también son la aldehído oxidasa, la deshidroortico deshidrogenasa, la flavin deshidrogenasa y las peroxidasas (Kolher y Jenzer, 1989).

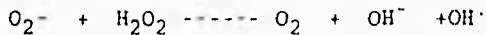
En tejidos normales, la xantina oxidasa existe predominantemente como una enzima deshidrogenasa, utilizando NAD^+ como aceptor de electrones. Esta reacción se representa de la siguiente manera:



(Del Maestro, 1993).

A pH fisiológico y concentración atmosférica de O_2 , aproximadamente el 20% del flujo total de electrones resulta en la producción de O_2^- . (Dreosti, 1991).

Por otro lado, Haber y Weiss en 1934, describen una serie de reacciones que estudian la química Fenton. Una de estas reacciones, llamada reacción de Haber-Weiss, fue sugerida en un principio como el mecanismo por el cual el OH^\cdot , un agente oxidante mucho más fuerte que el O_2^- o el H_2O_2 , pudiera ser generado por su interacción (Fridovich, 1978). A continuación se muestra la reacción de Haber-Weiss.

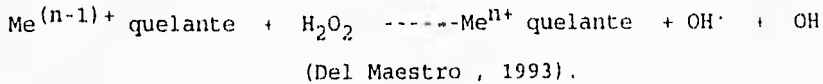


(Del Maestro, 1993).

La reacción de Haber-Weiss es lenta (Koppenol y col, 1978).

No obstante, la presencia de un metal quelante como el Fe^{2+} ó el Cu^+ , puede sufrir una reducción por O_2^- , fue sugerida como la serie de reacciones que ocurren biológicamente (Halliwell, 1978a; Halliwell, 1978b). El fierro cataliza la reacción de Haber-Weiss, como se muestra a continuación:





La generación de las especies oxidantes parece ser dependiente de la concentración y de la reactividad del metal quelante presente (Sutton y Winterbourn 1989).

-Peróxido de Hidrógeno

El H_2O_2 puede ser considerado como un fuerte agente oxidante en altas concentraciones. A una concentración de 1 mM, y el H_2O_2 produce la despolarización de la membrana plasmática, incrementando la permeabilidad membranal, entre otros factores, lo cual sugiere que, como el H_2O_2 tiene una constante de permeabilidad alta, grandes concentraciones pueden redundar en daño a la membrana lipídica (Dreosti, 1991).

Dos tipos de reacciones resultan en la generación de H_2O_2 :
 1) la reducción divalente del O_2 por enzimas tales como la urato, D-aminoácido y xantina oxidasa, y 2) que es la dismutación del O_2^\cdot . espontánea o catalizada por enzimas.

La mayoría de las enzimas divalentes que dan como resultado la generación de H_2O_2 , se encuentran localizadas en organelos específicos llamados peroxisomas (Chance y col, 1979).

La mitocondria puede ser una de las fuentes intracelulares de H_2O_2 , aunque cualquier fuente intracelular de O_2^\cdot puede

contribuir a la generación de H_2O_2 .

-Radical Hidroxílo

El radical hidroxílo ($OH\cdot$) es una especie química extremadamente reactiva e inestable, reacciona con una gran variedad de compuestos biológicos, tanto en ambientes hidrofóbicos como hidrofílicos.

El radical hidroxílo participa en reacciones de adición, abstracción de hidrógeno, y en la transferencia de electrones (Pryor, 1976). A diferencia del O_2^- y de el H_2O_2 , los sistemas no enzimáticos involucran la modulación de la reactividad del radical $OH\cdot$, y el fin de mecanismos atrapadores celulares parece contrarrestar la generación de $OH\cdot$ o de otros agentes oxidantes.

Estos mecanismos existen en cualquier microambiente en el cual sea generado el O_2^- , y existan metales quelantes in vivo (Dreosti, 1991).

REFERENCES

- Aust, D.S., Morehouse, L.A., and Thomas, C.E.: Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* 1:3-25, 1985.
- Bates, J.N.: The study of the biological Nitric Oxide. *Neuroprotocols*, 1:99-107, 1992.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, L.B.: Replications of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, 321:168-171, 1986.
- Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshal, P., and Freeman, A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:1620-1624, 1990.
- Boveris, A.: Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 78:67-82, 1977.
- Bredt, D.S., Ferris, C.D., and Snyder, S.H.: Nitric Oxide Synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP dependent protein kinase, protein kinase C and Calcium/Calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin sites. *J. Biol. Chem.* 1991
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H.: Isolation of nitric oxide synthetase a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acadm Sci. USA.*, 87:682-685, 1990.
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H.: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 86:9030-9033, 1989.
- Brune, B., and Lapetina, E.G.: Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.*, 264:8455-8458, 1989.
- Bruyn, R., and Stoof, J.: The Quinolinic Acid hypothesis in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* 95:29-38, 1990.
- Coyle, J.T., Bird, S.J., Evans, R.H., Gulley, R.L., Nadler, J.V., Nicklas, W.J., and Olney, J.W.: Excitatory aminoacid neurotoxins selectivity, specificity and mechanisms of action. *Neurosci. Res.* 19: 331-427, 1981.
- Coyle, J.T., and Puttfarcken, P.: Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262:689-694, 1993.
- Curtis, D.R., and Johnson, G.A.R.: Aminoacid transmitter in the mammalian central nervous system. *Ergeb. Physiology.* 69:98-188, 1974.

- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**:527-605, 1979.
- Chetkovich, D.M., Klann, E., and Sweatt, J.D.: Nitric Oxide Synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *Neuroreport*, **4**:919-922, 1993.
- Cheung, J., Bonventre, J., Malis, D., and Leaf, A.: Calcium and ischemic injury. *New Engl. J. Med.* **314**:1670-1676, 1986.
- Chevion, M.: A site-specific mechanism for free radicals induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Rad. Biol. Med.* **5**:27-37, 1989.
- Choi, D.W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. **1**:623-634, 1988.
- Deguchi, T.: Activation of guanylate cyclase in cerebral cortex of rat by hydroxylamine. *J. Biol. Chem.* **252**:596-601, 1977.
- Del Maestro, R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **492**:153-168, 1980.
- Del Maestro, R.F.: Free radicals as mediators of tissue injury. In "Trace elements, micronutrients, and free radicals", ed. by I.E. Dreosti pp.25-51, Human Press, N.J. 1991.
- Dormandy, T.L.: Free radical oxidations and antioxidants. *Lancet*, **2**:647-650, 1978.
- Dreosti, I.: Trace elements, micronutrients and free radicals. Division of Human Nutrition CSIRO, Adelaide Australia, 1991.
- Drummond, G.I.: Cyclic GMP. In "Cyclic Nucleotids in the nervous system", pp. 40-125, Raven Press, N.Y. 1984.
- Esterbauer, H.: Lipid peroxidation products: formation, chemical properties, and biological activities. In *Free Radicals in Liver Injury*, G. Poli, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani, and T.F. Slater, eds., IRL Press, Oxford, 1985, pp. 29-47.
- Fee, J.A., and Valentine, J.S.: Chemical and physical properties of superoxide. In "Superoxide and superoxide dismutases", ed. by A.M. Michelson, J.M. McCord, and I. Fridovich, pp.19-60, Academic N.Y. 1977.
- Feelisch, M., and Noack, E.A.: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **139**:19-30, 1987.
- Ferrendelli, J.A., Blank, A.C., and Gross, R.A.: Relationships between seizure activity and cyclic nucleotide levels in rat

- brain. *Brain Res.* 200:93-103, 1980.
- Forstermann, U., Gorsky, L.D., Pollo S.M., and Olney, J.W.: excitoto receptor. *Trends Neurosci.* 10:299-302, 1987.
- Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals. *Science*, 201:875-880, 1978.
- Ganong, A.H., and Cotman, C.W.: Kynurenic acid and quinolinic acid act at M-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236:293-299, 1986.
- Gardner, H.W.: Oxigen radicals chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* 7:65-86, 1983.
- Garthwaite, J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the neurons system. *Trends neurosci.*, 14: 60-67, 1991.
- Garthwaite, J.: Nitric oxide synthesis linked to activation of excytatory neurotransmitter receptor in brain. In "Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system", ed. by S. Moncada and E.A. Higgs, pp. 115-137, Elsevier Amsterdam 1990.
- Garthwaite, J.: NMDA receptors, neuronal development and neuronal degeneration. In "The NMDA receptor", ed. by J.C. Watkins and G.L. Collingidge. pp. 187-205, Oxford University Press, Oxford, England 1989b.
- Garthwaite, J., and Garthwaite, G.: Cellular origins of cyclic GMP responses to excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellum in vivo. *J. Neurochem.* 48:29-39, 1987.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M.J., and Moncada, S.: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172:412-416, 1989a.
- Garthwaite, J., Southam, E., and Anderton, M.: A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from L-arginine. *J. Neurochem.*, 53:1952-1954, 1989.
- Greenwald, R.A., and Moy, W.W.: Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23:455-463, 1980.
- Grossman, A., and Wendel, A.: Nonreactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzyme-generated hydroperoxide phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 135:549-552, 1982.
- Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical formation in biological systems?. *FEBS Lett.* 96:321-326, 1978.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.: The importance of free

- radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects. Med.* 8:89-193, 1985.
- Hogg, N., Darley-Usmar, U., Wilson, M., and Moncada, S.: The oxidation of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous-generation of Superoxide and Nitric Oxide. *FEBS*, 326 (1-3):199-203, 1993.
- Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., and Vincent, S.R.: Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2811-2814, 1991.
- Hu, J., and El-Fakahany, E.: Beta-amyloid 25-35 activates Nitric Oxide Synthase in a neuronal clone. *Neuroreport*, 4:760-762, 1993.
- Ikeda, J., Ochiai, K., Morita, I., and Moruta, S.: Endogenous Nitric Oxide blocks calcium influx induced by glutamate in neurons containing NADPH-Diaphorase. *Neurosci. Lett.* 158:193-196, 1993.
- Jewett, S.L., Eddy, L.J., and Hochstein, P.: Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury?. *Free Rad. Biol Med.* 6:185-188.
- Kanner, J., German, J.B., and Kinsella, J.E.: Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25:317-364, 1987.
- Katsuki, S., Arnold, W.P., Mital, C.K., and Murad, F.: Stimulation of Guanylate Cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissues preparations, and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3:23-35, 1977.
- Kemp, J.A., Foster, A.C., and Wong, E.H.I.: Non-competitive antagonists of excitatory aminoacid receptor. *Trends Neurosci.* 10:294-298, 1987.
- Kiedrowski, L., Costa, E., and Wroblewski, J.T.: Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 58:335-341, 1992.
- Kitchener, P.D., Bourreau, J.P., and Diamond, J.: NADPH-diaphorase histochemistry identifies isolated endothelial cells at sites of traumatic injury in the adult rat brain. *Neuroscience*, 53:613-624, 1993.
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J., and 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.*, 86:5159-5162, 1989.

- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J., and Moncada, S.: Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:207-210, 1990.
- Koh, J., Peters, S., and Choi, D.W.: Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science*, 234:73-76, 1986.
- Kohler, H., and Jenzer, H.: Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide. Formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. *J. Free Rad. Biol. Med.* 6:323-339, 1989.
- Koppenol, W.H., Butler, J., and Van Leeuwen, J.W.: The Haber-Weiss cycle. *Photochem. Photobiol.* 28:655-660, 1978.
- Kowaluk, E., and Fung, H.: Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vitro* vascular relaxation by S-Nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255(3):1256-1264, 1990.
- Lafon-Cazal, M., Culcasi, M., Gaven, F., Pietri, S., and Bockaert, J.: Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*. 32 (11):1259-1266, 1993.
- Lei, S.Z., Pan, Z., Sanjay, K., Aggarwal, H.V.C., Hartman, J., Sucher, N.J., and Lipton, S.A.: Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*, 8:1087-1099, 1992.
- Lynch, R.E., and Fridovich, I.: Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 253:1838-1845, 1978.
- Lolley, R.N., Farber, D.B., Rayborn, M.E., and Hollyfield, J.G.: Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: Stimulation of an inherited disease. *Science*, 196:664-666, 1977.
- Matsumoto, T., Nakane, M., Pollock, J.S., Kuk, J.E., and Förstermann, U.: A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of tissue to fixative. *Neurosci. Lett.* 155:61-64, 1993.
- Mayer, B., Heinzel, B., Werner, E., Wachter, H., Schultz, G., and Bohme, E.: Brain Nitric Oxide Synthase is a bioptherin- and flavin- containing multifunctional oxido-reductase. *Fed. Eur. Biol. Soc.*, 288:187-191, 1991.
- McCall, B., Boughton-Smith, N., Palmer, R.M.J., Whittle, B.J.R., and Moncada, S.: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem.*, 261:293-296, 1989.

- MacDonald, M.J., and Grewe, B.K.: Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxy kinase, glyceroneogenesis and fatty acid synthesis in rat adipose tissue by quinolinate and 3-mercaptopycolinate. *Biochim. Biophys. Acta.* 663:302-313, 1981.
- Manzoni, O., and Bockaert, J.: Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *J. Neurochem.* 61:368-370, 1993.
- Meldrum, B.: Protection against schaeamic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2:27-57, 1990.
- Minotti, G., and Aust, S.D.:The requirement of iron(III) in the initiation of lipid peroxidation by iron(II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262:1098-1104, 1987.
- Misra, H.P., and Fridovich, I.:The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxin. *J. Biol. Chem.*240:6886-6890, 1971.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., and Higgs, E.A.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, 38:1709-1715, 1989.
- Moncada, S.:Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2):109-142, 1991.
- Moroni, F., Lombardi, G., Monet, G., and Aldinio, C.: The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the ageing process. *Neurosci. Lett.* 47:51-55, 1984.
- Murphy, S., Minor, R.L., Jr., Welk, G., and Harrison, D.G.: Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. *J. Neurochem.* 55:349-351, 1990.
- Nomura, Y., and Kitamura, Y.: Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neuroscience Res.*, 18:103-107, 1993.
- Olney, J.W., Ho, O.L., and Rhee, V.: Cytotoxic effects of sodic and sulfur containing aminoacids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14:61-70, 1971.
- Olney, J.W., Price, M.T., Samson, L., and Labruyere, J.: The role of specific ions on glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65:68-71, 1986.
- Olson, D.R., Kon, C., and Breckenridge, B.M.: Calcium ion effects on guanylate cyclase of brain. *Life Sci.* 18:935-940, 1976.
- Parks, D.A., and Granger, D.N.: Xanthine oxidase-Biochemistry,

distribution and physiology. Acta Physiol. Scand. Suppl. 548:87-99, 1986.

- Peet, M.J., Curry, K., Magnuson, D.S., and McLennan, H.: Ca⁺⁺-dependent depolarisation and burst firing on rat CA1 pyramidal neurons, induced by N-Methyl-D-Aspartic acid and quinolinic acid: Antagonisms by 2-amino-5-phosphonovaleric and kynurenic acids. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64: 163-168, 1986.
- Perkins, M.N., and Stone, T.W.: Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. J.Pharmacol. Exp. Ther.226:551-557, 1983.
- Perkins, M.N., Stone, T.W., Collins, J.F., and Curry, K.: Phosphonate analogues of carboxylic acids as aminoacids antagonists on rat cortical neurons. Neurosci. Lett. 23:333-336, 1981.
- Peters, S., and Choi, D.W.:Quinolinic acid is a weak excitant of cortical neurones in cell culture. Brain Res. 420:1-10, 1987.
- Price, R.H., Mayer, B., and Beitz, A.J.:Nitric Oxide Synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. Neuroreport, 4:807-810, 1993.
- Puttfarcken, P.S., Lyons, W.E., and Coyle, J.T.: Dissociation of nitric oxide generation and kainate-mediated neuronal degeneration in primary cultures of rat cerebellar granule cells. Neuropharmacology, 31:565-575, 1992.
- Rios, C., and Santamaría, A.: Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. Neurochem. Res. 16:1139-1143, 1991.
- Rothe, F., Wolf, G., Fischer, S., Hass, P., Keilhoff, G., and Abicht, K.: Quinolinic acid and kainate facilitate magnesium penetration into brain tissue. Neuroreport, 4:205-207, 1993.
- Rothman, S.M., and Olney, J.W.:excitotoxicity and the NMDA receptor. Trends Neurosci. 10:299-302, 1987.
- Rowley, H.L., Ellis, Y., and Davies, J.A.: Age-related effects of NMDA-stimulated concomitant release of nitric oxide and glutamate in cortical slices prepared from DBA/2mice. Brain Res. 613:49-53, 1993.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleris, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B.: Nitric Oxide regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 16066-26091, 1994.
- Russi, P., Pellicciari, R., Gallo-Mezo, M., Moneti, G., and Moroni, F.: In vivo studies on the synthesis of quinolinic and

- kinurenic acids in the rat brain and other organs. In "Excitatory aminoacids", ed. by B.S. Meldrum, F. Moroni, R.P. Simon, and J.H. Woods, pp. 343-352, Raven Press N.Y., 1991.
- Sammuni, A., Chevion, M., and Czapski, G.: Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* **256**:12632-12635, 1981.
- Schwarcz, R., Foster, A., French, E., Whetsell, W., and Köhler, C.: Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sciences*, **35**:19-32, 1984.
- Schwarcz, R., and Kohler, C.: Differential vulnerability of central neurones of the rat to Quinolinic acid. *Neurosci. Lett.*, **38**:85-90, 1983.
- Southam, E., and Garthwaite, J.: Climbing fibers as a source of nitric oxide in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.*, **3**:379-382, 1991b.
- Southam, E., and Garthwaite, J.: Excitatory aminoacid receptor coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J. Neurochem.* **6**:2072-2081, 1991c.
- Stamler, J., Siegel, D., and Loscalzo, J.: Biochemistry of Nitric Oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**:1898-1902, 1993.
- Stone, T.W.: Neuropharmacology of quinolinic and kinurenic acids. *Pharmacol. Reviews.* **45**:309-379, 1993.
- Stone, T.W., and Perkins, M.N.: Quinolinic acid: A potent endogenous excitant at aminoacid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* **72**:411-412, 1981.
- Symons, M.C.R.: Free radicals in biological systems: In " Trace elements, micronutrients, and free radicals", ed. by I.E. Dreosti, pp. 1-24, Human Press, Totowa, N.J. 1991.
- Ts'o, P.O., Caspary, W.J., and Lorentzen, R.J.: The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis. In *Free radicals in Biology*, vol.3, W. Pryor, ed., Academic, New York, 1977, pp. 251-303.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., and Gregolin, C.: Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem. Biophys Acta*, **710**:197-211, 1982.
- Watkins, J.C., and Olverman, H.J.: Agonists and antagonists for excitatory aminoacid receptor. *Trends Neurosci.* **10**:265-272, 1987.

- Weiss, S.J.: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548:9-37, 1986.
- Winterbourn, C.C.: Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 182:625-628, 1979.
- Wood, P.C., Emmett, M.R., Rao, T.S., Cler, J., Mick, S., and Iyengar, S.: Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-Methyl-D-Aspartate-, Quisqualate-, Kainate-, Harmaline-, and Pentylenetetrazole-dependent increases in cerebellar cGMP in vivo. *J. Neurochem.* 55:346-348, 1990.
- Zhang, F., and Iadecola, C.: Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport* 4:559-562, 1993.
- Zhang, F., White, J.G., and Iadecola, C.: Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: Evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4(2): 217-226, 1994.
- Zhu, X., and Luo, L.: Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J. Neurochem.* 59(3):932-935, 1992.