

GENERACIÓ D'ÒXID NÍTRIC EN CÈL·LULES DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

AGUSTINA GARCÍA

Institut de Biologia Fonamental V. Villar Palasí i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Institut de Biologia Fonamental V. Villar Palasí. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Espanya.

RESUM

Durant els últims anys hem assistit a una autèntica explosió de l'interès per l'òxid nítric al sistema nerviós central a causa de la implicació d'aquest atípic missatger intercel·lular en moltes funcions neurals. Les tres isoformes de l'òxid nítric sintasa inicialment identificades en neurones, macròfags i endoteli s'expressen a les cèl·lules del sistema nerviós central i l'òxid nítric generat sembla participar en el funcionament tant normal com patològic del teixit. La comprensió de l'especificitat d'acció d'un senyal difusible com és l'òxid nítric requerirà encara molts més estudis per esbrinar els mecanismes de transducció utilitzats.

I. INTRODUCCIÓ

El radical lliure òxid nítric (NO) és la substància bioactiva de més baix pes molecular produïda per cèl·lules de mamífer. L'NO és una molècula missatgera amb un ampli ventall d'accions en diversos sistemes biològics. En un principi va ser identificat com el factor relaxant derivat de l'endoteli en vasos sanguinis i l'intermediari de les accions tumoricides i bactericides dels ma-

cròfags. Poc temps després, va ser reconegut com un important missatger en el sistema nerviós central (SNC) i perifèric (SNP). A l'SNP, l'NO sembla ser el neurotransmissor alliberat pels terminals no adrenèrgics no colinèrgics (NANC) que regula la relaxació del tracte gastrointestinal i l'erecció del penis. Al cervell, l'NO és l'intermediari de l'estimulació de la formació del

GMP cíclic (cGMP) per l'aminoàcid excitador glutamat que actua sobre els receptors de tipus N-metil-D-aspartat (NMDA), i ha estat implicat en la modulació de l'alliberació de neurotransmissors i d'hormones hipotalàmiques i hipofisàries, en diversos aspectes del desenvolupament cerebral, en el manteniment del flux sanguini i en processos de plasticitat sinàptica dependents d'activitat, com ara la potenciació a llarg termini (LTP) a l'hipocamp i la depressió a llarg termini (LTD) al cerebel. A més, l'NO sembla estar implicat en la neurotoxicitat associada a l'infart vascular i en diferents desordres neurodegeneratius com l'esclerosi múltiple i l'encefalopatia associada al Sida (per a revisions, Moncada *et al.*, 1994; Nathan,

1992; Dawson i Snyder, 1994; Garthwaite i Boulton, 1995; Zhang i Snyder, 1995).

II. BIOSÍNTESI DE L'NO

L'NO es forma a partir d'un dels nitrògens del grup guanidí de la L-arginina per l'acció de l'enzim NO sintasa (NOS) (EC 1.14.13.39). A la reacció participen com a cosubstrats el O_2 i el dinucleòtid de nicotinamida i adenina fosforilat (NADPH) i es produeix com a coproducte la L-citrulina. La reacció transcorre en dues etapes, es forma com a intermediari la N^W -hidroxi-L-arginina, i es consumeixen cinc electrons (Knowles i Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994).

TAULA I. Isoformes de l'òxid nítric sintasa clonades

TIPUS	I	II	III
Nomenclatura descriptiva	ncNOS	iNOS	ecNOS
Origen	Cerebel rata	Macròfags RAW 264.7	Aorta bovina
Mecanisme d'activació	$Ca^{2+} \rightarrow CaM$	Inducció transcripció	$Ca^{2+} \rightarrow CaM$
Forma nativa	Dímer	Dímer	Dímer
Pes molecular monòmer	160.000	130.000	133.000
Subunitats associades	—	CaM	—
Seqüències consens unió	Sí	Sí	Sí
FAD, FMN, NADPH i CaM			
Conté hem	Sí	Sí	Sí
Requereix BH_4	Sí	Sí	Sí
Localització subcel·lular	Soluble/ Particulada	Soluble	Particulada
Mida de l'mRNA, kb	10-10,5	4-5	4-5
Localització cromosòmica en humans	12q24.2	17cen-q12	7q35-36

Tres isoformes de la NOS productes de diferents gens han estat purificades i clonades a partir de cervell (NOS-I), macròfags (NOS-II) i endoteli (NOS-III) (Taula I). Les tres isoformes tenen com a grups prostètics el dinucleòtid de flavina i adenina (FAD), el mononucleòtid de flavina (FMN) i el grup hem i requereixen tetrahidropterina (BH_4). La citocrom P-450 reduktasa és l'altre únic enzim que conté llocs d'unió pel NADPH, pel FAD i pel FMN i presenta un 60 % d'homologia a la seqüència d'aminoàcids amb la meitat carboxil terminal de totes les isoformes de la NOS. El mecanisme de la transferència electrònica catalitzada per la NOS és probablement similar al dels sistemes enzimàtics del citocrom P-450, amb la reducció pel NADPH del FAD que tot seguit redueix a l'FMN i aquest transfereix els electrons a l'ió fèrric de l'hem, el qual interacciona amb el O_2 . El paper de la BH_4 encara no és clar (Förstermann *et al.*, 1994).

La NOS-I també ha estat trobada a l'epiteli pulmonar, a les cèl·lules β del pàncrees, a la màcula densa del ronyó i al múscul esquelètic (Schmidt *et al.*, 1992; Nakane *et al.*, 1993), mentre que la NOS-III ha estat també localitzada a determinades poblacions neuronals (Dinermam *et al.*, 1994) i la NOS-II pot expressar-se en molts tipus de cèl·lules diferents com els hepatòcits, els condrocits (Förstermann *et al.*, 1994) i fins i tot les neurones i les cèl·lules glials (Murphy *et al.*, 1993; Minc-Golomb *et al.*, 1996). Les tres isoformes són dímers. El monòmer de la NOS-I té un pes molecular de 160 kD, mentre que els de les NOS-II i NOS-III està al voltant de 130 kD. Les isoformes I i II han estat caracteritzades com a proteïnes solubles, però dependent de les condicions d'homogenització una part considerable de la NOS-I cerebral sedimenta en fraccions particulades (Hiki *et al.*, 1992; Hecker *et al.*, 1994) i la major part de la immunoreactivitat

enfront d'anticossos de la NOS-I apareix associada al reticle endoplasmàtic i a engrosaments sinàptics (Wolf *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 1995). Aquesta associació sembla que és deguda a la interacció de l'extrem N-terminal que conté un motiu PDZ/GLGF d'uns 100 aminoàcids, que es troba a diverses proteïnes del citoesquelet, amb motius PDZ de la proteïna PSD-95 (Brenmann *et al.*, 1996). Aquesta proteïna es troba associada a membranes presinàptiques i postsinàptiques i interacciona per mitjà d'un segon motiu PDZ amb alguns canals iònics, com és el receptor de NMDA. De forma semblant, la NOS-I de múscul esquelètic està associada al sarcolemma mitjançant la interacció amb la α -sintrofina, proteïna del complex de la distrofina que també conté el motiu PDZ (Brenman *et al.*, 1995). Per la seva part, la NOS-III, encara que no conté dominis hidrofòbics transmembrana, és majoritàriament particulada per una miristoilació a l'extrem N-terminal que no tenen les altres isoformes (Förstermann *et al.*, 1994).

Les NOS-I i NOS-III s'expressen constitutivament i són activades de forma ràpida per associació amb la calmodulina de forma dependent de calci. Així doncs, aquestes activitats són estimulades per agonistes que fan augmentar la concentració intracel·lular de l'ió, i els moderats nivells de NO que generen (picomols) modulen processos ràpids com la neurotransmissió i la dilatació dels vasos sanguinis. Encara que s'expressin constitutivament, les isoformes I i III també poden ser regulades a llarg termini en resposta a determinats estímuls (vegeu més endavant). Per contra, la NOS-II gairebé no s'expressa en condicions basals i és induïda a nivell transcripcional per activació amb endotoxines bacterianes (lipopolisacàrid, LPS) o amb diverses citocines (interferó- γ , INF- γ ; interleucina-1 β , IL-1 β ; factor de necrosi tumoral- α , TNF- α). Aquesta isoforma conté calmodulina forta-

ment lligada i sembla ser que per això no requereix augments intracel·lulars de calci. La NOS-II genera quantitats elevades de NO (nanomols) durant períodes de temps llargs que poden resultar citotòxiques (Nathan, 1992).

La NOS pot ser regulada per fosforilació. Totes les isoformes presenten seqüències consens de fosforilació per la proteïna cinasa dependent d'AMP cíclic (cAMP). Estudis bioquímics indiquen que la NOS-I pot ser fosforilada per la proteïna cinasa de tipus C, la dependent de calci/calmodulina, la dependent de cAMP i la dependent de cGMP, i en tots els casos es produeix pèrdua d'activitat (Zhang i Snyder, 1995). La NOS-I també és substrat de la calcineurina i la desfosforilació catalitzada per aquesta augmenta l'activitat (Zhang i Snyder, 1995). Encara no es coneix si aquests mecanismes reguladors són operatius *in vivo*.

III. DIANES MOLECULARS DE L'NO

La diana molecular més important de l'NO identificada fins ara és la guanilil ciclasa soluble (GCs), la qual activa en interaccionar amb el ferro del seu grup hem. Els augments de cGMP resultants indueixen la relaxació del múscul llis dels vasos sanguinis, intestí i vies respiratòries, així com la inhibició de l'agregació plaquetària (Moncada *et al.*, 1991). En el cervell, l'excitació neuronal comporta augments en els nivells de cGMP a gairebé totes les regions (Garthwaite i Boulton, 1995). La funció del cGMP a l'SNC no és clara encara que hi ha evidències que pot modular directament canals de calci, induir la fosforilació d'una sèrie de proteïnes per activació de la proteïna cinasa G o reduir els nivells d'AMP cíclic per activació d'una fosfodiesterasa (Lincoln, 1995).

L'NO podria ser important com a regulador de la ciclooxigenasa, un altre enzim

que conté hem i catalitza el pas limitant de la síntesi de prostaglandines, tromboxà A₂ i prostaciclina a partir de l'àcid araquidònic. En fragments d'hipotàlem, s'ha observat que l'NO fa d'intermediari a la inducció per la noradrenalina de l'alliberació de PGE₂, que a la vegada estimula l'alliberació del factor alliberador de l'hormona luteïtzant (Rettori *et al.*, 1993). En teixits perifèrics s'han observat efectes semblants de l'NO sobre l'alliberació de prostaglandines (Salvemini *et al.*, 1993).

D'altra banda, l'NO s'uneix amb gran afinitat als grups hem de l'hemoglobina i la mioglobina i als centres ferrosulfurats de diversos enzims inhibint-ne la funció (Gross i Wolin, 1995). Entre aquests darrers enzims es troben la *cis*-aconitasa (cicle de l'àcid cítric), la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complex mitocondrial I) i la succinat-ubiquinona oxidoreductasa (complex mitocondrial II). L'NO també inhibeix la ribonucleòtid reductasa, un enzim que conté ferro i és limitant de la velocitat de la síntesi del DNA. La glucòlisi pot resultar també afectada per l'NO com a resultat de l'estimulació de l'ADP-ribosilació de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (Brune *et al.*, 1994). La pèrdua d'activitat de tots aquests enzims requereix nivells elevats de NO durant temps prolongats, així doncs aquestes dianes són més rellevants a la defensa immunològica i a la citotoxicitat mediada per la NOS induïble (Gross i Wolin, 1995).

L'NO indueix la S-nitrosilació de nombroses proteïnes. Aquest mecanisme pot tenir diversos efectes. D'una banda, pot provocar l'oxidació de tiols crítics per a la funció de la proteïna que condueix a la inhibició, com en el cas del receptor de NMDA. De l'altra, pot suposar un mecanisme de protecció enfront de l'NO o bé una forma d'emmagatzematge i transport d'aquest missatger (Gross i Wolin, 1995).

IV. ORIGEN CEL·LULAR I REGULACIÓ DE LA FORMACIÓ DE NO A L'SNC (TAULA II)

Neurones

Els primers estudis immunohistoquímics amb anticossos policlonals enfront de la NOS purificada de cerebel de rata mostraren que l'enzim s'expressava en poblacions discretes de neurones, a l'endoteli dels vasos sanguinis, però no a les cèl·lules glials. La distribució del marcatge coincidia amb la distribució de la NADPH diaforasa, una activitat enzimàtica que amb una fixació adequada del teixit amb aldehids, és considerada un

indicador histoquímic de la NOS (Dawson i Snyder, 1994). També està d'acord amb la localització neuronal de la NOS la demostració histoquímica de la localització neuronal de l'activitat argininosuccinat sintasa i de la L-citrul·lina (Aoki *et al.*, 1995). Tot i així, la localització immunohistoquímica de la L-arginina indica una distribució predominantment astrogliar (Aoki *et al.*, 1995) i diversos autors han demostrat que si bé és cert que la NOS-I està concentrada en neurones, cèl·lules no neuronals com els astròcits i la glia de Bergmann també expressen NOS-I (vegeu més endavant).

A moltes regions del cervell, com l'escorça cerebral, l'hipocamp o l'estriat, les neu-

TAULA II. Isoformes de la NOS a cèl·lules de l'SNC

	Isoforma	Activadors (seg, min)	Inductors (hores, dies)	Inhibidors/ Supressors
NEURONES	NOS-I	EAA's	Diferenciació Lesions Estrès Isquèmia Estradiol	Fosforilació per PKC, PKA, PKG, Ca ²⁺ CaMPK
	NOS-II		LPS+INF- γ	
	NOS-III	EAA's?		
ASTRÒCITS	NOS-I	Noradrenalina Bradicinina Glutamat Endotelina	Glucocorticoides	
	NOS-II		LPS INF- γ +IL-1 β Èsters forbol TNF- α HIV gp120 Micoplasma Lesions Isquèmia Neuropaties	NO cAMP IL-4, IL-10 Dexametasona TGF- β Inhibidors TK
MICRÒGLIA	NOS-II		LPS INF- γ +TNF- α Èsters forbol Neuropaties	IL-4 TGF- β

rones que contenen NOS constitueixen tan sols un 1 o 2 % del total. A l'hipocamp, les cèl·lules piramidals no expressen NOS-I o n'expressen molt poca (Wendland *et al.*, 1994), però si que ho fan nombroses interneurons amb processos al llarg de la regió CA1 i també expressen abundant NOS les neurones granulars del cos dentat. A l'hipotàlem, neurones NOS-positives són presents als nuclis paraventricular i supraòptic. També hi ha abundants neurones amb NOS als nuclis paraventricular i dorsal del rafe i als col·licles inferior i superior del cervell mitjà. El cerebel és la regió que presenta una major expressió de NOS-I localitzada a les neurones granulars, als terminals de les fibres paral·leles i a les cèl·lules de cistell, però no a les cèl·lules de Purkinje (Dawson i Snyder, 1994).

Dependent de la localització de la NOS, la seva activació té lloc per mitjà de diferents estímuls: a nivell postsinàptic, per estimulació de receptors que indueixen l'entrada de calci o la mobilització intracel·lular de l'ió, i als terminals presinàptics, pels potencials d'acció que provoquen l'entrada de calci pels canals dependents de voltatge. Postsinàpticament, l'estímul més important per a la formació de NO és l'activació dels receptors del neurotransmissor excitador glutamat, principalment dels receptors ionotrópics de tipus NMDA, que presenten una elevada permeabilitat al calci (Garthwaite i Boulton, 1995).

Encara que la NOS-I neuronal sigui considerada constitutiva, la seva expressió pot canviar dràsticament com a conseqüència de determinats tractaments. En rates, la transecció del nervi ciàtic provoca, al cap de dos dies, un notable augment de mRNA de la NOS-I i de la proteïna als ganglis lumbar. Altres resultats indiquen que neurones de la medul·la espinal i de diverses àrees cerebrals responen de manera semblant a les lesions (Garthwaite i Boulton,

1995; Zhang i Snyder, 1995). D'altra banda, s'han detectat augments de mRNA de la NOS-I al nucli paraventricular de l'hipotàlem com a resposta a l'estrès i a la lactància, a la pituitària com a resposta a la gonadectomia i a l'hipocamp després del tractament amb liti i amb el fàrmac anticolinesteràsic tacrina. Per contra, a la glàndula pineal s'ha observat una disminució de l'expressió de l'activitat NOS per exposició continuada a la llum (Garthwaite i Boulton, 1995).

Estudis immunohistoquímics i bioquímics han demostrat que l'expressió de la NOS-I també és regulada durant el desenvolupament cerebral en rosegadors. Utilitzant tècniques immunohistoquímiques s'ha observat una expressió transitòria de la NOS-I a la placa cerebrocortical en embrions de 15 a 19 dies quan la majoria de les cèl·lules apareixen tenyides i els seus processos es projecten al tàlem. Aquesta innervació desapareix gradualment després del naixement i no és present a l'adult. De la mateixa manera, als ganglis sensorials embrionaris gairebé totes les neurones són NOS-I positives, mentre que durant la vida adulta tan sols un 1 % expressen NOS (Zhang i Snyder, 1995). A més, sembla haver una inducció d'immunoreactivitat enfront de la NOS-I i d'activitat NOS coincidint amb l'inici de la sinaptogènesi en regions cerebrals específiques, seguida d'una disminució d'expressió en poblacions cel·lulars concretes i a la fracció sinaptosomal (Ogilvi *et al.*, 1995).

A més de NOS-I, més recentment s'ha descrit la localització, mitjançant immunotincions, de la NOS-III en determinades poblacions neuronals de diferents regions cerebrals, encara que sembla que està concentrada especialment en les neurones piramidals de l'hipocamp (Dinerman *et al.*, 1994). També ha estat descrita la inducció de NOS-II per LPS i INF- γ en neurones granulars de cerebel tant *in vitro* com *in vivo* (Minc-Golomb *et al.*, 1996).

Cèl·lules glials

La senyalització intercel·lular a l'SNC no està restringida a les neurones. Tant les cèl·lules macroglials (astròcits i oligodendròcits) com la micròglia (macròfags residents a l'SNC) poden rebre i transmetre informació i comunicar-se entre elles, amb les neurones, amb les cèl·lules vasculars o amb cèl·lules infiltrades.

Els astròcits són les cèl·lules més nombroses del SNC i es troben íntimament associades a les neurones i als vasos sanguinis cerebrals. Durant els últims deu anys, i en bona mesura gràcies a la utilització de cultius primaris enriquits en aquestes cèl·lules, s'han acumulat una gran quantitat d'evidències que els astròcits expressen receptors pels neurotransmissors convencionals (Hösli i Hösli, 1993) i són capaços de sintetitzar i alliberar molècules neuroactives i vasoactives (pèptids, eicosanoides) (Murphy, 1993). A més, els astròcits responen a factors alliberats pels limfòcits i macròfags infiltrats, així com per la micròglia activada, tornant-se reactius i alliberant citocines. La micròglia, per la seva part, presenta antígens de superfície com els dels monòcits i és activada per citocines i allibera una sèrie de factors que inclouen citocines i productes de baix pes molecular, com l'òxid nítric, que poden ser nocius per a les cèl·lules circumdants (Thomas, 1992; Murphy *et al.*, 1995). S'ha descrit també la presència de receptors de neurotransmissors a la micròglia (Kettenman *et al.*, 1993).

Encara que els primers estudis immunoquímics i d'hibridació *in situ* indicaren l'absència de NOS en cèl·lules glials, estudis realitzats independentment pel grup de S. Murphy als Estats Units i pel nostre grup, van demostrar que els astròcits de cervell de rata en cultiu podien generar NO. Murphy *et al.* (1990) observaren que el medi procedent de cultius primaris enriquits en astrò-

cits d'escorça cerebral de rata estimulats amb noradrenalina, bradicinina o glutamat, induïa la relaxació d'anells d'artèria coronària desprovista d'endoteli, i van detectar la presència d'òxids de nitrogen per quimioluminescència. Al nostre laboratori, en realitzar un estudi comparatiu sobre l'estimulació de la formació de cGMP en cultius enriquits en neurones o bé en astròcits d'hemisferis cerebrals de rata, vàrem observar que, de tota una sèrie d'agonistes reconeguts com a estimuladors de la GCs en diverses preparacions de teixit nerviós, tan sols el glutamat augmentava el cGMP en neurones, mentre que en astròcits diversos agonistes tenien efectes significatius, els més importants deguts a la noradrenalina i al glutamat (Agulló i García, 1991, 1992a). Tant els efectes d'aquests agonistes com els d'ionòfors del calci eren inhibits per l'inhibidor competitiu de la NOS N^{G} -monometil-L-arginina. Utilitzant agonistes i antagonistes dels diferents receptors del glutamat es va demostrar que l'efecte de l'aminoàcid en neurones era mediat per receptors de tipus NMDA, mentre que en astròcits ho era per receptors metabotrópics. L'efecte de la noradrenalina era degut majoritàriament a l'estimulació de receptors α_1 -adrenèrgics i era inhibit per l'hemoglobina i potenciat per la superòxid dismutasa, que prolonga la vida mitjana de l'NO en eliminar el radical superòxid (Agulló i García, 1992b). Els efectes d'aquestes dues proteïnes que actuen fora de la cèl·lula indiquen que la síntesi de NO i de cGMP deuen tenir lloc en diferents poblacions d'astròcits. La resposta a la noradrenalina és molt ràpida (és màxima a un minut) i requereix l'entrada de calci, però no és afectada per condicions que inhibeixen la mobilització intracel·lular de l'ió. Totes aquestes dades indiquen la presència d'una NOS constitutiva i dependent de calci a l'astròglia (Murphy *et al.*, 1993).

L'estimulació per noradrenalina i gluta-

mat de la formació de cGMP dependent de NO en cultius d'astròcits presenta variacions regionals (Agulló *et al.*, 1995). Hem observat una resposta elevada a la noradrenalina als astròcits cerebel·losos, respostes intermèdies a les cèl·lules de l'hipocamp i de l'hipotàlem i molt baixes als astròcits corticals. El glutamat, però, no produeix estimulació significativa als astròcits cerebel·losos i ho fa menys que la noradrenalina als de l'hipocamp. D'altra banda, l'estimulació directa de la GCs per concentracions màximes d'un donador de NO, com el nitroprussiat sòdic, produeix importants acumulacions de cGMP a totes les regions estudiades que no es correlacionen amb els efectes dels agonistes. Així doncs, les diferències regionals observades són degudes probablement a diferències en els nivells de NOS o bé al diferent grau de colocalització cel·lular de l'enzim i dels receptors implicats en la resposta. En aquest context és interessant remarcar que al cerebel hi ha un plexe elaborat

d'axons noradrenèrgics a la capa molecular i en menor mesura a les capes granular i de Purkinje, tant en rosegadors com en humans (Ottersen, 1993), i que en aquesta regió cerebral és conegut des de fa temps que la noradrenalina és un dels neurotransmissors que, a més del glutamat, estimula la formació de cGMP en actuar sobre receptors α_1 -adrenèrgics (Wood, 1991).

Les característiques bioquímiques de l'activitat de la NOS constitutiva d'astròcits cerebel·losos són molt semblants a les de la NOS de neurones granulars de la mateixa regió, encara que l'activitat específica en astròcits és unes deu vegades inferior. La K_M per la L-arginina, l' EC_{50} pel calci i les IC_{50} per diversos inhibidors de la NOS no són significativament diferents en els dos tipus de cèl·lules, com tampoc no hi ha diferència en el pes molecular del monòmer (uns 160 kD) que és detectat en *Western blots* amb un anticòs policlonal específic de la NOS-I recombinant (Taula III) (Arbonés *et al.*, 1996).

TAULA III. Característiques de la NOS constitutiva de neurones granulars i d'astròcits de cerebel de rata

Característica	Neurones	Astròcits
K_M L-arginina, μM	$3,9 \pm 0,1$	$6,6 \pm 3,9$
EC_{50} Calci, μM	$0,34 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$
IC_{50} N^G -nitro-L-arginina, μM	$0,35 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,09$
IC_{50} N^G -monometil-L-arginina, μM	$1,8 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,2$
Activitat citosòlica, % total	67 ± 2	99 ± 1
Pes monòmer, kD	160	160
Mida de l'mRNA, kb	10,5	8

L'activitat NOS va ser mesurada per la conversió de [3H]arginina a [3H]citrul·lina a fraccions solubles (100.000 xg). Els paràmetres de l'activitat es van determinar mitjançant l'ajust de les corbes concentració-efecte a l'equació de Michaelis-Menten. El pes molecular aproximat del monòmer es va determinar per comparació amb estàndards coneguts a *Western blots* utilitzant un anticòs enfront de la NOS-I recombinant (Arbonés *et al.*, 1996). La mida aproximada de l'mRNA es va determinar en *Northern blots* utilitzant com a sonda un fragment del cDNA (3,3 kb) de la NOS-I de ratolí.

Tot i així, hem observat algunes diferències entre la NOS neuronal i l'astroglial que suggereixen que aquesta podria ser una variant de la NOS-I majoritària al cervell. D'una banda, mentre que la NOS neuronal apareix parcialment associada a fraccions particulades (sediment de 100.000 xg), la NOS astroglial sembla ser totalment citosòlica (Taula III). Recentment, s'ha descrit la presència al cervell de ratolí de variants de tall i relligat (*splicing*) de la NOS-I que no presenten el domini PDZ (vegeu apartat II), i per això no es troben associades a membranes, però que tenen característiques cinètiques semblants a les de la forma no truncada de la NOS-I (Brenman *et al.*, 1996). De l'altra, un altre aspecte diferencial entre les NOS-I neuronal i astroglial que podria estar relacionat amb la manca del domini d'interacció amb proteïnes d'unió a estructures membranoses, és la diferent sensibilitat d'ambdues activitats envers els aldehyds utilitzats per fixar el teixit a les tècniques histoquímiques. Nosaltres hem pogut demostrar la localització de la NOS-I mitjançant immunotincions en astròcits cerebel·losos en cultiu tan sols en condicions de fixació suaus (1 % paraformaldehid o mesclades d'acetona i metanol). Fent tincions dobles per immunofluorescència amb anticossos de la NOS-I i de la proteïna específica d'astròcits, proteïna àcida fibril·lar de glia (GFAP), hem observat que una petita població d'astròcits que apareixen sovint en conjunts presenta un fort marcatge de la NOS-I que es localitza predominantment al voltant del nucli i té una aparença granular, fet que indica associació amb elements del reticle endoplasmàtic-complex de Golgi (Figura 1 A i B). Als astròcits amb morfologia més estelada també apareixen marcats els processos. El mateix patró de marcatge es veu amb la tinció amb avidina-biotina-peroxidasa i amb la reacció de la NADPH diaforasa, però en aquests casos es detecta una reactivitat molt més

generalitzada, encara que a la majoria de cèl·lules és més feble (Figura 2). Per contra, a les neurones granulars el marcatge de la NOS és més propi d'una proteïna soluble al soma cel·lular (marcatge continu) i d'una proteïna associada a membrana (marcatge puntuat) al llarg de les prolongacions (Arbonés *et al.*, 1996).

És evident ara que la raó per la qual inicialment no es detectés NOS-I en astròcits en talls de teixit cerebral era deguda en bona part al fet que s'utilitzaven fixacions relativament fortes, amb paraformaldehid al 4 % o glutaraldehid al 4 %, que permeten una bona detecció immunohistoquímica de la NOS-I neuronal però produeixen una reducció de l'antigenicitat de la NOS astroglial. Així, tincions molt febles havien estat descrites en astròcits, principalment de cerebel i d'hipocamp tant en rosegadors com en humans (Schmidt *et al.*, 1992; Wendland *et al.*, 1994; Egberongbe *et al.*, 1994). Recentment, Kugler i Drenckhahn (1996) han demostrat immunotincions molt intenses a la glia de Bergmann i en astròcits cerebel·losos i hipocampals amb diferents anticossos de la NOS-I en talls de teixit congelat i dessecat (*freeze-dried*) i fixat amb acetona durant cinc minuts. A més han observat que els processos astrocitaris que envolten els vasos sanguinis són NOS-I positius.

També hem observat diferències entre la NOS-I astrocitària i la neuronal quant a la regulació a llarg termini. En els cultius d'astròcits cerebel·losos, la incubació amb glucocorticoides durant períodes de temps de 6 a 32 hores potencia l'estimulació per norepinefrina i ionòfors del calci de l'activitat de NOS, de forma dependent de la concentració ($EC_{50}=1nM$ per la dexametasona) (Baltrons *et al.*, 1995). L'efecte requereix transcripció i síntesi de proteïnes, ja que és inhibit per actinomicina D i cicloheximida i és mediat per receptors de glucocorticoides de tipus II. El mateix tractament no produeix

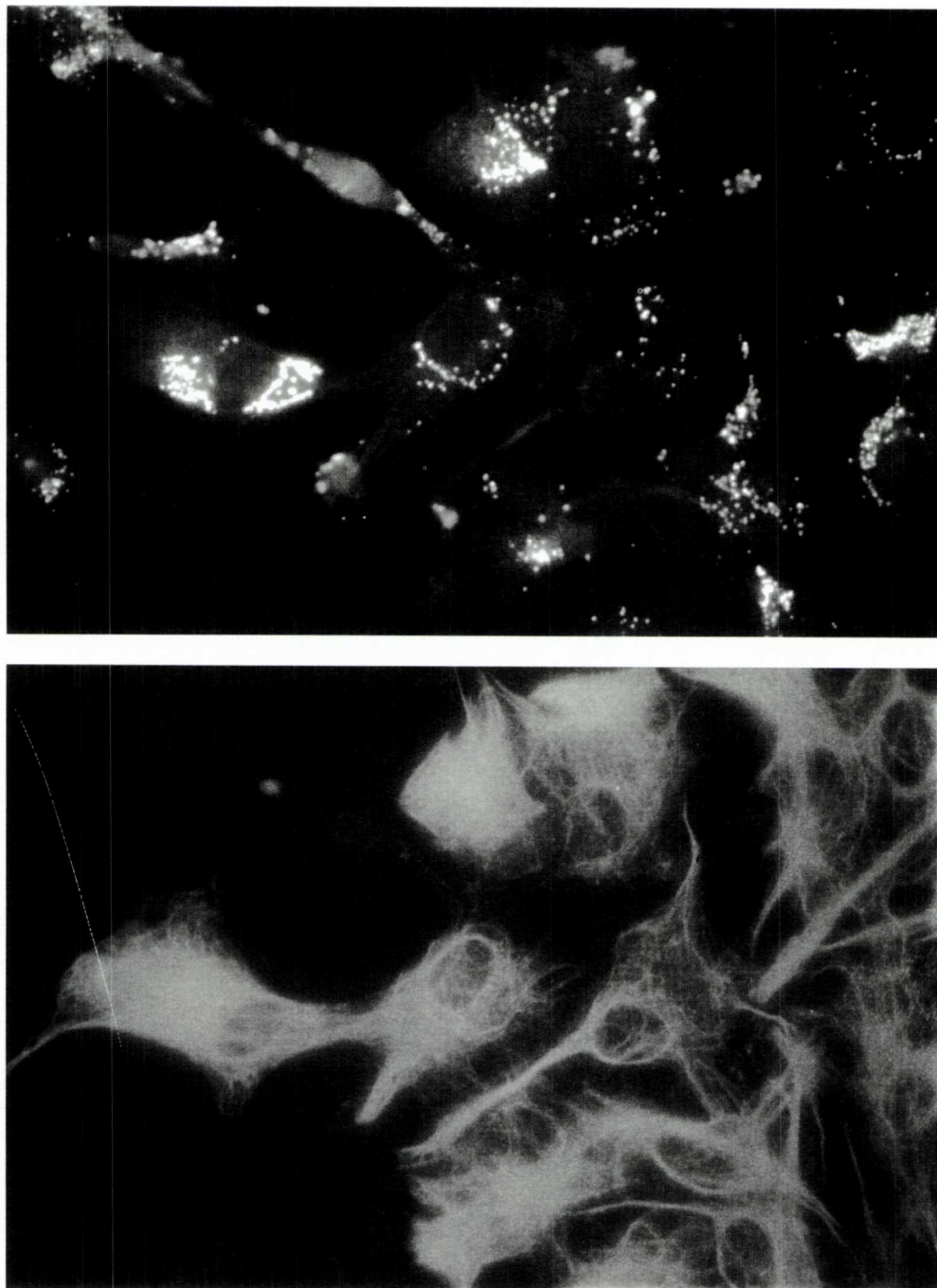


FIGURA 1. Doble marcatge per immunofluorescència en cultius d'astròcits utilitzant un antisèrum de conill antiNOS-I (A) i un anticòs monoclonal enfront de la GFAP (B). Com a anticossos secundaris es van utilitzar IgG anticonill conjugada amb rodamina i IgG antiratolí conjugada amb fluoresceïna (1 cm = 12 μ m).

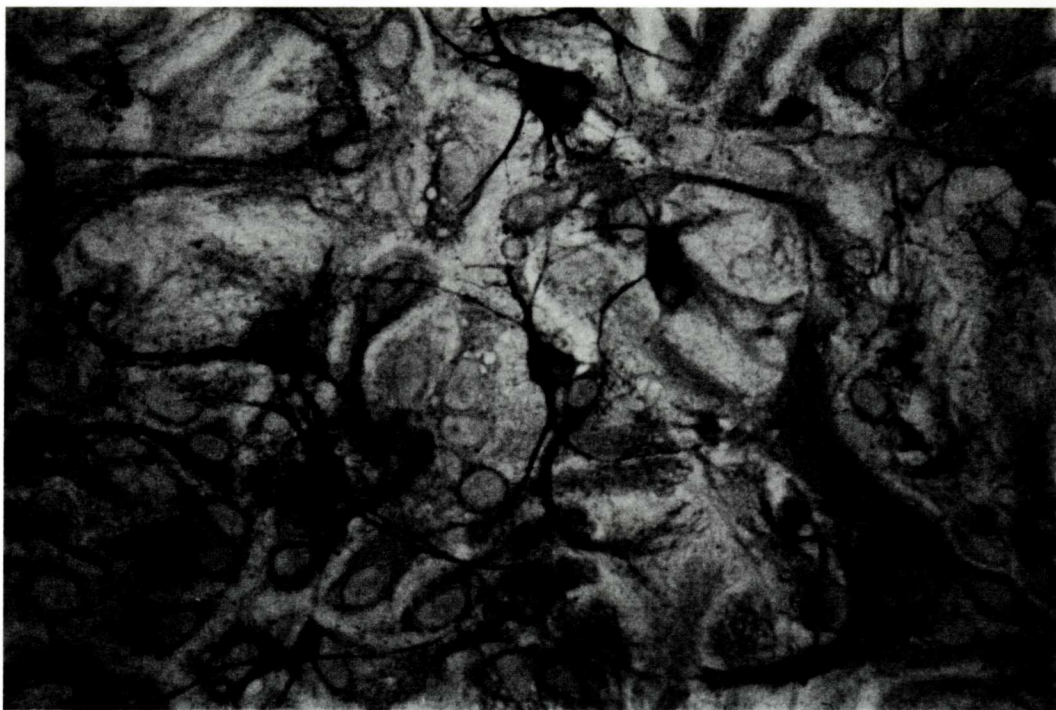


FIGURA 2. Doble marcatge d'un cultiu d'astròcits amb NADPH-diaforasa i antiGFAP. La immunoreactivitat per l'antiGFAP es va visualitzar amb el complex de l' avidina-biotina-peroxidasa (marcatge clar generalitzat). Després de la incubació amb β -NADPH apareixen dipòsits de formazan (marcatge intens) sobre els astròcits NADPH diaforasa positius (1 cm = 20 μ m).

capefecte a l'estimulació de la NOS de neurones granulars de cerebel per NMDA. Aquests resultats suggereixen diferències en la regulació de l'expressió de les NOS astrocitària i neuronal i estarien d'acord amb l'expressió de diferents variants de la NOS-I en els dos tipus de cèl·lules. També està d'acord amb aquesta hipòtesi la detecció en *Northern blots* mitjançant una sonda nucleotídica per la NOS-I d'un mRNA d'astròcits de mida inferior (unes 8 kb) que el de la NOS-I neuronal (10,5 kb) (Taula III; Arbonés *et al.*, resultats no publicats). Les anàlisis recents del gen de la NOS-I d'humans estan revelant una organització molt complexa, on l'mRNA es troba dispers sobre un mínim de 160 kb i la seqüència oberta de lectura és codificada per 28 exons amb l'inici i terminació de la transcripció en els exons 2 i 29, respectivament. A

la regió flanquejant 5' s'han detectat diverses seqüències reguladores i l'expressió de determinats exons sembla ser controlada a nivell transcripcional per promotors separats que donen lloc a diversitat en els mRNA (Hall *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1995).

Tant l'astròglia com la micròglia de rosegadors en cultiu expressen NOS-II quan són tractades durant períodes de temps de més de quatre hores amb LPS, amb determinades citocines com l'INF- γ , l'IL-1 β i el TNF- α , soles, en combinació o amb èsters de forbol (Murphy *et al.*, 1995). En cultius de micròglia d'humans, però, aquests agents sols o en combinació no indueixen la producció de NO. Això està d'acord amb l'observació que la NOS de macròfags humans no és induïda pels mateixos estímuls que la de macròfags de rosegadors (Nathan, 1992). Per contra, en

cultius d'astròcits humans s'indueix activitat de la NOS amb combinacions d'IL-1 β i INF- γ o bé TNF- α (Murphy *et al.*, 1995).

La NOS induïble d'astròcits de rata ha estat clonada i presenta un 93 % d'homologia amb l'enzim de macròfags de ratolí (Galea *et al.*, 1993). El mecanisme de la inducció per LPS o per INF- γ /IL-1 β sembla ser diferent. La inducció amb citocines requereix menys temps que la de l'LPS. A més, aquesta és inhibida pel glucocorticoide sintètic dexametasona però no ho és la inducció per citocines (Murphy *et al.*, 1995). Una possible explicació és que l'LPS produeix l'alliberació d'IL-1 β o TNF- α i que aquestes induïxen la NOS més directament, mentre que la dexametasona estaria inhibint l'alliberació per l'LPS de les citocines.

La inducció de la NOS-II en astròcits pot ser inhibida per incubació de les cèl·lules amb inhibidors de tirosina cinases abans del tractament amb LPS o citocines (Murphy *et al.*, 1995). És conegut que l'LPS, l'INF- γ i l'IL- β activen tirosina cinases. D'altra banda, l'exposició dels astròcits a noradrenalina o anàlegs del cAMP per períodes de temps molt curts (5 minuts) impedeix la inducció de la NOS a nivell transcripcional. L'efecte de la noradrenalina és mediat per receptors β -adrenèrgics i requereix la síntesi de proteïnes, ja que és inhibit per cicloheximida. Així doncs, podria ser degut a la inducció dependent de cAMP d'una citocina inhibidora. De fet, tant en astròcits com en micròglia les interleucines IL-4, IL-10 i el factor de creixement tumoral β (TGF- β) disminueixen la inducció de la NOS-II per LPS (Murphy *et al.*, 1995). Aquest efecte és degut probablement al bloqueig de l'estimulació per LPS de la transcripció de citocines inductores de la NOS com ara el TNF- α . El mateix NO, a més d'inhibir l'activitat catalítica de la NOS per interacció amb el grup hem, té un efecte inhibitori sobre la transcripció de la NOS-II (Murphy *et al.*, 1995). Aquests dos mecanis-

mes de retroinhibició poden comportar un important control de la producció de NO a la cèl·lula on s'origina i a les dels voltants.

Hi ha diverses evidències sobre la inducció de NOS-II a l'SNC *in vivo* que han estat obtingudes en models animals d'infeccions agudes amb diversos virus (herpes simple, ràbia), malaltia autoimmunitària (encefalitis al·lèrgica experimental, EAE), isquèmia i lesions traumàtiques, entre d'altres (Murphy *et al.*, 1995), però a la majoria dels estudis no queda clarament definit el tipus cel·lular on té lloc la inducció de la NOS.

V. POSSIBLES FUNCIONS FISIOLÒGIQUES DE L'NO A L'SNC

La capacitat de l'NO de difondre, i per tant, de poder actuar presinàpticament, ha estimulat la investigació sobre la possibilitat que l'NO modulés l'alliberació de neurotransmissors. Diversos estudis que han utilitzat inhibidors de la NOS suggereixen que l'alliberació d'aminoàcids excitadors i inhibidors, de catecolamines i d'acetilcolina, pot ser estimulada per l'NO. A més, s'ha demostrat que tant l'NO exogen, com l'NO endogen present en teixit no estimulat o NO generat per estimulació del receptor de NMDA, modulen l'alliberació de neurotransmissors (Garthwaite i Boulton, 1995). La rellevància fisiològica d'aquests efectes encara no és clara. Però, en neurones d'hipocamp en cultiu, l'exposició a l'NO condueix a un augment durador de la freqüència dels corrents excitadors postsinàptics miniatura, i en talls d'hipocamp la perfusió amb NO aparellada amb una estimulació tetànica feble induïx una potenciació duradora de l'eficàcia sinàptica (Haley i Schuman, 1994). Aquests efectes suggereixen una acció de l'NO en els terminals glutamatèrgics i una possible participació en processos de plasticitat sinàptica depen-

dents d'activitat i relacionats amb la memòria i l'aprenentatge.

La forma de potenciació sinàptica que ha estat més estudiada al cervell és la LTP que s'observa a les sinapsis excitadores de l'hipocamp i que és mesurada com un augment sostingut de la magnitud dels potencials postsinàptics excitadors (EPSP) després de l'administració a intervals breus d'estímuls elèctrics d'alta freqüència. La inducció de la LTP requereix l'activació de receptors de NMDA postsinàptics a les cèl·lules piramidals de la zona CA1 de l'hipocamp i l'entrada de calci associada i també un augment de l'alliberació de glutamat dels terminals presinàptics dels col·laterals de Schaffer, suposadament per un missatger retrògrad alliberat per les neurones piramidals. Ja que l'NO difon lliurement i és generat com a conseqüència de l'influx de calci associat a l'estimulació de receptors de NMDA, és un bon candidat per al paper de missatger retrògrad, però la seva participació a la LTP és controvertida. Dependent del protocol experimental utilitzat, alguns grups han observat el bloqueig de la LTP per inhibidors de la NOS, i altres no n'han obtingut cap efecte. Tot i així, l'estimulació d'alta freqüència produeix acumulació de cGMP en la regió CA1 de l'hipocamp, resposta que és inhibida per inhibidors de la NOS; anàlegs del cGMP potencien respostes sinàptiques quan són aplicats aparellats amb estimulacions tetàniques febles; i inhibidors de la proteïna cinasa G bloquegen la inducció de la LTP (Garthwaite i Boulton, 1995; Haley i Schuman, 1994). A més, la LTP pot ser demostrada en talls d'hipocamp de ratolins en què l'expressió de la NOS-I ha estat anul·lada per recombinació homòloga (*knock-out*) (O'Dell *et al.*, 1994). En aquests animals, però, els inhibidors de la NOS poden bloquejar la LTP. L'explicació a aquesta paradoxa podria residir en l'expressió de NOS-III a les cèl·lules piramidals de l'hipocamp demos-

trada immunohistoquímicament (Dinerman *et al.*, 1994) i també en la demostració recent de l'expressió de variants de tall i relligat de la NOS-I que són presents tant en animals *knock-out* com en animals normals (Brenman *et al.*, 1996).

Una altra forma de plasticitat sinàptica en la qual s'ha implicat l'NO és la LTD. Aquest fenomen ha estat ben estudiat al cerebel, on es relaciona amb l'aprenentatge motor (Linden, 1994). Es manifesta com una depressió persistent dels EPSP a la sinapsi entre les fibres paral·leles i les cèl·lules de Purkinje. Aquestes són les úniques neurones eferents del cerebel i reben dos inervacions glutamatèrgiques, les fibres paral·leles i les ascendents. La LTD té lloc quan coincideixen ambdós estímuls i requereix l'activació tant de receptors de glutamat de tipus AMPA com metabotròpics. La LTD és postsinàptica i implica disminució de la sensibilitat dels receptors de tipus AMPA. Utilitzant diferents estratègies experimentals s'ha demostrat la modulació per NO i cGMP de la LTD en talls de cerebel, però l'origen cel·lular de l'NO no es coneix. Les neurones de Purkinje no contenen NOS i són probablement la diana de l'NO generat en altres cèl·lules, ja que contenen GCs. S'ha observat que en dialitzar les neurones de Purkinje amb donadors de NO es deprimeixen els EPSP mediats per les fibres paral·leles (Linden, 1994; Garthwaite i Boulton, 1995). D'altra banda, s'ha observat que l'efecte modulador de l'NO desapareix en talls de cerebel tractats amb un gliotòxic (Linden, 1994). Tenint en compte que la glia de Bergmann està en contacte íntim amb les neurones de Purkinje i que aquelles cèl·lules expressen NOS-I (vegeu l'apartat IV), l'NO implicat en la LTD podria tenir origen glial.

L'expressió transitòria de la NOS-I en àrees concretes de l'SNC de la rata durant el desenvolupament i la correlació de l'expressió de la NOS-I neuronal amb la sinaptogènesi (vegeu

l'apartat IV) suggereixen un paper per a l'NO en la modulació del desenvolupament cerebral. L'NO pot ser un factor tròfic per a les neurones en desenvolupament. Així, ha estat descrit que, a les cèl·lules PC12 que adquireixen un fenotip neuronal en ser tractades amb el factor de creixement nerviós (NGF), l'NO fa d'intermediari de les accions citostàtiques i diferenciadores d'aquest (Peunova i Enikolopov, 1995). Alternativament, l'NO podria contribuir a la mort cel·lular programada per la qual el 50 % de les neurones moren durant el desenvolupament. S'ha vist que agents que generen NO produeixen el col·lapse de cons de creixement neuronal (Hess, 1993). Al cerebel, la inhibició de la NOS impedeix la migració de les neurones granulars a la capa granular interna a través de la capa molecular al llarg de la glia de Bergmann i també es veu afectada la diferenciació d'ambdós tipus de cèl·lules (Tanaka *et al.*, 1994). L'NO implicat en aquests efectes podria tenir un origen glial ja que durant aquest període del desenvolupament la major activitat de la NOS ha estat detectada a la capa molecular on es troben els processos de la glia de Bergmann, mentre que les neurones granulars gairebé no expressen NOS. En aquest context, és interessant la nostra observació que els glucocorticoides, hormones amb notables efectes sobre el desenvolupament cerebral i l'aprenentatge i que presenten nivells elevats de receptors al cerebel durant el període de maduració (Pavlik i Buresova, 1984), potencien l'activitat NOS-I glial (Baltzons *et al.*, 1995).

Una quantitat considerable d'evidències indiquen que l'NO participa en el manteniment del to cerebrovascular basal i que pot tenir un paper en algunes respostes vasodilatadores concretes (Iadecola *et al.*, 1994). Tal com passa a la perifèria, l'NO produït a les cèl·lules endotelials probablement contribueix a aquesta regulació. Però, a l'SNC l'NO pot representar el factor que acobla els

augmentos locals de flux sanguini amb l'activitat nerviosa. Ha estat descrit que l'estimulació de les fibres paral·leles del cerebel produeix un augment del flux sanguini que és reduït per inhibidors de la NOS (Akgoren *et al.*, 1994). L'NO implicat en aquesta resposta pot alliberar-se de terminals nerviosos i també dels astròcits que, com s'ha descrit a l'apartat anterior, presenten un intens immunomarcatge per la NOS-I en els processos que envolten els vasos.

L'NO també participa en altres funcions neurals, com ara la modulació de l'alliberació d'hormones hipotalàmiques i hipofisàries i la nocicepció (Dawson i Snyder, 1994; Garthwaite i Boulton, 1995).

D'altra banda, l'NO sembla estar implicat en diverses situacions neuropatològiques i pot ser neurotòxic quan la seva formació sigui excessiva. Per exemple, l'NO és responsable, en part, de la neurotoxicitat del glutamat (Dawson i Snyder, 1994) i de la micròglia activada (Mollace i Nistico, 1995; Murphy *et al.*, 1995) envers neurones en cultiu. Però, les neurones que contenen NOS són resistentes al dany excitotòxic tant en cultiu com en l'infart vascular o en malalties neurodegeneratives com la de Huntington i la d'Alzheimer (Zhang i Snyder, 1995). La implicació de l'NO en el dany cerebral resultant d'un procés isquèmic és un tema controvertit ja que l'NO sembla ser beneficiós en una fase inicial, probablement induint una resposta compensatòria dins el compartiment vascular que millori la circulació cerebral, i en una fase més tardana esdevenint neurotòxic com a conseqüència de l'excessiva estimulació de la NOS neuronal pels receptors NMDA o per la inducció de la NOS-II a les cèl·lules glijals o a les cèl·lules inflammatòries infiltrades (Iadecola, 1994). L'NO generat per la NOS-II glial també podria estar implicat en la demència associada a la SIDA, ja que la proteïna GP120 de la coberta del virus HIV és capaça

d'induir la NOS en l'astrocitoma humà i la toxicitat d'aquesta proteïna envers neurones en cultiu requereix NO i la presència de macròfags o cèl·lules glials (Mollace i Nistico, 1995). Una altra condició amb la qual l'NO produït per la NOS-II glial podria contribuir a la neurodegeneració és l'esclerosi múltiple humana. Els cervells d'animals amb EAE, un procés induït de desmielinització auto-immune utilitzat com a model animal de la malaltia humana, presenten nivells augmentats d'expressió de l'mRNA de la NOS-II. A més, la citotoxicitat de la micròglia activada envers oligodendrocits en cultiu és mediada per l'NO (Molace i Nistico, 1995; Murphy *et al.*, 1995).

AGRAÏMENTS

El treball del nostre grup ha estat elaborat per L. Agulló, M. L. Arbonés, M. A. Baltrons i S. Saadoun, amb la col·laboració de J. Ribera als marcatges d'immunofluorescència, de F. García a la preparació dels cultius i de R. Fibla a la part tècnica. Aquest treball ha estat finançat per la DGICYT i la CIRIT. S. Saadoun és becària de l'Institut de Cooperació amb el Món Àrab.

BIBLIOGRAFIA

- AGULLÓ, L.; M. A. BALTRONS; A. GARCÍA (1995). «Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells». *Brain Res.*, núm. 686, pàg. 160-168.
- AGULLÓ, L.; A. GARCÍA (1991). «Norepinephrine increases cyclic GMP in astrocytes by a mechanism dependent on nitric oxide synthesis». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 206, pàg. 343-346.
- (1992a). «Different receptors mediate stimulation of nitric oxide-dependent cyclic GMP formation in neurons and astrocytes in culture». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 182, pàg. 1362-1368.
- (1992b). «Characterization of noradrenaline-stimulated cyclic GMP formation in brain astrocytes in culture». *Biochem. J.*, núm. 288, pàg. 619-624.
- AKGOREN, N.; M. FABRICIUS; M. LAURITZEN (1994). «Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 5903-5907.
- AOKI, E.; I. K. TAKEUCHI; R. SHOJI (1995). «Nitric oxide: an attractive signaling molecule». *Acta Histochem. Cytochem.*, núm. 28, pàg. 97-106.
- ARBONÉS, M. L.; J. RIBERA; L. AGULLÓ; M. A. BALTRONS; A. CASANOVAS; V. RIVEROS-MORENO; A. GARCÍA (1996). «Expression of nitric oxide synthase type-I in rat cerebellar astrocytes». *Glia*, núm. 18, pàg. 224-232.
- BALTRONS, M. A.; L. AGULLÓ; A. GARCÍA (1995). «Dexamethasone up-regulates a constitutive nitric oxide synthase in cerebellar astrocytes but not in granule cells in culture». *J. Neurochem.*, núm. 64, pàg. 447-450.
- BRENNAN, J. E.; D. S. CHAO; S. H. GEE; A. W. MCGEE; S. E. CRAVEN; D. R. SANTILLANO; Z. WU; F. HUANG; H. XIA; M. F. PETERS; S. C. FROEHNER; D. S. BRETT (1996). «Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α_1 -syntrophin mediated by PDZ domains». *Cell*, núm. 84, pàg. 757-767.
- BRENNAN, J. E.; D. S. CHAO; H. XIA; K. ALDAPE; D. S. BRETT (1995). «Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne Muscular Dystrophy». *Cell*, núm. 82, pàg. 743-752.
- BRUNE, B.; S. DIMMELER; L. M. Y. VEDIA; E. G. LAPETINA (1994). «Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins». *Life Sci.*, núm. 54, pàg. 61-70.
- DAWSON, T. M.; S. H. SNYDER (1994). «Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain». *J. Neurosci.*, núm. 14, pàg. 5147-5159.
- DINERMAN, J. L.; T. M. DAWSON; M. J. SCHELL; A. SNOWMAN; S. H. SNYDER (1994). «Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 4214-4218.
- EGBERONGBE, Y. I.; S. M. GENTLEMAN; P. FALKAI; B. BOGERTS; J. M. POLAK; G. W. ROBERTS (1994). «The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain». *Neurosci.*, núm. 59, pàg. 561-578.
- FÖRSTERMANN, U.; E. I. CLOSS; J. S. POLLOCK; M. NAKANE; P. SCHWARZ; I. GATH; H. KLEINERT (1994). «Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions». *Hypertension*, núm. 23, pàg. 1121-1131.
- GALEA, E.; D. J. REIS; D. L. FEINSTEIN (1994). «Cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from rat astrocytes». *J. Neurosci. Res.*, núm. 37, pàg. 406-414.
- GARTHWAITE, J.; C. L. BOULTON (1995). «Nitric oxide signaling in the central nervous system». *Annu. Rev. Physiol.*, núm. 57, pàg. 683-706.

- GROSS, S. S.; M. S. WOLIN (1995). «Nitric oxide: pathophysiological mechanisms». *Annu. Rev. Physiol.*, núm. 57, pàg. 737-769.
- HALEY, J. E.; E. M. SCHUMAN (1994). «Involvement of nitric oxide in synaptic plasticity and learning». *Sem. Neurosci.*, núm. 6, pàg. 11-20.
- HALL, A. V.; H. ANTONIOU; Y. WANG; A. H. CHEUNG; A. M. ARBUS; S. L. OLSON; W. C. LU; C. L. KAU; P. A. MARSDEN (1994). «Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1)». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 33082-33090.
- HECKER, M.; A. MÜLSCH; R. BUSSE (1994). «Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase». *J. Neurochem.*, núm. 62, pàg. 1524-1529.
- HESS, D. T.; S. I. PATTERSON; D. S. SMITH; J. H. PATESKENE (1993). «Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide». *Nature*, núm. 366, pàg. 562-565.
- HIKI, K.; R. HATTORI; C. KAWAI; Y. YUI (1992). «Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum». *J. Biochem. (Tokyo)*, núm. 111, pàg. 556-558.
- HÖSLI, E.; L. HÖSLI (1993). «Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system». *Prog. Neurobiol.*, núm. 40, pàg. 477-506.
- IADECOLA, C.; D. A. PELLGRINO; M. A. MOSKOWITZ; N. A. LASSEN (1994). «Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 14, pàg. 175-192.
- KETTENMANN, H.; R. BANATI; W. WALZ (1993). «Electrophysiological behavior of microglia». *Glia*, núm. 7, pàg. 93-101.
- KNOWLES, R. G.; S. MONCADA (1994). «Nitric oxide synthases in mammals». *Biochem. J.*, núm. 298, pàg. 249-258.
- KUGLER, P.; D. DRENCKHAHN (1996) «Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I». *Glia*, núm. 16, pàg. 165-173.
- LINCOLN, T. M. (1995). «Cyclic GMP receptor proteins: role in nervous system and other tissues». A: Vincent, S. R. *Nitric oxide in the nervous system*. London: Academic Press. pàg. 51-80.
- LINDEN, D. J. (1994). «Long-term synaptic depression in the mammalian brain». *Neuron*, núm. 12, pàg. 457-472.
- MINC-GOLOMB, D.; G. YADID; I. TSARFATY; J. H. RESAU; J. P. SCHWARTZ (1996). «*In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons». *J. Neurochem.*, núm. 66, pàg. 1504-1509.
- MOLLACE, V.; G. NISTICÒ (1995). «Release of nitric oxide from astroglial cells: a key mechanism in neuro-immune disorders». *Adv. Neuroimmunol.*, núm. 5, pàg. 421-430.
- MONCADA, S.; R. M. J. PALMER; E. A. HIGGS (1991). «Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology». *Pharmacol. Rev.*, núm. 43, pàg. 109-142.
- MURPHY, S. (1993). *Astrocytes: pharmacology and function*. San Diego: Academic Press.
- MURPHY, S.; D. M. GRZYBICKI; M. L. SIMMONS (1995). «Glial cells as nitric oxide sources and targets». A: Vincent, S. R. *Nitric oxide in the nervous system*. London: Academic Press. pàg. 163-189.
- MURPHY, S.; R. L. MINOR; G. WELK; D. G. HARRISON (1990). «Evidence for an astrocyte-derived vaso-relaxing factor with properties similar to nitric oxide». *J. Neurochem.*, núm. 55, pàg. 349-351.
- MURPHY, S.; M. SIMMONS; L. AGULLÓ; A. GARCÍA; D. L. FEINSTEIN; E. GALEA; D. J. REIA; D. MINC-GOLOMB; J. P. SCHWARTZ (1993). «Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells». *Trends Neurosci.*, núm. 16, pàg. 323-328.
- NAKANE, M.; H. H. SCHMIDT; J. S. POLLOCK; U. FÖRSTERMANN; F. MURAD (1993). «Cloned human nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle». *FEBS Lett.*, núm. 316, pàg. 175-180.
- NATHAN, C. (1992). «Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells». *FASEB J.*, núm. 6, pàg. 3051-3064.
- O'DELL, T. J.; P. L. HUANG; T. M. DAWSON; J. L. DINERMAN; S. H. SNYDER; E. R. KANDEL; M. C. FISHMAN (1994). «Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS». *Science*, núm. 265, pàg. 542-546.
- OGILVIE, P.; K. SCHILLING; M. L. BILLINGSLEY; H. H. H. W. SCHMIDT (1995). «Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis». *FASEB J.*, núm. 9, pàg. 799-806.
- OTTERSEN, O. P. (1993). «Neurotransmitters in the cerebellum». *Rev. Neurol. (Paris)*, núm. 149, pàg. 629-636.
- PAVLIC, A.; M. BURESOVA (1984). «The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain». *Dev. Brain Res.*, núm. 12, pàg. 13-20.
- PEUNOVA, N.; G. ENIKOLOPOV (1993). «Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells». *Nature*, núm. 376, pàg. 68-73.
- RETTORI, V.; N. BELOVA; W. L. DEES; C. L. NYBERG; M. GIMENO; S. M. MCCANN (1993). «Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 10130-10134.
- SALVEMINI, D.; T. P. MISO; J. L. MASFERRER; K. SEIBERT; M. G. CURRIE; P. H. NEEDLEMAN (1993). «Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 7240-7244.
- SCHMIDT, H. H. H. W.; G. D. GAGNE; N. MASAKI; S. J. POLLOCK; M. F. MILLER; F. MURAD (1992). «Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction». *J. Histochem. Cytochem.*, núm. 40, pàg. 1439-1456.

- TANAKA, M.; S. YOSHIDA; M. YANO; F. HANAKOA (1994). «Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures». *NeuroReport*, núm. 5, pàg. 2049-2052.
- THOMAS, W. E. (1992). «Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions». *Brain Res. Reviews*, núm. 17, pàg. 61-74.
- WENDLAND, B.; F. E. SCHWEIZER; T. A. RYAN; M. NAKANE; F. MURAD; R. H. SCHELLER; R. W. TSIEH (1994). «Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 2151-2155.
- WOLF, G.; S. WÜRDIG; G. SCHÜNZEL (1992). «Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmatic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity». *Neurosci. Lett.*, núm. 147, pàg. 63-66.
- WOOD, P. L. (1991). «Pharmacology of the second messenger, cyclic guanosine 3',5'-monophosphate, in the cerebellum». *Pharmacol. Rev.*, núm. 43, pàg. 1-25.
- XIE, J.; P. RODDY; T. K. RIFE; F. MURAD; A. P. YOUNG (1995). «Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92, pàg. 1242-1246.
- ZHANG, J.; S. H. SNYDER (1995). «Nitric oxide in the nervous system». *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, núm. 35, pàg. 213-233.