

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/27
I.S.B.N.: 978-84-15910-27-5

ENRIQUE VIEJO RIVERO

**Distribución de niveles extracelulares
de óxido nítrico en el sistema nervioso central
de la rata adulta utilizando técnicas voltamétricas:
aproximaciones metodológicas
y validación farmacológica**

Director
JOSÉ LUIS GONZÁLEZ MORA



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Al terminar el presente trabajo me he dado cuenta la gran cantidad de personas a los que debería nombrar en este apartado, no sólo por lo prolongado del período de investigación dedicado a esta Tesis, sino también por tantos buenos momentos que compañeros y amigos me brindaron. A todos ellos, que han enriquecido este estudio desde el punto de vista profesional y humano, mi eterno agradecimiento.

Mi primer agradecimiento es para el profesor Dr. Manuel Mas al que conocí en mi etapa de residente de Análisis Clínicos. Me impresionó su inteligencia analítica y su capacidad de estudio, y esto me impulso a buscarlo cuando pensé en hacer la Tesis doctoral. Gracias por permitirme entrar en el departamento.

La lista de compañeros durante estos años es innumerable: Tere Guadalupe, Blas Fumero, Juan Ramón Fernández, Ini Rodríguez, Juraj Petrinc, José Antonio Navarro, Ana Ester Escrig, Felipe Martín.....y muchos más. Por todo lo que me han aportado científicamente y por los buenos ratos pasados durante estos años de convivencia muchas gracias.

Tiene una especial mención Antonio Rodríguez Hernández con el que estoy en deuda por no querer escucharme en un momento de desganancia y obligarme a retomar el tedioso camino. Gracias por ese momento de lucidez.

Al profesor Dr. Miguel Ángel Castellano del departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología por su ayuda en el tratamiento histológico de las láminas del cerebro.

Al profesor Manuel Fera por las profundas conversaciones mientras preparaba los calibradores, gracias por esos momentos de humor y trascendencia.

Al profesor Dr. José Luis González Mora, mi director de Tesis, al que hoy considero sobre todo un amigo. Gracias por mantener ese difícil equilibrio que hizo posible compaginar mi actividad profesional con la idea de investigación propuesta. Si alguna vez tuve una imagen de un genio científico ese es José Luis.

A todos los amigos por los momentos que perdimos de estar juntos, les agradezco que mantuvieran nuestra amistad.

DEDICATORIA

A Merche, Enrique y Carlos

por robarles tanto tiempo libre durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por su amor y comprensión.

A toda la familia Viejo por estar siempre conmigo.

A D^a. Mercedes Fuentes (mi suegra) por su cariñoso e inquebrantable apoyo . “Paciencia y resignación cristiana tan necesaria en estos casos”

No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles,
pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas.

Lucio Anneo Séneca

INDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
I 1	El óxido nítrico (NO)	2
I 2	Biosíntesis del óxido nítrico	4
I 3	Metabolismo y eliminación del NO	8
I 4	Papel fisiopatológico	9
I 4.1	NO en el sistema inmunológico	9
I 4.2	NO y Sepsis.....	11
I 4.3	NO en el aparato digestivo	13
I 4.4	NO en el sistema vascular.....	15
I 4.5	NO y Diabetes	18
I 4.6	NO en la erección peneana.....	19
I 5	El NO en el Sistema Nervioso Central	20
I 5.1	NO como neurotransmisor.....	20
I 5.2	NO como neurosecretor	23
I 5.3	NO como neuroprotector	24
I 5.4	NO en la neurodegeneración	25
I 6	Métodos de detección de Óxido Nítrico (NO)	26
I 7	Análisis del pico de NO	29
II	OBJETIVOS.....	31
III	MATERIAL Y METODOS.....	35
III 1	Célula Electroquímica	36
III 1.1.	Electrodo de trabajo selectivo a NO	36
III 1.2	Electrodo de referencia	40
III 1.3	Electrodo auxiliar	40
III 2	Calibradores.....	41
III 2.1	Preparación del calibrador de NO.....	41

III 3 Métodos de comparación <i>in vitro</i>	43
III 3.1 Quimioluminiscencia: Analizador para NO	44
III 4 Productos y Soluciones de trabajo utilizados	45
III 4.1 Soluciones generales	45
III 4.2 Fármacos	46
III 4.2.1 precursores.....	46
III 4.2.2 Donantes de NO	46
III 4.2.3 Interacción con otros sistemas neurotransmisores.....	46
III 4.2.4 Inhibidores enzimáticos	46
III 5 Moléculas que pueden interferir con NO en la voltametría	47
III 6 Tinción histológica de la enzima NADPH-diaforasa	47
III 7 Toma de datos de concentraciones de óxido Nítrico en el Sistema Nervioso Central (SNC) de rata	50
III 8 Tratamiento informático de los datos de concentraciones de óxido Nítrico	51
III 9 Sistema de inyección local <i>in vivo</i>: Cánula de microinyección	53
III 10 Sistema mecánico estereotáxico con movimiento en tres ejes	54
III 11 Animal de experimentación	56
III 11.1 Cirugía Estereotáxica.	56
III 11.2 Implantación del sistema electroquímico.	59
III 12 Modificación del método para su aplicación en la medición de fluidos biológicos humanos	60
III 13 Tratamiento informático	61
IV RESULTADOS.....	63
IV 1 Evaluación del sistema de medida	64
IV 1.1 Efecto del tratamiento eléctrico previo al estudio.....	64
IV 1.2 Variabilidad de la respuesta “in vivo” de la fibra de carbono tras el tratamiento previo	65
IV 1.3 Efecto del tratamiento eléctrico para la porfirina níquel	67

IV 1.4 Efecto de la cobertura de Nafion®	68
IV 1.5 Efecto de la temperatura de secado del Nafion®	69
IV 1.6 Efecto del diámetro de la fibra de carbono	70
IV 1.7 Variabilidad inter-electrodos	71
IV 2 Calibración del NO	72
IV 2.1 Concentración óptima de trabajo del calibrador según la estabilidad en el tiempo.....	72
IV 2.2 Reproducibilidad de los calibradores de NO	73
IV 3 Aislamiento del pico de NO y control de posibles sustancias interferentes en el voltamograma.....	74
IV 3.1 Discriminación de los picos de Oxido nítrico y de Nitritos	74
IV 3.2 Aminoácidos.....	76
IV 4 Validación farmacológica	77
IV 4.1 Interferencia del volumen de inóculo.....	78
IV 4.2 Acción de precursores: L-arginina.....	79
IV 4.3 Donantes de NO: Nitroprusiato sódico (SNP) y S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina (SNAP)	83
IV 4.3.1 Nitroprusiato sódico (SnP).....	84
IV 4.3.2 S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina (SNAP).....	85
IV 4.4 Interacción con otros neurotransmisores	87
IV 4.4.1 Glutámico	87
IV 4.4.2 N-metil D-aspartato (NMDA).....	89
IV 4.4.3 Anfetamina	90
IV 4.5 Inhibidores enzimáticos de la NOS	91
IV 4.5.1 Inespecíficos: N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).....	91
IV 4.5.2 Específicos	93
IV 4.5.2.1 Inos: L-N6-(1-Iminoetil) lisina (L-NIL).....	93
IV 4.5.2.2 eNOs: N ⁵ -(1-iminoetil)-L-ornitina (L-NIO).....	94
IV 4.5.2.3 nNOs: 7-Nitroindazol, sal monosódica (7-NINA).....	95

IV 5 Diseño y puesta a punto de un atlas anatómico-funcional 3D de niveles de NO	96
IV 6 Comparación entre actividad diaforasa y NO extracelular: Justificación fisiológica y funcional.....	121
IV 7 Utilización en aplicaciones clínicas.....	135
V CONCLUSIONES	137
Índice de Figuras.....	141
Índice de Tablas	145
Bibliografía	147
Anexos	173

I INTRODUCCIÓN

I 1 EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico (NO) es un gas tóxico, incoloro, que puede artificialmente generarse desde nitrógeno y oxígeno por la acción de una descarga eléctrica a alta temperatura. Fue el primer producto obtenido en el procedimiento del arco eléctrico de fijación del nitrógeno del aire y fue preparado por primera vez en 1620 por el científico belga Jan Baptist van Helmont (considerado el padre de la Bioquímica). Posteriormente, el químico inglés Joseph Priestley, que entre sus múltiples aportaciones a la ciencia tiene la de introducir la palabra *gas*, estudió esta sustancia a la que llamó “*aire nitroso*”. Hoy se obtiene industrialmente por la oxidación catalítica del amoniaco.

El interés actual como una molécula importante en la fisiopatología del organismo humano es muy reciente, aunque su uso se conoce desde la época de los sumerios que curaban las carnes con sales de nitratos (que produce NO con acción bactericida), y más próximamente en los trabajos de Willian Murrell en 1879 sobre el efecto de la nitroglicerina en el tratamiento del “*angor pectoris*” aun sin vincular estos hechos específicamente al NO.

Químicamente, el óxido nítrico es una molécula pequeña (30,01 g/mol de masa molecular) y contiene un número impar de electrones por lo que se puede considerar más correctamente las formas en resonancia:



Esta estructura electrónica de radical libre le confiere una alta reactividad e inestabilidad, debido a que un orbital molecular antienlazante está ocupado por un solo electrón que le proporciona propiedades paramagnéticas y la característica estructural de radical libre, lo que en determina que en ciertos medios tenga una vida media muy corta.

Su punto de ebullición es $-151,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ y su punto de congelación es $-163,61\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo ambos estados (líquido y sólido) de color azulado. Su temperatura crítica es -94°C y su presión crítica es 64,85 bar, por lo que licúa con dificultad.

El NO es moderadamente soluble en el agua: 0,074 vol/vol (a 1,013 bar y $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($32\text{ }^{\circ}\text{F}$)). En un supuesto teórico de ausencia de reactividad, la concentración estimada en una solución saturada a una atmósfera de presión y a $22\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiene valores muy diferentes para distintos autores: 1,4 mM [Lantoine F. et al., 1995]; 1,8 mM 1,9 mM [Gerrard, 1980; Maskus et al., 1996], 2,0 [Friedemann et al., 1996], 3,0 [Rivot et al., 1997]. Es sin embargo, mucho más soluble en solventes apolares tal como el N-

hexano. Este carácter lipofílico [Anggard et al., 1994; Austin et al., 1967] le permite disolverse de manera selectiva en las membranas y en las fases lipídicas de las células [Griffith et al., 1984]. Usando microsensores selectivos para NO, se han demostrado altas concentraciones de NO en zonas adyacentes a la membrana plasmática de una célula endotelial productora de NO [Malinski et al., 1993]. En las membranas plasmáticas el coeficiente de difusión del NO determinado a 20 °C varía desde $1,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ en liposomas hasta $0,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ en eritrocitos [Denicola et al., 1996], valor que se incrementa significativamente con la temperatura. Basándonos en estos cálculos, podemos señalar, en procesos de difusión simulada del NO, que esta molécula puede perfundir sorprendentemente a distancia desde las células que la produce hasta el punto de interacción con las células dianas [Lancaster, 1994], afectando de esta manera a células, procesos neuronales o efectores aunque estos no se encuentren en íntimo contacto con la célula que lo sintetiza [Bredt et al, 1992]

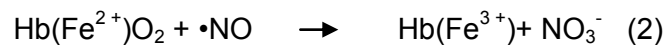
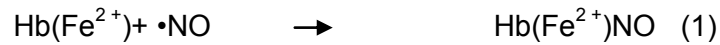
Como hemos dicho, la molécula tiene una muy alta inestabilidad fundamentalmente en presencia de O_2 . De esta manera, en un medio acuoso salino en condiciones fisiológicas de tensión de oxígeno, pH y temperatura, se produce la formación de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-).

En las células de los mamíferos la vida media del NO es relativamente corta (5 - 10 seg) [Ignarro et al., 1987; Ignarro, 1993; Palmer et al, 1987] y la máxima concentración del NO se supone que está en rangos micromolares [Rivot et al., 1997]. Por ello la formación de óxidos de nitrógeno más altos a partir de la reacción de NO con el O_2 puede resultar más dañina para las células dianas que el propio NO. El óxido nítrico es inactivado por la hemoglobina y aniones superóxidos, y esta alta afinidad por la hemoglobina condiciona que el NO solo actúe de manera local.

En condiciones aeróbicas, el NO se oxida espontáneamente y da lugar a sus formas inactivas, estables y definitivas: los nitritos y los nitratos. Esta propiedad explica la particularidad ya descrita de los mamíferos, que excretan más nitratos de los que ingieren, especialmente si existe inflamación.

Esta breve vida media del NO limita su campo de acción por lo que no puede actuar a distancia y solo lo hace a nivel local (acción paracrina). A su vez, actúa sobre la propia célula endotelial generadora (acción autocrina), autolimitando de esta manera su formación en un típico mecanismo regulador de feed-back. Sin embargo, la longevidad y el rango de sus efectos fisiológicos pueden extenderse mediante la formación de productos estables biológicamente activos cuando reaccionan con proteínas y otras moléculas.

Cuantitativamente, la reacción más importante del NO en los mamíferos es la reacción con la oxihemoglobina. Esta reacción es una transferencia de O₂ más un electrón al NO, formando el anión nitrato y metahemoglobina. Además, clásicamente se ha descrito que esta reacción ocurre con deoxiferro y oxiferrohemoglobina formando nitrosilhemoglobina (1) o metahemoglobina (2), y producción de un complejo de peroxinitrito (ONOO⁻), una especie molecular estable y altamente reactiva [Kelm et al., 1997; Patel, 2000; González-Mora et al., 2002]



I 2 BIOSINTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

En 1977 Deguchi describió en el cerebro una sustancia de bajo peso molecular que activaba la guanilato ciclasa soluble (GCs) y que este efecto era inhibido por la hemoglobina.

En 1987, por distintos caminos, dos grupos de investigadores (Ignarro, Buga y Wood de una parte y Palmer, Ferrige y Moncada por otra), demostraron que en el endotelio vascular se libera NO y además su acción era semejante a la que en 1980 describieron Furchgott y Zawadski que era producida por el endotelio vascular y que era necesario para promover la vasodilatación al añadir acetilcolina a un fragmento de aorta de conejo constreñida previamente con fenilefrina. En 1982, Cherry, Furchgott y Zawadski, lo denominaron “*Endothelium Derived Relaxing Factor*” (EDRF). Al mismo tiempo, el conocimiento de que algunos derivados nitrados liberadores de NO como el nitroprusiato sódico y la trinitroglicerina, podían producir la relajación del músculo liso sin la participación de células del endotelio vascular, apoya la propuesta de que el denominado EDRF es el NO.

En 1988, Garthwaite J. y colaboradores, publicaron que tras la activación de los receptores NMDA (N-Metil-D aspartato), se libera una sustancia con acción sobre los capilares sanguíneos similar a la que producía el NO y que además inducía un incremento del (3',5') guanosín-monofosfato (GMPc).

El mecanismo de producción de NO a nivel celular está subordinado a la acción de tres isoformas de la enzima NO sintasa (NOS). Estas han tenido en el transcurso del tiempo diferentes denominaciones. Clásicamente, se han definido dos grupos atendiendo a su modo de formarse (constitutiva e inducible) y a su vez, la forma constitutiva se ha clasificado según su localización en neuronal (nNOS) y endotelial

(eNOS). Sin embargo, a medida que avanza el conocimiento se ha podido comprobar que tales diferenciaciones no tienen límites tan claros.

Si atendemos a la división de la enzima NOS según su proceso de formación en constitutiva e inducible, se ha observado que por ejemplo la isoforma eNOS (constitutiva) puede ser inducida en ciertas situaciones tales como el ejercicio continuado o durante la gestación [Sessa et al., 1993]. También, la isoforma nNOS puede ser inducida en ciertas situaciones desencadenadas por una intensa actividad fisiológica o por procesos fisiopatológicos; como ocurre durante la gestación, ya sea en los primeros días del desarrollo embrionario [Giulli et al., 1994; Santacana et al., 1998], durante los primeros días del desarrollo postnatal cerebral en animales normales o en aquellos que sufrieron un periodo de hipoxia durante el parto [Rodrigo et al., 1998a] o durante el periodo de reperfusión que sigue a una isquemia cerebral de 30 minutos en cerebros de ratas adultas [Rodrigo et al., 2001]. Por otra parte la isoforma iNOS parece estar presente constitutivamente en algunos tejidos como son el epitelio bronquial humano [Kobzik et al., 1993] y en riñón de gato [Mohaupt et al., 1994].

Desde el punto de vista de su localización, la isoforma nNOS (neuronal) ha sido localizada fundamentalmente en las células nerviosas, donde medidas bioquímicas de su actividad, llevadas a cabo en diferentes regiones del cerebro, han demostrado altas concentraciones de nNOS en el cerebelo, en el hipotálamo, en el cerebro medio, en el estriado e hipocampo, y baja actividad en la medula oblongada [Forstermann et al., 1990], tiene además, una ligera expresión en las células de los túbulos colectores distales del riñón de rata [Fernandez et al., 2003]. Así mismo, esta isoforma se encuentra en el músculo esquelético [Kobzik et al., 1994], en los neutrófilos, en los islotes pancreáticos, en los endotelios y epitelios del aparato respiratorio [Kobzik et al., 1993], y en las vísceras del tracto gastrointestinal. La isoforma endotelial (eNOS) que fue purificada y clonada en las células endoteliales también puede encontrarse en ciertas poblaciones neuronales del cerebro [Dinerman et al., 1994] y en las plaquetas [Radomski et al., 1990]. En cuanto a su localización en las células que las contienen, esta es también distinta, siendo citosólica para la isoforma nNOS y asociada a membrana para la isoforma eNOS [Forstermann et al., 1991; Mitchell et al., 1991]. La enzima constitutiva endotelial (eNOS) tiene un sitio de miristilación, capaz de unirse a un ácido graso. Esto le permite asociarse a la membrana lipídica de las células, a diferencia de las otras isoformas, que no tienen este brazo lipídico, y en consecuencia, son hidrosolubles y se encuentran libres en el citoplasma. Se cree que la asociación de la eNOS a la membrana facilita que el NO formado esté más cercano al exterior celular

y en consecuencia difunde más rápidamente hacia la sangre y hacia el músculo liso adyacente [Gosgnach et al., 2000].

Por último, en cuanto a la isoforma inducible (iNOS), fue aislada por primera vez en el citosol de macrófagos purificados y activados de ratón [Hevel et al., 1991; Yui et al., 1991; Lyons et al., 1992], mostrando una conformación dimérica y masa molecular de 135 kDa. Se ha descrito una isoforma de iNOS en plaquetas humanas de 200 kDa [Chen et al., 1996]. La iNOS también ha sido localizada en hepatocitos, células tumorales, neutrófilos, células plasmáticas, linfocitos, células mesangiales, células endoteliales y células musculares lisas de la pared vascular [Moncada et al., 1991; Wright et al., 1989], en el hilio del hipocampo, en el cerebelo, corteza y otras áreas del sistema nervioso central de ratas adultas normales, teniendo además esta isoforma características diferentes entre las expresadas por diferentes tejidos de una misma especie [Mohaupt et al., 1994].

La XIV Reunión Internacional sobre la nomenclatura farmacológica del NO y compuestos relacionados trató de poner un poco de orden adoptando una nomenclatura desde el punto de vista académico [Moncada et al., 1997].

En definitiva, se ha clasificado las NOS en dos isoformas: la constitutiva (cNOS) y la otra inducible (iNOS). Con la denominación cNOS identificamos a la vez a dos isoformas; una denominada endotelial (eNOS), por estar mayoritariamente presente en las células endoteliales de la pared de los vasos. A esta isoforma también se la reconoce, en diversos trabajos previos, bajo las abreviaturas (NOS tipo III, NOS-3, ecNOS). La otra NOS constitutiva ha sido denominada neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el cerebro, medula espinal y sistema nervioso periférico, reconociéndose también en otros trabajos con las abreviaturas (NOS tipo I, NOS-1, bNOS, ncNOS). Finalmente, la isoforma de la NOS inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios se la conoce como iNOS y también como en el caso de las anteriores en muchos trabajos se la identifica con las abreviaturas (NOS tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS) [Collard, 1995; Forstermann et al., 1991; Knowles et al., 1994; Marletta, 1993; Moncada et al., 1991; Myers et al., 1990; Sessa, 1994; Stuehr et al., 1992].

En cuanto a la localización cromosómica de los genes implicados en las diferentes isoformas de la NOS, ha sido determinada por “*Southern blotting*”, usando el cDNA específico de cada isoenzima e hibridando líneas celulares humanas, de rata y de ratón. Estos genes forman una familia que se encuentra dispersa en tres cromosomas. El gen de la isoforma nNOS (160 Kb, 29 exones, 1.433 aminoácidos) aparece

localizado en el cromosoma humano número 12 (12q 24.2) [Kishimoto et al., 1992; Xu et al., 1993]. El gen de la isoforma de la eNOS (21-22 Kb, 26 exones, 1203 aminoácidos) corresponde al cromosoma 7 (7q35-36) [Xu et al., 1994] y finalmente, el gen de la isoforma iNOS (37 Kb, 26 exones, 1153 aminoácidos) se localiza en el cromosoma 17, estando situados en este caso los genes a cada lado del centrómero (17cen-17q 11.2) [Xu et al., 1994].

Característica	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Designación	nNOS	iNOS	eNOS
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Regulada	Ca ²⁺ y calmodulina	citoquinas	Ca ²⁺ y calmodulina
Ubicación intracelular	Citosólica	Citosólica	Membrana
Producción de NO	picomoles	nanomoles	picomoles
Función	Señalización celular	Citotóxicas, citostáticas, citoprotectoras	Señalización celular
Cromosoma	12q24.2	17cen-q12	7q35-36

Tabla 1. Características de las isoformas NOS

Las formas constitutivas de la sintasa del óxido nítrico (NOS), están implicadas en la oxidación del aminoácido L-arginina para producir N^G-hidroxi-L-arginina que es rápidamente oxidado para producir óxido nítrico y el aminoácido L-citrulina [Palmer et al., 1988a].

Estas isoformas de la enzima cNOS, tienen zonas de reconocimiento para el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), para el flavín adenín dinucleótido (FAD), el flavín mononucleótido (FMN), la calmodulina y el grupo hemo (hierro protoporfirina IX) [Bredt et al., 1991a; Stuehr et al., 1992]. Todo ello hace que estas isoformas tengan semejanza con la familia de las hemoproteínas monooxigenasas y con las enzimas que actúan en el citocromo P450 [Griffith et al., 1995; Marletta, 1993]. Las isoformas cNOS son por tanto, totalmente dependientes de Ca²⁺ y calmodulina, actuando sobre la L-arginina, NADPH y el oxígeno molecular como substratos y utilizando como cofactores los FAD y FMN [Bredt et al., 1989; Bredt et al., 1990; Garthwaite, 1991; Knowles et al., 1990; Santacana et al., 1998]. Su actividad enzimática puede estar también controlada por fosforilización [Nakane et al., 1991] e incrementada por otro cofactor, la tetrahidrobiopterina (H₄B) [Giovanelli et al., 1991; Alderton et al., 2001].

La forma inducible de este enzima (iNOS), cuya expresión en las células ocurre tras la estimulación con citoquinas, no requiere calmodulina activada por calcio como cofactor. Hasta la fecha, las citoquinas y ciertos productos bacterianos son considerados los principales reguladores de la actividad iNOS, siendo por tanto, su expresión dependiente de lipopolisacáridos (endotoxinas) y citoquinas proinflamatorias [Salter et al., 1991]. La enzima para su completa actividad requiere NADPH, FAD y FMN y en cierta medida H₄B y glutatión [Hevel et al., 1991].

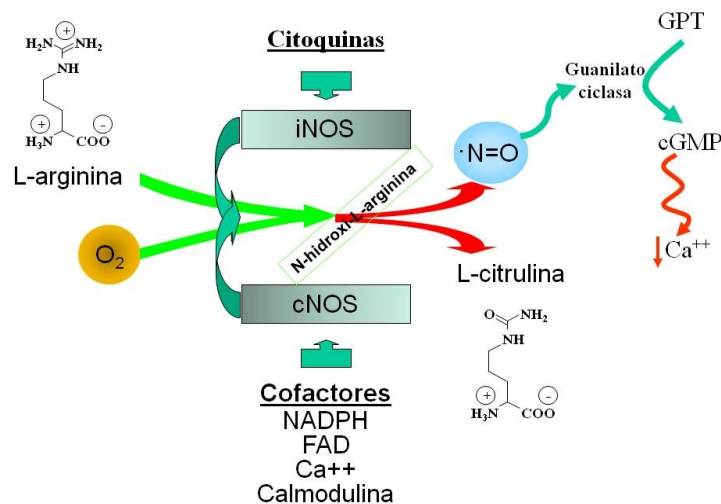


Figura 1. Esquema de la síntesis de óxido nítrico

El óxido nítrico puede atravesar con facilidad la membrana plasmática de las células donde se une al enzima guanilato ciclasa [Arnold, 1977; Bredt, 1989], produciendo un cambio conformacional en la molécula que aumenta su actividad. La activación de la guanilato ciclasa estimula la conversión del guanosin-5"-trifosfato (GTP) a (3', 5') guanósín-monofosfato cíclico (GMPc). La acumulación de GMPc en la célula lleva a una cascada de sucesos a nivel intracelular cuyo resultado final es la disminución del calcio libre [Bruhwylter et al., 1993; Gross et al., 1995].

I 3 METABOLISMO Y ELIMINACIÓN DEL NO

La vida media del NO en la circulación es, como se ha descrito anteriormente, muy corta puesto que es rápidamente inactivado por su unión a diferentes moléculas. El NO por sus características paramagnéticas interacciona básicamente con metales de transición, oxígeno y radicales libres.

De las metaloproteínas portadoras de metales de transición ya hemos mencionado su acción sobre la guanilato ciclasa soluble y también es conocida su reacción con otros

enzimas con grupos Fe^{2+} -hemo como las citocromos P450 [Oguro et al., 1997], sin embargo, la vía principal de eliminación es mediante la unión con el grupo ferroporfirina de la hemoglobina [Stamler et al., 1992], convirtiéndose de esta forma en nitrosilhemoglobina (NOHb). En presencia de O_2 el grupo hemo de la nitrosilhemoglobina (Fe^{2+}) es rápidamente oxidado (Fe^{3+}), dando lugar a metahemoglobina (MetaHb) y nitratos y nitritos residuales [Kerwin, 1995]. La mayor parte de estos nitratos son eliminados por la orina, mientras que la MetaHb es regenerada a Hb principalmente por la metahemoglobina reductasa en los hematíes.

I 4 PAPEL FISIOPATOLÓGICO

Desde que en 1987 se demostró, como ya hemos manifestado, que en el endotelio vascular se libera NO, se han producido numerosos estudios clínicos hasta el punto de que en el año 1992 fue nombrada molécula del año por la revista Science [Koshland, 1992] y posteriormente en el año 1998 Ignarro, Murad y Furchgott fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina y Fisiología.

En los últimos años se han descrito una amplia gama de procesos biológicos en los que el NO puede estar implicado. Estos procesos incluyen acciones en los sistemas cardiovascular, nervioso, inmunológico y otros. Por otra parte, se han estudiado tanto sus efectos adversos como su aplicabilidad terapéutica.

De todo ello tenemos que concluir que es imposible abarcar en toda su amplitud el estado actual del conocimiento del Oxido Nítrico y no siendo este el objeto del presente trabajo solamente de manera breve expondremos algunos de los estados fisiopatológicos donde la intervención del NO tiene un papel relevante, haciendo especial hincapié en el papel del NO en el Sistema Nervioso Central, dado que en él se centra el objetivo del presente trabajo.

I 4.1 NO EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La producción del NO es un mecanismo citotóxico defensivo de la inmunidad celular ante la infección de bacterias, hongos, parásitos y células tumorales [Marletta et al., 1988; Billiar et al., 1989].

La generación de NO es una característica clave de muchas células del sistema inmunitario, incluyendo las células dendríticas, células NK, mastocitos, macrófagos y otras células fagocíticas. Tanto iNOS como eNOS se ha encontrado en todos estos tipos de células, pero la evidencia permanece incierto en cuanto a si los linfocitos T o B expresan las isoformas de NOS [Bogdan, 2001].

La iNOS está presente en las células del sistema retículoendotelial, siendo la encargada de sintetizar NO cuando dichas células son estimuladas por las citoquinas y la endotoxina [Hibbs et al., 1988; Marletta et al., 1988; Stuehr et al., 1989]. En función del microorganismo o del estímulo de citoquinas, por diferentes vías de señalización se favorece o inhibe la expresión de iNOS. El NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) está presente en una forma inactiva en el citosol como un complejo con la proteína inhibidora I κ B. Cuando un inductor, como el LPS, estimula la célula, el complejo I κ B-NF- κ B se fosforila, permitiendo que el NF- κ B se transloque al núcleo e induzca la expresión del gen iNOS [Aktan, 2004].

En estudios llevados a cabo por Musial y Eissa [Musial et al., 2001] encontraron que algunos compuestos también eran capaces de suprimir la inducción de iNOS mediante el bloqueo de la degradación de I κ B. De esta manera, el mismo NO puede regular su propia producción. Este feedback negativo podría ser un mecanismo para ayudar a prevenir el exceso de producción de NO y la patología asociada a dicho exceso.

En algunos estudios, se ha utilizado una combinación de LPS y de IFN γ (Interferón gamma) para estimular las células inmunes, como los macrófagos, para producir NO. Esto se debe a que ciertas combinaciones de citoquinas o LPS con IFN γ son capaces de inducir sinérgicamente la expresión de iNOS. Se ha propuesto que sería a través de la vía Jak-STAT, donde STAT1 se activa y se transloca al núcleo, incrementando los niveles IRF-1 (Factor 1 regulador de Interferón) y finalmente la inducción de iNOS [Aktan, 2004].

Los elevados niveles de nitritos y nitratos en la enfermedad del huésped contra el injerto o del injerto contra el huésped, se usan como marcadores de la aparición de dicha enfermedad cuando todavía no existen indicios clínicos. Ello sugiere que el NO puede ser un intermediario en dicha situación [Langrehr et al., 1992].

El NO inhibe la adhesión leucocitaria al endotelio vascular y su déficit puede dar lugar a la adhesión y la migración leucocitarias características de los fenómenos de inflamación [Kubes et al., 1991]. En un estudio se demostró el potencial antiinflamatorio del NO *in vivo* [Chollet-Martin et al., 1996]. En dicho estudio se administraba 18 ppm de NO inhalado durante cuatro días a un grupo de pacientes con Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y se evaluó la expresión de β 2-integrinas CD11b/CD18, la producción de H₂O₂ y los niveles de IL-6 e IL-8 en el lavado broncoalveolar, comparándolo con pacientes con SDRA pero que no recibían NO inhalado. Se pudo observar como a los cuatro días, en el grupo tratado con la inhalación de NO había un

descenso de la expresión de β 2-integrinas CD11b/CD18, de la producción de H_2O_2 y de los niveles de IL-6 e IL-8, a diferencia del grupo no tratado. Ello confirma la capacidad del NO de atenuar la capacidad de oxidación y adhesión de los polimorfonucleares, así como la liberación de citoquinas.

I 4.2 NO Y SEPSIS

El NO se ha relacionado con la patogénesis del estado hemodinámico de tipo hipercinético del shock séptico [Petros et al., 1991]. Este estado vendría dado por un exceso en la producción endógena de NO.

Existen diversos estudios que demuestran un aumento de la producción de citoquinas en el transcurso del shock séptico. Como se ha expresado anteriormente, una vez el sistema inmune se pone en contacto con determinados componentes de las bacterias, como el lipopolisacárido de la pared celular se desencadena la producción de múltiples citoquinas como el TNF, la IL-1 e IL-6, el IFN- α e IFN- γ [Calandra et al., 1990; Calandra et al., 1991; Damas et al., 1989; Marks et al., 1990; Michie et al., 1988; Nussler et al., 1992; Pinsky et al., 1993]. Algunas de ellas se han relacionado con la mortalidad o la aparición de complicaciones severas [Calandra et al., 1990; Calandra et al., 1991; Marks et al., 1990]. Las citoquinas tienen la propiedad de favorecer la expresión de la iNOS, que a diferencia de la cNOS es capaz de sintetizar gran cantidad de NO durante largos períodos de tiempo.

El elevado nivel de NO endógeno producido por la iNOS favorecería, al actuar sobre la pared vascular, el estado de vasodilatación típico de la sepsis y que suele tener una escasa respuesta a los vasoconstrictores. Asimismo se ha demostrado que el efecto del NO no sólo se limita a la pared vascular sino que también afecta a la pared ventricular colaborando en la disfunción cardíaca de la sepsis [Brady et al., 1993; Schulz et al., 1992]. En un estudio se demostró cómo las arterias mesentéricas de humanos en shock séptico presentan una hiporreactividad *in vitro* a la noradrenalina en comparación con humanos sanos, y que dicha hiporreactividad desaparecía cuando las arterias del grupo séptico eran tratadas con un inhibidor de la síntesis de NO [Tsuneyoshi et al., 1996]. Ello prueba el papel importante del NO en el estado de vasodilatación del shock séptico.

Diversos estudios en animales de experimentación (ratas, perros, conejos y ovejas) han demostrado cómo la administración de inhibidores de la síntesis de NO son capaces de revertir dicho estado de vasodilatación y disfunción cardíacas [Kilbourn et al., 1990; Kilbourn et al., 1990a; Klabunde et al., 1991; Landin et al., 1994; Lorente et

al., 1993; Lorente et al, 1993a; Moncada et al., 1991; Nava et al., 1991; Petros et al., 1991; Wright et al., 1992; Hollenberg et al., 2000; Matejovic et al., 2004].

Los inhibidores de la síntesis de NO son análogos de la L-arginina, que compiten con ella en la síntesis de NO. Los más utilizados en la práctica experimental son la L-NMMA (N^G-monometil-L-arginina) que inhibe indistintamente la cNOS [Palmer et al., 1988] y la iNOS [Hibbs et al., 1987] y es considerado el menos tóxico, la L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil ester) que inhibe la cNOS y la N^G-amino-L-arginina, menos usado por la posibilidad de aparición de convulsiones [Kilbourn et al., 1992]. En un estudio randomizado que comparaba pacientes con shock séptico tratados con L-NMMA vs placebo [Petros et al., 1994], se observó que en los pacientes tratados con L-NMMA se producía un aumento dosis dependiente de la presión arterial media, de la resistencia vascular sistémica, resistencia vascular, con un descenso del gasto cardíaco y de la frecuencia cardíaca. No se produjeron cambios en la función renal ni en los enzimas hepáticos y no hubo cambios ni en la saturación arterial, ni en los niveles de lactato. Otros estudios aislados en humanos han demostrado cambios hemodinámicos similares [Lin et al., 1994].

Un estudio reciente sugirió que nNOS juega un papel más importante en la sepsis de lo que se reconocía. En los ratones deficientes en nNOS había déficit en la depuración de bacterias y disminución de la supervivencia en un modelo producción de sepsis de "ligadura y punción cecal" (CLP). Los resultados fueron similares cuando los ratones de tipo salvaje fueron tratados con un inhibidor selectivo de nNOS, lo que sugiere que nNOS puede tener un papel protector en la sepsis [Cui et al., 2007], de igual modo que la eNOS [Sundrani et al., 2000; Huttunen et al., 2009] y tiene la finalidad de producir una pequeña cantidad de NO probablemente para favorecer la vasodilatación esplácnica y con ello contrarrestar el efecto dañino de la endotoxina en el hígado y en el tubo digestivo en el transcurso de la sepsis.

Todo ello ha llevado a afirmar a algunos autores que la combinación de los inhibidores de la síntesis de NO junto con el aporte de NO exógeno inhalado puede ser una alternativa terapéutica válida, tanto para el estado hemodinámico de tipo hipercinético observado en el shock séptico como para favorecer una vasodilatación selectiva pulmonar [Wright et al., 1992].

Los niveles de nitritos y nitratos en sangre se han considerado los principales indicadores de la síntesis de NO, ya que son producidos en la vía "L-arginina – NO", siendo eliminados por vía renal, aunque existen otras vías de producción de nitritos y nitratos como es la propia fuente nutricional [Bryan, 2006]. En el shock séptico se

produce un aumento de estos niveles y estos se correlacionan de forma directa con el nivel de endotoxina en la sangre y el gasto cardiaco y de forma inversa con la presión arterial sistólica [Gomez-Jimenez et al., 1995]. Este es pues otro dato que apunta al NO como uno de los principales mediadores del estado hemodinámico característico del shock séptico.

Otro de los estudios que relaciona el NO con la sepsis ha podido comprobar cómo el nivel de NO exhalado por ratas en un modelo de shock séptico es superior al nivel de NO exhalado por ratas sin shock séptico, y que un determinado nivel es un índice pronóstico para desarrollar una lesión pulmonar aguda. Ello ha sugerido que dicho nivel de NO exhalado serviría como marcador para decidir el uso de fármacos anti-endotoxina en determinados subgrupos de pacientes [Stewart et al., 1995].

Se ha observado recientemente alta correlación entre la mortalidad y el nivel de producción de intermediarios reactivos del oxígeno por las células endoteliales cultivadas cuando se exponen a sueros de pacientes con sepsis grave [Huet et al., 2007]. Además, se ha señalado que el estrés oxidativo contribuye al desacoplamiento de la eNOS, aumentando la formación de intermediarios reactivos del oxígeno [Forstermann et al., 2006].

Así pues, abordar tanto el estrés oxidativo y nitrosativo reduciendo la formación de peroxinitrito y otros intermedios tóxicos, podría tener utilidad terapéutica.

I 4.3 NO EN EL APARATO DIGESTIVO

El metabolismo del NO se ha relacionado con la motilidad intestinal y la dilatación gástrica, al detectar producción de NO en las neuronas no adrenérgicas no colinérgicas (NANC) del tracto gastrointestinal [Mellion et al., 1981]. Tanto el exceso como el defecto de síntesis de NO han sido relacionados con diversas patologías como los trastornos hemodinámicos típicos de la cirrosis y de la hepatopatía crónica [Guarner et al., 1993; Jimenez, 1995; López-Talavera et al., 1995; Vallance et al., 1991], la acalasia y la estenosis de píloro [Vanderwinden et al., 1992] y la colitis ulcerosa [Middleton et al., 1993]. Los tratamientos actuales para reducir el dolor y la inflamación incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y su uso altera los mecanismos gastroprotectores en el tracto gastrointestinal, incluyendo la secreción de moco y el flujo de la sangre [Laine et al., 2008] lo que conlleva la aparición de efectos adversos como ulceración de la mucosa y hemorragia gastrointestinal o incluso perforación.

Es bien sabido que las prostaglandinas derivadas de las ciclooxigenasas (COX) desempeñan múltiples funciones en el mantenimiento de la integridad de la mucosa

gastrointestinal, incluyendo la estimulación de la secreción de moco y bicarbonato, la resistencia de las células epiteliales a la lesión, la inhibición de la incorporación de leucocitos en la mucosa, y la disminución de la liberación de mediadores de la inflamación [Wallace et al., 1995]. El NO y las prostaglandinas, también presentan un elevado grado de cooperación y la supresión de uno de ellos puede conducir a una elevación compensatoria en los otros [Wallace et al., 2000; Morin et al., 2001; Wallace, 1997]. Parece por tanto que el NO es responsable de ayudar a mantener la integridad del epitelio gástrico y la barrera mucosa.

NO es un vasodilatador y media en el flujo sanguíneo gástrico. Los experimentos en ratas revelaron que el inhibidor de la NOS, la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), indujo un aumento dosis-dependiente de la presión arterial sistémica y una disminución en reposo del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica [Pique et al., 1989]. Hay pruebas de que la adición exógena de NO, similar a la proporcionada por un parche transdérmico de nitroglicerina en los seres humanos, puede ayudar a proteger el daño gástrico de la mucosa gástrica de rata inducida por indometacina, tal vez porque el parche de nitroglicerina mantiene el flujo adecuado de sangre e inhibe en la mucosa interacciones celulares de los leucocitos en el endotelio [Calatayud et al., 1999].

Se sabe que el moco producido en la mucosa, contribuye a la defensa del tracto digestivo actuando como una barrera física a los daños, así como ayudar a proteger el epitelio de los efectos causados por el ácido clorhídrico y la pepsina [Wallace et al., 2000; Allen et al., 1993]. La incubación con el NO estimula la secreción de moco en las células de la mucosa gástrica de rata en una forma dosis-dependiente y que este estímulo depende de cGMP [Brown et al., 1993].

En experimentos *in vivo*, se demostró que la administración del dinitrato de isosorbide (donante de NO) a la luz gástrica de la rata, conduce a un aumento dosis-dependiente en el espesor de la capa mucosa, demostrando una vez más que bajo ciertas condiciones el NO ayuda a mediar la secreción de moco para proteger el epitelio gástrico [Brown et al., 1992].

La aplicación intragástrica de donantes de NO, entre ellos FK409 (4 Etil-2-hidroximino-5-nitro-3-hexenamida) y nitroprusiato de sodio, disminuyó significativamente la secreción basal y la secreción estimulada por pentagastrina y YM-14673 (N alpha-((S)-4-oxo-2-azetidiny carbonyl)-L-histidyl-L-prolinamide dihydrate), un análogo de la hormona liberadora de tirotrópina [Allen et al., 1993].

Experimentos posteriores han demostrado que, cuando células de la glándula gástrica humana aisladas se incubaron con donantes de NO como el S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), la estimulación con histamina produjo la disminución de la secreción de ácido clorhídrico en comparación con los controles [Berg et al., 2005]. Debido a que la secreción de ácido se inhibió en presencia de un análogo de (3', 5') guanosín-monofosfato cíclico (GMPc) y la presencia de SNAP y un inhibidor de la sintetasa de guanilato ciclasa no dio lugar a una disminución en la secreción de ácido gástrico, los autores concluyeron que el papel del NO en la secreción de ácido gástrico es dependiente de GMPc.

A pesar de que las prostaglandinas y NO son necesarios para la función gastrointestinal normal, también hay cierta evidencia de que un gran exceso de estos compuestos podrían tener efectos nocivos en el tracto gastrointestinal. En el tracto gastrointestinal, iNOS se activa en la gastritis inducida por la infección por *Helicobacter pylori*, enfermedades inflamatorias del intestino, y la ulcerogénesis inducidas por AINE [Wallace et al., 2000; Mannick et al., 1996; Martin et al., 2001].

1.4.4 NO EN EL SISTEMA VASCULAR

El endotelio es un órgano ampliamente distribuido en el organismo, con un peso aproximado de 1,5 kg, y que está profundamente involucrado en múltiples funciones, sintetizando, metabolizando y liberando un número de sustancias que ejercen efectos de modo autocrino, paracrino, o epicrino [Bassenge, 1996]. Entre dichas sustancias se destaca el NO, por su papel central y fundamental en varias funciones endoteliales, tales como la regulación del tono vasomotor, la inhibición de la actividad plaquetaria, el mantenimiento del balance entre los procesos de trombosis y fibrinólisis y la regulación de la incorporación de células inflamatorias dentro de la pared vascular [Vallance et al., 1994; Court et al., 2002].

En 1981 aparecieron los primeros datos que relacionaban el descenso del c-GMP plaquetaria con una mayor agregación plaquetar y viceversa [Mellion et al., 1981]. En 1987 se pudo comprobar cómo el NO era capaz de inhibir la adhesión plaquetar al endotelio [Radomski et al., 1987]. En 1988 se evidenció la inhibición plaquetar *in vivo* con la elevación de c-GMP [Hogan et al., 1988]. Radomski y colaboradores comprobaron la existencia de c-NOS en las plaquetas humanas y que la vía L-arginina-NO regulaba la agregación plaquetar en el hombre [Radomski et al., 1990]. A raíz de esto se han realizado varios estudios para comprobar si el NO inhalado era capaz de variar el tiempo de sangría. Si bien en un estudio se ha podido comprobar cómo los

pacientes tratados con inhalación de NO presentan un tiempo de sangría alargado [Hogman et al., 1993]. En 1995, se confirmó la inhibición de la agregación plaquetar en pacientes con Síndrome de dificultad respiratoria aguda tratados con NO inhalado, aunque concluyeron que ello no comportaba cambios significativos en el tiempo de sangría [Samama et al., 1995].

La alteración del funcionamiento normal del endotelio se ha denominado "*disfunción endotelial*" y está claramente presente en la hipertensión arterial y en la aterosclerosis, y ha sido implicada en otras patologías como la isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria estable, en el síndrome coronario inestable [López-Jaramillo et al., 1995], y en la diabetes mellitus [Wu et al, 1995]. También se ha demostrado que, en ausencia de una función endotelial intacta, o inclusive durante el proceso normal de envejecimiento, la capacidad de sintetizar y liberar NO y autacoides endoteliales se ve disminuida, y en consecuencia la capacidad de dilatar las arterias se reduce [Vanhoutte, 1991; Raji, 1991].

La función endotelial es clave para la homeostasis vascular y para la traducción de señales de activación de la circulación. Una definición ampliamente aceptada de la disfunción endotelial es la de una reducción de óxido nítrico endotelial, que se manifiesta como una disminución en la vasodilatación dependiente del endotelio inducido por los agonistas o debido al flujo. La disfunción endotelial se ha observado con anterioridad a cualquier otra evidencia de enfermedad cardiovascular en sujetos con una historia familiar de hipertensión esencial o de otros factores de riesgo de aterosclerosis. También se ha asociado con el tabaquismo y en general su presencia es un factor predictivo de enfermedad cardiovascular. La disminución en la formación de NO puede resultar de la reducción de la expresión de eNOS o de cambios en sus sustratos o cofactores, como la L-arginina o tetrahidrobiopterina (H_4B). Sin embargo, el mecanismo más probable de la disfunción endotelial es el de una menor biodisponibilidad de NO como consecuencia de sus interacciones con las especies reactivas del oxígeno, en concreto el radical anión superóxido (O_2^-). La inactivación del NO por superóxido contribuye al estrés oxidativo, un término utilizado para describir varios procesos nocivos derivados de un desequilibrio entre la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o los oxidantes derivados del NO y con limitadas defensas antioxidantes [Vaziri et al., 2000]

La reacción entre el NO y O_2^- conduce a la formación de peroxinitritos [Beckman et al., 1990]. Esta especie oxidante de gran importancia ha sido implicada en el

establecimiento de las condiciones clínicas tales como la hipercolesterolemia, la diabetes y la enfermedad arterial coronaria [Greenacre et al., 2001].

Una potencial fuente de O_2^- es la que ha sido descrita como "desacoplamiento de NO sintasa", una situación en la que eNOS puede generar O_2^- cuando las concentraciones de H_4B o L-arginina son bajas. El desacoplamiento de la eNOS se ha descrito en la aparición en varias patologías como la diabetes, la hipercolesterolemia y la hipertensión [Cai et al., 2000]. Sin embargo, el desacoplamiento de la eNOS debido a la disminución de L-arginina y H_4B no es probable que sea un mecanismo temprano de generación de O_2^- , ya que la reducción del sustrato o el cofactor a niveles críticos probablemente requiere cambios drásticos en el sistema vascular.

Recientemente se ha demostrado que el NO, al favorecer la reducción del citocromo-c oxidasa, facilita la liberación de O_2^- de la mitocondria. Este se transforma posteriormente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con las consiguientes consecuencias de señalización [Palacios-Callender et al., 2004]. Es probable que tal mecanismo, que es una extensión de la acción fisiológica de NO en el citocromo c oxidasa, podría proporcionar pistas para la comprensión de los orígenes del estrés oxidativo en el sistema vascular.

La protección contra la disminución de la generación de NO constitutivos en la vasculatura puede prevenir el desarrollo de enfermedad vascular. Esto puede lograrse mediante el uso de antioxidantes y la transfección de eNOS. Cada uno de estas intervenciones se han mostrado prometedoras en animales de experimentación y en humanos. Curiosamente, las estatinas se han demostrado recientemente como incrementadoras de la producción de óxido nítrico endotelial en los cultivos de células endoteliales. Los mecanismos propuestos para esta acción incluyen la reducción del estrés oxidativo por el aumento de la síntesis de H_4B , aumentando el acoplamiento de la eNOS o la reducción de la activación de la NADPH oxidasa [Laufs, 2003].

Una evidencia preliminar sugiere que la administración de estradiol aumenta la relajación dependiente del endotelio y la aorta de hembra de conejos generando más NO que los de los machos. Esto, junto con el hecho de que NO podría estar aumentado durante embarazo, llevó a estudiar el efecto de los estrógenos sobre las diferentes isoformas de NOS. Los resultados indican que los estrógenos no sólo aumentan la actividad de eNOS, sino también su expresión [Weiner et al., 1994]. Estos resultados han sido confirmados en muchos estudios y, de hecho se ha demostrado que la ovariectomía de ratas reduce drásticamente la cantidad y actividad de eNOS.

Además de una acción a nivel de expresión de eNOS o actividad, se ha afirmado que los estrógenos actúan reduciendo la generación de O_2^- en la pared del vaso, dando lugar a una disminución del desajuste del NO disponible [Khalil, 2005].

I 4.5 NO Y DIABETES

Otra patología en la que el compromiso vascular es responsable de complicaciones graves es la Diabetes mellitus (DM); dicha enfermedad produce deterioro de la función endotelial, lo cual es determinante en la patogénesis de la enfermedad vascular asociada [Durante et al., 1988; Yaqoob et al., 1993; Galajda et al., 1997]. El control estricto de la glicemia a largo plazo parece ser el factor fundamental, aunque no el único, para evitar las complicaciones microvasculares en la DM tipo 1. Se ha postulado que la alteración del sistema de producción del NO es una de las vías a través de la cual podría iniciarse la enfermedad vascular en los pacientes que sufren DM [Durante et al., 1988; Huszka et al., 1997].

La diabetes mellitus induce un defecto en la producción de NO. Ello provoca una reducción de la capacidad de relajación de las arterias de los pacientes con diabetes, un aumento de la agregación plaquetar, un aumento de la permeabilidad vascular y un trastorno de la función nerviosa, todo ello es capaz de facilitar la aparición de las complicaciones tardías de la diabetes [Amado et al., 1995].

La falta de señalización de NO es un componente importante en la patogénesis de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes, que conduce a la aterosclerosis acelerada y eventos vasculares. La hiperglucemia puede inducir la producción excesiva de O_2^- , puede disminuir la producción de NO, y dañar las células endoteliales, lo que sugiere un mecanismo por el cual la glucosa contribuye a la disfunción endotelial en la diabetes [Bermudez et al., 2008].

La resistencia a la insulina también desempeña un papel importante [Bermudez et al., 2008]. Estudios recientes han demostrado que la disfunción endotelial en la diabetes también pueden estar relacionados con la producción de dimetilarginina asimétrica (ADMA), por inhibición competitiva de la unión de la arginina a NOS y el desacoplamiento de la eNOS [Sud et al., 2008]. En dichos estudios han comenzado a explorar el papel de Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), una enzima principal responsable de la degradación de ADMA. Los niveles de dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) están disminuidas en la diabetes, especialmente en el riñón [Palm et al., 2007].

Estrategias para mejorar la actividad dimethylaminohidrolase dimetilarginina puede tener un potencial terapéutico para modular los niveles de ADMA en esta y otras condiciones.

La diabetes también puede causar la inducción de iNOS, con el estrés nitrosativo resultante. Un estudio reciente en la diabetes inducida por estreptozotocina en ratas mostraron la sobreexpresión de la iNOS en el hígado y el riñón diabético, lo que sugiere un posible papel de la iNOS en la mediación de una disfunción orgánica [Stadler et al., 2008].

La iNOS puede también mediar la resistencia a la insulina en los procesos inflamatorios, perjudicando la señalización de la insulina y el empeoramiento de la hiperglucemia.

I 4.6 NO EN LA ERECCIÓN PENEANA

La síntesis de NO y su vinculación con la adenilato ciclasa soluble es esencial para el proceso de erección. La identificación de NO como un neurotransmisor ha sido posible mediante el uso de los inhibidores de la NOS en el cuerpo cavernoso del pene [Ignarro et al., 1990].

Hasta la fecha, está ampliamente aceptado que el NO es el neurotransmisor y principal mediador de la erección del pene, que se libera durante la neurotransmisión del sistema no adrenérgico-no colinérgico (NANC). Tras su liberación, el NO difunde localmente en las células adyacentes del músculo liso del cuerpo cavernoso y se une a su receptor fisiológico, Guanilato Ciclasa soluble (GCs) [Burnett, 1997]. La enzima es activada con lo cual cataliza la conversión del trifosfato de guanosina (GTP) a (3', 5') guanosín-monofosfato cíclico (GMPc). Este nucleótido cíclico a continuación, sirve como segundo mensajero mediante la activación de la proteína kinasa G (PKG), conocida como proteína dependiente de GMPc quinasa I (cGKI), que a su vez ejerce acciones que implican canales de iones y proteínas contráctiles que regulan el estado contráctil del músculo liso.

La consecuencia es la disminución de la concentración de calcio citosólico y la relajación del músculo liso, lo que resulta en la dilatación de las arterias y el aumento del flujo sanguíneo en los senos de la cuerpos cavernosos [Lue, 2000; Rajfer et al., 1992]. Así, en el inicio de la estimulación sexual, el NO neuronal inducido por la despolarización neuronal y el NO endotelial en gran medida generado en respuesta a las fuerzas de apertura provocadas por el aumento del flujo sanguíneo en el pene, sirven respectivamente, como un neurotransmisor iniciador del proceso de erección y

como un factor paracrino en el mantenimiento de la completa respuesta fisiológica. Por otra parte, la fosfodiesterasa 5 (PDE5) opera en esta vía de transducción de señales para contener el efecto eréctil. Esta enzima se expresa predominantemente en el cuerpo cavernoso y funciona como una GMPc-fosfodiesterasa específica, que cataliza la hidrólisis de (3',5') guanosín-monofosfato cíclico (GMPc) a GMP [Turko et al., 1999].

Tanto el endotelio y los nervios NANC del cuerpo cavernoso sirven como la fuente de NO, y por lo tanto, más de una isoforma de la NOS está involucrada. Varios investigadores han demostrado la presencia de nNOS en el nervio cavernoso y sus terminaciones dentro del cuerpo cavernoso, así como en las ramas dorsal de los nervios del pene y los plexos nerviosos en la adventicia de las arterias cavernosas profundas [Burnett et al., 1996; Burnett, 1997; Hedlund et al., 2000]. En el corpus cavernoso humano, la nNOS está presente en las fibras nerviosas que inervan el cuerpo cavernoso y las arterias cavernosas, mientras que la eNOS en gran parte se encuentra en las células endoteliales que cubren los espacios cavernosos y arterias helicinas pero no en las células del músculo liso trabecular [Stanarius et al., 2001].

I 5 EL NO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Teniendo en cuenta que el objetivo de nuestro estudio es la valoración de la concentración de Óxido nítrico en el Sistema Nervioso Central (SNC), nos centraremos en esta revisión en la fisiología e implicaciones patológicas del óxido nítrico en la regulación de la actividad del SNC. Es además, en el SNC donde esta molécula está presente en todas sus estructuras y además de una manera muy regulada.

Dada la amplia gama de funciones del NO en el SNC, centramos nuestra atención en las funciones del óxido nítrico como neuromodulador, neuroprotector y como agente neurotóxico.

I 5.1 NO COMO NEUROTRANSMISOR

El hallazgo de neuronas capaces de sintetizar NO en el SNC implica la necesidad de plantear el papel del NO como posible neurotransmisor. Efectivamente, las propiedades físico-químicas de la molécula de NO se oponen a la consideración de esta como una sustancia neurotransmisora ya que no cumple algunos de los criterios que definían hasta el momento los mecanismos de la neurotransmisión. Los siguientes argumentos pretenden explicar esta controversia.

El NO como molécula gaseosa liposoluble, reactiva y difusible, permite que penetre libremente en las membranas biológicas, y por tanto, es poco probable su

almacenamiento en vesículas sinápticas. Por lo tanto a diferencia de otros neurotransmisores, el óxido nítrico no se almacena en el elemento presináptico. Debe ser producido “*de novo*” ante su requerimiento funcional y no se libera por exocitosis.

Por otra parte la liberación del óxido nítrico no se realiza exclusivamente en las terminales sinápticas [Wiklund et al., 1997]. Al existir NOS en el cuerpo neuronal y en las dendritas éste podría ser sintetizado en estos elementos y difundir libremente.

Como ya hemos mencionado, en las células de los mamíferos la vida media del NO es relativamente corta (5 - 10 seg) [Ignarro et al., 1987; Ignarro, 1993; Palmer, 1987] y su distancia de difusión radial es de 540 μm mientras que en sangre, estos valores disminuyen respectivamente a 1 segundo y 100 μm [Kelm et al., 1988]. Estas distancias son considerables si tenemos en cuenta las dimensiones de las neuronas y elementos nerviosos del cerebro; de hecho, en un radio de 100 μm se encontrarían numerosas sinapsis y fibras. Por lo tanto, el NO es capaz de actuar, teóricamente, sobre todas las estructuras que posean su receptor, contenidas en una esfera hipotética que tiene como centro el sitio de producción del gas y cuyo volumen depende del coeficiente de difusión del NO en el ambiente en que se encuentre. El NO alcanzaría un número de blancos neuronales (terminales presinápticos y otros elementos postsinápticos) más o menos cercanos o lejanos dependiendo de las reacciones químicas producidas a medida que difunde y de la existencia de vasos sanguíneos cercanos, que contienen hemoglobina a la que se uniría el NO anulando su acción como hemos referido anteriormente.

Es posible que el NO se mantenga más tiempo en contacto con los elementos neuronales que un neurotransmisor clásico porque: a) no es removido activamente del espacio sináptico y b) la vida media del NO en los sistemas biológicos es relativamente prolongada, sobre todo si se compara con la duración de la acción sináptica mediada por receptores ionotrópicos que es del orden de las décimas de milisegundos. El cese de las acciones del NO en sus células blanco estaría determinado, entre otras cosas, por: a) la velocidad con la cual disminuye la concentración de NO en el espacio sináptico por difusión desde su sitio de síntesis y por combinación con grupos químicos afines (por ejemplo la oxihemoglobina circulante [Vincent, 1995], b) la velocidad de degradación del (3', 5') guanosín-monofosfato cíclico (GMPc) intracelular por las fosfodiesterasas, y c) la velocidad de desfosforilación de proteínas por fosfatasas [Sanders et al., 1992].

Por lo tanto, es evidente que no todos los criterios para considerar a una molécula como un neurotransmisor son cumplidos estrictamente por el NO, pero esto no invalida

la noción de que esta sustancia es un neurotransmisor, sino que implica que la transmisión nitrérgica constituye una nueva y particular forma de neurotransmisión. Es así que, para aceptar que en un determinado sistema la transmisión es nitrérgica, debería tenerse en cuenta el cúmulo de evidencias experimentales, en lugar de insistir en el cumplimiento riguroso de un conjunto de criterios determinados *a priori* y que excluirían a nuevos mecanismos y/o sustancias del proceso de neurotransmisión [Vincent, 1995; Rand et al., 1995].

La primera evidencia de un papel del NO como un neurotransmisor en el SNC fue manifestada por Garthwaite [Garthwaite et al., 1988], que mostró que la estimulación con glutamato de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) en el cerebelo causa la liberación de una molécula difusible con fuertes similitudes con el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). Poco antes de que este estudio fuera publicado, el NO fue identificado como la molécula EDRF [Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987]. Posteriormente, se demostró que el NO actúa como un neurotransmisor tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) por mecanismos dependientes de GMP cíclico [Garthwaite et al., 1995; Sanders et al., 1992]. En el sistema nervioso periférico se demostró por primera vez su papel como neurotransmisor en el músculo liso del intestino [Bult et al., 1990] en el estómago y en los esfínteres del tracto digestivo [Desai et al., 1991].

Además, el NO regula la liberación de neurotransmisores clásicos en muchas áreas cerebrales, de hecho, el NO se ha demostrado que estimula indirectamente la liberación de acetilcolina en el *núcleo accumbens*, estimulando neuronas glutamatérgicas adyacentes [Prast et al., 1998]. Se ha demostrado que concentraciones basales de NO reducen la liberación de GABA (Ácido γ -aminobutírico) de manera dependiente de Ca^{++} y Na^{+} [Getting et al., 1996; Ohkuma et al., 1996], mientras que los altos niveles de NO aumentan la liberación de GABA.

Los donantes de NO estimulan la liberación de noradrenalina y el glutamato en el hipocampo [Lonart et al., 1992], mientras que la hemoglobina, un secuestrador endógeno de NO, inhibe la liberación de estas moléculas. En el área preóptica medial de la rata, el NO aumenta la liberación de dopamina y serotonina por una vía GCs-GMPc dependiente [Kaehler et al., 1999a; Lorrain, 1993].

En el telencéfalo y el cerebelo, el NO tiene un papel importante en la regulación de la plasticidad sináptica que está implicada en procesos cognitivos, como la memoria.

La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) de la transmisión sináptica están bien establecidas dentro de la plasticidad sináptica [Bohme et al., 1991; Shibuki et al., 1991], y hay evidencia demostrada de que el NO producido presinápticamente o en las interneuronas, actúa postsinápticamente durante la LTD cerebelosa y estriatal, mientras que la generación postsináptica de esta molécula gaseosa y su acción en los sitios presinápticos caracterizan al NO como un mensajero difusible retrógrada en el LTP en el hipocampo y la corteza cerebral [Bon et al., 2003].

En cortes de hipocampo y amígdala de rata, el NO dependiente de la potenciación a largo plazo, es inhibido por el inhibidor de sGC el 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), pero reforzada por el activador de sGC la 3-(5-hidroximetil-2-furyl)-1-bencil-indazole (YC-1), lo que demuestra que la modulación mediada por NO de la plasticidad sináptica es un mecanismo dependiente de sGC-GMPc [Boulton et al., 1995; Chien et al., 2003].

En el diencefalo, el NO es un regulador importante de la actividad neurosecretora del hipotálamo. En el mesencefalo, el NO está implicado en la regulación de muchas funciones, incluyendo el ciclo del sueño. La L-arginina, el precursor de NO, provocó un aumento de ondas lentas en el sueño en ratas cuando se administró durante la fase de luz en el tegmento pedunculopontino (un área del cerebro asignado al control del sueño) [Hars, 1999]. Del mismo modo, la microinyección del donante de NO la S-nitroso-acetil-penicilamina en el tegmento del pedunculopontino de gato, durante la vigilia, aumentó tanto las ondas lentas del sueño como los movimientos oculares rápidos de la fase REM [Datta et al., 1997]. Curiosamente, 3-bromo-7-nitroindazol, un inhibidor específico de la nNOS, se utilizó para mostrar que el NO producido específicamente por esta isoforma NOS regula el proceso en el sueño ratas [Cavas et al., 2006].

I 5.2 NO COMO NEUROSECRETOR

La NOS neuronal se localiza en el núcleo supraóptico hipotalámico y el núcleo paraventricular, ambos están dedicados principalmente a la actividad neurosecretora de esta área del cerebro [Stern, 2004]. De hecho, el núcleo paraventricular hipotalámico (porciones parvicelular y magnocelular) y el núcleo supraóptico (Porción magnocelular) contienen los cuerpos celulares de neuronas que emiten la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la arginina vasopresina (AVP) y la oxitocina [Toni et al., 2004], hormonas que participan en el estrés y la regulación del sueño.

CRH y AVP son los principales neuropéptidos que controlan el eje de la tensión. Cuando se activan en respuesta al estrés, las neuronas en el núcleo paraventricular producen la liberación tanto de CRH y AVP en la eminencia media; estos neuropéptidos luego viajan a la hipófisis anterior a través del sistema vaso portal [Toni et al., 2004]. Una vez en la hipófisis, CRH y AVP activan las células corticotropas que liberan la hormona liberadora de adrenocorticotropina (ACTH) en la circulación general. ACTH, a su vez, estimula a las glándulas suprarrenales para liberar glucocorticoides [Tsigos et al., 2002]. AVP y la oxitocina también puede ser liberado por las neuronas del hipotálamo en la glándula pituitaria posterior (la neurohipófisis), y desde allí directamente a la circulación sistémica, donde AVP regula la reabsorción de agua por el riñón y la oxitocina participa en la contracción uterina y regula la contracción de las células mioepiteliales que rodean alvéolos en la glándula mamaria [Toni et al., 2004; Barberis et al., 1996].

I 5.3 NO COMO NEUROPROTECTOR

El NO tiene un efecto neuroprotector a través de múltiples mecanismos. En células granulares de cerebelo de ratas que han sido cultivados durante 7 días, la inhibición de la síntesis NO produce un aumento significativo de la apoptosis mediante la activación de la caspasa 3. Esta Apoptosis por privación de NO fue reproducida con el ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one) que es inhibidor de la GCs e invertido el efecto con los donantes de NO o análogos de GMPc [Contestabile et al., 2004].

Usando este sistema experimental, se ha postulado que el NO ejerce efectos neuroprotectores a través de las vías intracelulares. La quinasa Akt (fosfatidilinositol 3-quinasa) y el factor de transcripción CREB (*cAMP* elemento de respuesta a la proteína de unión) se han demostrado que participan en el vía de supervivencia que se produce por el NO en células granulares del cerebelo; en particular, ambas proteínas son importantes como transductores de señal de supervivencia mediada por neurotrofinas y para la defensa contra las diversas agresiones neurodegenerativas [Contestabile et al., 2004; Riccio et al., 2006].

El NO también confiere neuroprotección en el modelo de neurotoxicidad mediada por NMDA en el que la estimulación prolongada de los receptores NMDA causan muerte celular excitotóxica [Guix et al., 2005]. El NO protege frente a la excitotoxicidad con la S-nitrosilación de las subunidades NR1 y NR2 del receptor NMDA [Choi et al., 2000; Jaffrey et al., 2001], reduciendo la afluencia de Ca^{++} intracelular que es el responsable de la muerte neuronal [Lipton et al., 1994].

El NO, por otra parte, puede conferir citoprotección a través de la inhibición de la actividad de la caspasa por S-nitrosilación de las cisteínas del área catalítica [Liu et al., 1999; Melino et al., 1997]. La S-nitrosilación se ha demostrado capaz de reducir la actividad de las caspasas en varias líneas celulares, incluyendo las neuronas [Liu et al., 1999; Mannick et al., 2001; Tenneti et al., 1997]. Estudios recientes han demostrado que las neuronas corticales que habían sido tratados con varios donantes de NO como los S-nitrosotioles, mostraron una significativa reducción de actividad caspasa 3 y caspasa 9 inducida por estaurosporina (STS), posiblemente debido a la mediación de NO en la S-nitrosilación del residuo de cisteína en el sitio catalítico de estas caspasas. Además, el tratamiento con NO inhibe la aparición de la imagen de apoptosis nuclear clásica [Zhou et al., 2005].

I 5.4 NO EN LA NEURODEGENERACIÓN

El incremento en la concentración de óxido nítrico en el sistema nervioso central se ha correlacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas, así como con infecciones virales. En estos casos, la iNOS se expresa en la glía produciendo altas concentraciones de NO [Murphy, 2000].

Por otra parte, el NO es mucho más perjudicial bajo condiciones patológicas, que involucran la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como aniones superóxido, y la formación de peroxinitrito [Guix et al., 2005; Pacher et al., 2007].

La formación de nitrotirosina, un marcador de estrés nitrosativo, se ha documentado en pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson [Guix et al., 2005; Good et al., 1998; Sultana et al., 2006]. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, pudiendo el estrés oxidativo contribuir a la muerte neuronal en esta. En los seres humanos se ha observado al menos una relación de causalidad entre la activación de la microglía y enfermedad de Parkinson. La activación de la microglia es capaz de producir daño neuronal a través de la producción de moléculas bioactivas como son las citoquinas, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) [Jenner, 1998; Pabon et al., 2011].

En la enfermedad de Alzheimer es bien conocido que el péptido β amiloide es el principal componente de la placa amiloide, la disminución de la biodisponibilidad de NO en la disfunción endotelial pueden contribuir al aumento del péptido β amiloide y con ello a la enfermedad [Chu et al., 2010].

En otras patologías como son la esclerosis múltiple y de la encefalomiелitis autoinmune, que se caracterizan por la pérdida de mielina de los axones, se produce daño en la barrera hematoencefálica lo que permite la infiltración de monocitos y linfocitos, así como la activación de la glía que contribuye a la producción de citocinas y NO [Merrill et al., 1996]. En la esclerosis múltiple, también se ha propuesto la hipótesis mitocondrial que implica a la citocromo-c oxidasa, de tal manera que el incremento de NO inhibe la respiración mitocondrial y reduce la síntesis de ATP [Brown et al., 2001].

El ictus cerebral es el trastorno cerebrovascular mas peligroso para la vida, la segunda causa de muerte y la principal causa de discapacidad en el mundo. El resultado del ictus es la interrupción del flujo sanguíneo cerebral que causa daño irreversible y fatal para las neuronas afectadas. La interrupción de la homeostasis conduce a la despolarización rápida y a la gran afluencia de calcio y potasio. Como consecuencia de la sobrecarga de calcio intracelular se produce la activación de la transmisión glutamatérgica excito-tóxica, el óxido nítrico (NO) sintasa, la caspasa, la xantina oxidasa y la liberación de especies reactivas del oxígeno [Dirnagl et al., 1999]

La liberación excesiva de glutamato conduce a la activación de fosfolipasas, la hidrólisis de fosfolípidos y la liberación de ácido araquidónico, y en última instancia resulta en necrosis y muerte celular por apoptosis. [Phillis et al., 2003].

I 6 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Muchos métodos se han descrito para medir NO, y los problemas más importantes que hay que afrontar son la selectividad y la sensibilidad. Alguno de estos métodos los reseñamos en la siguiente tabla [Feelisch et al., 1996]:

Métodos directos	<u>Emisión de luz:</u> <i>Quimioluminiscencia</i>
	<u>Electrodo selectivo de NO:</u> <i>Electroquímica</i>
	<u>Fijación con hemoglobina:</u> <i>Espectrofotometría</i>
	<u>Peroxidasa de rábano:</u> <i>Espectrofotometría</i>
	<u>EPR:</u> <i>Espectroscopía de resonancia magnética</i>
Métodos indirectos	<u>Medida de NO₂⁻:</u> <i>Espectrofotométrico</i>
	<u>Medida de otros productos:</u> <i>Citrulina, Ferrocianuro, ABTS...</i>
	<u>Inhibidores de NOs:</u> <i>Isoformas de NOs</i>

Tabla 2. Métodos de medición de óxido nítrico

Para la medida *in vivo* en el sistema nervioso central, hay que tener en cuenta que el medio biológico es un sistema complejo formado por soluciones de múltiples

sustancias encerradas en receptáculos formados por las barreras celulares. Desde un punto de vista estructural podemos simplificar estos espacios en:

- Intracelular
- Extracelular
- Intravascular (como una forma especial del espacio extracelular)

De alguna manera, los procesos biológicos se producen condicionados por las necesidades propias de estos espacios, de tal manera que es el agua quien en definitiva condiciona sus concentraciones y actividades. Posiblemente como consecuencia ancestral del origen marino de la vida hace un millón de años, el agua que rodea las células de los vertebrados y del hombre, es decir, el agua extracelular, posee una composición electrolítica similar a la que tenía el mar en los tiempos más remotos. Esta composición le confiere al líquido extracelular unas propiedades electrónicas que son aprovechables para el uso de métodos electroquímicos en la detección de sustancias disueltas en dicho compartimentos.

La detección directa *in vivo* requiere un método de medida en tiempo real no destructiva. De todos los métodos enumerados en la tabla 2, las técnicas electroquímicas tienen una especial importancia en el estudio *in vivo* de las transformaciones químicas del cerebro ya que pueden detectar cambios en un entorno espacial reducido y en un plazo de tiempo corto, como son los procesos implicados en la neurotransmisión [Malinsky et al., 1992].

Por otra parte, las medidas no son destructivas del analito y el daño tisular es mínimo ya que se trata de sondas que oscilan entre 0 – 500 μm de largo por 4 – 30 μm de diámetro.

Dentro de la electroquímica analítica, la voltametría comprende un grupo de técnicas denominadas de potencial de electrodo controlado, en las cuales se aplica sobre el electrodo de trabajo un determinado programa de potencial, que puede ser constante o variar con el tiempo.

La célula electroquímica para medidas *in vivo*, está constituido por un circuito de tres o cuatro electrodos, siendo la más común la de tres que es la que hemos usado en nuestro estudio (Esquema de la figura 2):

1. Electrodo de trabajo (ET): Sobre el que se efectúan las medidas.
2. Electrodo de referencia (ER): Para el control potencioestático.
3. Electrodo auxiliar (EA): Frente al que se establecen los programas de potencial.

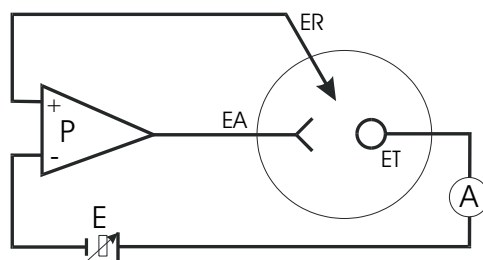


Figura 2. Componentes de la Célula electroquímica
A: amperímetro o voltímetro E: Fuente variable de potencial P: amplificador operacional

La interfaz solución electrodo se comporta como un condensador. A un potencial dado existirá una carga sobre la superficie del electrodo y una carga igual, pero de signo contrario en la solución. La carga en la superficie del electrodo es debida a un exceso o un déficit de electrones. La carga de la solución es aportada por un exceso de iones de una u otra carga en la vecindad del electrodo. El conjunto de todas estas cargas existentes en la interfaz metal-solución se denomina *doble capa eléctrica*.

Los procedimientos voltamétricos suelen clasificarse en función de la velocidad de muestreo en:

Rápidos: Los más usadas son la Amperometría Pulsada Diferencial (DPA), la Voltametría Rápida Cíclica (FCV) y Amperometría Rápida Multipulsada Diferencial (FDMA) que ha sido desarrollada en nuestro laboratorio y combina las características de DPA y DNPV. Tiene la ventaja de su alta velocidad de muestreo siendo su selectividad igual a las técnicas lentas.

Lentos: Los procedimientos más usados son: Voltametría Pulsada Diferencial (DPV), Voltametría Pulsada Diferencial Normalizada (DNPV) y la Voltametría de Barrido Lineal (LSV). Estas técnicas usan velocidades de barrido que oscilan entre 20 y 100 segundos.

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado una variante: la Voltametría Pulsada Doble Diferencial (DDPV) que permite registrar los analitos electroactivos de manera más sensible (2x) que la DNPV al extraer electrónicamente el fondo de oxidación del material analizado. En esta técnica, se reemplaza un pulso de medida por dos más pequeños de amplitud y duración igual. La corriente se mide al final del primer y del segundo pulso respectivamente. La diferencia entre ambos, suprimen las corrientes capacitivas generadas. En el gráfico de la figura 3 se muestra en coordenadas de Potencial/Tiempo el tratamiento DDPV.

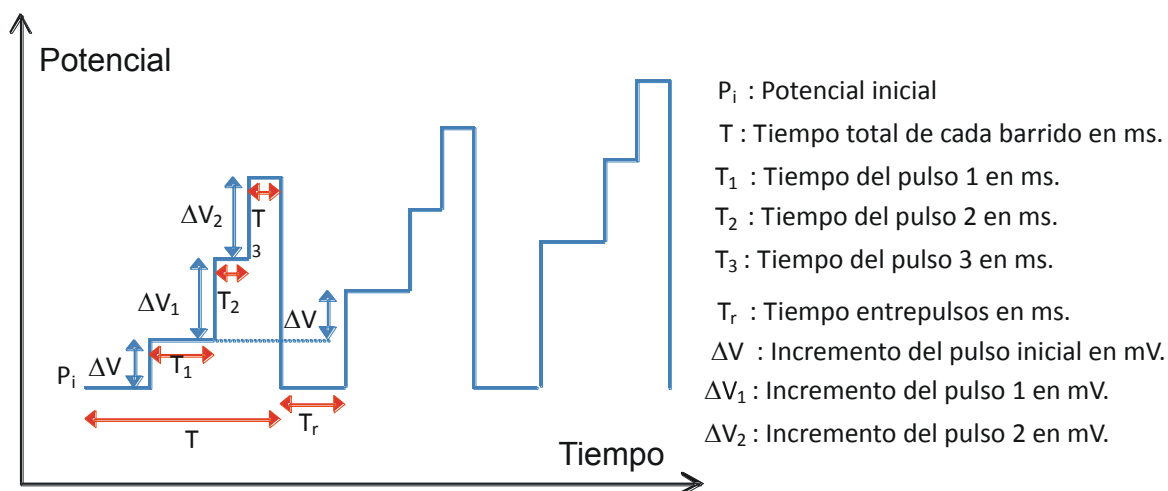


Figura 3. Gráfico de la variación de los pulsos en DDPV

Para discriminar selectivamente entre los productos nitrogenados con capacidad electroactiva, se fijan los potenciales de oxidación de cada molécula, siempre que la diferencia de sus potenciales de oxidación respectivos sean superiores a 10 mV.

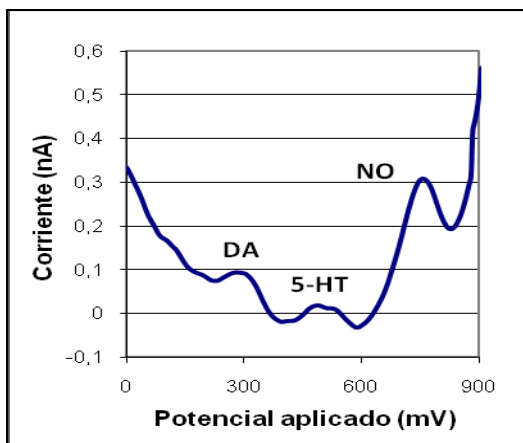


Figura 4. Voltamograma originado por DDPV donde se muestran los picos DA, 5-HT y NO

17 ANÁLISIS DEL PICO DE NO

El número de sustancias cerebrales electroactivas es realmente limitado aunque muy importante. En el esquema de la figura 5, se representan en función de sus potenciales de oxidación diferentes compuestos que clásicamente pueden ser medidos por voltametría, mediante electrodo de fibra de carbono electroquímicamente tratado.

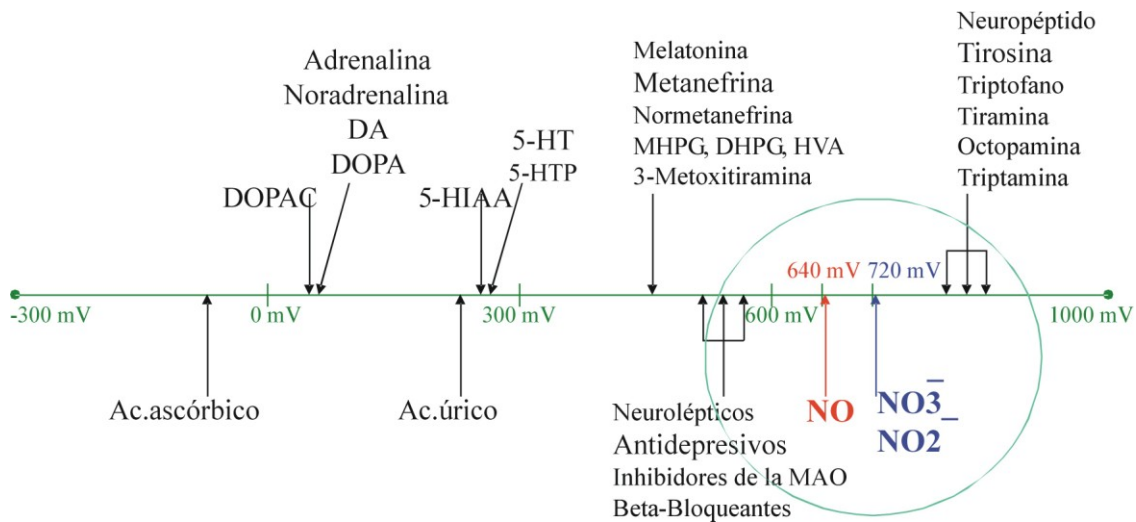


Figura 5. Moléculas potencialmente cuantificables por voltametría. Se representan sobre un eje de potencial aplicado en la voltametría las distintas moléculas detectables según su potencial de oxidación.

Por otra parte, varios factores han de ser considerados para la correcta localización de dicho pico y su estandarización con los electrodos diseñados. Factores derivados de los parámetros voltamétricos tales como la amplitud y duración de pulso y prepulso, velocidad de barrido etc., deben ser ajustados para preservar la estabilidad de la medida y eliminar procesos indeseables como son las corrientes capacitivas.

Factores de la propia superficie activa del electrodo (tamaño, limpieza, tratamiento....) pueden modificar ligeramente los potenciales. Finalmente, dependiendo del animal de experimentación, el factor más importante es el pH y la temperatura ya que los estados acidótico o alcalótico pueden modificar los potenciales de oxidación de los productos analizados, fundamentalmente en los estudios agudos con animales anestesiados sin control ventilatorio.

II OBJETIVOS

El estudio *in vivo* de la detección de NO, ha presentado básicamente dos grandes dificultades: Primero, la gran inestabilidad debida a su alta reactividad lo que dificulta obtener muestras que puedan posteriormente ser analizadas y nos obliga por ello a la medida directa del NO libre en el espacio intersticial, a diferencia de otras sustancias como DA, 5-HT etc...que pueden ser extraídas y posteriormente analizadas. En segundo lugar, la falta de un método directo, estable y reproducible que nos permita medir en un área reducida como son los espacios intercelulares del SNC.

Las contribuciones más extendidas sobre la valoración de NO en el SNC se basan en medidas indirectas por la presencia de actividad NOS, que no es equivalente a la concentración extracelular de NO y por tanto desconocemos la relación real entre ambas (NO y NOS) en cada área del SNC.

La medida de la concentración extracelular de NO de forma fiable nos permitiría plantear una posterior hipótesis de trabajo sobre la relación entre la distribución de la actividad NOS y concentración de NO libre.

De forma general, y como objetivo global, el presente trabajo se propone crear un mapa tridimensional de los niveles extracelulares de NO en el SNC de rata. Para ello, hemos establecido los siguientes objetivos específicos:

- 1º. Diseño y fabricación de un microsensor de NO con una metodología directa y sensible que nos permita la medida reproducible y fiable de los niveles de NO en áreas del orden de 100 μm , que es el área media de difusión del NO generado por una fuente biológica y que coincide con la distancia máxima a la que una célula puede estar alejada de un capilar.
- 2º. Elaboración de un calibrador estable, reproducible y de fácil fabricación que nos permita valorar por un lado la calidad del sensor y por otro que nos dé una concentración fiable de NO en el espacio intersticial.
- 3º. Validación del microsensor considerando:
 - a. Optimización del proceso de fabricación con la validación de los componentes de la célula electroquímica.
 - b. Caracterización del pico de NO.
 - c. Validación de selectividad frente a otras moléculas que pudiesen interferir en la cuantificación de NO, fundamentalmente de las interferencias con otros productos nitrogenados (NO_2^- , NO_3^- , N_2O , etc.....).

d. Validación farmacológica del microsensor.

4°. Medir los niveles basales de NO en diferentes regiones del SNC de rata anestesiada, de tal manera que nos posibilite una reconstrucción en un atlas tridimensional con dichos niveles basales.

5°. Comparación de los niveles de NO con la localización histológica de NOS.

6°. Evaluar su aplicabilidad en clínica humana.

Desde nuestro punto de vista todo ello tiene una gran importancia por varios aspectos:

1. Aportar una herramienta fiable y de fácil implementación para la medida de NO en el SNC.
2. Generar un mapa 3D que permita disponer de las concentraciones de NO en cualquier punto del SNC de rata, actualmente inexistentes.
3. Establecer la concordancia entre NO basal y la presencia de NOS en un entorno común y evaluar el posible grado de activación de la NOS.
4. Conocer los efectos de la actuación selectiva sobre las isoformas de NOS en la variación de la concentración extracelular de NO.
5. Evaluar la aplicabilidad clínica de un sensor estable para la cuantificación directa en sangre de NO exclusivamente a diferencia de los métodos de cuantificación de nitritos y nitratos que incluyen estos analitos de origen no nitrérgicos.

III MATERIAL Y METODOS

III 1 CÉLULA ELECTROQUÍMICA

III 1.1. ELECTRODO DE TRABAJO SELECTIVO A NO

El electrodo de trabajo o microsensar surge desde el diseño clásico de biosensar descrito por Clark [Clark et al., 1962] donde el NO es directamente oxidado en la superficie del electrodo de trabajo. No se puede considerar un “*biosensar*” típico dado que la molécula que utilizamos, el tetraquis (3-methoxy-4-hidroxifenil) porfirina (TMHPPNi), no es de origen biológico sino de síntesis y la diferencia con la porfirina de origen biológico es que contiene como metal central coordinado el Ni⁺⁺ (níquel) en vez de el Fe⁺⁺ (hierro), por lo que le llamaremos microsensar o microelectrodo selectivo. Por lo tanto, para fabricar nuestro microelectrodo hemos realizado un recubrimiento por electrodeposición basado en el procedimiento descrito por Malinski y Taha [Malinski et al., 1992] y posteriormente modificado por nuestro grupo, [Mendez et al. en 1997], consistente en una fibra de carbono revestida de una película polimérica de tetraquis (3-methoxy-4-hidroxifenil) porfirina (TMHPPNi) y recubierta con un poliácido perfluorado con propiedades de intercambio catiónico (Nafion[®], Aldrich Chemical Co., Milwaukee, USA).

El TMHPPNi cataliza la oxidación de NO a NO⁺ por la capacidad electrocatalizadora del átomo central de metal de la porfirina y por lo tanto, en gran medida influye en la magnitud de la oxidación obtenida de los electrodos [Malinski et al., 1992].

El Nafion[®] actúa como membrana de intercambio catiónico; por una parte permite penetrar al NO a través de la película, mientras que simultáneamente las cargas negativas del grupo SO₃⁻ de la cobertura de Nafion[®] evitan que nitritos y nitratos puedan acceder a la superficie activa de la porfirina, previniendo la sobreestimación de la respuesta NO [Malinski et al., 1992]. Este efecto selectivo de también se han demostrado para el ácido úrico y ácido ascórbico y además la película de Nafion[®] no afecta al pico de oxidación del NO [Ikeda et al., 2005].

Los distintos componentes del microelectrodo son:

Conductor eléctrico

Consiste en un cable de cobre de 0,25 mm de diámetro que se une con un material conductor (pintura de plata de RS, Northants, UK) a la fibra de carbón.

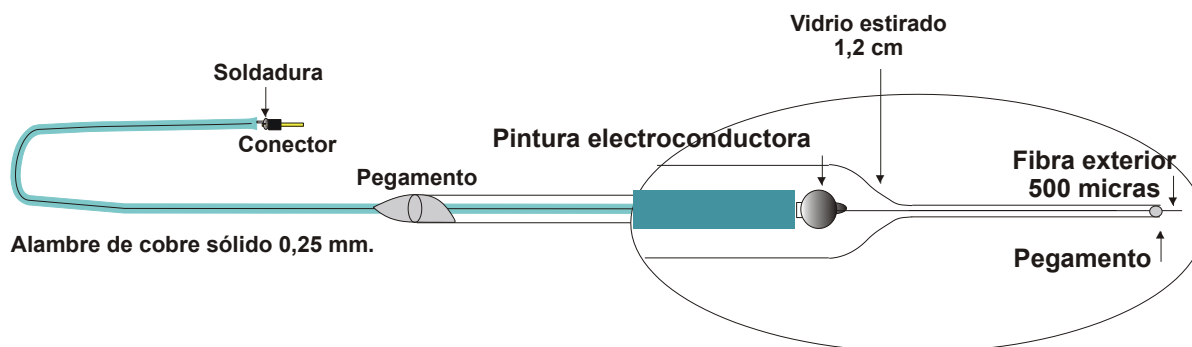


Figura 6. Electrodo de trabajo

El extremo distal del cable de cobre, se suelda a un conector que nos permitirá acoplarlo al sistema potencioestático.

1. Funda de vidrio estirado de borosilicato

Capilares de borosilicato (Clark Electromedical Instruments. Whitchurch on Thames. Reading UK: Ref.IB100-6) de 1,00 / 0,58 mm d.e./d.i. el cual es estirado en un Estirador de Pipetas Kopf modelo 750 (Davies Kopf Instruments Tijunga, California, USA). El extremo estirado es recortado en el extremo distal para permitir el paso de la fibra de carbono.

Tras introducir la fibra de grafito unida al conductor eléctrico y dejar sobresalir una longitud de fibra superior a 500 μm , se obstruye con pegamento rápido Araldit (Ciba-Geigy, Suiza) para evitar el paso de líquidos al interior del electrodo. Posteriormente se recorta la fibra bajo microscopio, lo más exactamente posible para dar la longitud de trabajo de 500 μm .

La parte anterior del capilar también es obstruida con pegamento para evitar que entre líquido a la pipeta estirada y altere la funcionalidad del microsensar.

2. Superficie químicamente activa

El electrodo de trabajo consiste por tanto, en una fibra de grafito pirolítico altamente ordenado con diámetros entre 12 μm (Union Carbide) y 30 μm (World Precision) de diámetro y 500 μm de longitud,. La estructura de la fibra de grafito está organizada en una red cristalina hexagonal compacta con pocos defectos estructurales que lo asemejan al cristal perfecto de grafito, lo que le confiere unas cualidades eléctricas y mecánicas muy apropiadas para nuestros objetivos. La fibra es cubierta por electro-

deposición, utilizando voltamperometría pulsada diferencial (DPV), con una película polimérica de tetraquis (3-methoxy-4-hidroxifenil) porfirina (TMHPPNi) que contiene níquel como núcleo metálico (Interchim, Montluçon, Francia) y posteriormente se someten a baños de inmersión en una solución de Nafion[®] (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EE.UU.).

Los objetivos de estos tratamientos son respectivamente, hacer selectiva la fibra de carbono al NO a potenciales de trabajo bajos y excluir la interferencia de aniones tales como nitritos, obteniendo así un electrodo que puede detectar los niveles de NO en el rango nanomolar [Malinski et al., 1996; Méndez et al. 1997].

Previamente a la electrodeposición se limpia la punta del electrodo con SO₄H₂ concentrado con introducciones instantáneas y alternativas entre SO₄H₂ y H₂O destilada. El efecto final se observa porque el vidrio se pone blanco, efectuado 3 pases. Posteriormente es secado durante media hora en estufa a 60° C.

La Cobertura de Porfirina Níquel se realiza por electrodeposición voltamétrica usando como metodología voltametría pulsada diferencia (DPV) en el polarógrafo Biopulse, (Taccussel-Radiometer. Villeurbanne Francia). En el sistema de electrodos Auxiliar y Referencia se conectan ambos electrodos por un hilo conductor para los tratamientos de electrodeposición.

La Porfirina es previamente desoxigenada burbujando Nitrógeno en un tubo *ependorf* durante 5 minutos para eliminar el O₂ de la solución.

La electrodeposición se realiza con asa de platino conectada al electrodo de referencia y trabajo. Para ello, colocamos una gota de porfirina en el asa conectada al potencióstato de 3 electrodos con el protocolo siguiente:

- Corriente continua fondo de escala: 12,5 nA.
- Tiempo: 95 seg.
- Potencial aplicado: de -240 mV a +1000 mV.
- Potencial de paso: 4 mV / 0,4 seg.

Damos tratamientos hasta que la línea se hace plana, lo que indicará que se ha agotado la capacidad de electrodeposición (figura 7). Posteriormente se seca en estufa durante 30 minutos.

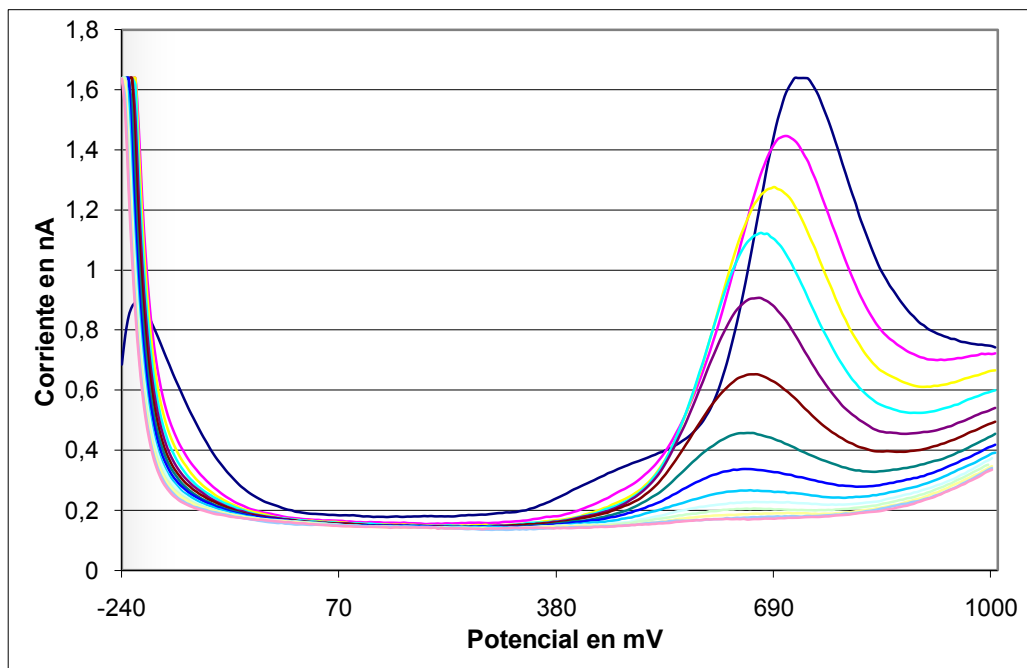


Figura 7. Voltamogramas del recubrimiento del microsensor de trabajo selectivo a NO.

Obsérvese que el registro presenta un pico de oxidación de la porfirina níquel cercano a 700 mV. Este pico se va haciendo plano según se deposita la porfirina níquel, momento en el cual se da por finalizado el recubrimiento por electrodeposición.

En un segundo paso se da una cobertura con Nafion® al 20% en propilenglicol. Para ello lavamos el asa de platino antes de comenzar el tratamiento y colocamos una gota de Nafion® en el asa y aplicamos el siguiente protocolo eléctrico:

- Corriente continua fondo de escala: 12,5 nA
- Potencial aplicado: + 2,8 V

Realizamos 5 tratamientos consistentes en introducir 5 segundos en el Nafion® y sacarlo durante 20 seg, pasados los cuales se repite el proceso. Posteriormente se deja secar a temperatura ambiente durante 10 min.

El microelectrodo o microsensor así modificado queda listo para ser usado *in vitro* o *in vivo*.

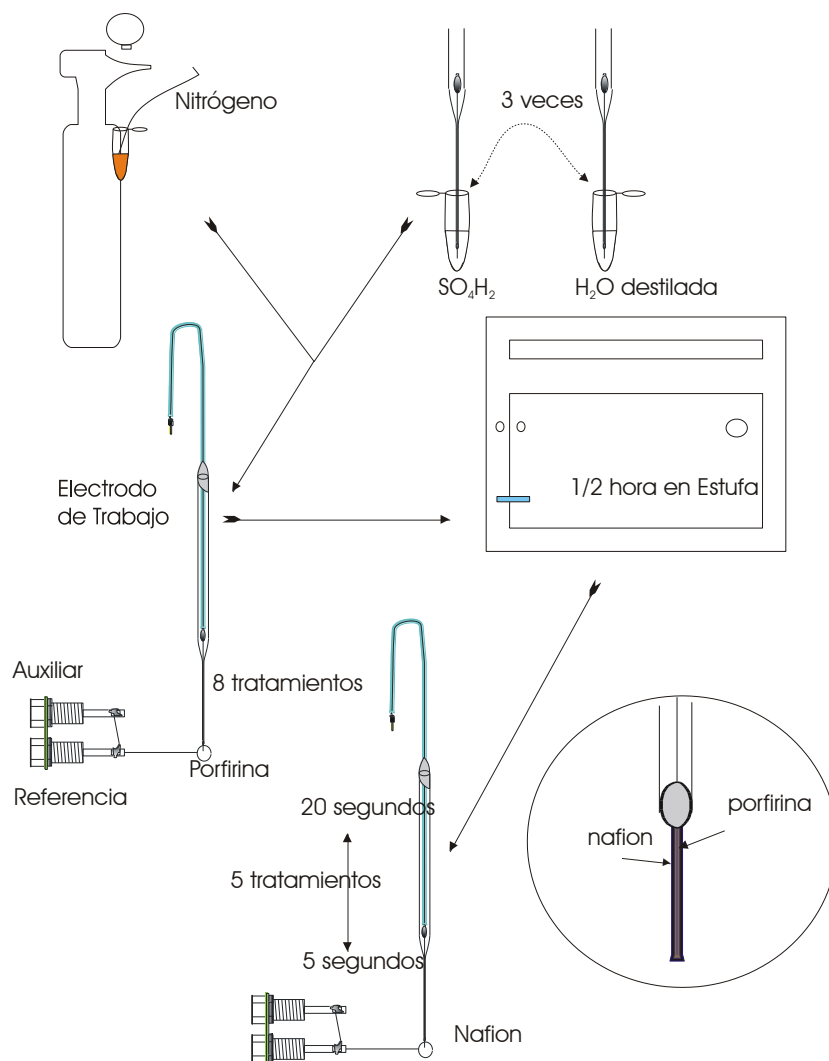


Figura 8. Esquema del procedimiento explicado en el texto y empleado sobre electrodo de trabajo para electrodepositar las coberturas de porfirina Níquel y de Nafion®.

III 1.2 ELECTRODO DE REFERENCIA

Actúa como control potencioestático. Fabricamos un par Ag/AgCl utilizando hilo de plata de 0,2 mm de diámetro cubierto de teflón (Medwire Corp., Mt Vernon, NY), que se despoja de dicha cubierta por ambos extremos. Uno de ellos se suelda a un conector que se unirá al potencioestado, y al otro extremo se le da tratamiento de cloruración en una cubeta con HCl 1N aplicando un potencial de 0,8 V hasta que la superficie adquiere un tono marrón oscuro (AgCl).

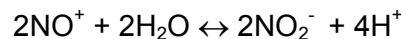
III 1.3 ELECTRODO AUXILIAR

Se compone de un alambre de un material noble que no sufra oxidación, se puede utilizar platino oro o acero inoxidable.

En nuestro caso se ha optado por acero inoxidable de 1 mm de diámetro, soldado por un extremos a un conector que se une al potencióstato.

III 2 CALIBRADORES

Debido a la alta reactividad del NO en presencia de O₂, la inestabilidad del NO en solución acuosa propicia el que se produzca un fenómeno de conversión en NO₂⁻ desde el momento de la disolución:



Esa alta inestabilidad del NO repercute posiblemente en la disparidad de valores de la concentración final para el NO, que en una solución *buffer* acuosa a 22°C oscila como hemos mencionado anteriormente según autores entre 1,5 y 3,0 mM.

Además, la preparación de los calibradores en recipientes abiertos, y sin control de volumen, temperatura y presión, no garantizan la homogeneidad de los distintos lotes de calibradores preparados. Por ello, nos planteamos la preparación de un calibrador en solución altamente desoxigenada y en unas condiciones de presión, volumen y temperatura uniformes y con una metodología reproducible. De esta manera, para minimizar los efectos adversos, hay que definir y controlar previamente el máximo de variables y las condiciones de preparación tales como:

- Frasco contenedor de la solución calibradora.
- Disolvente empleado.
- Temperatura de disolución
- Grado de desoxigenación.
- Tiempo de burbujeo.
- Concentración final de la solución de NO.

Por otra parte, es muy importante acortar el tiempo desde su preparación y su utilización, así como, evitar al máximo la interposición de oxígeno en el momento de realizar las diluciones requeridas.

III 2.1 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR DE NO

En el proceso se requieren tres soluciones:

1. Solución PBS desoxigenada (A)
2. Solución madre de NO en PBS (B)

3. Solución de trabajo de NO (C).

El primer paso consiste en la desoxigenación encaminada a disponer por una parte un tubo (A) con una solución de PBS y por otra parte un tubo (B) vacío y ambos con la mínima cantidad posible de O₂.

Los recipientes (A) y (B) son de vidrio color topacio para minimizar los efectos externos de la luz y el cierre se ha preparado con un tapón de goma libre de látex que permite la penetración de agujas manteniendo la estanqueidad del tapón. El cierre se asegura mediante una tapa de plástico con rosca que deja libre el centro del tapón por donde se podrán realizar las inyecciones para los distintos tratamientos.

Trabajamos a temperatura ambiente del laboratorio que oscila entre 23 y 25 °C

El primer frasco (A) con 6,5 cc de PBS (contenido máximo para minimizar la cámara de aire) se desoxigena con una bomba de vacío para eliminar al máximo el O₂ disuelto en el PBS. Posteriormente se inyecta N₂ durante 5 minutos manteniendo una salida del gas mediante una aguja con lo que se consigue renovar completamente la cámara de aire existente en el recipiente y desplazar el O₂ disuelto. Luego, tras eliminar la aguja que sirve de conducto de salida, se mantiene durante 30 seg la inyección de N₂ a presión, que producirá una atmósfera de N₂ desoxigenada. Estos recipientes con gas NO de alta pureza, sin más tratamiento se reservan para preparar posteriormente tanto la solución madre como la de trabajo.

El tubo (B) vacío, se somete a los mismos pasos de desoxigenación que el tubo (A). Una vez desoxigenado, el tubo se empleará para introducir NO gas en un ambiente desoxigenado. El dispositivo por el cual inyectamos NO, se muestra en el esquema de la figura 9 y consta de una botella de gas NO comprimido que mediante un conducto metálico burbujea primero en un matraz con NaOH 5M, seguido por un segundo matraz con agua destilada para purificar el gas eliminando de esta manera formas nitrogenadas interferentes. El trabajo se realiza bajo campanas de seguridad con extracción de aire. Durante 5 minutos se gasea en el interior del tubo (B) a 0,3 atmósferas de presión controlado por un manorreductor colocado a la salida de la botella de NO. El tubo (B) tiene un conducto de salida del gas mediante una aguja que atraviesa el tapón de goma, con lo que se consigue que el contenido final del recipiente sea prácticamente solo NO. Pasado este tiempo, se elimina la aguja de salida y se continua gaseando NO durante 30" a 0,5 atmósferas para obtener una atmosfera saturada de NO. De esta manera, en estos recipientes tendremos un volumen de NO

conocido en unas condiciones de presión y temperatura establecidas. Estos tubos al igual que los tubos (A) son conservados en nevera (4°C) hasta el momento de uso.

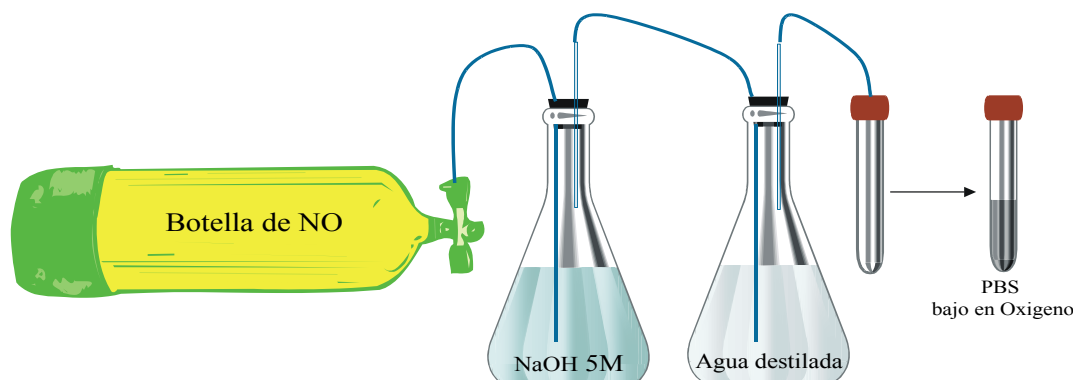


Figura 9. Esquema del dispositivo de fabricación del calibrador de NO. El dispositivo consta de una botella de gas NO comprimido que se burbujea en un primer matraz erlenmeyer con NaOH 5M y un segundo matraz con agua destilada para posteriormente inyectar el NO en los contenedores de vidrio para preparar la solución madre de NO

En el momento de realizar la calibración, se inyectan en el frasco (B) 2cc del frasco (A) con solución PBS. De esta manera obtenemos un recipiente con una solución saturada de NO con una concentración entre 1,8 a 2 mM.

Las soluciones de trabajo (C) se preparan en un tubo eppendorf donde se coloca 1,5 cc del PBS desoxigenado (frasco A) y en el momento del estudio se inyecta con una jeringa Hamilton de alta precisión, un volumen determinado (según la concentración deseada) de la solución madre del frasco (B).

III 3 MÉTODOS DE COMPARACIÓN *IN VITRO*

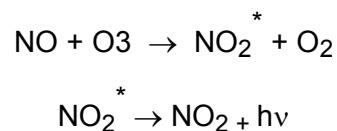
Los métodos indirectos de medida como el método de Griess descrito en 1879 se han utilizado para medir nitritos y nitratos con un límite de detección que se encuentra en un rango micromolar. Por tanto no consideramos útil su utilización como método comparativo ya que: 1) No mide directamente NO, 2) Su límite de detección es superior a las concentraciones esperadas en el SNC de rata y 3) No se puede utilizar en tiempo real.

Hemos preferido recurrir a la reacción de quimioluminiscencia dado que mide exclusivamente NO sin interferencia de NO₂, CO₂, CO, C₂H₄, NH₃, SO₂, H₂O₂.

III 3.1 QUIMIOLUMINISCENCIA: ANALIZADOR PARA NO

De la reacción de NO con O₃ resulta la emisión de luz y está se emite proporcionalmente a la concentración de NO, siendo esta la base para el método de detección de NO más exacto disponible. Esta reacción fue descrita al principio de los años 60s.

El NO reacciona con el ozono produciendo NO₂. Una fracción del NO₂ se forma con electrones en estado excitado, los cuales emiten un fotón al caer al estado fundamental, siendo detectados por un fotomultiplicador.



La cantidad de fotones producidos es directamente proporcional a la cantidad de NO de la muestra. Para detectar el espectro de emisión se utiliza un tubo fotomultiplicador sensible al rojo (barrido de 640-3.000 nm con pico de intensidad a 1.000 nm).

La molécula excitada NO₂^{*} puede tener una amortiguación por interacción con otras moléculas de gas. Sin embargo, esta vía se reduce a presión inferior a 0,3 atmósferas en la cámara de reacción, siendo en este caso particularmente sensible la señal de luminiscencia a la concentración de NO.

En nuestro laboratorio se midió por un analizador de quimioluminiscencia (Modelo 2108; Dasibi Environmental Corp., Glendale, CA). El equipo tiene un límite mínimo detectable de 2 ppm, precisión de ± 1%, linealidad de ± 1%, rango estándar de 0-500 ppm, y fue calibrado antes y de forma recurrente durante cada estudio con un cilindro de gas comercial que contiene una concentración conocida de NO en N₂ (50 a 100 ppm con menos de 1ppm de NO₂). Para ello, el flujo de NO se ajustó para mantener las concentraciones de NO que mide entre 5 y 15 ppm.

En este sistema se ha colocado un dispositivo que permite inyectar muestras líquidas y mediante un flujo continuo de nitrógeno, el NO gas es arrastrado hasta el equipo de quimioluminiscencia donde reacciona con el ozono.

El registro y análisis de las muestras se realizó con el programa PowerChom® de Powerlab System ® (ADI Instruments Inc, Colorado Springs, CO 80906, USA).

En nuestro laboratorio se determinó para nuestros electrodos y nuestro calibrador una relación correspondencia de 1 nA = 0,850 nM de NO [Escrig et al.,1999; González-Mora et al., 2002].

El sistema adaptado se representa en el siguiente esquema de la figura 10:

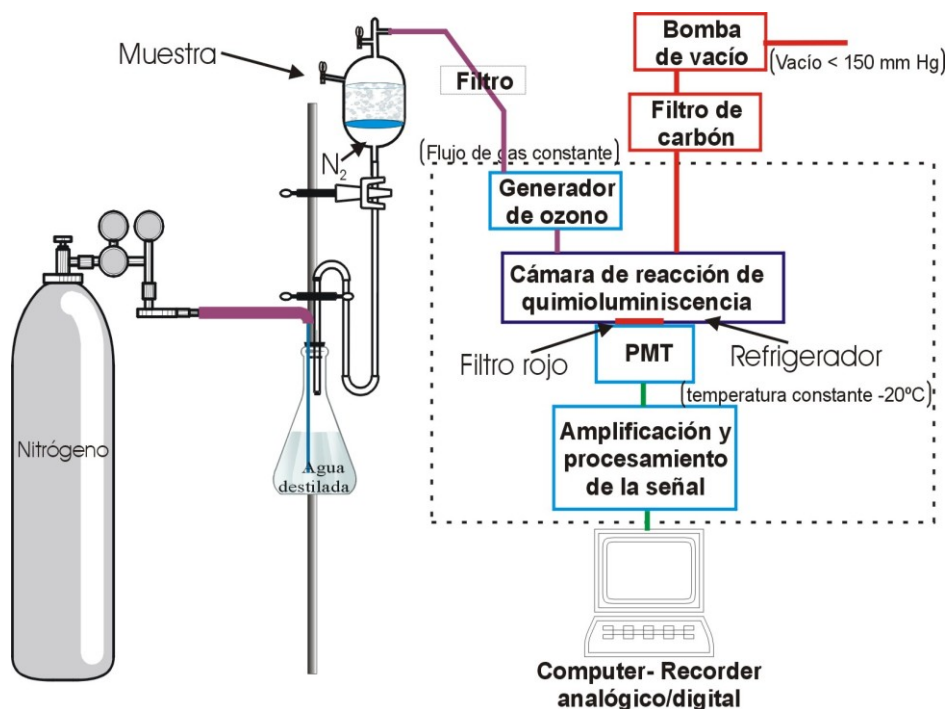


Figura 10. Esquema del sistema de detección de NO por quimioluminiscencia

III 4 PRODUCTOS Y SOLUCIONES DE TRABAJO UTILIZADOS

III 4.1 SOLUCIONES GENERALES

1.- Tampón fosfato PBS.- Preparada con los siguientes productos:

NaCl	0,8 gramos
KCl	0,2 gramos
KH ₂ PO ₄	0,2 gramos
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	1,4 gramos

Se diluye en agua doble destilada y el pH final se ajusta a 7,4 con adiciones de ClH o NaOH 1 N, según el pH inicial.

2.- Suero fisiológico estéril comercial de Braun Medical S.A.

3.- Solución madre de nitrito sódico 1 M de la que se harán soluciones de trabajo

III 4.2 FÁRMACOS

Los resultados analíticos se han de validar *in vivo* e *in vitro* para confirmar tanto la correcta cuantificación como los mecanismos implicados en la formación de NO. La herramienta de trabajo utilizada son los estudios farmacológicos en los distintos pasos expuestos en el esquema de formación de óxido nítrico.

III 4.2.1 PRECURSORES

L-arginina (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 174,2. Dosis: 3-20-100-500 nmoles.

III 4.2.2 DONANTES DE NO

5-nitroprusiato (5NP) (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 261,9. Dosis: 10 nmoles.

S-nitrosos-N-acetilpenicilamina (SNAP) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 220,2. Dosis: 2,5 nmoles

III 4.2.3 INTERACCIÓN CON OTROS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES

Serotoninérgico: Serotonina (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 212,7. Dosis: 20 nmoles

Glutamatérgico: Glutámico (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 147,1. Dosis: 5-10-20-100 nmoles.

NMDA (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 147,13. Dosis: 5-10-50 nmoles.

Dopaminérgico: Anfetamina (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), PM 135,2. Dosis: 5-10-20 nmoles.

III 4.2.4 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Como ya hemos descrito más arriba, la síntesis de óxido nítrico está regulada por tres isoformas de sintasa. Queremos ver el efecto de la inhibición de cada una de ellas en el SNC y la posible contribución de cada una a la concentración fisiológica de NO en el espacio intersticial.

III 4.2.4.1 INESPECÍFICOS

N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 248,28. Dosis: 100-200 nmoles

N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 269,7. Dosis: 20-100-200 nmoles

III 4.2.4.2 ESPECÍFICOS

III 4.2.4.2.1 SOBRE INOS

N⁶-(1-iminoetil)-L-lisina (L-NIL) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 223,7. Dosis: 10-20 nmoles

III 4.2.4.2.2 SOBRE NNOS

7-nitoindazole (7- NI) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 163,1. Dosis: 2,5 nmoles

(7-NINA), (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 185,12. Dosis: 10-20 nmoles.

III 4.2.4.2.3. SOBRE ENOS

N⁵-(1-iminoetil)-L-ornitina. (L-NIO) (Tocris Bioscience, Bristol UK), PM 173,2. Dosis: 10-40-100 nmoles.

III 5 MOLÉCULAS QUE PUEDEN INTERFERIR CON NO EN LA VOLTAMETRÍA

En orden a detectar posibles compuestos interferentes ensayaremos, además, algunos productos que pueden impedir la correcta tipificación del pico de NO. Los compuestos ensayados serán los siguientes aminoácidos:

DL-Alanina	DL-DOPA	DL-Leucina	DL-Prolina
DL-Arginina	DL-Etionina	DL-Lisina	DL-Serina
DL-Asparragina	DL-Glicina	DL-Metionina	DL-Tirosina
DL-Aspártico	DL-Glutámico	DL-Norleucina	DL-Treonina
DL-Cistina	DL-Histidina	DL-Norvalina	DL-Triptófano
DL-Citrulina	L- Isoleucina	DL-Phenilalanina	DL-Valina

Tabla 3. Aminoácidos medidos por voltametría

III 6 TINCIÓN HISTOLÓGICA DE LA ENZIMA NADPH-DIAFORASA

Como ya hemos adelantado, para tratar de explicar los hallazgos de las concentraciones de NO, y relacionarlos con su metabolismo y su fisiopatología, queremos confrontar las variaciones histológicas de NO en el espacio intersticial con respecto a las áreas ricas en NOS medido con los niveles de NADPH-diaforasa, así como correlacionar estos hallazgos con su significación funcional.

En 1991 Hope y colaboradores, encontraron que la actividad de la óxido nítrico sintasa es NADPH diaforasa y por tanto esta técnica simple y robusta se ha utilizado en un gran número de estudios de experimentación.

La isoforma nNOS fue en un principio localizada inmunocitoquímicamente en diversas poblaciones neuronales del SNC de rata y en neuronas distribuidas en diversos órganos de la rata, mono y humano [Bredt et al., 1990; Bredt et al., 1991a; Springall et al., 1992], conociéndose hoy en el cerebro de rata su amplia distribución [Rodrigo et al., 1994], así como su correlación con aquellas estructuras celulares que contienen cGMP, que actúa como sustancia receptora del NO [De Vente et al., 1998]. Del mismo modo, hoy se tiene una clara información sobre la existencia de estos grupos neuronales nitrérgicos mediante el uso de la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa realizada en diversas especies [Bruning, 1993; Dawson et al., 1991; Hope et al., 1989; Hope et al., 1991; Vincent et al., 1992]. Sobre la co-localización de la nNOS inmunorreactiva y la NADPH-diaforasa ha existido y existirá cierta controversia, porque en algunos casos ésta no se da completamente, atribuyéndose esta falta de coincidencia a los efectos que sobre la actividad NADPH-diaforasa puede ejercer la fijación con paraformaldehído [Buwalda et al., 1995; Matsumoto et al., 1993]. Sin embargo, Terenghi [Terenghi et al, 1993] demostró una buena correlación entre la actividad NADPH-diaforasa y la inmunorreactividad para la isoenzima nNOS en secciones de médula espinal fijadas con 1% de paraformaldehído.

La NADPH-diaforasa purificada aparece como una proteína simple de 150 kDa similar a la nNOS, habiendo sido esta isoforma inmunoprecipitada por un anticuerpo que reconoce a la NADPH-diaforasa [Hope et al., 1991]. Por otra parte, la transfección de células de riñón humano con el cDNA de la isoforma nNOS permitió la detección de la actividad tanto para la NADPH-diaforasa como para la isoforma nNOS, y además se puso en evidencia el hecho de que ambas actividades residían en la misma proteína [Dawson et al, 1991]. Basados en estas aportaciones se ha considerado, en estudios llevados a cabo en cerebros de primates y de rata, que la NADPH diaforasa y la nNOS son coincidentes [Bredt et al., 1991a; Dawson et al., 1991; Sobreviela et al., 1995; Vincent et al., 1992; Yan et al., 1997]. De esta manera, las células NADP-diaforasa positivas son productoras de óxido nítrico y por tanto su localización histológica nos dará una visión sobre uno de los pasos de los mecanismos reguladores de la formación de NO y de esta manera, nos permitirá comparar la localización histológica de la enzima con la representación de los niveles de NO medidos por voltametría.

El método de tinción histoquímica utilizado es el descrito por Wolf, Henschke y Würdig [Wolf et al.,1993], que garantiza una óptima reacción histoquímica y permite una adecuada preservación de la estructura tisular.

Técnica

Los animales son anestesiados profundamente con tiopental sódico (Pentothal Sódico, Abbott 200 mg/Kg) y perfundidos por vía intracardiaca mediante una bomba peristáltica con 50 ml de PBS heparinizado, seguido por una solución fijadora constituida por 400 ml de paraformaldehido al 4% a los cuales se les había añadido un 2% de sacarosa y un 4% de una solución de glutaraldehido al 25%. La función de la sacarosa es la de proteger el tejido de los potenciales daños que provoca la congelación de las muestra en el posterior tratamiento.

Después de la extracción del cerebro, estos se sumergen durante 60 minutos en la misma solución fijadora y luego en PBS con sacarosa al 15% durante 24 horas a 4° C.

Posteriormente se congelan los cerebros entre -16°C y -23°C y se cortan en criostato para obtener cortes coronales seriados de 40 µm de grosor. Los cortes se recogen con PBS y se ponen a incubar en un medio que contiene solución salina 0,1 M en tampón fosfato (pH=8,0), 0,8 % de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich® St.Louis USA), 1,2 mM de NADPH-d (Sigma-Aldrich® St.Louis USA) y 0,8 mM de Sal Nitro Azul de Tetrazolio (Sigma-Aldrich® St.Louis USA). Los cortes permanecerán 90 minutos en estufa a 37 °C.

Transcurrido ese tiempo, se lavan los cortes dos veces con una solución salina tamponada, se montan sobre portaobjetos y se dejan secar a temperatura ambiente.

Las preparaciones se deshidratan pasándolos por las siguientes soluciones alcohólicas:

Solución	Tiempo
Etanol de 70 °C	30 segundos
Etanol de 80 °C	30 segundos
Etanol de 90 °C	30 segundos
Etanol de 90 °C	30 segundos
Etanol de 70 °C	30 segundos
Etanol de 100 °C	30 segundos
Etanol de 100 °C	30 segundos
Xilol	2 minutos

Tabla 4. Soluciones alcohólicas y tiempo de aplicación

Finalmente, se cubren los cortes con cubreobjetos utilizando Entellan® (Merck) como medio de inclusión.

III 7 TOMA DE DATOS DE CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) DE RATA

Como hemos dicho anteriormente, el objetivo principal es desarrollar un mapa tridimensional de las concentraciones de NO libre en el espacio intersticial del SNC de rata anestesiada.

El cerebro de rata está muy investigado desde el punto de vista anatómico [Paxinos G. et al., 1982; Toga et al., 1995; Zilles K., 1985] y desde el punto de vista de la distribución de NOS [Cork et al., 1998; Rodrigo et al., 1994; Vincent, 1992]. Sin embargo, no existe un mapa de distribución de las concentraciones del propio NO libre en amplias áreas cerebrales.

La creación de una estructura tridimensional de una imagen supone, en primer lugar disponer de datos en los tres ejes cartesianos (x,y,z) y en segundo lugar localizar estos datos sobre las posiciones que deseamos.

Tratándose del cerebro de rata, parece evidente que un modelo adecuado donde acoplar estos datos sería un mapa estereotáxico. Por ello, partimos de los cortes coronales proporcionados por las láminas estereotáficas de los Atlas Karl Zilles y el de Paxino y Watson que contienen diferentes capas de información como son: cuadrícula estereotáfica de coordenadas, los nombres de las estructuras y las líneas de contorno. Todos los esquemas se organizan en capas separadas y alineadas con el mapa estereotáxico.

Hemos elegido 9 cortes coronales en sentido antero-posterior. El punto de referencia cero será siempre el bregma que se considera una localización estereotáfica precisa siempre que el ángulo del cráneo se mantenga constante [Whishaw et al., 1977; Paxinos et al., 1982].

A partir del Bregma, designamos las láminas o rodajas según las distancias en mm siguientes:

AP: + 3,20; + 1,0; - 1,3; -3,14; -5,3; -6,8; -8,8; -11,00; -12,30

La amplitud del intervalo la justificamos en razón de la eficiencia de la variación de la señal en una valoración piloto en la superficie del cerebro.

En cada lámina se ha procurado hacer tomas de muestras cada 500 μm . en vertical (coordinada y) y repetir el muestreo cambiando 500 μm en lateral desde la posición de inicio (coordinada x). La dificultad está fundamentalmente en la presencia de obstáculos ocasionados por vasos sanguíneos o la propia estructura del cráneo que nos obligará en ocasiones a cambiar ligeramente estas coordenadas.

La recogida de datos se registrará durante el descenso del electrodo desde áreas dorsales a ventrales.

Se harán dos protocolos de toma de datos:

a) Área de confianza de la señal: Se trata de establecer que los datos obtenidos en cada descenso son estables para un determinado entorno. Se practicarán penetraciones con intervalos de 500 μm tanto AP como Lateral en dos áreas contralaterales.

b) Toma de datos sistemáticos: Para establecer el mapa primeramente bidimensional se harán las oportunas medidas de NO guiadas por las láminas seleccionadas de los atlas estereotáxicos.

El protocolo será el siguiente:

- Tiempo inicial de estabilización de la señal: 5 minutos.
- Intervalo de recogida de datos: cada 500 μm .
- Tiempo de muestreo: 120 seg.
- Intervalo de muestreo Lateral: Cada 0,5 mm.
- Intervalo de muestreo Antero-posterior: Según laminas del estereotáxico.
- Seguridad al fondo cerebro: 250 μm .

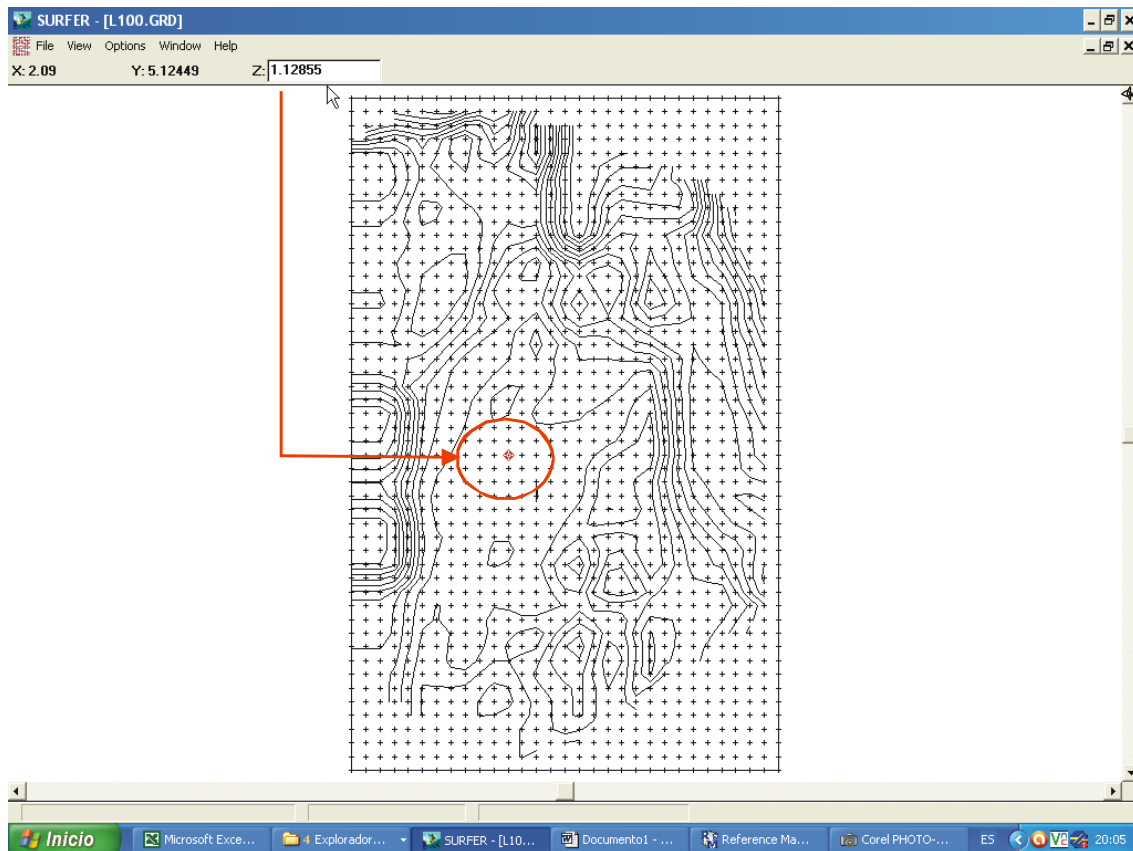
III 8 TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LOS DATOS DE CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO

Los datos de las concentraciones de NO para cada lámina, serán posteriormente tratados en el programa SURFER® 5.00 (*Surface Mapping System, Golden Software Inc., Golden, Colorado, USA*).

Cada lámina proporcionará una matriz de datos definidas por la posición lateral (x), la posición vertical (y) y los valores de NO que para cada par de coordenadas hemos obtenido.

SURFER® es un programa de generación de mapas gráfico desde una matriz de datos en tres coordenadas (x, y, z), convirtiendo esta matriz de datos en una imagen

bidimensional. Desde los datos originales, SURFER® genera una malla regular de datos interpolados que delimitaran áreas enmarcadas en curvas de nivel en función de los valores de cada posición.



El tratamiento que hemos elegido para generar la malla de datos interpolada es “*triangulación con interpolación lineal*”, que utiliza los algoritmos de la triangulación de Delaunay, los cuales permiten la construcción de una triangulación óptima para la representación de la imagen bidimensional. Esta malla de datos proporciona la posibilidad de tabular para cada par de coordenadas x,y un valor de NO (z). Dichas tablas se exponen en los anexos finales.

Las áreas enmarcadas en curvas de nivel, podemos diferenciarlas por intensidades de color (seleccionable), que de esta manera nos proporcionarán una descripción de las diferentes concentraciones de NO distribidas por toda la superficie de la lámina investigada.

Para comparar mejor posteriormente estos cortes con la tinción histoquímica de NADPH-diaforasa elegiremos el tono de color más cercano posible de la paleta cromática al de la tinción histoquímica.

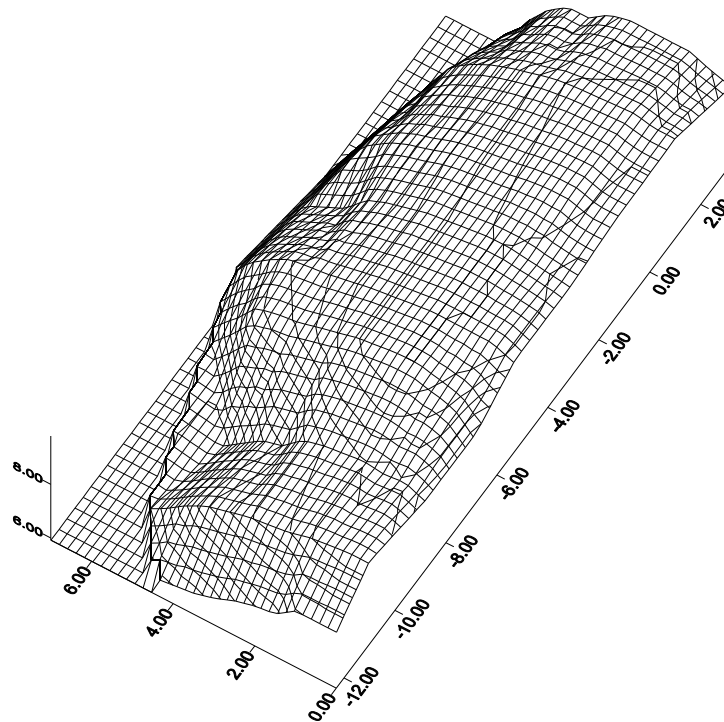


Figura 11. Estructura 3D, que perfila el contorno del cerebro obtenida con SURFER®

Para crear la estructura tridimensional del cerebro, se combinaron estas imágenes 2D de las 9 láminas coronales con su localización según la referencia bregma. De esta manera, proporcionará una red de datos donde la interpolación entre láminas generará una imagen continua en una la estructura 3D

III 9 SISTEMA DE INYECCIÓN LOCAL *IN VIVO*: CÁNULA DE MICROINYECCIÓN.

Los estudios farmacológicos se han diseñado en base a estudiar los diversos efectos con las drogas seleccionadas y descritas en los objetivos. Para poder aplicar estos productos en la zona de trabajo deseada, hemos diseñado un sistema de inyección que proporciona un volumen controlado en el entorno de acción de la fibra de carbón y que se muestra en el esquema siguiente.

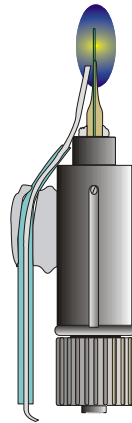


Figura 12. Sistema desarrollado para inyección local de fármacos en el área próxima al microelectrodo selectivo a NO.

El electrodo de trabajo se introduce en un soporte de aluminio, diseñado para este fin, que actúa como cánula guía. Por el lateral de dicha cánula se coloca una aguja de acero sellada al exterior del soporte y por cuyo interior se hace pasar un tubo de polimicro de 76 μm de diámetro interno que termina en el entorno de la punta exterior del electrodo.

El volumen administrado está supeditado por la integridad del tejido cerebral ante la irrupción del bolo de líquido. En este sentido hemos decidido un volumen de 0,2 a 0,5 μl .

Los efectos serán siempre comparados con los producidos por la inyección del mismo volumen de PBS o líquido cefalorraquídeo artificial.

III 10 SISTEMA MECÁNICO ESTEREOTÁXICO CON MOVIMIENTO EN TRES EJES.

Para localizar de manera precisa cualquier estructura o núcleo del SNC se requiere un aparato que, manteniendo fija la cabeza del sujeto (bajo anestesia profunda), permite situar un punto particular en el espacio a partir de tres ejes. Cuando se trata del SNC, cada eje se corresponde con una dimensión: medial-lateral (X), ventral-dorsal (Y) y anterior-posterior (Z).

Este instrumento estereotáxico está diseñado para adaptarse al animal de experimentación seleccionado y todas las escalas están orientadas para poder ser leídas por el investigador desde el frontal del instrumento. Las líneas de las escalas están grabadas con láser en intervalos de 0,1 mm y se mueve mediante un nonio con

precisión de 100 micras, que permite acceder fácilmente a cualquier punto del SNC del animal en los tres ejes de coordenadas.



Figura 13. Instrumento estereotáxico

El dispositivo incluye:

- Base
- Armazón compuesto de:
 - Soporte para la cabeza, que mantiene el cráneo del animal en la orientación adecuada mediante las Barras para los oídos.
 - Adaptador para colocar la mordida de la rata
- Brazo Manipulador, que es un mecanismo calibrado que permite desplazar este soporte porta electrodos en los tres ejes espaciales a lo largo de las distancias previamente calculadas: anterior-posterior, dorsal-ventral y lateral-medial
- Porta electrodos

Para la localización exacta de los puntos del SNC a estudiar se usa un atlas estereotáxico, el cual es un conjunto de mapas cerebrales de la rata de una cepa o raza concreta y con un peso definido dentro de un margen de tolerancia. Estos mapas tienen coordenadas que permiten llegar a una determinada región del SNC de la rata con el aparato estereotáxico.

En nuestro trabajo hemos empleado los Atlas Estereotáxicos de Zilles y los de Paxino y Watson Aunque las coordenadas de estos atlas se han desarrollado a partir del estudio de ratas Wistar macho adultas con pesos que van 270 a 310 g, el atlas puede ser

utilizado con éxito en ratas machos o hembras con pesos de 250 a 350 g [Paxinos et al., 1982].

El atlas presenta diagramas de las secciones coronales del cerebro, a intervalos con un promedio de 0,25 mm. Las secciones fueron cortadas de cerebros congelados no fijados.

La coordenada de referencia se establece con el punto bregma que han definido los autores como *“el punto de intersección de la sutura sagital con la curva de mejor ajuste a lo largo de la sutura coronal”*. En la mayoría de los casos, la posición de una estructura se representa con una precisión inferior a 0,2 mm.

III 11 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas machos del tipo Sprague-Dawley nacidas y estabuladas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna, que en el momento de la cirugía tuvieran un peso aproximado de 300 - 320 gramos. La imposibilidad de determinar en una sola rata todas las áreas establecidas para obtener datos del cerebro obliga a una perfecta estandarización de los animales elegidos con el propósito de evitar una gran variabilidad en el tamaño del animal y por consiguiente de su cerebro.

III 11.1 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.

Los animales son anestesiados por inyección intraperitoneal de Uretano en dosis de 1,25 g/kg de peso de rata. La elección del anestésico se basa en el estudio de nuestro grupo de trabajo comparando los efectos de la actividad dopaminérgica en estriado evaluado con voltametría (DNPV), de cuatro fármacos habituales (hidrato de cloral, uretano, pentobarbital y ketamina-xylazina) en los experimentos con ratas anestesiadas. Los resultados muestran un menor efecto del uretano sobre el estrés post inyección intraperitoneal en los niveles de DA y ácido ascórbico, así como una más rápida recuperación de la señal [Petrinec et al., 1993]. Similares resultados obtienen Sabeti y colaboradores [Sabeti et al., 2003]. Otros resultados publicados con medición del flujo sanguíneo cerebral o la glucosa extracelular [Lowry et al., 2001] refuerzan nuestra elección.

La sedación se controla por el reflejo palpebral. La rata así anestesiada, se coloca sobre una almohadilla térmica que está controlada electrónicamente mediante un sistema PID (controlado proporcional integral derivativo) y que controla la temperatura corporal mediante un termómetro rectal para estabilizarla entre 36,5 a 37 °C.

Se afeita la cabeza del animal procurando que la zona sea suficientemente amplia y se limpia con solución yodurada.

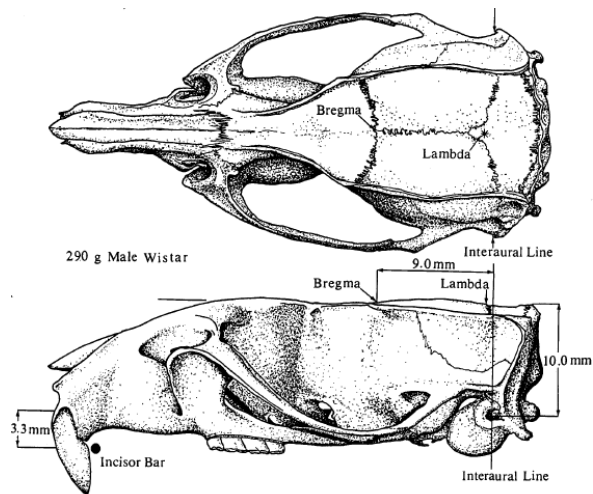


Figura 14. Medidas del cráneo de la rata tomadas del Atlas de Paxino y Watson

El animal se fija en el aparato de estereotaxia mediante la colocación de las barras laterales en el canal auditivo. Sabemos que está correctamente cuando la cabeza ya no se puede mover lateralmente. Se acoplan los incisivos en el orificio dispuesto frente a la cabeza y se ajusta para fijar completamente a la rata siguiendo la orientación marcada en el Atlas Estereotáxico de Paxino y Watson quedando 3,3 mm por debajo del cero horizontal.

Se hace una incisión cutánea longitudinal en sentido anteroposterior en la línea media de la piel iniciada desde la línea ocular hasta la base posterior del cráneo.

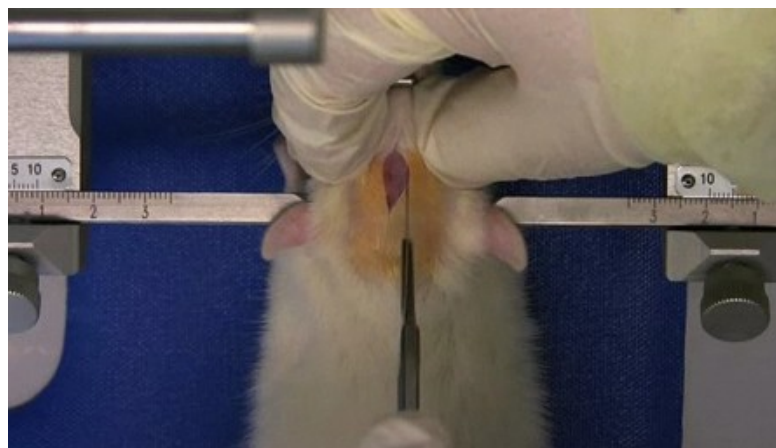


Figura 15. Colocación de la rata en estereotáxico-Incisión de la piel

Se utilizan hisopos de algodón estériles para secar el sangrado y limpiar la herida.

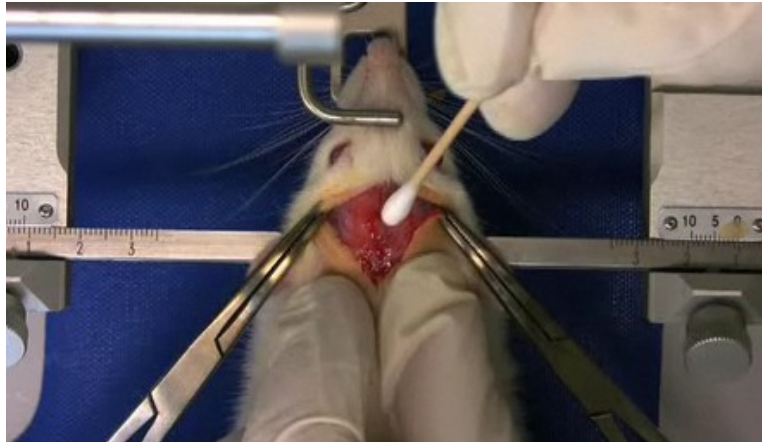


Figura 16. Separación de la piel y limpieza de la herida

Se continúa cortando los tejidos blandos de la superficie del cráneo hasta dejar en este perfectamente visible las suturas craneales y su unión en los puntos Bregma y Lambda (puntos de corte entre suturas craneales). Se seca la superficie expuesta del cráneo.



Figura 17. Cráneo de la rata donde se observan los puntos bregma y lambda

Es muy importante en este momento identificar perfectamente las coordenadas del punto bregma. Para ello se coloca la varilla guía en su montura y se posiciona sobre el bregma, anotando las coordenadas anterior, posterior y lateral. A partir de estas coordenadas podremos encontrar las coordenadas correctas necesarias para la

colocación de la cánula de microinyección o del microsensor para realizar las mediadas seriadas para la determinación de la concentración de NO.

A partir de aquí los procedimientos se diferencian según el estudio a realizar:

1.- Orificio para Implantación de una cánula estática de microinyección para estudios farmacológicos.

2.- Decalotación de un área específica para las penetraciones seriadas del electrodo en diversas zonas del cerebro, partiendo de la pared lateral del cráneo para permitir el máximo abordaje de la superficie del cerebro expuesta y llegando hasta la línea media que une bregma y lambda que será el límite interior de muestreo (fundamentalmente para evitar el seno venoso, por el riesgo que supone su rotura).

Para perforar el cráneo se utiliza un taladro eléctrico que permite realizar un agujero de unos 6 mm de diámetro. Hay que tener mucho cuidado para no dañar las membranas meníngeas ni los vasos sanguíneos. Durante el proceso se emplea como hemostático tópico apósitos de gelatina purificada y esterilizada Espongostán film Byk Leo® impregnadas de solución salina al 0,9% que además humidifica el área quirúrgica.

Por último, se retira convenientemente con una aguja estéril la porción de duramadre del área para facilitar la penetración del electrodo.



Figura 18. Perforación con taladro eléctrico del cráneo de la rata

III 11.2 IMPLANTACIÓN DEL SISTEMA ELECTROQUÍMICO.

Los electrodos de referencia y auxiliar se colocan en la superficie del cráneo y para facilitar la buena conducción eléctrica con el líquido extracelular ambos son envueltos

en una tira de gelatina purificada y esterilizada Espongostán film Byk Leo®, impregnada en suero fisiológico que continuamente es humedecida para mantener la buena conducción.

III 12 MODIFICACIÓN DEL MÉTODO PARA SU APLICACIÓN EN LA MEDICIÓN DE FLUIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS.

Conociendo la importancia fisiológica de la molécula de NO, dentro del capítulo de puesta a punto de la metodología, hemos querido valorar la aplicabilidad metodológica en muestras sanguíneas humanas. Pretendemos de esta manera dos objetivos:

1) Validar el método desde el punto de vista funcional.

2) Obtener los valores de referencia para una población normal adulta, con el propósito de poder interpretar modificaciones en posteriores estudios que se diseñen para valorar las alteraciones en los niveles de NO en diversas patologías.

En el momento actual, prácticamente todos los estudios de medición de niveles de NO en sangre se han realizado por métodos indirectos (Reacción de Griess) que tienen el inconveniente de medir nitritos totales como productos de metabolismo del NO, pero éste es parte de otras vías de aporte tales como la reducción de nitratos por bacterias comensales de la boca y del tracto gastrointestinal o las propias fuentes nutricionales (carne, verduras, agua potable, etc.....) [Bryan, 2006].

Por otra parte, la corta vida media del NO en vivo hace que sea difícil de medir directamente en tejidos. La resonancia paramagnética electrónica (EPR) es un método robusto y específico para el NO, pero tiene varios inconvenientes como los equipos caros y especiales y métodos de preparación y medida complejos. La combinación de microdiálisis y medición de oxihemoglobina es un método menos sofisticado y muy sensible para el NO en medios acuosos [Martin et al.,2007].

La detección electroquímica con diferentes tipos de electrodos sensibles para NO se ha utilizado en mediciones *in vitro* e *in vivo* como ya hemos descrito anteriormente. Sin embargo, los electrodos son difíciles de manejar y muy sensibles a las influencias del medio ambiente y a daños mecánicos.

Diseñamos para ello un sistema de análisis que nos permita medir en cualquier momento y monitorizar *in situ* las variaciones de la concentración de NO evitando las dificultades anteriormente expuestas (figura 19).

Este dispositivo prototipo consta de una jeringa de polipropileno transparente de alta densidad con pistón de elastómero de goma natural libre de látex. La célula

electroquímica se adaptó en el cono de plástico de una aguja (perfectamente ajustable al extremo de la jeringa) donde los electrodos de referencia y auxiliar están permanentemente fijados al igual que un soporte de aluminio que actúa de cánula guía y que permite que el electrodo de trabajo pueda ser removido para cambiarlo. El extremo opuesto al cono de plástico está abierto para la introducción de la muestra de sangre mediante el aspirado con el embolo de la jeringa.

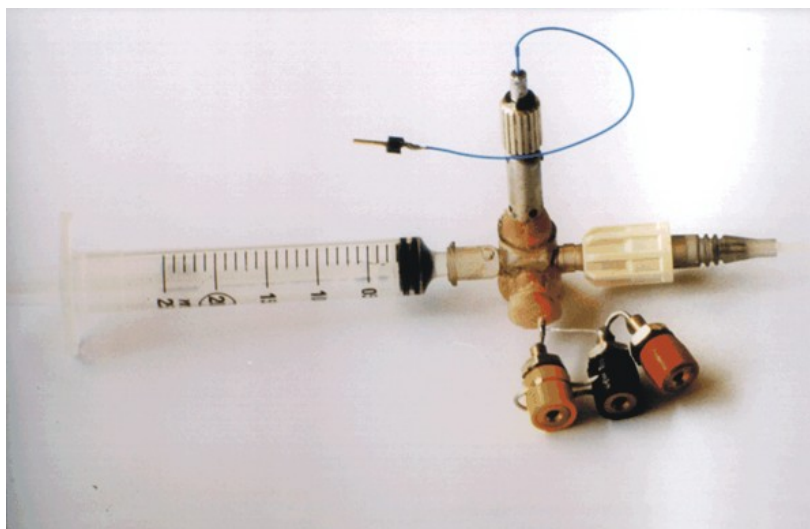


Figura 19. Dispositivo para la medición de NO en muestras sanguíneas

Los resultados en este procedimiento pueden estar afectados por algunos errores que vienen dados por los factores entre el muestreo y análisis voltamétrico. Estas variables pueden ser el retardo de tiempo entre ambos procesos, los cambios de la temperatura de la muestra de sangre durante la determinación de NO o la exposición al oxígeno del aire para el análisis en el vial. Estas irregularidades se pueden minimizar en cierta medida al mantener un procedimiento estricto de la toma de muestras para la determinación voltamétrica de NO y, para ello, se decidió hacer el ensayo directamente en el momento de la extracción obteniendo un espécimen específicamente para el análisis de NO. De esta manera, el tiempo que transcurre desde la extracción y el procedimiento analítico es mínimo, reduciendo las posibilidades de error enumeradas anteriormente.

Entre lecturas, el sensor se limpia y almacena en PBS pH 7,4 en el refrigerador.

III 13 TRATAMIENTO INFORMÁTICO

En el diseño de esta tesis hemos previsto los siguientes tratamientos informáticos:

Adquisición de datos: Tarjeta de adquisición de datos AD-DAD con resolución de 14 bits a una velocidad de adquisición de 40 KHz (Flytech Technology Co Ltd, UK).

Programa de voltametría: Programa Volta® diseñado y escrito en nuestro laboratorio.

Análisis a posteriori de la señal voltamétrica: Programa Picos ®.

Hoja de cálculo: Microsoft ® Excell 2002. Microsoft Corporation, (USA).

Proceso de textos: Microsoft ® Word 2002. Microsoft Corporation, (USA).

Gráficos: CorelDRAW® -Versión 9.0 1999. Corel Corporation Limited. Ottawa (Canadá).

Microsoft ® Excell 2002. Microsoft Corporation, (USA).

Estadísticos: SPSS® Statistics 17.0. IBM Corporation, (USA).

GraphPad Prism® 5. GraphPad Software Inc. La Jolla, CA 92037 (USA).

Cartografía de Superficie 3D: SURFER® 5.00 (Surface Mapping System, Golden Software Inc., Golden, Colorado, (USA).

Bibliografía: Reference Manager® V.10, Thomson Corporation. 3501 Market Street Philadelphia, PA 19104, (USA).

IV RESULTADOS

IV 1 EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE MEDIDA

La experiencia con los sistemas de medida (microelectrodos selectivos a NO) descritos por otros autores nos han demostrado que el proceso de fabricación manual de los electrodos de trabajo genera dispositivos con una gran variabilidad en las características requeridas. Si bien en estudios con mediciones aisladas (clásico experimento farmacológico o comportamental) tienen una importancia relativa, cuando queremos abordar estudios que requieran medidas seriadas y relacionadas tanto en el tiempo como “*inter*” animales de experimentación, necesitamos garantizar la intercomparación de esas medidas, y anular las causas de la variabilidad sistemática para tener así un sistema estable.

Para ello, siguiendo el proceso de fabricación de los electrodos, hemos sometido cada fase a un estudio comparativo con diversos tratamientos con el propósito de seleccionar el microelectrodo más sensible y estable.

Por otra parte, es fundamental la conversión de medidas de voltametría a valores de concentración de NO, lo que nos exige disponer de un calibrador de NO robusto y fiable. El hecho de trabajar con un gas inestable en medio acuoso requiere establecer unas condiciones muy estrictas de producción, conservación y análisis de las soluciones de NO. Pretendemos evaluar los siguientes efectos:

1. Efecto del tratamiento electroquímico previo.
2. Efecto del tratamiento electroquímico para la deposición de porfirina níquel.
3. Efecto de la cobertura de Nafion® e integridad de la misma.
4. Efecto de la temperatura en el secado del Nafion®.
5. Variabilidad de la fibra de carbono (efecto del tamaño, diámetro y características físicas).

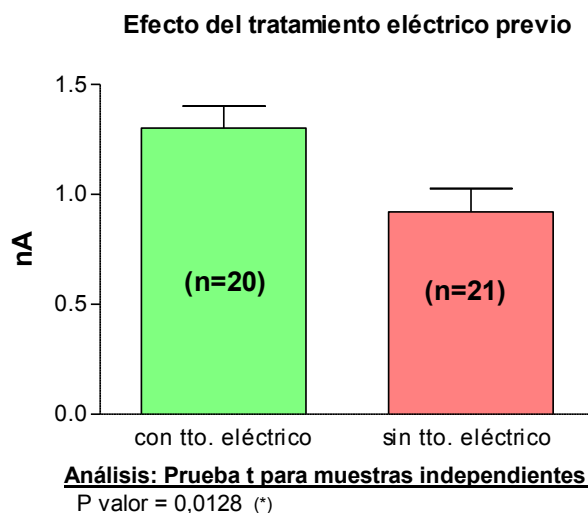
Todas las medidas se realizan en un área de aislamiento electromagnético que actúa como una jaula de Faraday para frecuencias que puedan afectar a las medidas electroquímicas.

IV 1.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO ELÉCTRICO PREVIO AL ESTUDIO

Tras el ensamblaje de todos los componentes del microelectrodo, Gonon [Gonon et al., 1981] propone que las fibras utilizadas sean tratadas electroquímicamente, con lo que se mejoran las propiedades físicas, permitiendo una señal más robusta y la separación de moléculas como el ácido ascórbico de la dopamina. Por este motivo, para

comprobar estos efectos, se decidió realizar un tratamiento eléctrico previo al estudio “*in vivo*” o “*in vitro*”, con el propósito de estabilizar la fibra de carbono y mejorar así sus prestaciones electroquímicas. El tratamiento consistió en aplicar al electrodo sumergido en PBS un potencial triangular de 0 a 2,3 V de 70 Hz durante 20 segundos, seguido de un potencial de corriente continua de -0,8 V durante 5 segundos y finalizar con un potencial de +1,5 V durante 5 segundos.

Para confirmar si era necesario o no, hemos comparado la respuesta en nA de dos series de electrodos (n=20 y n=21) con tratamiento y sin tratamiento electroquímico previo empleando una solución de NO. Los resultados demuestran un aumento estadísticamente significativo de la intensidad de la corriente en los electrodos tratados (P<0,05) (figura 20).



Tratamiento	n	media (nA)	SD (nA)
con tto. eléctrico	20	1,302	0,100
sin tto. eléctrico	21	0,920	0,106

Figura 20. Efecto del tratamiento eléctrico previo sobre la corriente registrada.

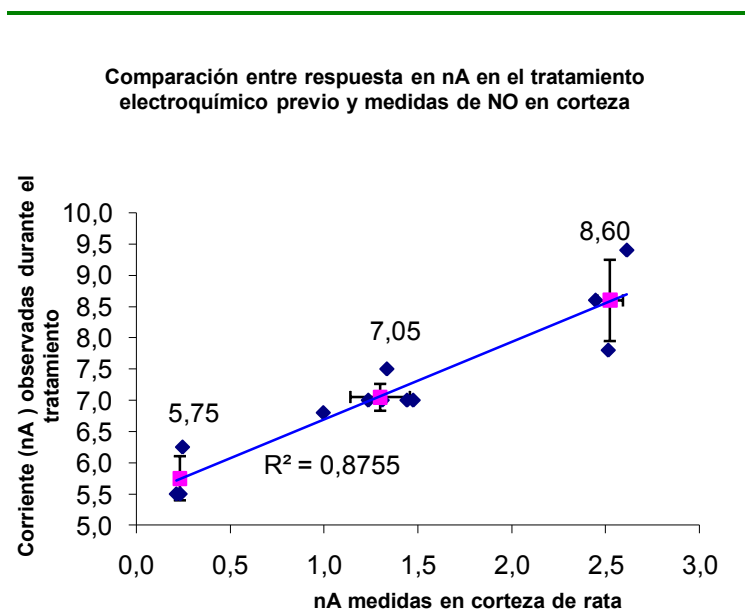
IV 1.2 VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA “IN VIVO” DE LA FIBRA DE CARBONO TRAS EL TRATAMIENTO PREVIO

Durante la aplicación del tratamiento electroquímico previo observamos una gran variabilidad en la respuesta de la señal de corriente y hemos querido valorar la posibilidad de que esta respuesta pudiera darnos información sobre la selección posterior de los electrodos en relación a un comportamiento mejor “*in vivo*”.

Medimos para ello la señal de NO en nA en la corteza del cerebro de ratas. Representando la intensidad de la señal de NO frente a la corriente del tratamiento eléctrico previo, observamos un agrupamiento en tres conglomerados dependientes.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas usando un contraste ANOVA para ambas respuestas, siendo todos los grupos significativamente diferentes entre sí.

Con los datos obtenidos podemos decir que la sensibilidad al NO en el cerebro de rata es mayor en los electrodos que dan una respuesta mayor de corriente durante el tratamiento previo.



Centros de los conglomerados finales

		1	2	3
Tratamiento	μ	5,75	7,05	8,60
	SD	0,354	0,214	0,653
Corteza	μ	0,232	1,299	2,523
	SD	0,014	0,157	0,068

nA en el tratamiento

Análisis: ANOVA de un factor

P valor = 0,0001 (***)

F = 28,52

Prueba de comparación múltiple: Newman-Keuls

P valor

Conglomerado 1 vs Conglomerado 3 > P < 0,001

Conglomerado 1 vs Conglomerado 2 > P < 0,01

Conglomerado 2 vs Conglomerado 3 > P < 0,01

nA en corteza	
Análisis: ANOVA de un factor	
P valor < 0,0001 (***)	
F = 218,1	
Prueba de comparación múltiple:	Newman-Keuls
	<u>P valor</u>
Conglomerado 1 vs Conglomerado 3 >	P < 0,001
Conglomerado 1 vs Conglomerado 2 >	P < 0,001
Conglomerado 2 vs Conglomerado 3 >	P < 0,001

Figura 21. Respuesta en tratamiento previo frente a respuesta en el cerebro de rata

Estos resultados proporcionan dos conclusiones:

- 1.- El tratamiento eléctrico previo mejora la señal obtenida por el microelectrodo selectivo tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”
- 2.- Dependiendo de la corriente registrada durante el tratamiento podemos elegir el tipo de electrodo para cada experimento, lo que proporciona un ahorro de tiempo y seguridad en las medidas realizadas.

IV 1.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO ELÉCTRICO PARA LA PORFIRINA NÍQUEL

Dado que suponemos que el depósito porfirina níquel facilita la detección del NO en la superficie de la fibra de carbono, decidimos abordar un experimento con el objetivo de valorar el comportamiento ante distintas maneras de realizar este depósito. Hemos separado tres grupos de electrodos y le hemos aplicado a cada uno un tratamiento diferente para el depósito de porfirina: A) con barrido de potencial, B) sin tratamiento y C) con potencial constante, y hemos medido su respuesta de NO tras la implantación del electrodo en el cerebro de rata. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con contraste ANOVA, siendo la respuesta en los electrodos con barrido de potencial significativamente superior a los otros dos grupos (figura 22).

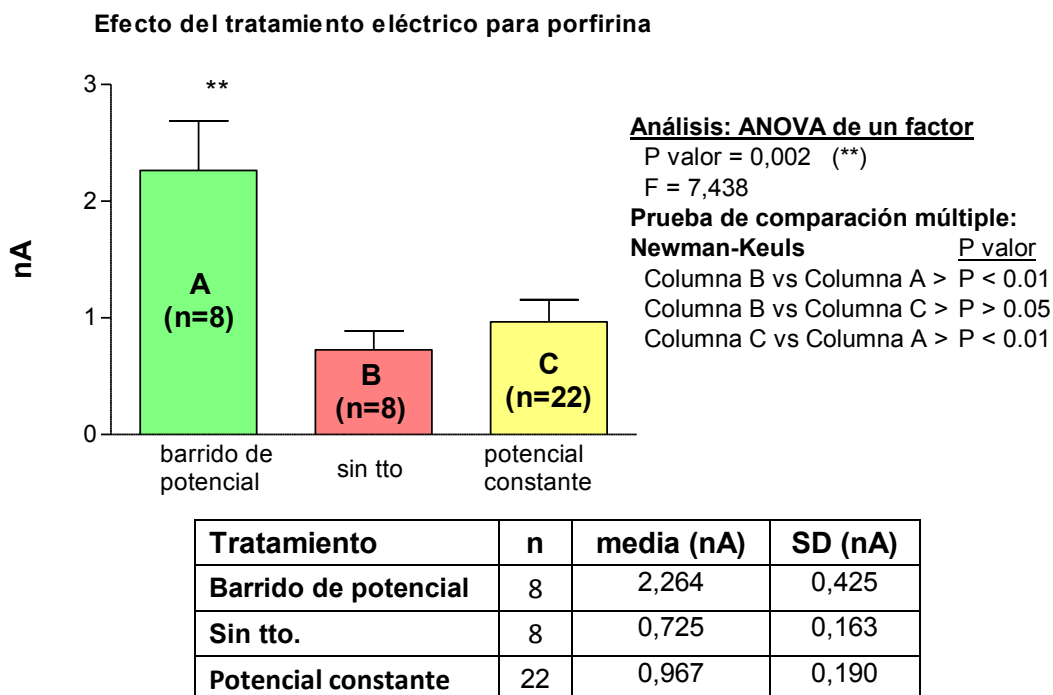


Figura 22. Tratamientos de depósito de porfirina frente a respuesta al NO en cerebro de rata

Por tanto concluimos que el tratamiento de elección debe ser con barrido de potencial frente a los otros tratamientos alternativos.

IV 1.4 EFECTO DE LA COBERTURA DE NAFION®

Como hemos dicho anteriormente, se considera que la cobertura de Nafion® supone un rechazo de las moléculas con carga negativa (fundamentalmente nitritos y nitratos) [Malinski et al. 1992] y queremos evaluar los efectos que tienen sobre la señal de detección de NO tanto por parte de diferentes concentraciones de Nafion® como del posible efecto negativo de dicho tratamiento.

Hemos estudiado el efecto de dos concentraciones diferentes de Nafion® (1 % y 5 %) y un tercer grupo de electrodos que no fueron recubiertos, no encontrando con un análisis estadístico ANOVA diferencias significativas entre los tratamientos y por tanto no debe influir en la fabricación del electrodo. Sin embargo, con la cobertura de Nafion® al 5% la media en la respuesta en nA es algo mayor y mas importante aun, es que la variabilidad entre los diferentes elementos del mismo tratamiento son menores (Desviación Estándar = 0,173 nA).

Si consideramos por tanto, el efecto selectivo sobre partículas cargadas negativamente y que no se detectan efectos negativos frente a los electrodos no cubiertos, hemos decidido la cobertura con Nafion® al 5% como la mejor opción.

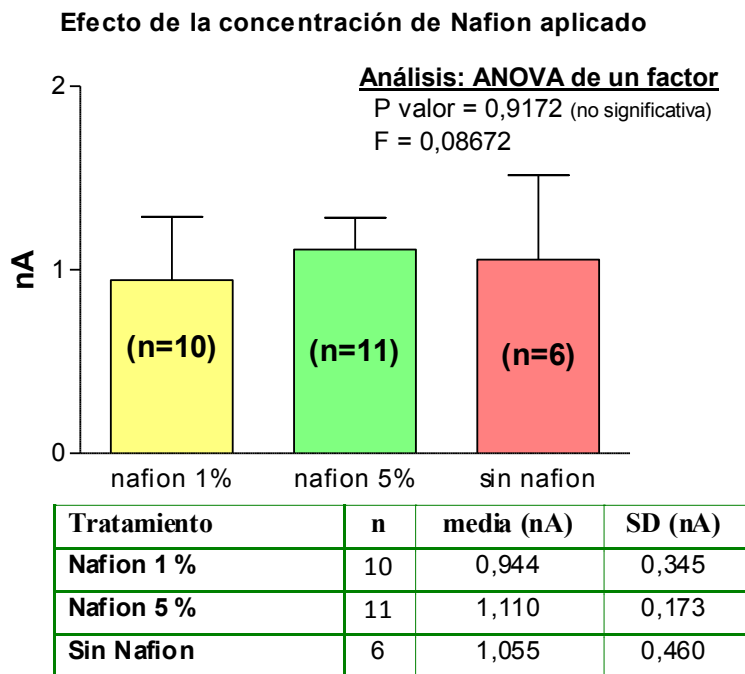
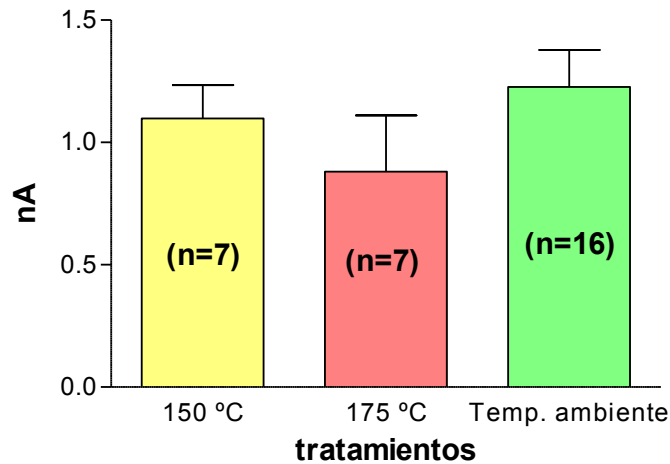


Figura 23. Efecto de la concentración de Nafion® en la respuesta en intensidad de corriente

IV 1.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE SECADO DEL NAFION®

La posibilidad de que al aumentar la temperatura se produjeran transformaciones tanto en la estructura de la fibra de carbono como en los compuestos químicos de su cobertura, como puede ser el Nafion®, aconsejó realizar la medición de la respuesta frente a soluciones de NO de los electrodos que han sido secados a temperatura ambiente o en estufa a 150 °C y 175 °C tras la cobertura con Nafion®. Las diferencias en nA no fueron significativas con un contraste de ANOVA. Sin embargo, observamos que la respuesta media en el secado a 175 °C es inferior, por lo que hemos desestimado este tratamiento en el proceso de fabricación.

Efecto de la temperatura de secado tras la cobertura con nafion



Análisis: ANOVA de un factor

P valor = 0,4047 (no significativa)

F = 0,9356

Tratamiento	n	media (nA)	SD (nA)
150° C	7	1,098	0,136
175 ° C	7	0,880	0,230
Temp-ambiente	16	1,226	0,151

Figura 24. Efecto de la temperatura de secado de la cobertura de Nafion® en la respuesta de NO en cerebro de rata

IV 1.6 EFECTO DEL DIÁMETRO DE LA FIBRA DE CARBONO

Disponemos en nuestro laboratorio de dos tipos de fibras según su diámetro (12 y 30 micras) y decidimos medir la respuesta de electrodos en razón del diámetro de la fibra de carbono.

Medimos cada tipo de electrodo frente a tres concentraciones diferentes de NO en solución de PBS. Analizando los datos con un modelo de regresión lineal hemos encontrado una alta correlación positiva entre la intensidad de la respuesta y la concentración de NO en ambos casos.

La figura 25 describe la recta de regresión entre las soluciones de NO y las respuestas en nA..

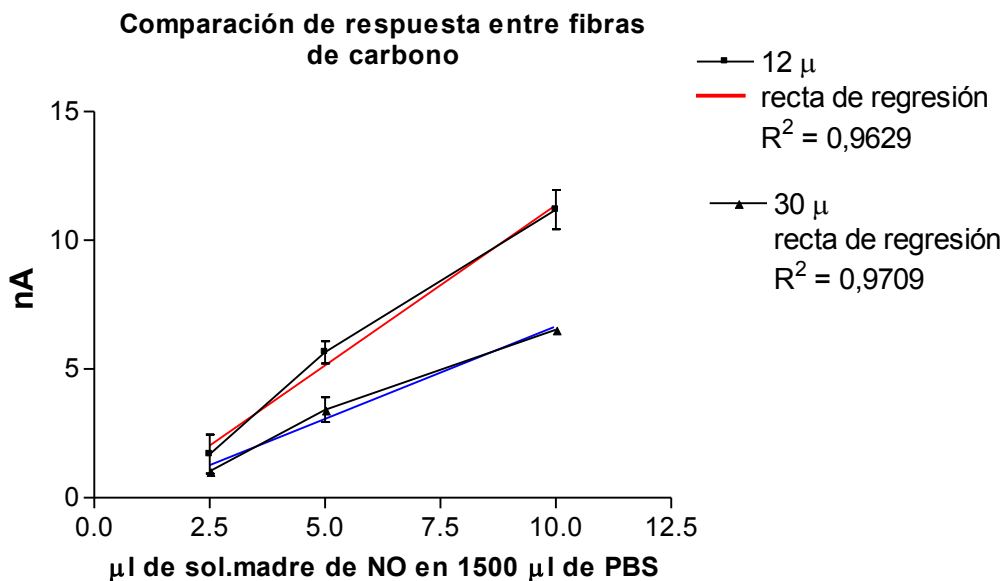
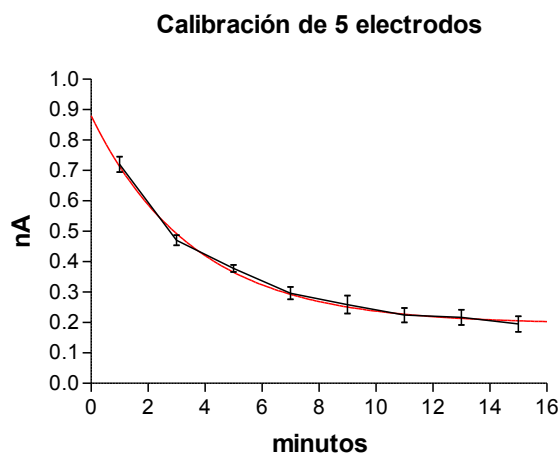


Figura 25. Diferencias en la respuesta según el diámetro de la fibra de carbono. Se valoraron las fibras de 12 y 30 micras ante soluciones crecientes de NO en PBS.

La fibra de 12 micras parece ser más sensible a las variaciones de concentración pero, sin embargo, resulta mucho más frágil tanto en la manipulación durante la fabricación del electrodo, como en los estudios *in vivo*. No obstante, el daño tisular producido por la implantación de fibras de gran diámetro es sustancialmente mayor, lo cual nos impulsa a tomar partido por las de pequeño diámetro.

IV 1.7 VARIABILIDAD INTER-ELECTRODOS

Una vez definido el modelo de fabricación y teniendo en cuenta que debido a todos los pasos de la fabricación se pueden condicionar diferencias entre electrodos, hemos querido valorar la variabilidad entre electrodos fabricados y seleccionados con los criterios de mayor eficiencia anteriormente definimos. Hemos utilizado 5 electrodos con los que medimos la misma dilución de NO en PBS (5 µl de solución madre en 1.500 µl de PBS) durante 8 ciclos de 120 segundos.



Tiempo total hasta 1er. Pico	90 segundos		
Duración total por barrido	120 segundos		
Dilución final de NO	10 ⁻³	(5 µl sol.madre en 1500 µl de PBS)	
Tratamiento estadístico	One phase exponential decay		
Variables		Std. Error	95% Confidence Intervals
SPAN	0.7865	0.04966	0.6858 to 0.8872
K	0.004637	0.0005784	0.003465 to 0.005810
PLATEAU	0.1951	0.01776	0.1591 to 0.2311
HalfLife	149.5		200.1 to 119.3
Goodness of Fit		Data	
Degrees of Freedom		37	Number of X values 8
R ²	0.9259		Number of Y replicates 5
Absolute Sum of Squares	0.08791		Total number of values 40
Sy.x	0.04874		Number of missing values 0

Figura 26. Variabilidad inter-electrodos

Respuesta en nA de 5 electrodos midiendo ante un calibrador de NO en PBS

Hemos detectado que la variabilidad interelectrodos es baja, pero la señal tiene un comportamiento de caída desde el momento inicial hasta que se estabiliza hacia los 10 minutos, lo que nos plantea la necesidad de estabilizar el electrodo al inicio de cada proceso de medida *in vivo*.

IV 2 CALIBRACIÓN DEL NO

IV 2.1 CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE TRABAJO DEL CALIBRADOR SEGÚN LA ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

Un grave problema planteado con la preparación de los calibradores es su estabilidad como ya hemos mencionado anteriormente. Por ello, pretendemos establecer una concentración óptima de trabajo para los calibradores de tal manera que tenga una señal suficientemente alta y medible con una buena relación señal/ruido y que la estabilidad en el tiempo no manifieste cambios muy grandes. Hemos medido tres

concentraciones crecientes con diferentes electrodos y los resultados se exponen en la figura 27.

Las soluciones se prepararon inyectando con una jeringa hamilton de alta precisión los volúmenes de solución madre descritos (2,5 / 5,0 / 10,0 µl) en un tubo eppendorf con 1,5 cc de solución desoxigenada de PBS. El momento de la inyección se realizó 12 segundos de promedio antes del barrido voltamétrico.

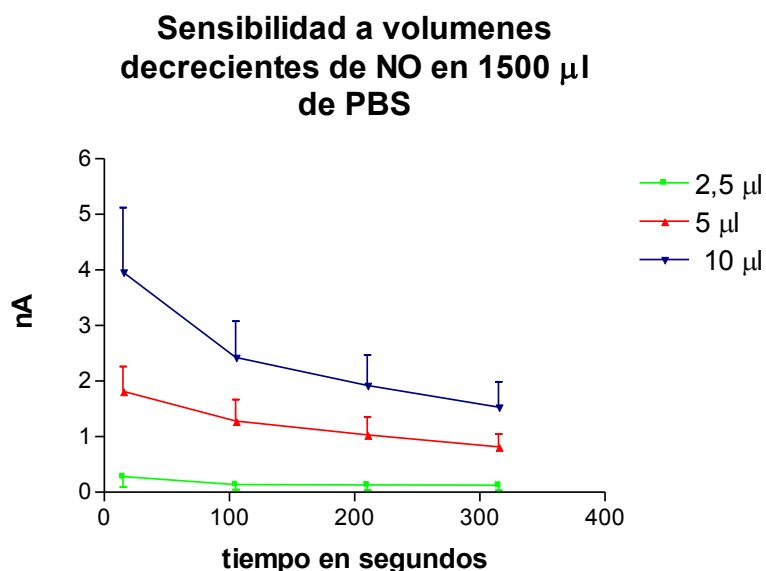


Figura 27. Variación de la señal en el tiempo de distintas concentraciones de NO

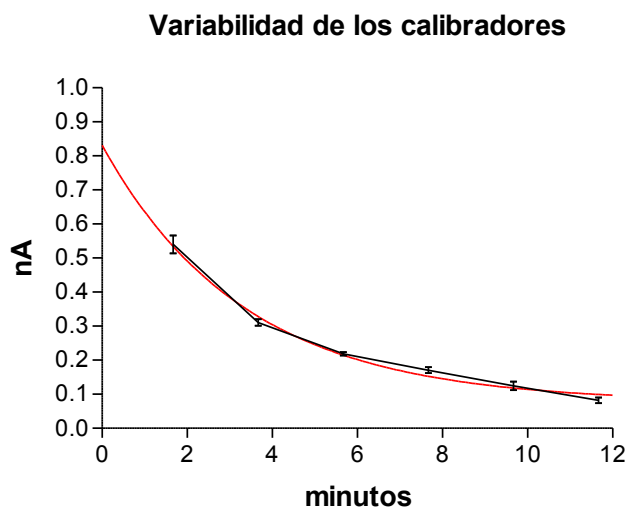
Hemos decidido que la solución de 5 µl. de solución madre en 1,5 cc de PBS es la más adecuada ya que frente a la de 10 µl tiene una menor caída inicial y una estabilización más rápida. La concentración de 2,5 µl, tiene una señal muy débil y por tanto no resulta un buen calibrado.

IV 2.2 REPRODUCTIBILIDAD DE LOS CALIBRADORES DE NO

La concordancia de las concentraciones finales de los calibradores preparados para la verificación de los microelectrodos de NO debe ser muy alta ya que se las medidas realizadas *in vivo* o *in vitro* serán ajustadas al valor del calibrador y por tanto su variabilidad será transferida a las medidas realizadas en los diferentes ensayos.

Para verificar dicha variabilidad se sometieron 7 calibradores preparados con las condiciones expuestas anteriormente a valoración con un mismo microelectrodo selectivo de NO. Los datos obtenidos se ajustan a una regresión exponencial con $R^2 = 0,9474$ con un bajo error estándar para el intervalo de confianza del 95%. Todo ello

nos permite asegurar que la reproductibilidad de los calibradores preparados en nuestro laboratorio es alta.



Tiempo total hasta 1er. Pico	100 segundos		
Duración total por barrido	120 segundos		
Dilución final de NO	10 ⁻³	(5 µl sol.madre en 1500 µl de PBS)	
Tratamiento estadístico	One phase exponential decay		
Variables	Std. Error	95% Confidence Intervals	
SPAN	0.7542	0.03957	0.6742 to 0.8343
K	0.004981	0.0005814	0.003805 to 0.006157
PLATEAU	0.07620	0.01782	0.04014 to 0.1123
HalfLife	139.2		182.2 to 112.6
Goodness of Fit		Data	
Degrees of Freedom	39	Number of X values	6
R ²	0.9474	Number of Y replicates	7
Absolute Sum of Squares	0.05348	Total number of values	42
Sy.x	0.03703	Number of missing values	0

Figura 28. Comparación de 7 calibradores medidos con el mismo electrodo

IV 3 AISLAMIENTO DEL PICO DE NO Y CONTROL DE POSIBLES SUSTANCIAS INTERFERENTES EN EL VOLTAMOGRAMA.

IV 3.1 DISCRIMINACIÓN DE LOS PICOS DE OXIDO NÍTRICO Y DE NITRITOS

La presencia de nitritos y nitratos como productos de transformación del propio NO, pudiera producir interferencias en la identificación del pico voltamétrico dado que sus potenciales de oxidación se detectan a potenciales muy próximos [Malinski et al., 1992; Friedemann et al., 1996].

Nos interesa valorar tanto el pico voltamétrico específico como las posibles concentraciones de nitritos que pudieran interferir en la señal de NO. Hemos diseñado para ello una estrategia utilizando dos tipos de electrodos combinando la mayor o menor sensibilidad al NO y los nitritos. Los resultados se observan en la figura 29.

En un tubo eppendorf con 1,5 cc de PBS se van haciendo las soluciones de trabajo extrayendo 100 μ l de PBS para añadir 100 μ l de una solución 100 mM de nitritos o una solución calibradora con 1,8 mM de NO.

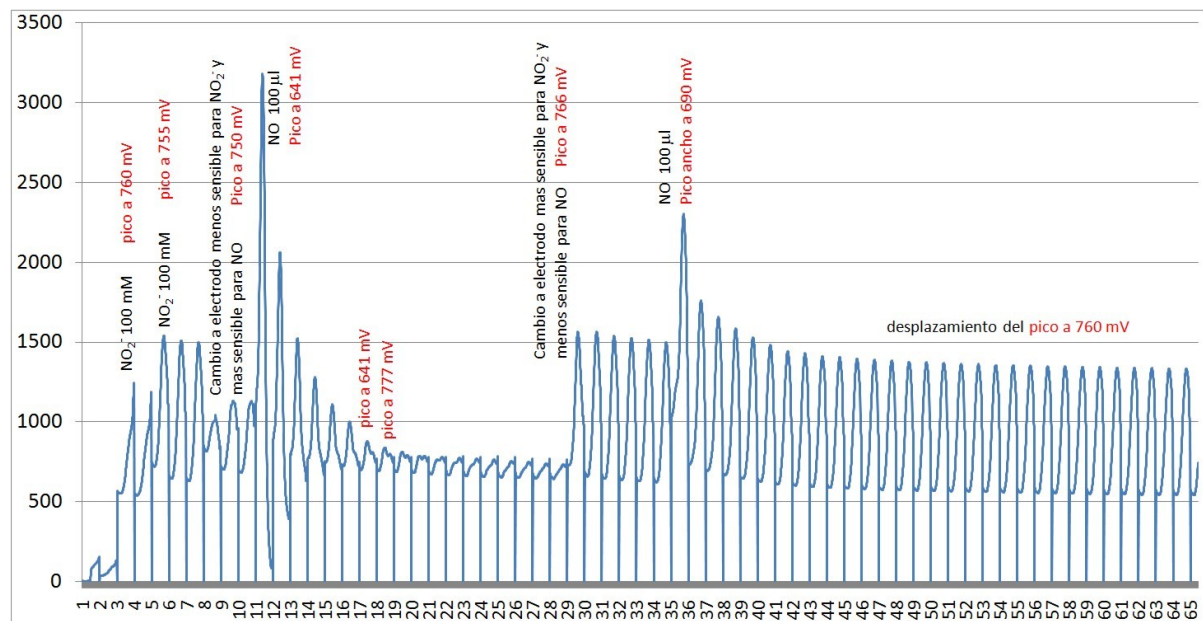


Figura 29. Comparación de la aparición de picos voltamétricos para NO y nitritos

Ciclo 1: Se comienza la toma de datos utilizando el electrodo sensibilidad alta a nitritos y baja para NO.

Ciclo 3: Adición de Solución de Nitrito (100 mM) para dar una concentración final de 6,7 mM. Aparece un pico a 760 mV.

Ciclo 5: Adición de Solución de Nitrito (100 mM) para dar una concentración final de 12,9 mM. Aparece un pico a 755 mV.

Ciclo 8: Cambio a electrodo con sensibilidad alta a NO y baja a Nitritos.

Ciclo 11: Adición de NO (1,8 mM) para dar solución final de 0,12 mM de NO y de 12 mM de Nitritos. Aparece un pico a 641 mV que decrece gradualmente hasta el ciclo 21 indicando la transformación de No en Nitritos.

Ciclo 17 a 28: Aparición de un pico a 777 mV como consecuencia de la existencia de la solución de fondo de Nitritos 12 mM a la desaparición gradual de NO.

Ciclo 29: Cambio al electrodo inicial de baja sensibilidad a NO y alta a Nitritos manifestándose la concentración de Nitritos con la misma señal que obteníamos en los picos 5,6 y 7.

Ciclo 35: Adición de NO (1,8 mM) para dar solución final de 0,12 mM de NO y de 11,2 mM de Nitritos. Aparece un pico ancho a 690 mV que cae gradualmente al tiempo que se desplaza hacia los 760 mV compatible con la concentración de Nitritos existente en ese momento. La composición inicial del pico ancho a 690 mV es seguramente consecuencia de la interferencia del Nitrito con una concentración 100 veces superior.

Ciclo 48 a final: Señal mantenida para la solución final de Nitritos

El descenso en la altura del pico de nitritos (10%) es como consecuencia del descenso de concentración (12%).

En los primeros picos se observa un ligero descenso, posiblemente por un proceso de estabilización del electrodo que se considera completamente estabilizado en 90 minutos (ciclo 46)

De lo anterior podemos concluir que el pico de nitritos (entorno a 760 mV) está alejado del de NO (entorno a 640) y son perfectamente diferenciables. Por otra parte la concentración mínima de detección de nitritos está en rangos mM muy superiores a los esperados en los espacios a medir *in vivo*.

IV 3.2 AMINOÁCIDOS

De los aminoácidos ensayados exponemos en la tabla 5 la sensibilidad y el pico de los cuatro que presentaron un pico en el voltamograma.

	DL-DOPA	DL-HISTIDINA	DL-TIROSINA	DL-TRIPTOFANO
Picos (mV)	54	838	542	613
Sensibilidad μM	8,5	100	1	1

Tabla 5. Pico en el voltamograma y sensibilidad de aminoácidos

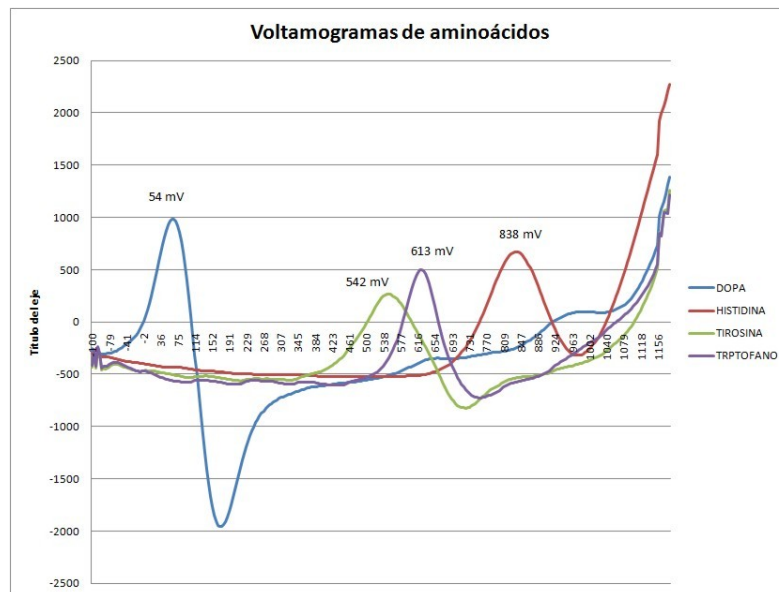


Figura 30. Voltamogramas de aminoácidos

Los picos observados son perfectamente identificados y están suficientemente separados del pico de NO, por lo que no esperamos interferencias en el estudio. El más próximo al potencial del NO es el DL-Triptófano (613mV) frente al NO (640 mV). Sin embargo, la sensibilidad del electrodo al triptófano es muy baja y a las concentraciones esperadas en el espacio extracelular sería despreciable la señal detectada frente a la obtenida para el NO, y por tanto podríamos decir que el pico detectado a 640 mV es debida al NO.

IV 4 VALIDACIÓN FARMACOLÓGICA

La validación farmacológica de los electrodos selectivos de NO se realizó con fármacos o moléculas conocidas, o bien por pertenecer a la ruta biosintética del NO o por tener actividad nitrérgica o ser donantes o inhibidores de la acción del NO en el SNC. Por ello, se podrían esperar efectos conocidos.

Hemos medido los efectos de las diferentes moléculas sobre los neurotransmisores estudiados después de la inyección en un área cerebral de una concentración determinada disueltos en PBS. Los datos son valores medios \pm ES del porcentaje de variación respecto al valor inicial comparando con este las medidas producidas en cada tiempo con un tratamiento estadístico Anova de una vía con post test de Newman-Keuls.

IV 4.1 INTERFERENCIA DEL VOLUMEN DE INÓCULO

La mayoría de la farmacología descrita en este capítulo se ha llevado a cabo con micro inyecciones locales y por medio del sistema descrito en Material y Métodos. En la micro inyección local se trata de transferir al espacio extracelular donde está implantado el microelectrodo selectivo a NO, alguna molécula de interés que debe estar disuelta en un líquido que produzca la menor perturbación posible al medio. Normalmente la solución que actúa como disolvente es PBS.

El volumen a inyectar debe ser el menor posible. Para estudiar el efecto que el solvente podría ejercer sobre la señal electroquímica, se inyectó en la vecindad del electrodo de trabajo diferentes volúmenes de PBS a pH 7,39. La grafica siguiente muestra el efecto de los diferentes volúmenes inyectados, expresados en porcentajes del nivel basal, con la idea de normalizar los resultados. Como puede verse en la figura 31, los volúmenes de 0,2, 0,4 y 0,6 no producen cambios significativos en la señal registrada por el electrodo sobre los niveles basales de NO medidos en cortex prefrontal de una rata anestesiada con Uretano (ver material y métodos para mas detalles).

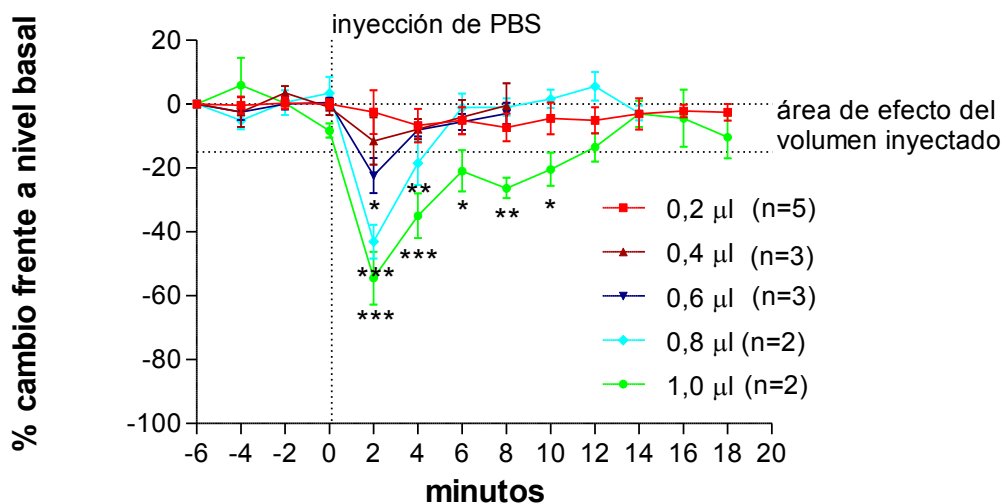


Figura 31. Cambios producidos en la señal basal de NO registrada en el cerebro de rata anestesiada por la inyección de volúmenes crecientes de PBS. Los valores se representan como media \pm ES

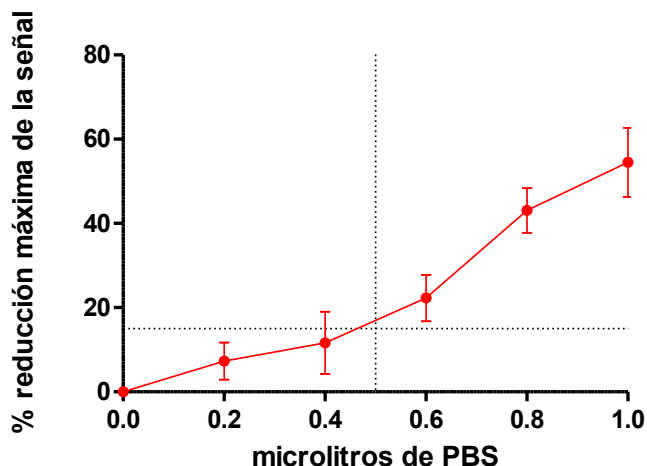
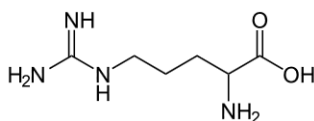


Figura 32. Reducción porcentual de la señal basal de NO frente a μ litros de PBS inyectados en el cerebro de rata anestesiada. Los valores se representan como media \pm ES de reducción de la señal inter-ratas. Se estima en 0,5 μ l el volumen inyectado crítico sin efecto significativo sobre la señal de NO.

Con los resultados obtenidos tras la inyección de los diferentes volúmenes de disolución, se estableció que la concentración óptima para evitar cambios en los niveles basales de NO atribuibles a efectos de la inyección del volumen de PBS fuera de 0,2 a 0,5 μ l. Este efecto se representa en los gráficos obtenidos para cada validación farmacológica que investigamos como “*área de efecto del volumen inyectado*”. La velocidad de inyección fue de 0,5 μ l/min. Este experimento nos permitió diferenciar los efectos farmacológicos de los cambios ocasionados por el vehículo disolvente.

IV 4.2 ACCIÓN DE PRECURSORES: L-ARGININA

Fórmula molecular: $C_6H_{14}N_4O_2$



Estructura molecular:

La L-arginina es un aminoácido semi-esencial con importantes funciones fisiológicas. Entre ellas destaca, como ya hemos mencionado anteriormente, su papel como precursora del óxido nítrico, una molécula producida a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) [Alderton et al., 2001] en muchos tejidos y fundamentalmente en el endotelio vascular donde se comporta como vasodilatadora, antiaterogénica y antiagregante plaquetaria. El estudio detallado de esta reacción

enzimática indica que la NOS tiene una gran afinidad por su sustrato (K_m del orden de 2 a 3 μM), y además, la arginina se encuentra en concentraciones altas en el endotelio (1 a 2 mM). Por tanto, la NOS debería estar continuamente saturada por la arginina y no modificar la producción de NO. Sin embargo, resultaba sorprendente que el funcionamiento de esta enzima estuviera condicionado por las variaciones en las concentraciones de L-arginina debidas al aporte nutricional. A esto se le llamó "paradoja de la arginina" [Tsikas et al., 2000; Lee et al., 2003; Böger, 2004].

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar esta paradoja de la arginina. Se ha demostrado la existencia de un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintasa denominado dimetilarginina asimétrica (ADMA) [Böger, 2004]. Este compuesto disminuiría la formación del óxido nítrico por inhibición competitiva con el sustrato natural, la L-arginina. De ahí la importancia de la suplementación con arginina exógena para contrarrestar este efecto.

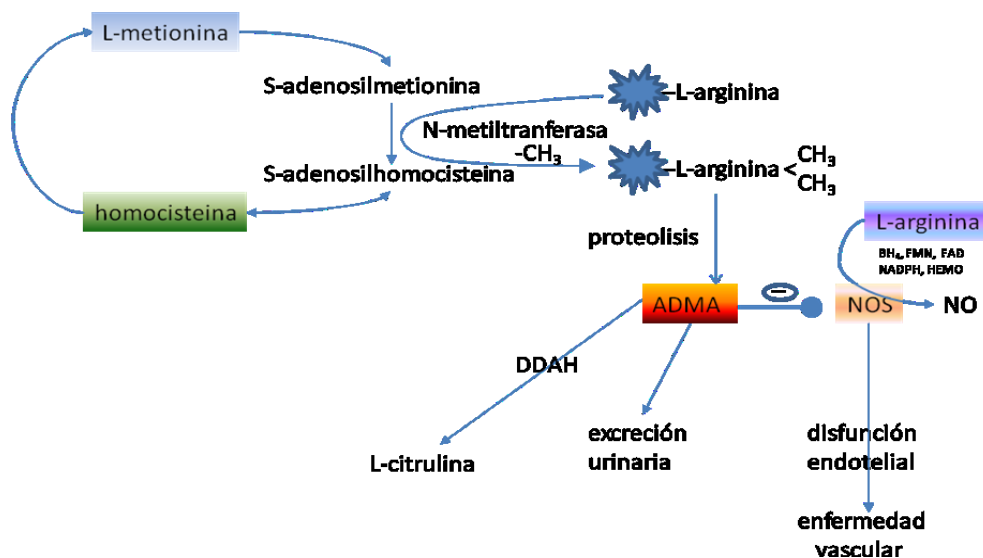


Figura 33. Esquema de las vías bioquímicas de la dimetil arginina asimétrica (ADMA)

La metilación de los residuos de arginina en las proteínas o polipéptidos ocurre a través de N-metiltransferasa, que utiliza S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. Después de la descomposición proteolítica de las proteínas queda libre ADMA en el citoplasma. También se pueden detectar en el plasma sanguíneo humano. ADMA actúa como un inhibidor de la NOS compitiendo con el sustrato L-arginina, y es la causa de la disfunción endotelial y, posteriormente, la aterosclerosis (Reproducido de Böger 2004)

Sin embargo, la administración local de L-arginina tiene unos efectos inesperados sobre la producción de NO. En nuestro estudio, hemos inyectado 5 nmoles de L-

arginina en 0,5 μ l de PBS y se puede observar en la figura 34 que la administración de L-arginina reduce los niveles de NO.

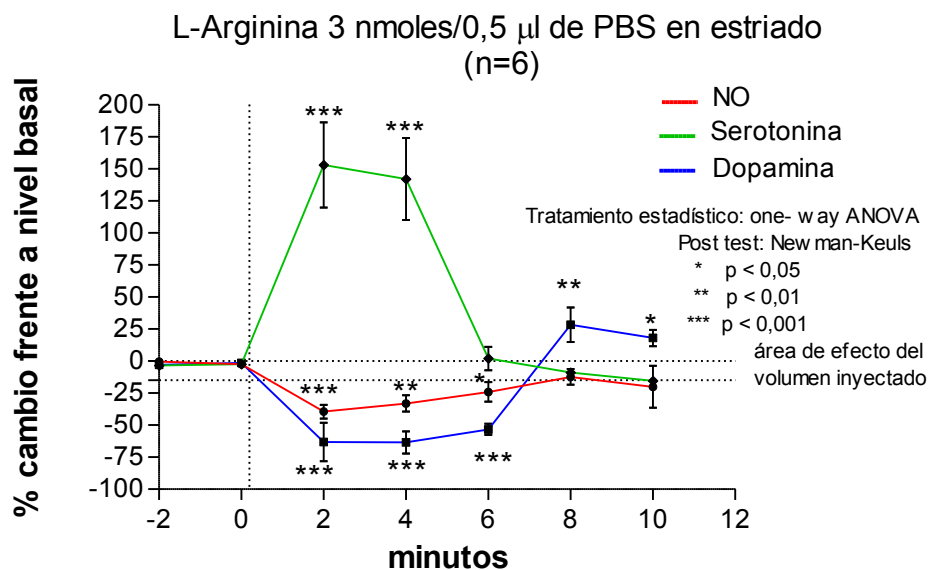


Figura 34. Cambios de DA, 5-HT y NO tras la inyección local de L-arginina en estriado

Todoroki y colaboradores en 1998, estudiaron el efecto de una alta concentración de L-arginina sobre células de neuroblastoma humano (NB9), que expresan óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Cuando se aumentó la concentración de L-arginina en el medio, después de la incubación durante 48 horas, aumento la concentración intracelular de L-arginina y de L-citrulina desde niveles no detectables. Este aumento en la concentración intracelular de L-arginina causó una disminución de la actividad de la NOS de aproximadamente el 71%. Además, por análisis de citometría de flujo demostró que se producían especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos resultados sugieren que puede ser la causa de la neurotoxicidad en la Argininemia.

Los resultados son coincidentes a los encontrados por nosotros tras la inyección local en el entorno celular del estriado.

El incremento de los niveles de serotonina (5-HT), un 250% de media, observado tras la administración de L-arginina es llamativo por los niveles extracelulares medidos. Se sabe que existe una profunda interconexión entre el sistema serotoninérgico y el dopaminérgico, dos de los más estudiados sistemas neurotransmisores en el cerebro, debido a su crucial importancia en las funciones fisiológicas y su participación en varios

desordenes neurológicos y mentales [Jijun et al., 2010; Perovic et al, 2010; Van Waes et al., 2010].

En relación al incremento de 5-HT observado tras la administración de L-arginina, sugerimos que probablemente esté asociado a la disminución observada en los niveles de NO, ya que varios estudios han sugerido una asociación fuerte entre el NO y el sistema serotoninérgico. Por ejemplo, el inhibidor no selectivo de isoformas de la NOS, el N-nitro-L arginina metil ester (L-NAME), inhibe la hiperfagia inducida por el agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-hidroxy-2-(dimetil-n-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT) [Yamada et al., 1996]. O también en ambos antagonistas de la NOS: L-NAME y 7-NI (7-nitroimidazole) un inhibidor selectivo de de la NOS neuronal (nNOS) [Moore et al., 1993; Moore et al., 1993a].

Kaehler y colaboradores [Kaehler et al., 1999a] han demostrado una regulación inversa, concentración dependiente, entre la liberación de 5-HT y la acción del NO como neuromodulador farmacológico en el hipotálamo de ratas. Esto es, a bajas concentraciones de NO generado por donantes de NO, disminuye la liberación de 5-HT. En estos trabajos llevados a cabo por Kaelher y colaboradores, demuestran que a bajas dosis de inhibidores de la NOS hay una gran liberación de serotonina y a altas dosis de inhibidores la liberación de serotonina es inferior. Estos resultados sugieren que el NO endógeno modula la liberación de serotonina de forma similar a los resultados presentados en esta memoria. Otros autores [Segieth et al., 2001] muestran resultados similares, en el sentido que disminuciones de NO extracelular aumentan la liberación de 5-HT en el espacio extracelular (más del 200%, con respecto a los niveles basales), lo que concuerda muy bien con nuestro resultados. Algunos autores como Chanrion y colaboradores [Chanrion et al., 2007] describen como explicación a esta interacción NO/5-HT, una regulación espacio-temporal del transporte de neurotransmisores que involucra a proteínas que interaccionan con los dominios intracelulares de los respectivos sistemas. Así pues, estos autores, usando una aproximación proteómica, identifican varias proteínas que interaccionan con el grupo C terminal del transportador de la serotonina (SERT). Esta interacción incluye en la NOS neuronal, un dominio PDZ (PSD-95, Disco largo y ZO-1). En resumen, estos autores sugieren que la nNOS controla la superficie celular donde se localiza el SERT, lo que evidencia que la regulación de la producción de NO se lleva a cabo por un transportador de sustrato, con enormes implicaciones en el tratamiento a largo plazo de desordenes psiquiátricos tales como depresión, estados obsesivos y ansiedad.

Hay otras varias líneas de investigación con evidencias que soportan una interacción funcional entre el SERT y el sistema nitrérgico [Millan et al., 2002; Miller et al., 1994; Zhu et al., 2004].

En relación a los efectos observados para la DA, Silva y colaboradores [Silva et al., 1998], demostraron que L-arginina en alta concentración en estriado de ratas produce un aumento en la descarga de dopamina NO-independiente.

En este ensayo de Silva se observó un efecto bifásico con una disminución inicial transitoria seguida de un aumento prolongado, que es un resultado similar al observado en nuestro experimento (figura 34).

Por otra parte, hay evidencias anatómicas, electrofisiológicas y bioquímicas que confirman una importante inter-regulación entre el sistema serotoninérgico y dopaminérgico, en particular el papel modulador del sistema serotoninérgico sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el sistema nervioso central (SNC) de animales y humanos [Tiina Kääriäinen, 2008].

Los datos disponibles evidencian que la DA modula las propiedades de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/2C}, particularmente en el sistema mesolímbico. Además hay fuertes evidencias de que una afinidad combinada con los receptores 5HT/D2 pudiera ser de gran efectividad en la modulación de los niveles de dopamina de todo el SNC. Así pues, es posible que los cambios en DA y 5-HT encontrados tras la administración de L-arginina se deban a la interacción entre ambos sistemas.

IV 4.3 DONANTES DE NO: NITROPRUSIATO SÓDICO (SNP) Y S-NITROSO-N-ACETIL-DL-PENICILAMINA (SNAP)

El nitroprusiato de sodio (SNP) es un producto que actúa como dador de óxido nítrico, en presencia de endotelio vascular. Ha sido investigado en modelos de lesión por isquemia/reperfusión orgánica aislada, logrando disminuir la lesión por reperfusión pulmonar, mejorando la oxigenación, la hemodinamia y la formación de edema pulmonar, y reduciendo la lesión mucosa y orgánica posterior a isquemia/reperfusión gástrica y del páncreas [Young et al., 2000; Benz et al., 1998].

El S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina es preparado sintéticamente y está formado por una mezcla racémica de D y L isómeros. Libera óxido nítrico (NO) en condiciones fisiológicas, por lo que es una herramienta útil para el estudio farmacológico y de las acciones fisiológicas del NO.

La evidencia experimental señala que entre los sistemas nitrérgicos y dopaminérgico se puede observar una interacción, que ha sido objeto de un abundante número de investigaciones, principalmente en el cuerpo estriado. Los efectos descritos del NO en la liberación de dopamina en el estriado son variables y sus efectos concretos sobre las terminaciones nerviosas del cuerpo estriado no están claros. En la literatura publicada encontramos resultados en uno u otro sentido (incremento/disminución) de los efectos en los niveles de dopamina tras la administración de donantes de NO en estriado: incrementado [Black et al., 1994; Stewart et al., 1996; West et al., 1997] o disminuido [Guevara-Guzman et al., 1994].

Por otra parte, el óxido nítrico y el 5-HT son dos neurotransmisores con un papel importante en la neuromodulación y la plasticidad sináptica. Hay evidencia sustancial de una superposición morfológica y funcional entre estos dos sistemas de neurotransmisores, en particular de la modulación de la función de 5-HT por el NO [Simpson et al., 2003]. A pesar de esta evidencia convincente de las interacciones entre los 5-HT y el NO, los efectos directos de NO en una sinapsis serotoninérgica identificados están escasamente definidos.

De la misma manera que para la dopamina, hay publicaciones aparentemente contradictorias en relación a los efectos que produce la administración de donantes de NO, algunos autores describen un incremento de 5-HT tras la acción de los donantes de NO [Guevara-Guzman et al., 1994].

IV 4.3.1 NITROPRUSIATO SÓDICO (SNP)

Nombre: Nitroprusiato sódico

Fórmula molecular: $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6\text{NO}]$

La administración local de un donante clásico como el Nitroprusiato sódico (SNP) a dosis de 10,1 nmol en 0,5 μl de PBS, produce un incremento en las concentraciones de NO (80%). La disminución inicial de NO se debe posiblemente en parte a dilución del entorno por la inyección local, antes de liberarse el NO.

Pogun y colaboradores [Pogun et al., 1994], refirieron que la captación de dopamina y serotonina en una preparación de sinaptosomas procedentes del estriado de rata, disminuía tras la administración de SNP y de otro donante de NO, el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Estos datos indican que el NO puede disminuir el transporte de DA y 5-HT, lo que puede justificar las disminuciones de DA y 5-HT tras la

administración de SNP. El efecto sobre sinaptosomas procedentes del núcleo acumbens y tubérculo olfatorio no fue tan claro.

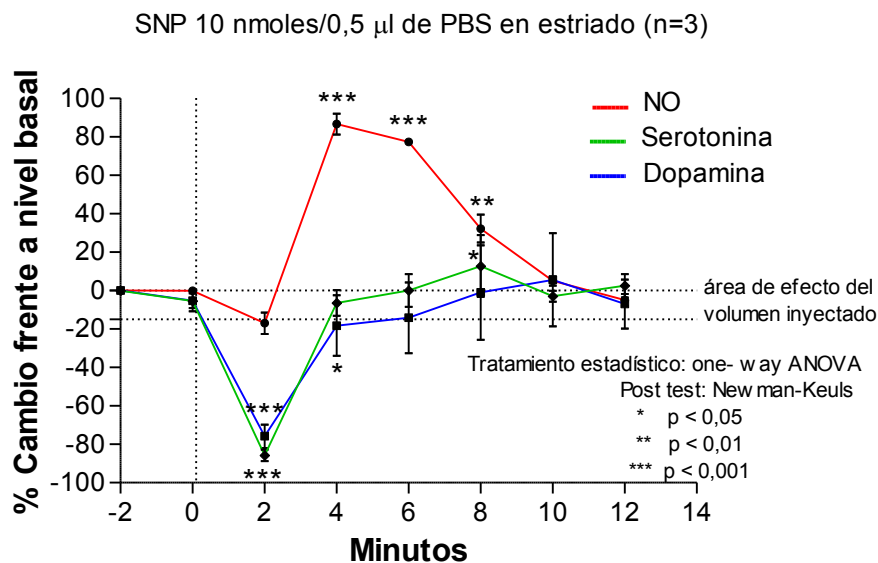


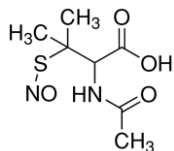
Figura 35. Efecto de la administración de Nitroprusiato sódico (SNP) 10 nmol/0,5 µl de PBS en estriado de rata adulta, inyectado localmente cerca del electrodo.

Como se comentó anteriormente es posible que la explicación de los bajos niveles de liberación de DA y 5-HT se deba a la destrucción de las moléculas por acción directa del SNP, ya que al administrar antioxidantes ambos niveles se incrementan de forma importante [Buyukuysal 1997].

IV 4.3.2 S-NITROSO-N-ACETIL-DL-PENICILAMINA (SNAP)

Nombre: S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina

Fórmula molecular: C₇H₁₂N₂O₄S



Estructura molecular:

El S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina (SNAP) es un conocido donante de NO. La administración de SNAP en el cuerpo estriado de rata a una concentración de 2,5 nmoles en 0,5 µl de PBS produjo un incremento de hasta 300% de DA extracelular y un incremento de NO de hasta 250%, mientras que los niveles de 5-HT disminuyeron de una forma no significativa estadísticamente frente a los niveles preinyección. Estos

datos sugieren que el efecto de este donante es diferente a los encontrados tras la administración de NO o SNAP.

West y Galloway [West et al., 1996] encuentran tras la administración local en estriado de SNAP, un aumento del nivel extracelular de dopamina (DA) por encima de los niveles de referencia. Así mismo, sugieren que la liberación de DA mediada por SNAP no se debe a la neurotoxicidad inducida por NO o el bloqueo del transportador de DA. El efecto de liberación de SNAP fue atenuado en condiciones libres de calcio y se suprimió en ratas pretratadas con reserpina (5 mg / kg) que elimina la liberación vesicular de DA, lo que implica un proceso de liberación sensible al calcio vesicular y que es independiente de la activación de la guanilato ciclasa.

Segieth y colaboradores [Segieth et al., 2000], observaron que la infusión SNAP en un período de 30 minutos causó un aumento o una disminución en la liberación de dopamina en función de la concentración utilizada. En las concentraciones más bajas (0,5 mM) se promueve la liberación, mientras que a concentraciones más altas (5 mM) se producía una reducción duradera de los niveles de dopamina basal.

En otro estudio, se observó que en dializado con SNAP a las concentraciones más bajas (0,5 mM) se eleva el 5-HT en un 55% con respecto a basal, mientras que en altas (5 mM) la disminución fue 70% [Segieth et al., 2001].

Efectos totalmente contrarios describen Kaehler y colaboradores en el hipotálamo, es decir las bajas concentraciones de SNAP disminuyen la liberación de serotonina, mientras que la mayor concentración mejora la salida de serotonina [Kaehler et al., 1999a].

Los resultados de estos dos últimos experimentos confirman la habilidad del NO para modular la liberación de neurotransmisores estriatales. Mas aún, estos experimentos muestran que a pesar de que la mayoría de estos efectos neuromoduladores son mediados vía GCs/GMPc calcio dependiente, según argumentan algunos autores [Trabace et al.,2000], también hay efectos mediados vía interacción del NO con superóxidos para formar ONOO⁻ [lesaki et al., 1999]. En el caso de la DA estriatal el NO puede hacer ambas cosas, inhibir la concentración de DA a través de la formación de ONOO⁻ e incrementarla a través del sGC/GMP cíclico. Estos resultados pueden explicar los actuales resultados donde un donante puede abolir la liberación de DA y otro puede incrementarla.

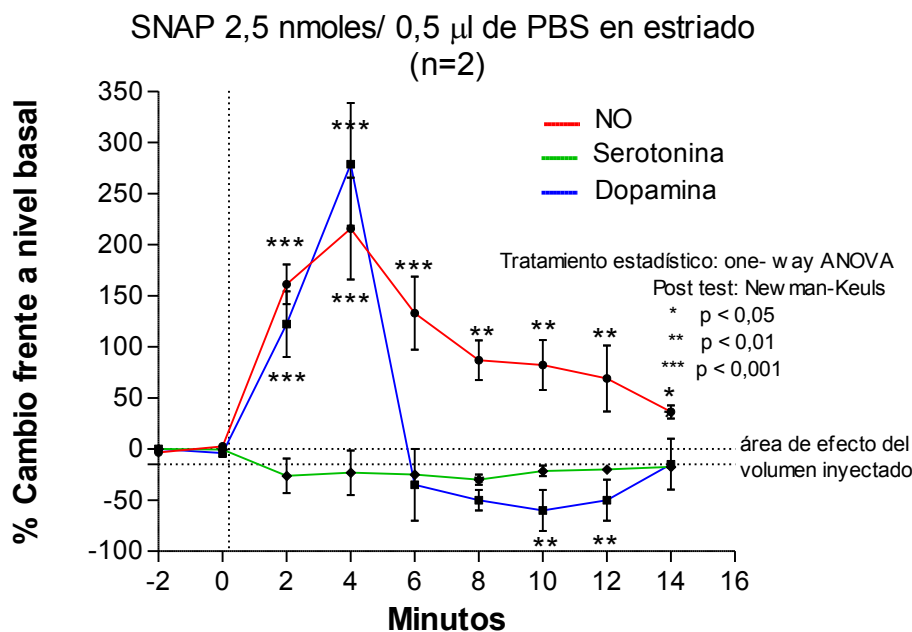


Figura 36. Efectos de la inyección de S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina(SNAP), un donante de NO, en estriado de rata

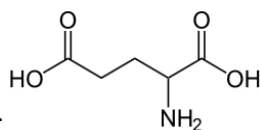
IV 4.4 INTERACCIÓN CON OTROS NEUROTRANSMISORES

Desde que se conoce el papel del NO como inductor de alteraciones en la liberación *in vivo* de DA en el estriado de ratas [West et al., 1996] se han considerado, al menos en parte, a los aminoácidos excitatorios como mediadores intermediarios en el proceso. Los siguientes experimentos pretenden no solo demostrar que el microsensor desarrollado puede cuantificar adecuadamente la liberación de NO en cerebro de rata sino tratar, además, de objetivar si el glutamato (un neurotransmisor esencial en la neurotransmisor cerebral) está implicado directa o indirectamente en los cambios de NO, DA y 5-HT.

IV 4.4.1 GLUTÁMICO

Nombre: Acido glutámico

Fórmula molecular: C₅H₉NO₄



Estructura molecular:

El ácido glutámico es un neurotransmisor cuyo papel está mediado por la estimulación de receptores específicos, denominados receptores de glutamato. Actúa como componente prioritario en la plasticidad neuronal y la memoria [Li et al., 2009].

Trabajos previos [Buyukuysal 1997a] han demostrado que la incubación de slices de estriado de rata con L-glutamato a dosis de 1 mM producían incrementos en la concentración de DA en el medio. La inhibición de la NOS con L-NAME 1 mM eliminaba el efecto liberador de DA extracelular [Buyukuysal 1997]. Los resultados de la figura 37 muestran los efectos de la inyección de 20 nmoles de glutámico en 0,5 μ l de PBS.

El incremento de NO producido por el glutamato puede justificar el incremento de 5-HT y viceversa. Sin embargo, a pesar de que se sabe que el NO y la DA están involucrados respectivamente, las evidencias descritas anteriormente que ligen el NO con la liberación 5-HT son escasas hasta el momento de escribir esta memoria. Se sabe que el NO incrementó la liberación de 5-HT en el área preóptica [Lorrain et al., 1993], mientras en el estriado de ratas anestesiadas los donantes de NO parece que incrementan la liberación de 5-HT [Guevara-Guzman et al., 1994].

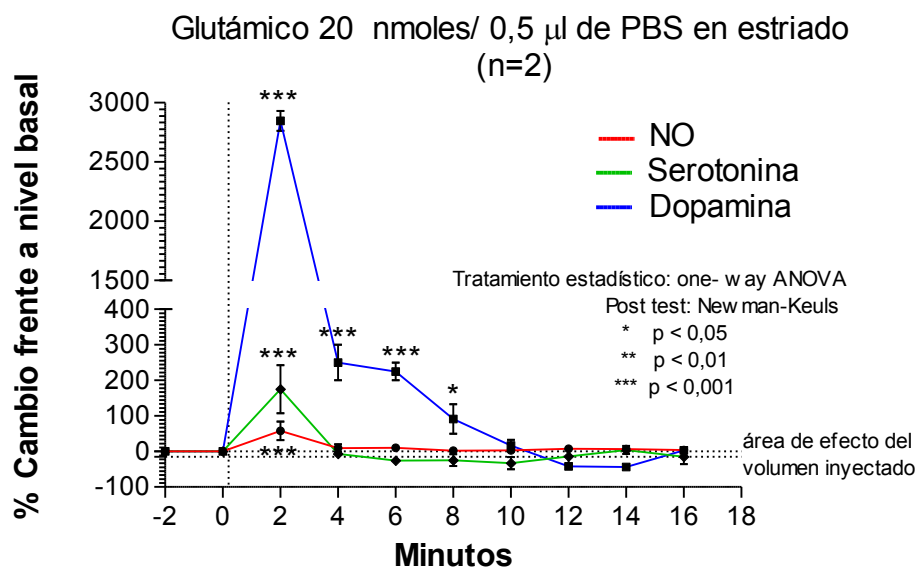


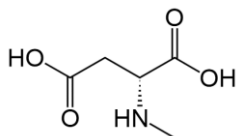
Figura 37. Efectos de la inyección local de ácido glutámico en 0,5 μ l de PBS en estriado de rata. Se observa un incremento de DA de 5-HT y NO de forma transitoria durante 6 minutos.

Por tanto, los resultados obtenidos están de acuerdo con los obtenidos por otros autores con otras técnicas y en otras regiones, y consecuentemente validan el microsensor tanto para NO como para 5-HT y DA medidos simultáneamente.

IV 4.4.2 N-METIL D-ASPARTATO (NMDA)

Nombre: N-metil D-aspartato

Fórmula molecular: C₅H₉NO₄



Estructura molecular:

Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) son receptores ionotrópicos de glutamato. El acrónimo NMDA procede de *N-metil D-aspartato*, un agonista selectivo que se une a este tipo de receptores de glutamato pero no a otros tipos. Su activación conduce a la apertura de un canal iónico selectivo para toda clase de cationes. El receptor puede activarse a resultas de una diferencia de potencial en presencia de iones Mg²⁺. Esto permite el flujo de iones Na⁺ e incluso de bajas cantidades de Ca²⁺ hacia dentro de la célula y de K⁺ hacia fuera de la célula. El flujo de iones de calcio se considera crítico durante el proceso de plasticidad sináptica, un proceso celular involucrado en el aprendizaje y la memoria [Dingledine et al., 1999; Liu et al., 2000].

Para comprobar el papel de los receptores NMDA sobre los sistemas nitrérgico, dopaminérgico y serotoninérgico, se inyectaron 10 nmol de NMDA en 0,5 µl de PBS en el estriado de rata (figura 38).

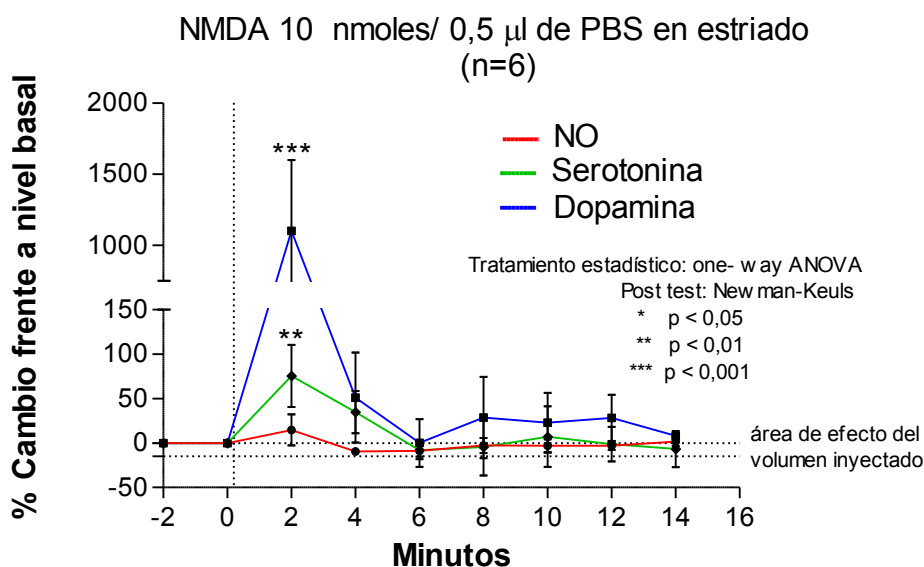


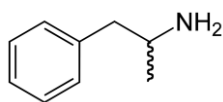
Figura 38. Cambios en NO, serotonina y dopamina tras la inyección de 10 nmoles/0.5 µl de PBS de NMDA en estriado de rata.

Los resultados son totalmente similares a los obtenidos con la inyección de ácido glutámico. Parece claro que la inyección de NMDA provoca la liberación de DA en altas concentraciones, probablemente mediado por óxido nítrico, como se ha demostrado en varias regiones cerebrales [Cepeda et al, 2009, Giorgetti et al, 2001, Dominguez et al 2004, Hall et al, 1998].

IV 4.4.3 ANFETAMINA

Nombre: D-metil fenilamina

Fórmula molecular: C₉H₁₃N



Estructura molecular:

Anfetamina 20 µg/0,5 µl de PBS en estriado
(n=3)

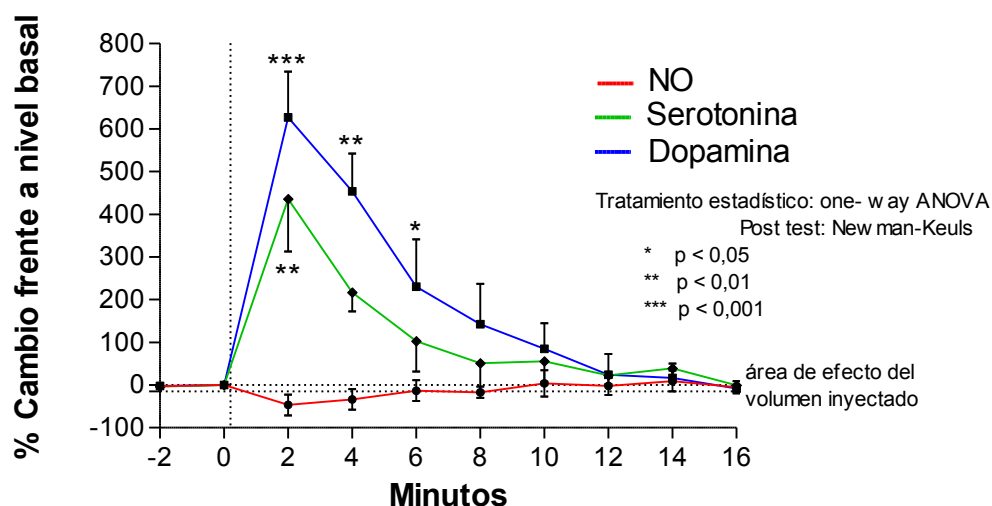


Figura 39. Inyección local de anfetamina (20µg/0,5µl) en estriado de rata. Se produce un incremento de DA y 5-HT. El NO disminuye en el espacio intersticial.

Con el objetivo de evaluar si el sistema dopaminérgico influye directa o indirectamente sobre el sistema nitrérgico, se inyectó localmente anfetamina, un psicoestimulante que incrementa los niveles extracelulares de DA. El mecanismo de acción de la anfetamina se piensa que es por incrementar la neurotransmisión dopaminérgica, más específicamente por incremento de la liberación (overflow), inhibición de la re-captación a nivel de terminales e inhibición de la actividad de la monoamino oxidasa B (MAOB) [John et al, 2007].

El papel del NO en la modulación de la liberación de DA es enormemente controvertido. Se sabe que los fármacos que generan NO normalmente inducen la liberación de DA [Hartung et al, 2011; Salum et al, 2010; Harvey et al, 2010; Singh et al, 2010; Mas et al, 1996], mientras que al contrario de lo que cabría esperar, disminuyen los niveles de DOPAC y HVA, muy parecido al efecto de la anfetamina [Gonzalez-Mora et al, 1988]. Más aún, si se trata previamente a la rata con un inhibidor de la NOS neuronal el 7-nitro-indazol (7-NI), se inhibe la liberación de DA [Nowak et al, 2002]. Contrariamente a lo anterior, Guevara-Guzman y colaboradores demostraron un papel inhibitorio del NO sobre la liberación de DA [Guevara-Guzman et al, 1994]. Sin embargo, Silva y colaboradores han encontrado que inhibiendo la NOS neuronal se incrementa la liberación de DA [Silva et al, 2003]. Otro inhibidor de todas las isoformas de NOS el L-NAME y el antagonista NMDA MK-801 elimina el NO que se genera tras la administración sistémica de anfetamina y protege de la depleción dopaminérgica del estriado [Lin et al, 1999].

Esta complejidad del NO para inducir o inhibir la liberación de DA indica que otros sistemas neuronales están implicados en los diferentes mecanismos de regulación.

Nuestros resultados están mas a favor de un papel liberador de DA en estriado mas que inhibitorio. Así, la inhibición de NO tras la administración de anfetamina podría justificar el efecto vasoconstrictor (hipóxico) de la anfetamina, publicado por nuestro grupo, probablemente mediado por disminución del NO entre otros procesos involucrados [Del Arco et al, 1999].

IV 4.5 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS DE LA NOS

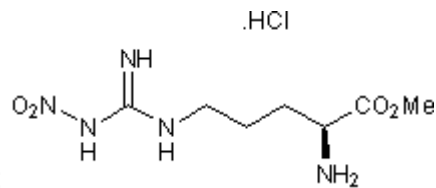
Una de las mejores formas de evaluar la calidad de los microsensors selectivos de NO que hemos desarrollado es utilizar inhibidores selectivos de las isoformas de la NOS ya que podemos inhibir selectivamente cada pool de producción de NO en el SNC. Hay una gran variedad de inhibidores de la NOS que se describen en la literatura científica, así como su uso como herramientas farmacológicas.

Es muy desigual la consideración de “especificidad” de estos inhibidores y esto es consecuencia de los diferentes criterios de definición de dicha selectividad como son: el IC₅₀ (concentración de inhibición del 50% del sustrato) o del Ki (afinidad de unión del inhibidor) [Alderton et al., 2001].

IV 4.5.1 INESPECÍFICOS: N^G-NITRO-L-ARGININA-METIL-ÉSTER (L-NAME)

Nombre: N^G-nitro-L-arginina-metil-ester

Fórmula molecular: (C₇H₁₅N₅O₄ HCl)



Estructura molecular:

Potencia inhibitoria: nNOS > eNOS > iNOS

L-NAME requiere la hidrólisis del ester metílico por esterasas intracelulares para convertirse en un inhibidor totalmente funcional (L-NNA) [Griffith, et al., 1996].

Tiene los siguientes valores de Ki: 15 nm (nNOS bovina), 39 nm (eNOS humana), y 4,4 mM (iNOS ratón) respectivamente [Buckner et al., 1988; Furfine et al., 1993; Garvey et al., 1994], nNOS (IC₅₀, 0.66 + 0.06 mM, n = 6), iNOS (IC₅₀, 10.6 + 0.4 mM, n = 6) eNOS 6,5 mM [Handy et al.1995].

El mecanismo de acción está relacionado con su parecido estructural con la L-arginina siendo así competitivo con el sitio de unión del sustrato L-arginina [Alderton et al., 2001; Rees et al., 1990] e influyendo drásticamente en el flujo de electrones tal como se manifiesta por los cambios en su tasa de oxidación de NADPH [Abu-Soud et al.,1994].

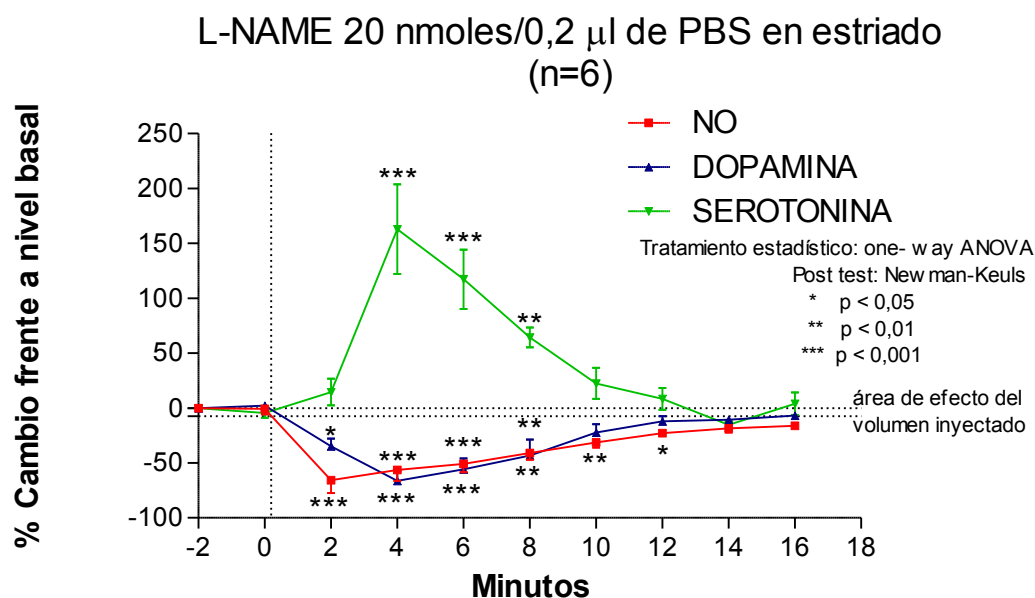


Figura 40. Efecto de la inyección local de L-NAME en estriado de rata.

En nuestro ensayo encontramos datos totalmente concordantes tanto del descenso de NO como del efecto de depleción dopaminérgica en estriado [Abekawa et al.2001] y del incremento de Serotonina [Kadokami et al. 1996].

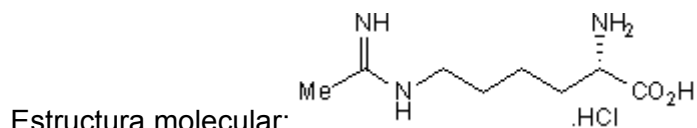
IV 4.5.2 ESPECÍFICOS

Como hemos descrito anteriormente, el concepto de especificidad es muy relativo y relacionado con afinidad de unión al enzima. Los citados a continuación los hemos relacionado con la especificidad descrita por algunos autores.

IV 4.5.2.1 INOS: L-N6-(1-IMINOETIL) LISINA (L-NIL)

Nombre: L-N6-(1-Iminoetil) lisina

Fórmula molecular: (C₈H₁₇N₃O₂ 2HCl)



Potencia inhibitoria: iNOS >> nNOS

El mecanismo de acción es análogo al descrito como competitivo con el sitio de unión del sustrato L-arginina por su parecido estructural con ella.

L-NIL se ha demostrado ser un inhibidor potente y selectivo de la sintetasa de óxido nítrico inducible del ratón. Tiene una IC₅₀ de 3,3 microM, en comparación con NOS constitutiva con un IC₅₀ de 92 microM en cerebro de rata, lo que indica que la L-NIL es 28 veces más selectivo para la NOS inducible [Moore et al., 1994].

Estos datos sugieren que la L-NIL puede ser útil como un inhibidor selectivo de la NOS inducible para determinar el papel de esta enzima en modelos de enfermedad [Moore et al., 1994]

Hemos encontrado que su efecto reductor de la señal de NO es muy bajo, posiblemente por la poca presencia de la iNOS en el cerebro de rata.

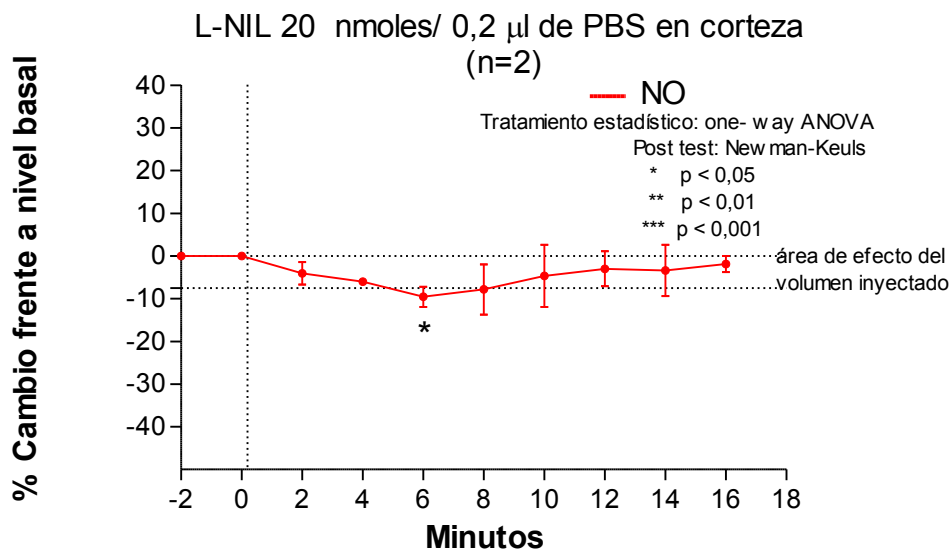
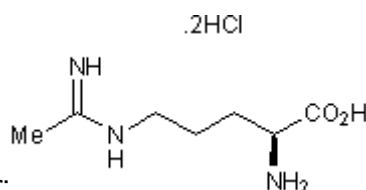


Figura 41. Efecto sobre la liberación de NO de la inyección local de L-NIL (20 nmoles/0,2 µl) en la corteza cerebral de rata.

IV 4.5.2.2 ENOS: N⁵-(1-IMINOETIL)-L-ORNITINA (L-NIO)

Nombre: N⁵-(1-iminoetil)-L-ornitina

Fórmula molecular: (C₇H₁₅N₃O₂ 2HCl)



Estructura molecular:

Potencia inhibitoria: nNOS > eNOS = iNOS

El mecanismo de acción es análogo al descrito como competitivo con el sitio de unión del sustrato L-arginina por su parecido estructural con ella.

La L-N5-(1-Iminoethyl) ornitina (L-NIO), que difiere de la L-NIL por tener un grupo menos de metileno, tiene una potencia muy similar en la NOS inducible pero carece de su selectividad.

Los valores de Ki son: 1,7 mM para nNOS (rata), 3,9 mM para la eNOS (bovino) y 3,9 mM la iNOS (ratón) respectivamente.

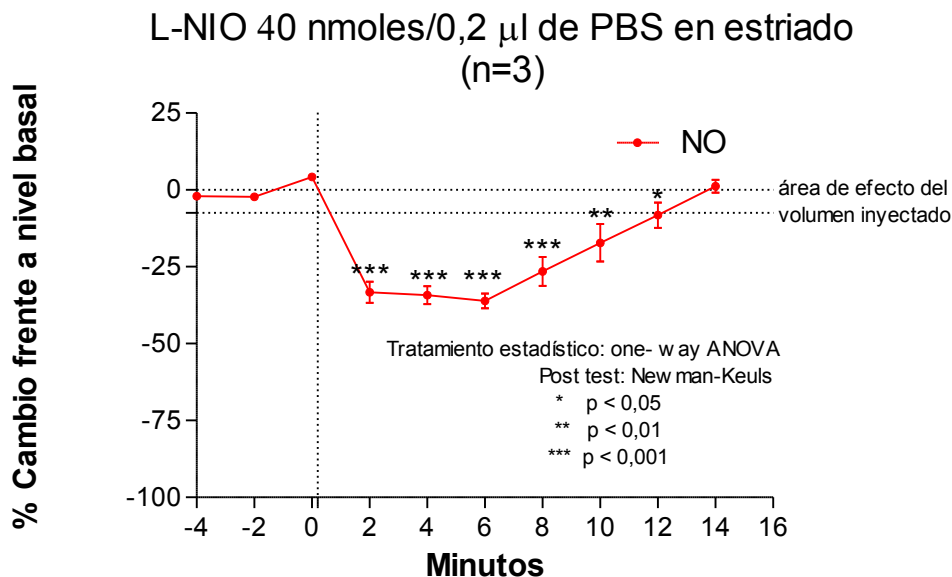


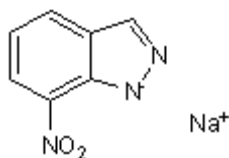
Figura 42. Efecto de la inyección local de L-NIO 40 nmoles en 0,2 µl de PBS en estriado de rata.

El efecto reductor de la señal de NO es alto aunque inferior a L-NAME y al igual que esta tiene una recuperación de la señal en torno a los 10 minutos.

IV 4.5.2.3 NNOS: 7-NITROINDAZOL, SAL MONOSÓDICA (7-NINA)

Nombre: 7-Nitroindazol, sal monosódica

Fórmula molecular: (C₇H₄N₃O₂ Na)



Estructura molecular:

Potencia inhibitoria: nNOS = eNOS >> iNOS

Moore y colaboradores (1993) informaron de la inhibición de la actividad neuronal de NO sintasa por indazol 7-nitro (7-NI) sin efecto sobre la presión arterial media, lo que sugiere que el 7-NI es un inhibidor selectivo de la NO sintasa neuronal.

El mecanismo de acción de 7-NI no se conoce, pero no parece estar relacionado con la inhibición de la NOS. Es probable que el 7-NI combine una acción antagonista de las células musculares lisas P2X-purinceptoras con la capacidad de inhibir la afluencia celular de los iones de calcio [Allawi et al., 1994].

Los valores de IC₅₀ son: 0,71 mM para la inhibición de nNOS rata, 0,78 mM para la eNOS de la especie bovina y 5,8 mM para la iNOS, respectivamente.

La insolubilidad de 7-NI en suero fisiológico artificial ha impedido su uso en estudios *in vivo* de la liberación de neurotransmisores. Por esta razón, hemos empleado su sal monosódica: 7-NINA.

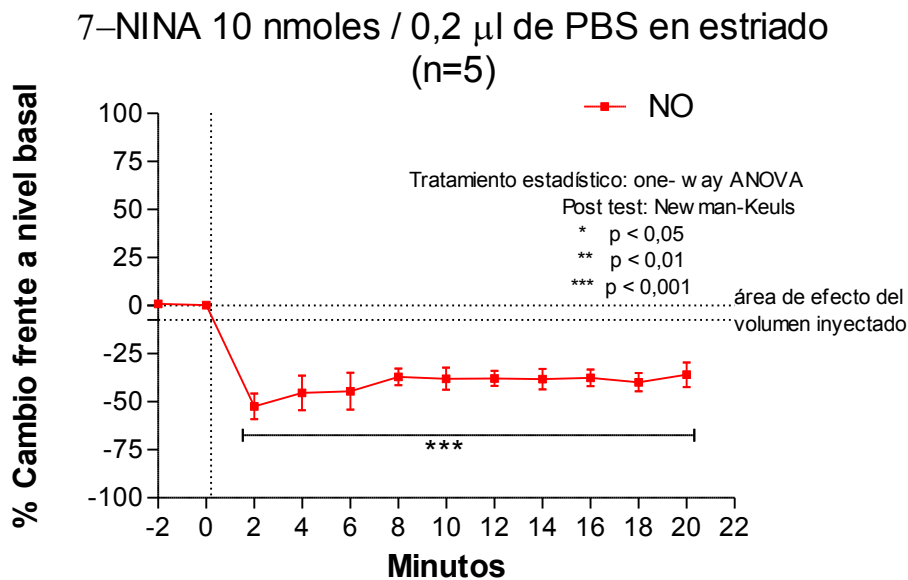


Figura 43. Efecto de la inyección local de 7-NINA en estriado de rata

El efecto observado es mayor que L-NAME y L-NIO y además persiste en el tiempo. Probablemente la especificidad para nNOS observada esté relacionada con la mayor actividad nNOS descrita en el cerebro de rata.

IV 5 DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE UN ATLAS ANATÓMICO-FUNCIONAL 3D DE NIVELES DE NO

En la obtención de datos para la confección del atlas con las concentraciones de NO nos encontramos fundamentalmente con dos variables como ya hemos mencionado: el electrodo de trabajo y el animal de experimentación.

En relación al electrodo de trabajo ya hemos desarrollado ampliamente los medios dispuestos para minimizar la posible variabilidad.

Respecto al animal de experimentación, tenemos que considerar que es absolutamente imposible realizar la totalidad de la toma de datos con una sola rata, y por ello hemos diseñado una estrategia doble basado en las observaciones descritas por Paxino y Watson en el desarrollo de su atlas estereotáxico.

En primer lugar, tal como ellos indican [Paxino et al.1982], hemos controlado en todo momento el peso de las ratas ya que las medidas estereotáxicas *“pueden ser utilizadas con éxito en ratas machos o hembras con pesos de 250 a 350 g”*

En segundo lugar, para minimizar la variabilidad de las medidas inter-ratas, necesitamos disponer de una referencia de control. Paxino y Watson, marcan tanto el plano vertical como en horizontal, con pistas de agujas. Nosotros hemos “marcado” la superficie horizontal del cerebro de la rata con una medida en la posición inicial para cada corte coronal y para cada posición lateral (mínimo 0,5 mm entre cada posición) que posteriormente será el inicio del muestreo vertical. Los datos obtenidos se exponen en la tabla 6 y la imagen de la figura 44 muestra la transformación de estos datos a una superficie plana con el programa informático Surfer®.

Bregma (mm)	LATERAL (mm)												
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
3.20		1,175		0,885		0,966		1,354		1,772			
1.00	2,472	2,146	2,595	2,771	1,127	2,163	2,385	2,163	1,505	0,641			
-1.30	2,554	2,772	2,318	1,913	1,487	1,231	0,968	0,943	0,943	0,762		0,727	
-3.14	2,366		1,343	0,747	1,032	0,807	0,730	1,121	1,071	0,969		0,632	
-5.30	0,741	1,005	1,409	1,870		1,804	2,603		2,192	1,145	0,766	0,568	
-6.8	1,977	3,592	2,949	2,224	1,862	3,614	2,126		3,047		0,764		1,057
-8.8				1,484		1,727		1,827		2,740			
-11.00	4,108	2,809	2,616	0,996	0,660	0,716	0,692	0,448			0,115		
-12.30	2,699	2,451	0,581		0,680		0,941		1,925				

Tabla 6. Lecturas de NO en nA obtenidas en la superficie del cerebro.

De esta manera, podremos posteriormente contrastar con las medidas obtenidas en la misma posición en cada lámina y así establecer una referencia para todas las medidas verticales que se efectuarán en cada corte coronal. Se practicaron mediciones con intervalos de 500 o 1.000 μm en lateral para cada localización de corte coronal y únicamente a profundidad 0,0 – 0,5 mm. Los datos se obtuvieron con cuatro ratas que dieron un promedio de peso de 327 gr (CV de 0,11) de esta manera, para cada coordenada (Bregma/lateral) se obtuvieron no menos de tres medidas de concentración de NO.

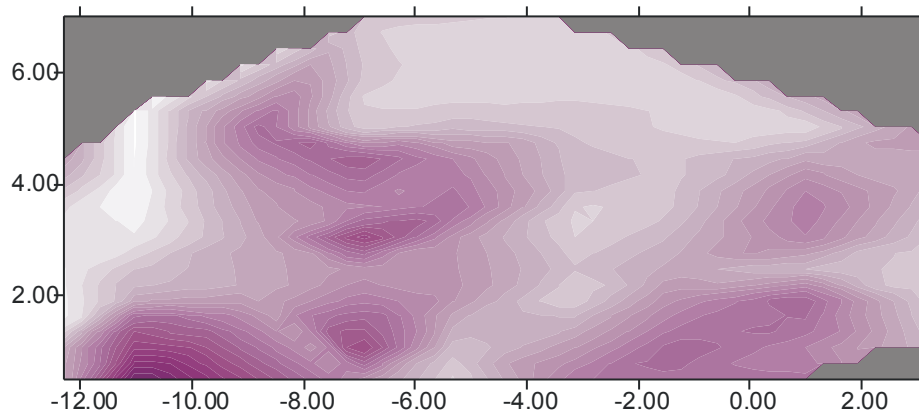


Figura 44. Imagen de las concentraciones de NO en la superficie del cerebro de rata

Para la composición de concentraciones de NO en cada corte coronal, se realizaron mediciones verticales y laterales para conformar una lámina de datos por cada uno de los nueve cortes coronales seleccionados, teniendo siempre como referencia en la medida inicial de la superficie las obtenidas anteriormente para confeccionar el plano horizontal de referencia. Los datos obtenidos en cada lámina se contrastaron con una nueva rata y siempre deben tener un coeficiente de correlación superior a 0,70 ($r > 0,7$).

En las páginas siguientes exponemos los datos los datos obtenidos para cada cada corte coronal y en orden a sistematizar la información, hemos considerado los siguientes apartados:

- 1.- Gráfico comparativo de los perfiles producidos por los valores de NO en superficie para la medida de referencia en superficie y para las medidas de cada corte. Se hace para cada lámina un análisis estadístico comparando ambas series (superficie y lámina) con el tratamiento t-test de datos apareados en el programa estadístico Graphpad Prismas® v. 5.0.
- 2.- Correlación lineal utilizando el programa estadístico Graphpad Prismas® v. 5.0, entre los datos de NO obtenidos en cada par de ratas para cada localización Bregma.
- 3.- Imagen obtenida por el tratamiento de los datos de dichas tablas con el programa informático Surfer®.
- 4.- Tabla donde se expresan los valores de NO para cada par de coordenadas (vertical y lateral).

Para los experimentos se utilizaron ratas cuyos pesos promedios y su coeficiente de variación (CV) para cada corte coronal se muestran en la tabla 7.

Bregma (mm)	3,20	1,00	-1,30	-3,14	-5,30	-6,80	-8,80	-11,00	-12,30
Peso medio (gramos)	329	332,5	319	347	295	312	346	310	297,5
CV	0,22	0,14	0,18	0,11	0,02	0,11	0,04	0,07	0,13

Tabla 7. Peso promedio de ratas usadas en los ensayos

Lámina del Corte Coronal en Bregma 3,2 mm

Comparación Superficie/Lámina Bregma 3,20 mm

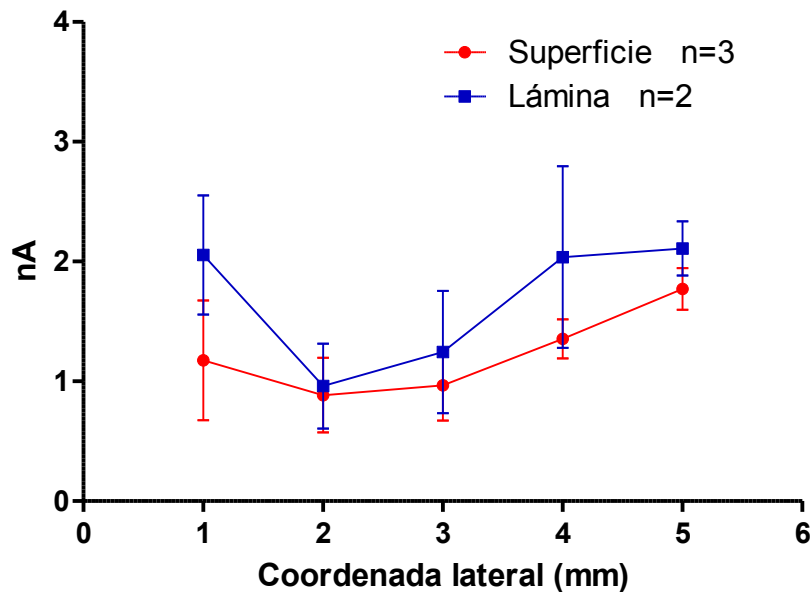


Figura 45. Perfil comparativo entre medidas de NO (nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma 3,20

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma 3,20 mm

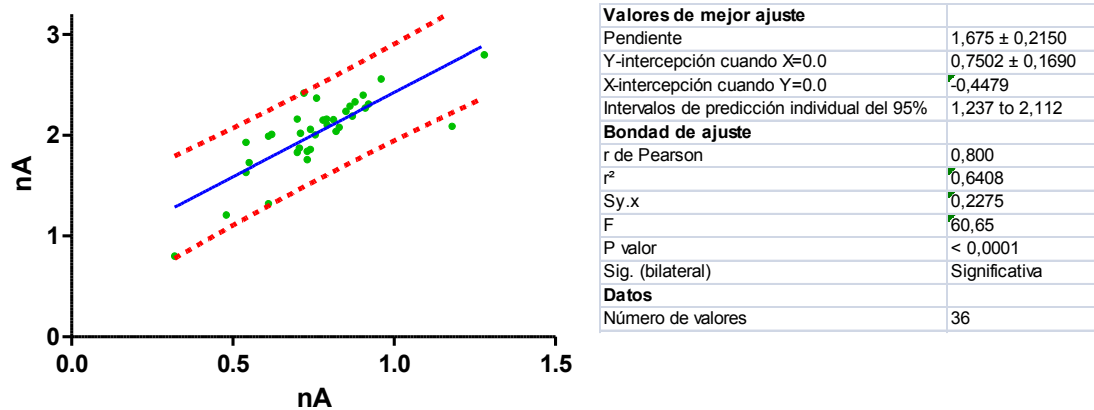


Figura 46. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma 3,20

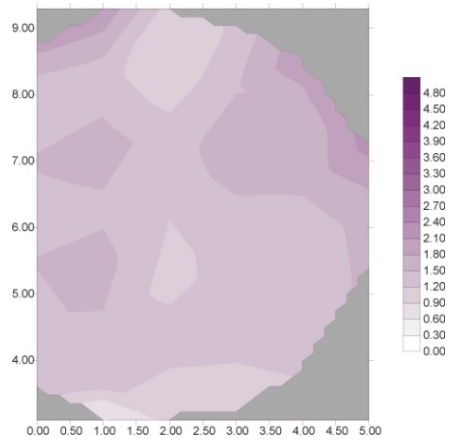


Figura 47. Distribución de NO en el corte coronal Bregma 3,20 mm

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)					
	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
0,0 - 0,5	1,653	2,055	0,960	1,244	2,037	2,109
1,0 - 1,5	1,234	1,299	0,962	1,482	1,530	1,537
2,0 - 2,5	1,536	1,617	1,367	1,686	1,530	1,489
3,0 - 3,5	1,385	1,458	1,226	1,385	1,387	
4,0 - 4,5	1,508	1,588	1,084	1,358	1,272	
5,0 - 5,5	1,422	1,429	1,331	1,245	1,227	
6,0 - 6,5	1,320	1,285	0,953	0,944		
6,5 - 7,0		0,562	0,847			

Tabla 8. Valores de NO (nA) en Bregma 3,20 mm

Bregma 1,00 mm

Comparación Superficie/Lámina Bregma 1,00 mm

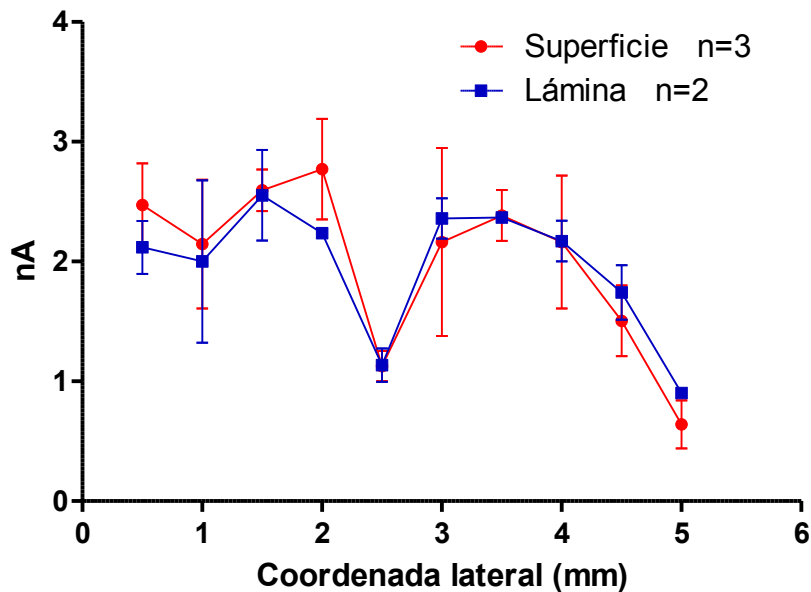


Figura 48. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma 1,00 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma 1,00 mm

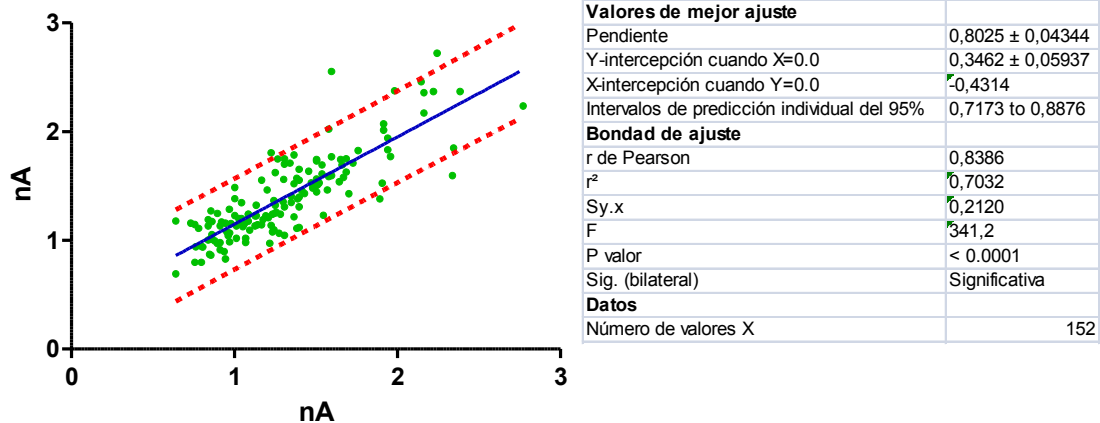


Figura 49. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma 1,00 mm.

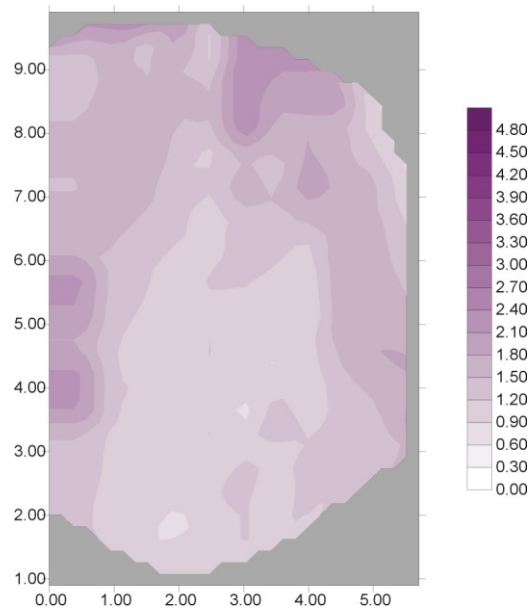


Figura 50. Imagen de distribución de NO en Bregma 1,00 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)										
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,7
0,0 – 0,5	2,118	2,459	2,553	2,237	1,135	2,360	2,368	2,171	1,743	0,902	0,761
0,5 – 1,0	1,381	1,787	1,385	1,849	1,143	2,377	2,072	2,023	1,941	1,011	
1,0 – 1,5	1,343	1,636	1,487	1,539	1,513	2,362	1,826	1,752	1,587	1,285	1,128
1,5 – 2,0	1,504	1,769	1,623	1,526	1,521	2,368	1,612	1,834	1,628	1,583	
2,0 – 2,5	1,579	1,655	1,702	1,428	1,143	1,530	1,349	2,015	1,711	1,602	1,431
2,5 – 3,0	1,475	1,731	1,748	1,217	1,258	1,694	1,480	1,595	1,711	1,678	
3,0 – 3,5	1,589	1,806	1,555	1,309	1,044	1,324	1,298	1,151	1,752	1,754	1,865
3,5 – 4,0	1,674	1,570	1,271	1,230	1,135	1,264	1,197	0,995	1,743	1,789	
4,0 – 4,5	2,185	1,346	1,248	1,046	1,225	1,201	1,150	0,913	1,694	1,808	1,967
4,5 – 5,0	2,081	1,324	1,192	1,099	1,160	1,176	0,896	1,094	1,554	1,678	1,637
5,0 – 5,5	1,759	1,239	1,135	1,138	1,209	1,151	0,863	1,020	1,357	1,450	
5,5 – 6,0	2,166	1,173	1,158	1,112	1,201	1,020	1,242	1,003	1,308	1,222	
6,0 – 6,5	2,156	1,229	1,169	1,079	1,127	0,798	1,464	1,192	1,242		
6,5 – 7,0	1,447	1,154	1,112	1,118	1,225	1,053	0,979	1,431	1,225		
7,0 – 7,5	1,438	1,078	1,146	1,066	0,938	1,406	0,872	1,431			
7,5 – 8,0	1,333	1,012	1,180	0,974	1,135	1,242	0,970				
8,0 – 8,5	1,333	0,946	0,942	0,829	1,020	1,242	0,970				
8,5 – 9,0		0,946	0,942	0,980	1,020						
9,0 – 9,5				0,980							

Tabla 9. Valores de NO (nA) en Bregma 1,00 mm

Bregma -1,30 mm

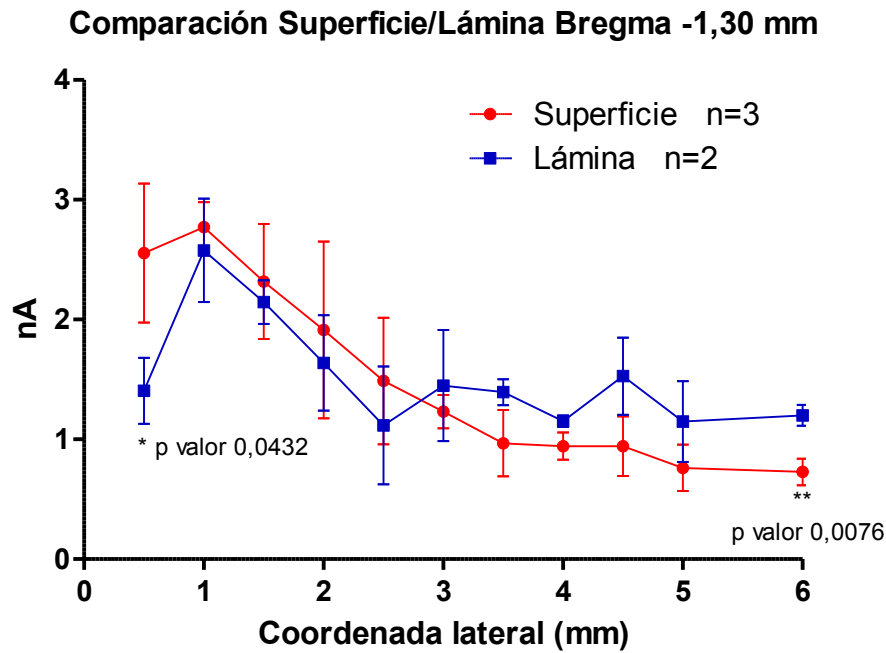


Figura 51. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -1,30 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas, excepto en la coordenada lateral 0,5 mm y 6,0 mm que si tienen diferencias significativas ($p < 0,05$) aunque conservan el mismo perfil.

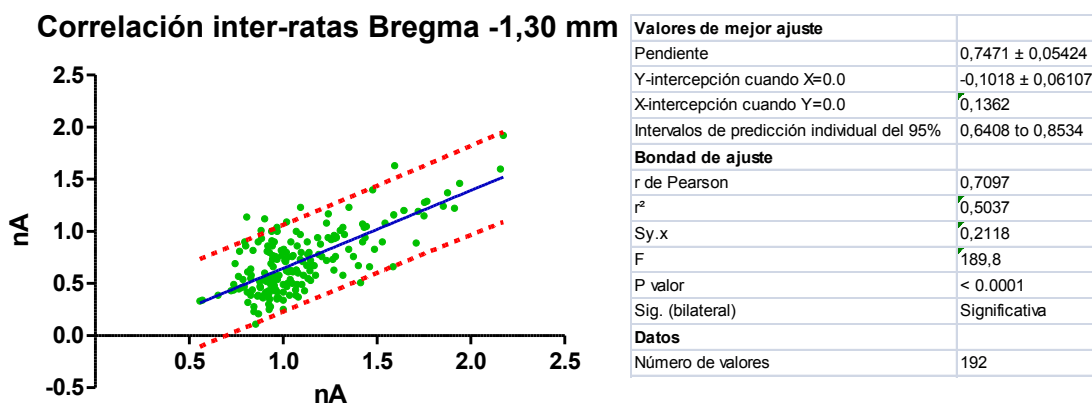


Figura 52. Correlación entre datos de N (nA) inter-ratas para Bregma -1,30 mm.

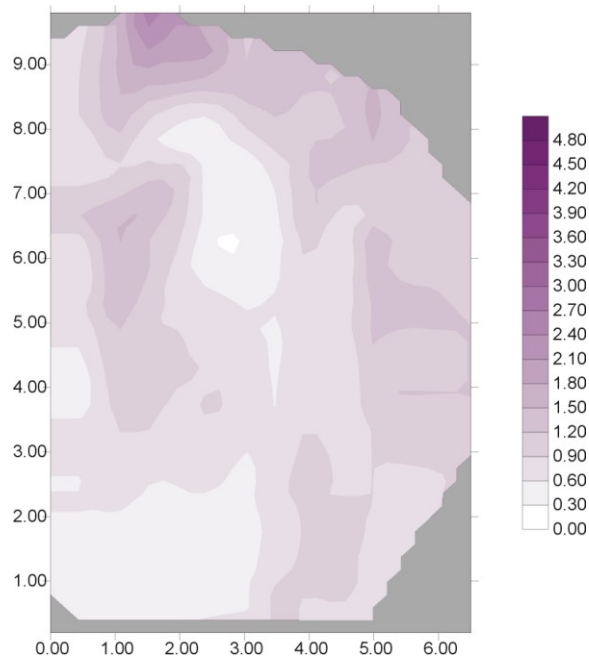


Figura 53. Imagen de distribución de NO en Bregma -1,30 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)											
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,5
0,0 - 0,5	0,763	1,405	2,577	2,146	1,637	1,117	1,449	1,394	1,150	1,527	1,148	1,200
0,5 - 1,0	0,852	1,416	2,190	1,958	1,880	1,195	1,261	1,217	1,217	1,622	1,185	
1,0 - 1,5	0,896	1,504	1,648	1,648	1,360	1,261	1,272	1,073	1,150	1,517	1,106	1,012
1,5 - 2,0	0,896	1,449	1,040	0,730	0,575	0,885	1,018	1,239	1,338	1,038	1,201	
2,0 - 2,5	0,586	1,206	0,642	0,398	0,332	0,420	0,675	1,261	1,029	0,885	1,064	1,211
2,5 - 3,0	0,830	0,885	1,106	1,161	0,376	0,343	0,564	1,261	0,664	1,422	0,964	
3,0 - 3,5	1,217	1,294	1,537	1,084	0,431	0,288	0,487	1,018	0,575	1,375	1,322	1,211
3,5 - 4,0	0,719	1,571	1,217	0,929	0,278	0,310	0,564	0,774	0,675	1,238	1,190	
4,0 - 4,5	0,654	1,460	1,228	0,730	0,509	0,487	0,630	0,907	0,752	1,248	0,953	1,009
4,5 - 5,0	0,830	1,438	1,073	0,763	0,763	0,664	0,531	0,830	0,619	1,148	1,227	
5,0 - 5,5	0,630	1,217	0,962	0,929	0,730	0,785	0,542	0,962	0,597	1,101	1,017	
5,5 - 6,0	0,442	1,117	1,051	0,984	0,885	0,830	0,575	0,852	0,619	0,911	0,948	
6,0 - 6,5	0,453	1,029	1,051	0,819	0,951	0,741	0,653	0,984	0,785	0,906	0,722	
6,5 - 7,0	0,852	0,896	0,896	0,774	0,841	0,586	0,697	1,117	0,819	0,906		
7,0 - 7,5	0,586	0,774	0,664	0,630	0,675	0,520	0,807	0,984	1,040	0,837		
7,5 - 8,0	0,608	0,719	0,564	0,586	0,564	0,476	0,697	0,962	1,106	0,706		
8,0 - 8,5	0,575	0,498	0,465	0,498	0,453	0,487	0,741	1,007	1,106	0,690		
8,5 - 9,0	0,520	0,376	0,465	0,498	0,453	0,531	0,984	0,863	0,664			

Tabla 10. Valores de NO (nA) en Bregma -1,30 mm

Bregma - 3,14 mm

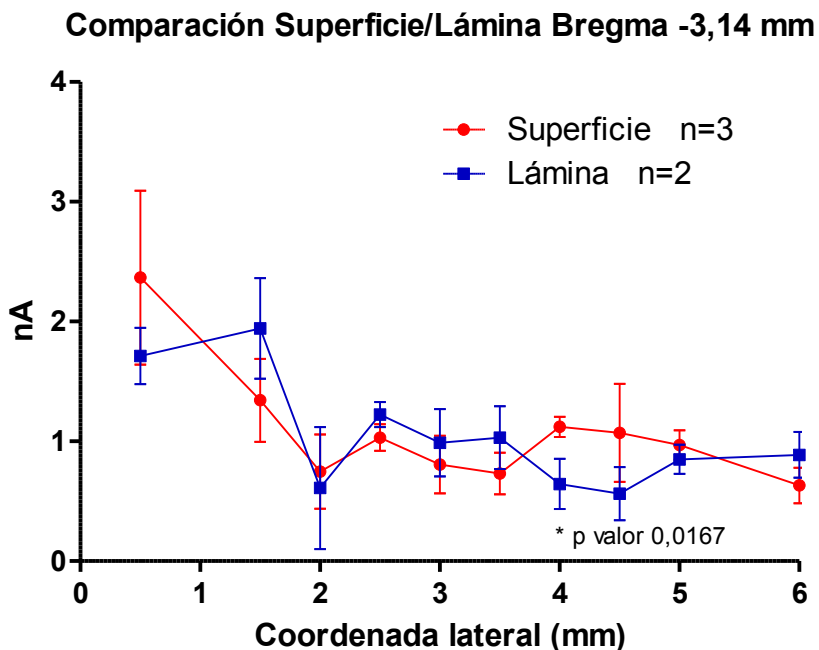


Figura 54. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -3,14 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas, excepto en la coordenada lateral 4,0 mm que si tiene diferencias significativas ($p < 0,05$).

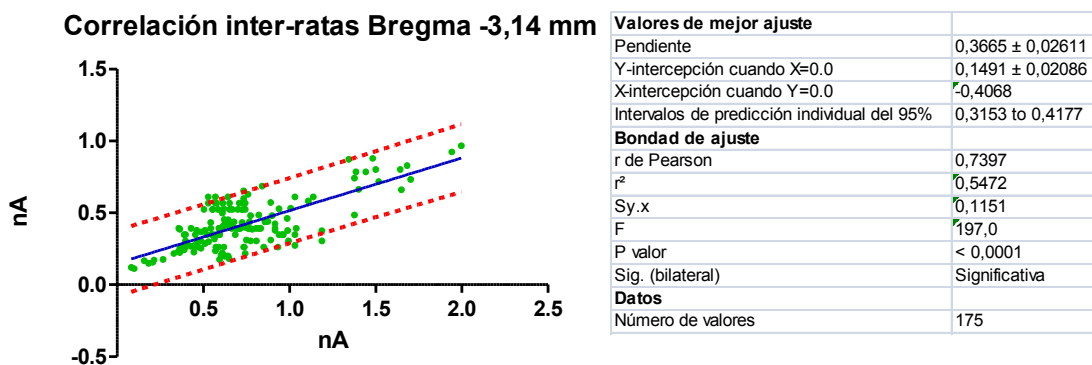


Figura 55. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -3,14 mm.

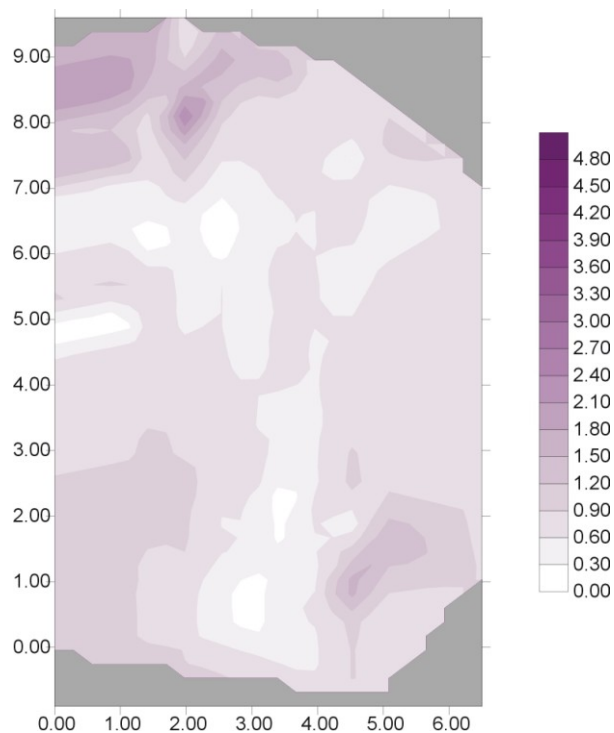


Figura 56. Imagen de distribución de NO en Bregma -3,14 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)										
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0
0,0 - 0,5	1,713	1,643	1,942	0,610	1,223	0,987	1,031	0,644	0,564	0,850	0,888
0,5 - 1,0	1,203	1,996	1,683	0,709	1,650	1,377	1,443	0,644	0,742		
1,0 - 1,5	1,582	1,138	1,386	1,501	1,402	0,825	0,841	0,821	0,726	0,957	0,818
1,5 - 2,0	0,733	1,518	0,726	1,483	0,916	0,685	0,643	0,770	0,206		
2,0 - 2,5	0,758	0,429	0,586	1,377	0,652	0,594	0,734	0,664	0,874	0,789	0,753
2,5 - 3,0	1,121	0,363	0,540	0,916	0,363	0,503	0,619	0,589	0,940		
3,0 - 3,5	1,030	0,759	0,530	0,445	0,099	0,404	0,602	0,589	0,371	0,701	0,746
3,5 - 4,0	0,807	0,940	0,624	0,462	0,214	0,487	0,701	0,621	0,445		
4,0 - 4,5	0,107	0,049	0,784	0,487	0,610	0,511	0,668	0,621	0,652	0,775	0,687
4,5 - 5,0	0,733	0,742	0,899	0,470	0,610	0,388	0,775	0,542	0,751		
5,0 - 5,5	0,544	0,759	0,808	0,652	0,660	0,429	0,734	0,569	0,891	0,751	0,776
5,5 - 6,0	0,577	0,734	0,858	0,652	0,734	0,610	0,561	0,542	0,784		
6,0 - 6,5	1,088	0,820	0,850	0,775	0,891	0,594	0,553	0,573	0,948	0,751	0,885
6,5 - 7,0	0,981	1,039	0,994	0,808	0,767	0,701	0,454	0,585	0,981		
7,0 - 7,5	1,055	1,031	1,006	0,990	0,742	0,685	0,082	0,715	0,388	1,476	
7,5 - 8,0	0,165	1,031	0,957	0,965	0,577	0,594	0,181	0,613	1,064		
8,0 - 8,5	0,717	1,109	0,916	0,932	0,643	0,511	0,363	0,554	1,724	0,742	
8,5 - 9,0		1,188	0,738	0,833	0,396	0,157	0,528	0,660	0,990		
9,0 - 9,5			0,619	0,709				0,569	0,916	0,817	

Tabla 11. Valores de NO (nA) en Bregma -3,14 mm

Bregma -5,30 mm

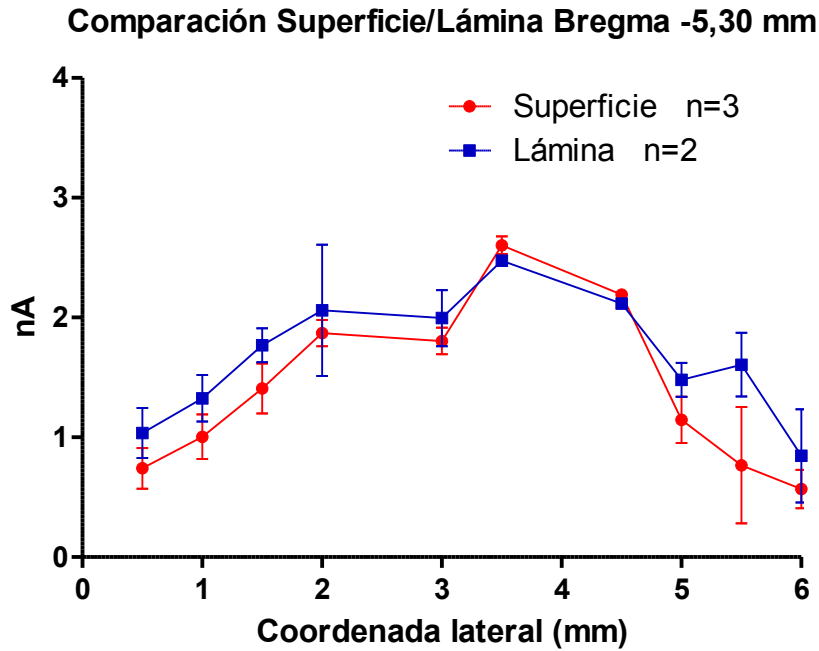
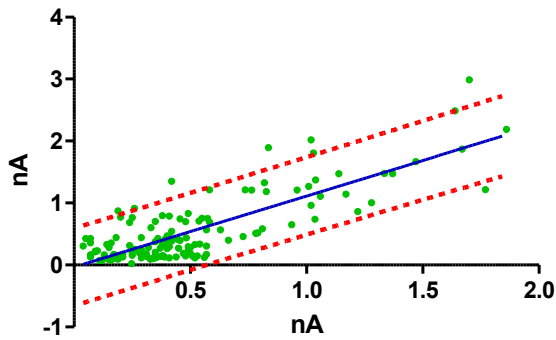


Figura 57. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -5,30 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma -5,30 mm



Valores de mejor ajuste	
Pendiente	1,147 ± 0,06930
Y-intercepción cuando X=0.0	-0,03319 ± 0,04377
X-intercepción cuando Y=0.0	0,02893
Intervalos de predicción individual del 95%	1,011 to 1,283
Bondad de ajuste	
r de Pearson	0,8146
r ²	0,6635
Sy.x	0,3162
F	274,1
P valor	< 0,0001
Sig. (bilateral)	Significativa
Datos	
Número de valores	141

Figura 58. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -5,30 mm.

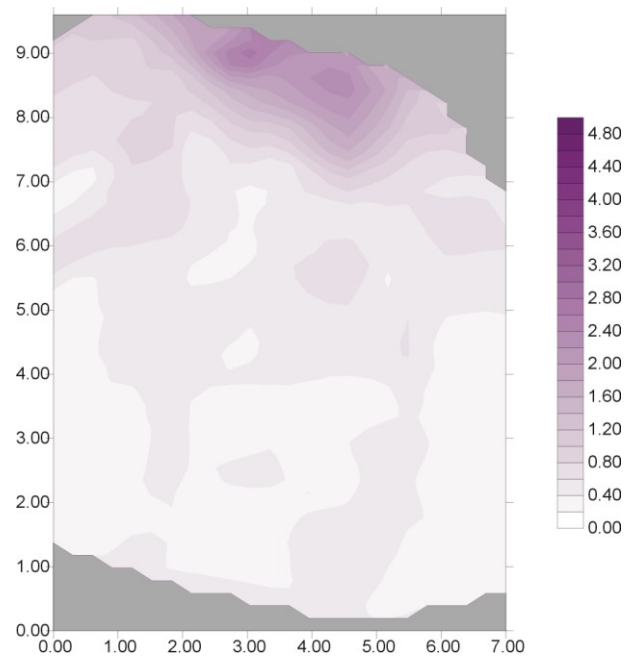


Figura 59. Imagen de distribución de NO en Bregma -5,30 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)										
	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	3,5	4,5	5,0	5,5	6,0	7,0
0,0 - 0,5	1,036	1,326	1,770	2,060	1,995	2,476	2,115	1,480	1,607	0,845	0,555
0,5 - 1,0	0,936	0,843	1,335	1,842	2,814	2,090	2,375	1,842	1,289	1,135	
1,0 - 1,5	0,782	0,850	0,827	1,172	1,616	1,788	2,067	1,552	1,063	0,691	0,619
1,5 - 2,0	0,728	0,772	0,818	0,737	1,090	1,036	1,706	1,099	0,791	0,555	
2,0 - 2,5	0,664	0,883	0,836	0,392	0,709	0,483	0,972	0,709	0,628	0,691	0,401
2,5 - 3,0	0,247	0,765	0,737	0,438	0,365	0,410	0,456	0,528	0,537	0,619	
3,0 - 3,5	0,492	0,713	0,764	0,583	0,365	0,510	0,637	0,492	0,456	0,465	0,338
3,5 - 4,0	0,791	0,635	0,583	0,564	0,311	0,537	0,845	0,347	0,592	0,401	
4,0 - 4,5	0,383	0,465	0,573	0,302	0,447	0,501	0,610	0,438	0,610	0,302	0,365
4,5 - 5,0	0,374	0,465	0,537	0,510	0,401	0,438	0,410	0,583	0,619	0,329	
5,0 - 5,5	0,347	0,530	0,456	0,519	0,365	0,438	0,401	0,392	0,465	0,338	0,338
5,5 - 6,0	0,356	0,448	0,583	0,419	0,410	0,401	0,329	0,320	0,428	0,365	
6,0 - 6,5	0,347	0,354	0,483	0,383	0,320	0,392	0,374	0,610	0,474	0,302	0,365
6,5 - 7,0	0,329	0,342	0,447	0,383	0,383	0,401	0,320	0,474	0,419	0,365	0,365
7,0 - 7,5	0,338	0,360	0,456	0,383	0,428	0,410	0,392	0,401	0,428	0,365	
7,5 - 8,0	0,383	0,383	0,410	0,347	0,347	0,347	0,583	0,501	0,347	0,365	
8,0 - 8,5	0,329	0,354	0,392	0,347	0,365	0,374	0,528	0,410	0,347	0,365	
8,5 - 9,0	0,329	0,560	0,374	0,356		0,374	0,474	0,338	0,347		
9,0 - 9,5		0,454					0,474				

Tabla 12. Valores de NO (nA) en Bregma -5,30 mm

Bregma -6,80 mm

Comparación Superficie/Lámina Bregma -6,80 mm

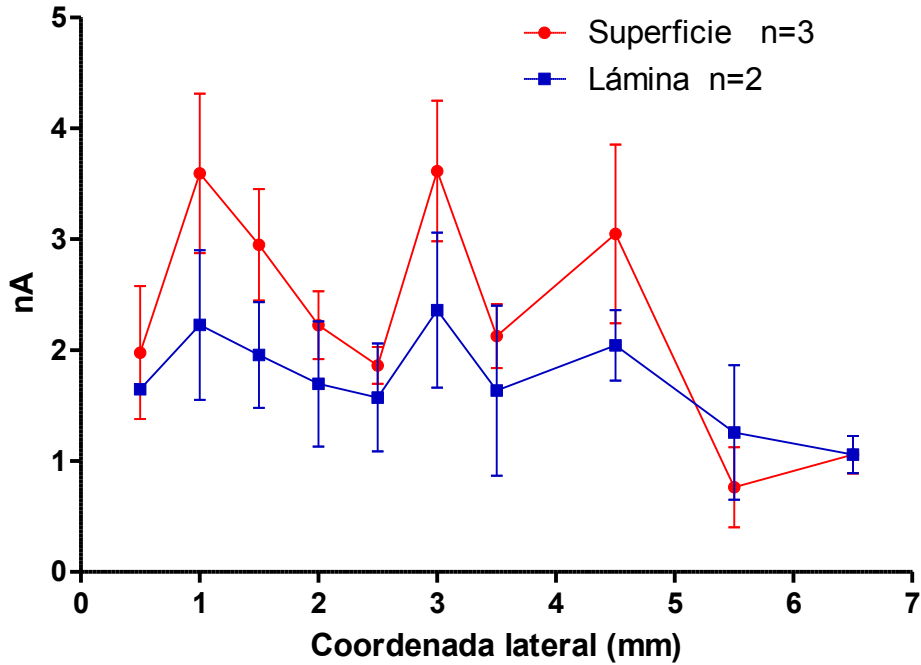
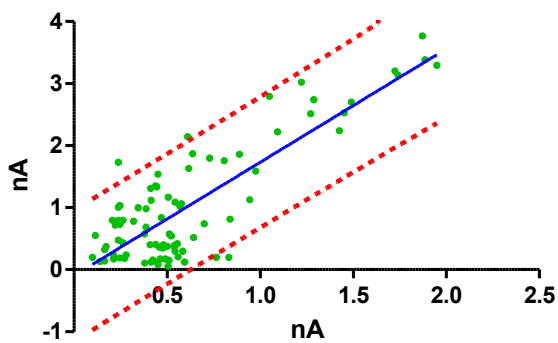


Figura 60. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -6,80 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias.

Correlación inter-ratas Bregma -6,80 mm



Valores de mejor ajuste	
Pendiente	1,827 ± 0,1302
Y-intercepción cuando X=0.0	-0,09653 ± 0,09699
X-intercepción cuando Y=0.0	0,05282
Intervalos de predicción individual del 95%	1,568 to 2,087
Bondad de ajuste	
r de Pearson	0,8358
r ²	0,6986
Sy.x	0,5236
F	197,0
P valor	< 0,0001
Sig. (bilateral)	Significativa
Datos	
Número de valores	107

Figura 61. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -6,80 mm.

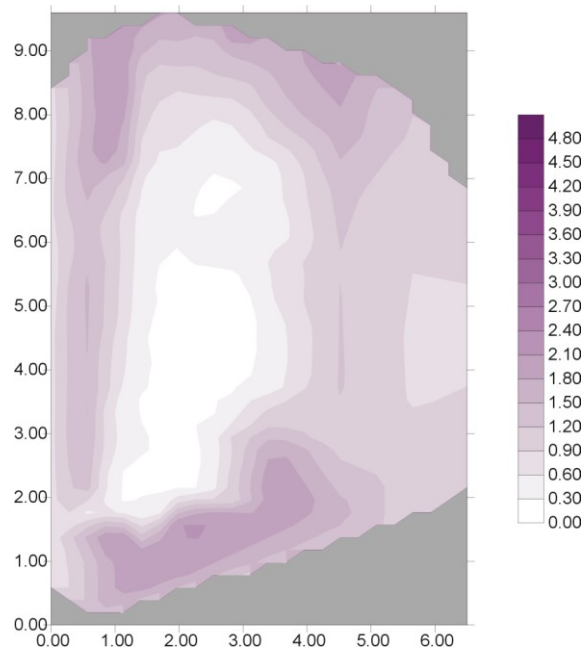


Figura 62. Imagen de distribución de NO en Bregma -6,80 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,5	5,5	6,5
0,0 - 0,5	1,648	2,226	1,955	1,695	1,573	2,360	1,635	2,042	1,257	1,058
0,5 - 1,0		2,284	1,461	1,487	1,355	1,520	1,579			
1,0 - 1,5	1,515	2,384	1,024	1,069	1,106	1,047	1,388	1,707	1,165	0,924
1,5 - 2,0		2,164	0,898	0,677	0,619	0,660	1,009			
2,0 - 2,5	1,693	2,069	0,652	0,652	0,397	0,471	0,520	1,316	0,950	0,887
2,5 - 3,0		1,322	0,512	0,421	0,273	0,273	0,495			
3,0 - 3,5	1,411	0,996	0,413	0,339	0,257	0,512	0,397	1,198	0,898	0,880
3,5 - 4,0		1,021	0,355	0,331	0,504	0,463	0,677			
4,0 - 4,5	1,618	0,987	0,322	0,240	0,240	0,248	0,644	1,219	0,876	0,958
4,5 - 5,0		0,972	0,281	0,298	0,224	0,158	0,479			
5,0 - 5,5	1,589	0,809	0,232	0,232	0,207	0,182	0,446	1,233	0,883	1,032
5,5 - 6,0		0,750	0,257	0,281	0,224	0,240	0,504			
6,0 - 6,5	1,618	0,471	0,232	0,298	0,298		1,143	1,098	1,032	
6,5 - 7,0		0,537	0,265	0,298	0,298		1,916			
7,0 - 7,5	1,470	0,289	0,274	0,224	0,224		2,156	1,619	1,032	
7,5 - 8,0		0,273	0,258	0,306	0,306		2,042			
8,0 - 8,5	1,156	2,276	0,520	2,108	2,108					
8,5 - 9,0		1,904	1,837	2,108						
9,0 - 9,5		1,904	1,904							

Tabla 13. Valores de NO (nA) en Bregma -6,80 mm

Bregma -8.80 mm

Comparación Superficie/Lámina Bregma -8,80 mm

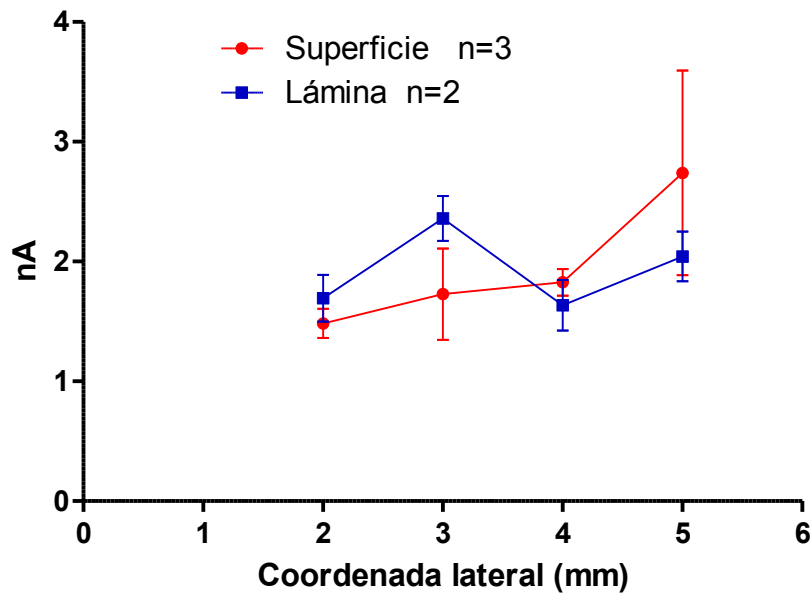


Figura 63. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -8,80 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma -8,80 mm

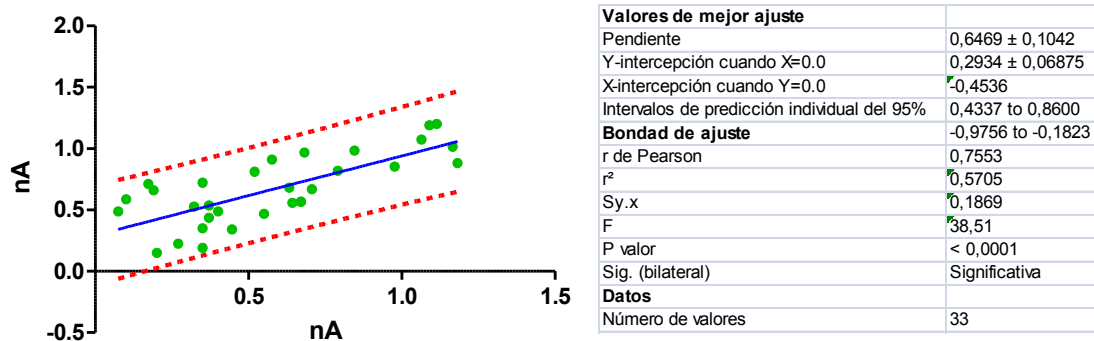


Figura 64. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -8,80 mm.

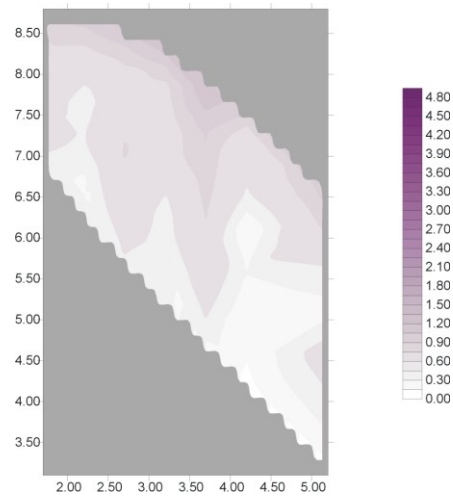


Figura 65. Imagen de distribución de NO en Bregma -8,80 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)						
	1,7	2,2	2,7	3,2	3,7	4,2	5,2
0,0 - 0,5	0,791	0,976	1,090	1,181	1,166	0,958	1,002
0,5 - 1,0	0,711	0,656	0,713	0,715	0,923	0,519	0,802
1,0 - 1,5	0,673	0,355	0,682	0,633	0,845	0,468	0,401
1,5 - 2,0	0,552	0,451	0,764	0,615	0,765	0,156	0,245
2,0 - 2,5	0,373	0,273	0,706	0,406	0,670	0,315	0,579
2,5 - 3,0			0,607	0,355	0,559	0,182	0,445
3,0 - 3,5			0,358	0,211	0,377	0,171	0,289
3,5 - 4,0						0,090	0,067

Tabla 14. Valores de NO (nA) en Bregma -8,80 mm

Bregma -11,00 mm

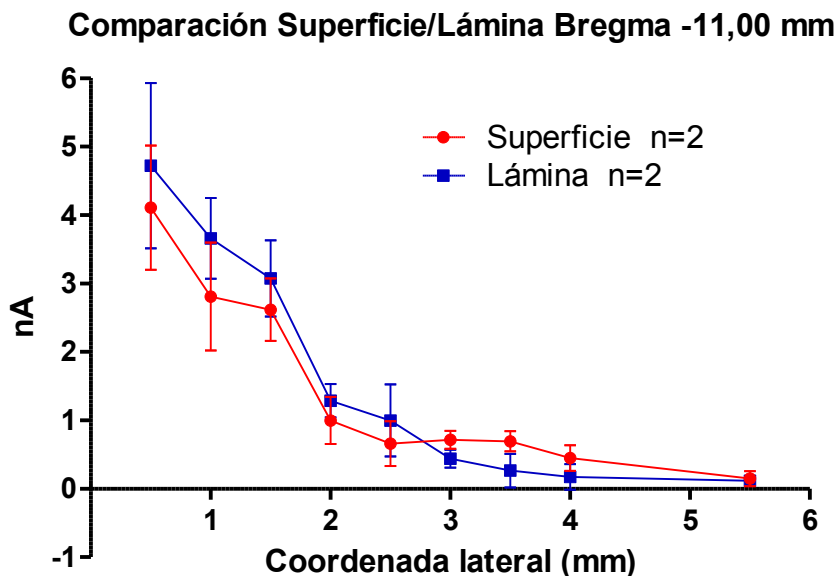


Figura 66. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -11,00 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma -11,00 mm

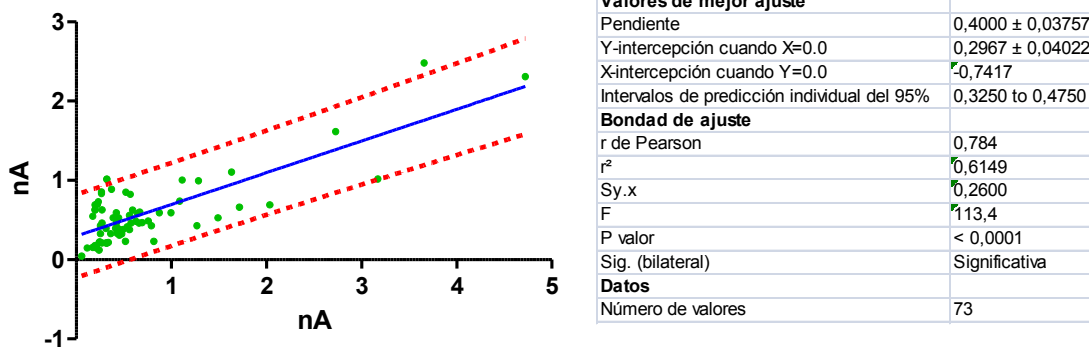


Figura 67. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -11,00 mm.

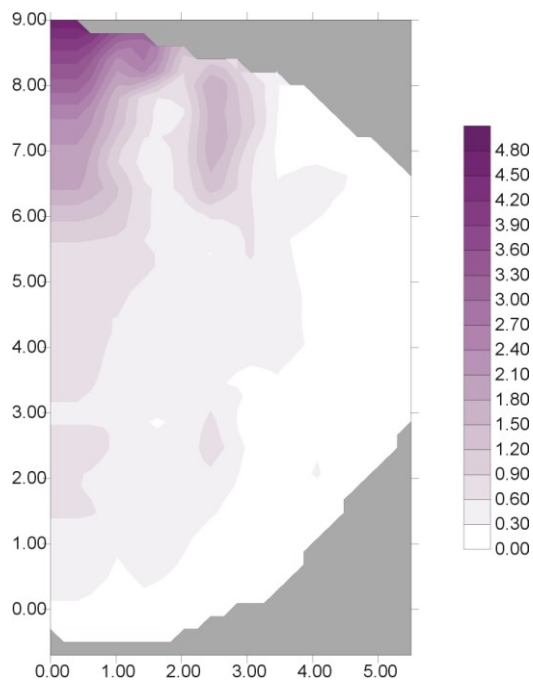


Figura 68. Imagen de distribución de NO en Bregma -11,00 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	5,5	
	0,0 - 0,5	4,721	3,658	3,073	1,285	0,997	0,437	0,264	0,173	0,115
0,5 - 1,0	3,815	2,307	2,727	0,816	1,911	1,005	0,247	0,189		
1,0 - 1,5	3,172	1,631	0,585	0,478	1,714	1,112	0,198	0,222	0,115	
1,5 - 2,0	2,365	1,425	0,568	0,684	1,813	0,684	0,255	0,437		
2,0 - 2,5	2,035	0,873	0,404	0,626	1,491	0,643	0,321	0,321	0,115	
2,5 - 3,0	1,920	1,269	0,577	0,478	0,626	0,676	0,338	0,206		
3,0 - 3,5	1,269	1,088	0,577	0,437	0,272	0,667	0,371	0,231	0,115	
3,5 - 4,0	0,791	0,610	0,659	0,395	0,445	0,428	0,428	0,239		
4,0 - 4,5	0,791	0,692	0,486	0,494	0,338	0,363	0,412	0,264	0,115	
4,5 - 5,0	0,626	0,593	0,420	0,461	0,395	0,330	0,313	0,198		
5,0 - 5,5	0,816	0,478	0,305	0,494	0,321	0,239	0,272	0,222		
5,5 - 6,0	0,758	0,354	0,560	0,305	0,667	0,099	0,198	0,297		
6,0 - 6,5	0,519	0,560	0,247	0,428	0,758	0,247	0,198	0,321		
6,5 - 7,0	0,741	0,568	0,470	0,412	0,544	0,189	0,206	0,231		
7,0 - 7,5	0,593	0,453	0,445	0,536	0,313	0,173	0,255	0,198		
7,5 - 8,0	0,659	0,519	0,437	0,354	0,165	0,165	0,222			
8,0 - 8,5	0,387	0,313	0,420	0,272	0,255	0,198				
8,5 - 9,0	0,470	0,222	0,305	0,058						
9,0 - 9,5	0,239	0,214	0,173							

Tabla 15. Valores de NO (nA) en Bregma -11,00 mm

Bregma -12,30 mm

Comparación Superficie/Lámina Bregma -12,30 mm

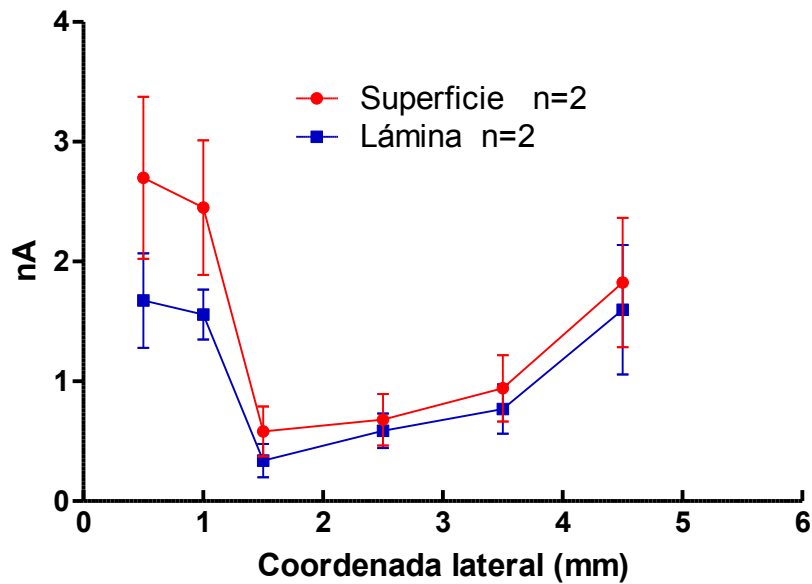
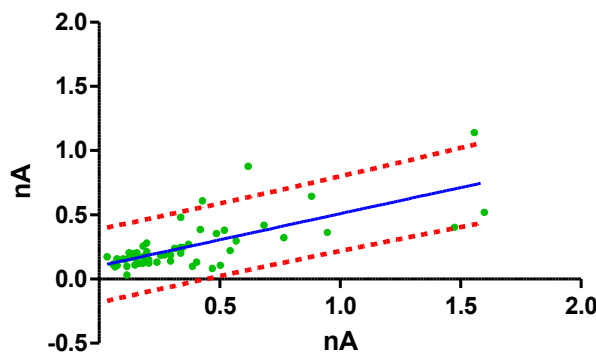


Figura 69. Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -12,30 mm

En el análisis t-test de una cola de datos no apareados de las medias de cada coordenada lateral no se observan diferencias significativas.

Correlación inter-ratas Bregma -12,30 mm



Valores de mejor ajuste	
Pendiente	0,4068 ± 0,05364
Y-intercepción cuando X=0.0	0,1021 ± 0,02700
X-intercepción cuando Y=0.0	-0,2511
Intervalos de predicción individual d:	0,2991 to 0,5144
Bondad de ajuste	
r de Pearson	0,7181
r ²	0,5157
Sy.x	0,1396
F	57,50
P valor	< 0,0001
Sig. (bilateral)	Significativa
Datos	
Número de valores	56

Figura 70. Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -12,30 mm.

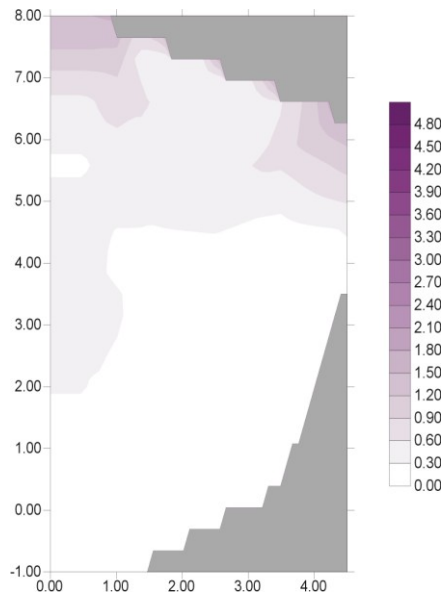


Figura 71. Imagen de distribución de NO en Bregma -12,30 mm.

VERTICAL (mm)	LATERAL (mm)					
	0,5	1,0	1,5	2,5	3,5	4,5
0,0 - 0,5	1,675	1,557	0,338	0,587	0,768	1,598
0,5 - 1,0	1,285	1,219				
1,0 - 1,5	0,766	0,882	0,618	0,313	0,684	0,947
1,5 - 2,0	0,470	0,766				
2,0 - 2,5	0,346	0,486	0,428	0,544	0,239	0,297
2,5 - 3,0	0,247	0,527				
3,0 - 3,5	0,404	0,519	0,272	0,206	0,181	0,157
3,5 - 4,0	0,461	0,264	0,148			
4,0 - 4,5	0,470	0,206	0,157	0,148	0,181	
4,5 - 5,0	0,503	0,330				
5,0 - 5,5	0,503	0,338	0,124	0,074	0,033	
5,5 - 6,0	0,437	0,247	0,198			
6,0 - 6,5	0,297	0,255	0,173	0,115	0,058	
6,5 - 7,0	0,272	0,214	0,124		0,058	
7,0 - 7,5	0,198	0,165	0,115	0,115		
7,5 - 8,0	0,222	0,157	0,074			
8,0 - 8,5	0,198	0,148	0,074	0,115		
8,5 - 9,0	0,140	0,148				
9,0 - 9,5	0,140					

Tabla 16. Valores de NO (nA) en Bregma -12,30 mm

Los datos de las 9 láminas muestreadas, generan 1.300 datos de concentraciones de NO distribuidas en la extensión del cerebro desde la posición bregma + 3,20 hasta bregma -12,30.

Para elaborar la Distribución 3D hemos integrado los valores de los nueve cortes, dando de esa manera tres situaciones en coordenadas tridimensionales: Posición Bregma (z), Lateral (x) y Vertical (y), obteniéndose una estructura tridimensional. La integración se ha realizado con el programa Autodesk® 3D Studio.

Para resaltar las diferencias entre valores bajos y altos de NO hemos elegido dos colores extremos: azul para valores bajo y rojo para valores altos.



Figura 72. Imagen anteroposterior en 3D de distribución de NO



Figura 73. Imagen lateral en 3D de distribución de NO

Estas imágenes se pueden desplegar en los tres ejes: Lateral, Horizontal y Coronal, lo que nos permite disponer una visión del entorno de cualquier coordenada para cada área específica.

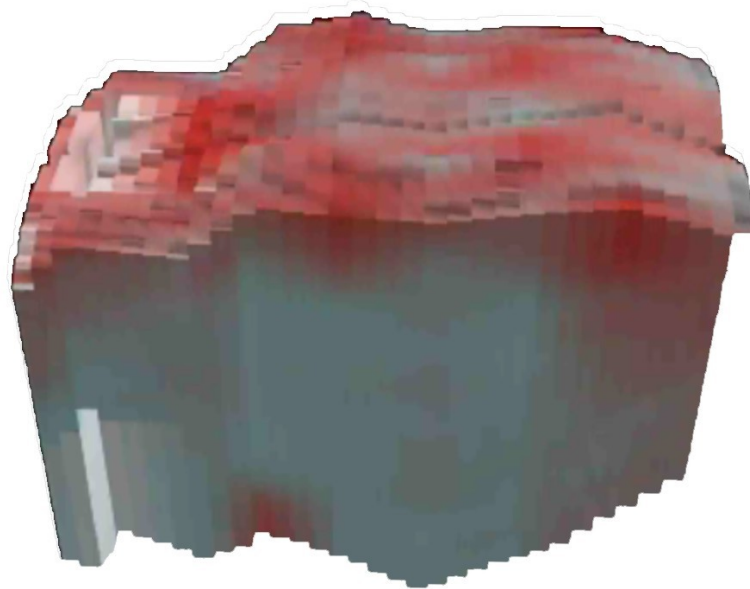


Figura 74. Imagen del despliegue lateral en 3D de distribución de NO

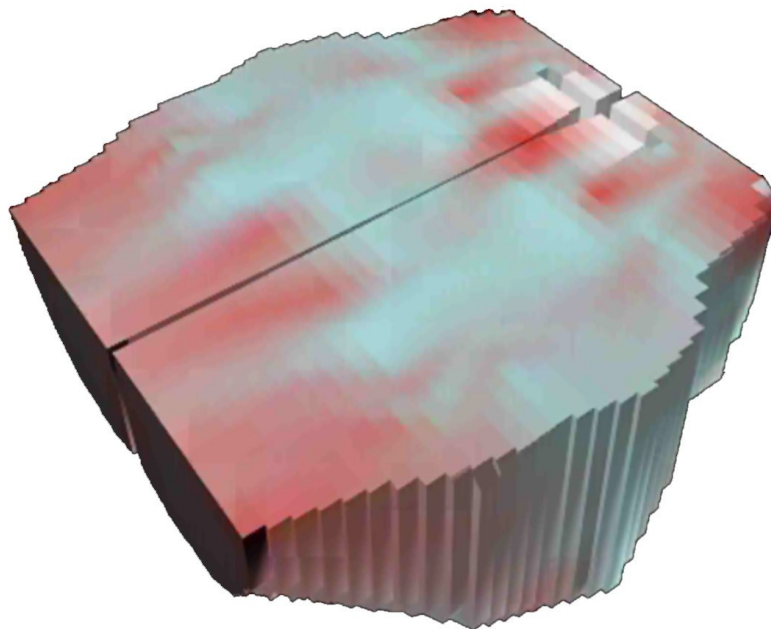


Figura 75. Imagen del despliegue horizontal en 3D de distribución de NO

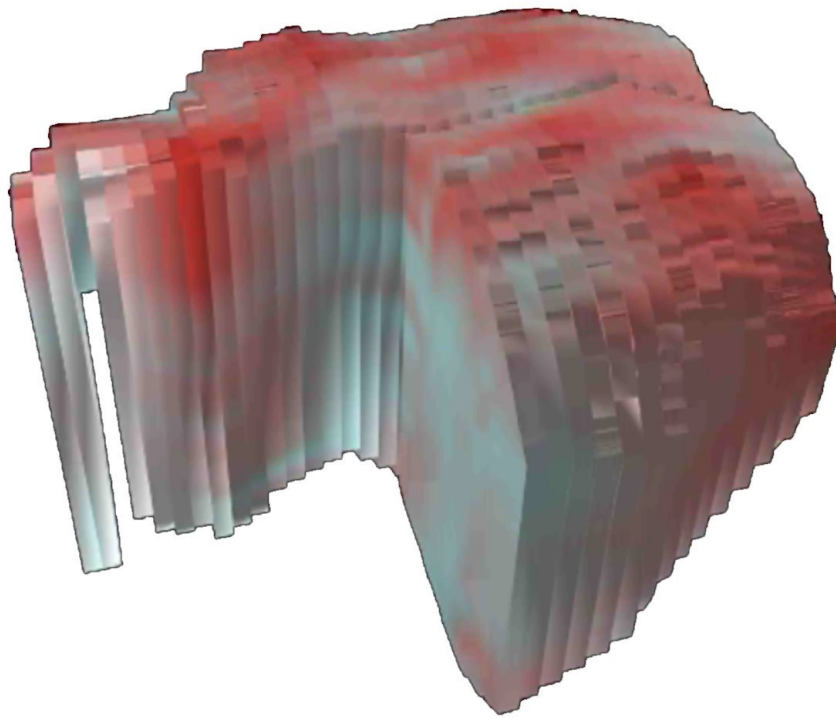


Figura 76. Imagen del despliegue coronal en 3D de distribución de NO

IV 6 COMPARACIÓN ENTRE ACTIVIDAD DIAFORASA Y NO EXTRACELULAR: JUSTIFICACIÓN FISIOLÓGICA Y FUNCIONAL

Como ya hemos expuesto anteriormente, la concentración extracelular de NO depende de la activación de la NOS y de otros factores (FMD, BH4, L-arginina, etc.....). Por tanto, no necesariamente en condiciones basales, la presencia de NOS debe implicar mayor concentración de NO. Por todo ello, planteamos este experimento cuyo objetivo es contrastar la distribución de la actividad enzimática de las isoformas comprometidas en la síntesis de NO y la concentración extracelular de NO.

En 1964, Thomas y Pearse describieron histoquímicamente por primera vez la presencia de neuronas contenedoras de actividad diaforasa. A partir de este momento, otros estudios se han enfocado en grupos específicos de células NADPH-diaforasa positivos. Sin embargo, la descripción de la distribución completa de estas neuronas en el cerebro de rata se debe a los trabajos de Vincent y Kimura en 1992 y de Rodrigo y colaboradores en 1994.

Para nuestro trabajo, se ha montado una imagen doble donde colocamos a la izquierda los cortes coronales seriado de 40 μm de grosor tratados con una tinción histoquímica de NADPH-diaforasa descrita anteriormente. En la derecha de la imagen, colocamos las láminas de la distribución de NO obtenida en el programa Surfer®, donde se han normalizado los colores para acercarlos al de la tinción histoquímica de NADPH-diaforasa.

Para poder delimitar y comparar áreas similares, le superponemos los dibujos coronales de los Atlas de de Karl Zilles o de Paxino y Watson que están enmarcados en coordenadas verticales y laterales.

Para cuantificar la intensidad de color, hemos utilizado la valoración del histograma del programa CorelDRAW que registra los valores de brillo de los píxeles de una imagen en una escala de 0 (oscuro) a 255 (claro). Aceptamos como el valor de la Media el que muestra la distribución media del brillo de los píxeles. Para cada área delimitada por el correspondiente atlas, se obtienen una pareja de datos (NADPH-diaforasa y NO).

De esta manera obtenemos dos series de datos: una para las tinciones histoquímicas y otra para los valores de NO. Para poder compararlas, teniendo en cuenta que los datos proceden de procesos diferentes, hemos segmentado cada serie en 5 intervalos, reasignando un valor de marca para cada intervalo que va desde 1 a 5 acorde con

cinco niveles de mayor a menor intensidad de color y por tanto de actividad enzimática o de concentración de NO en cada caso.

Para establecer la concordancia entre las áreas estudiadas calculamos las diferencias entre las marcas de cada pareja de datos de tal manera que a menor diferencia existe mayor concordancia. La tabla muestra las correspondientes concordancias para cada diferencia posible.

Diferencia	Concordancia
0	Muy alta
1 o -1	Alta
2 o -2	Media
3 o -3	Baja
4	Muy baja

Tabla 17. Tipo de Concordancia para las diferencias de marcas.

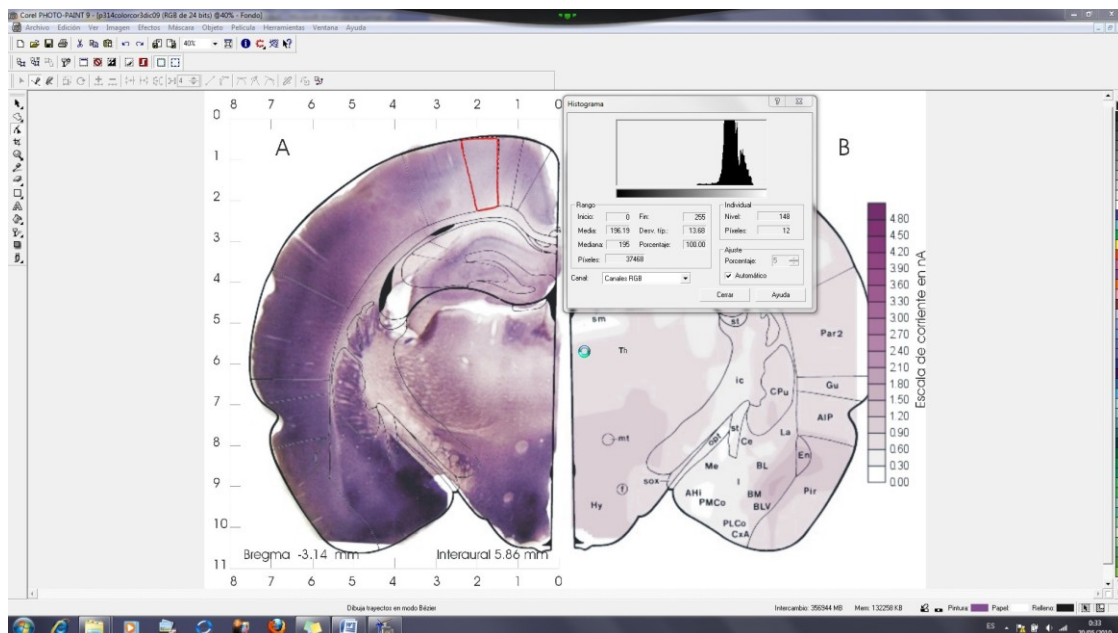


Figura 77. Tratamiento de cuantificación de la intensidad de color con CorelDRAW.

Para cada corte cortical estudiado obtenemos una tabla de concordancia donde expresamos los siguientes conceptos:

Abr.: Abreviatura asignada a cada estructura en el Atlas estereotáxico.

Área: Estructura definidas por los autores de los Atlas estereotáxicos.

mNO: Marca correspondiente al valor del histograma de cada área en la lámina de los valores de NO.

mDIA: Marca correspondiente al valor del histograma de cada área en la lámina de la tinción histoquímica de NADPH-diaforasa

Dif.: Diferencia entre mNO y mDIA

Concor.: Concordancia para la diferencia obtenida

Seguidamente describimos para cada corte coronal las imágenes comparativas entre la tinción histoquímica y la generada con los datos de NO. Así mismo, se muestra la tabla de concordancia correspondiente en la que destacamos las áreas donde se detectan discordancia entre niveles de NADPH-diaforas y de NO (concordancias baja o muy baja). A modo de análisis, al final de la tabla destacamos: 1) Número de áreas comparadas en el corte ya sea individualmente o agrupadas al no estar perfectamente definidos sus límites, y 2) Número de áreas consideradas discordantes.

CORTE CORONAL EN BREGMA 3,20 mm O INTERAURAL 12,20 mm

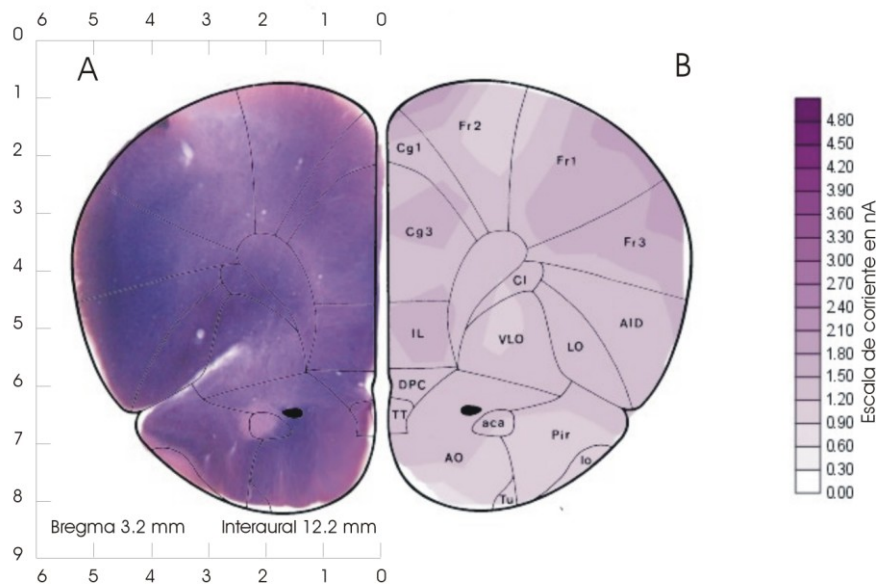


Figura 78. Corte Coronal en Bregma 3,20 mm o interaural 12,00 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
Cg1	Cortex cingular, área 1 (corteza media prefrontal)	3	3	0	Muy alta
Cg3	Cortex cingular, área 3 (corteza media prefrontal)	3	3	0	Muy alta
Fr1	Corteza frontal, área 1	3	3	0	Muy alta
aca	Comisura anterior, parte anterior	4	3	1	Alta
cc	Cuerpo caloso	4	3	1	Alta
CI	Claustro	4	2	2	Media
Fr2	Corteza frontal, área 2	4	3	1	Alta
Fr3	Corteza frontal, área 3	3	2	1	Alta
IL	Área infralímbica	3	2	1	Alta
lo	Tracto olfatorio lateral	4	3	1	Alta
VLO	Área orbital ventrolateral	4	3	1	Alta
AID	Cortex agranular insular, parte dorsal	4	2	2	Media
AO	Núcleo olfatorio anterior	4	2	2	Media
DPC	Corteza dorsal pedúncular	4	2	2	Media
LO	Área orbital lateral	4	2	2	Media
Pir	Corteza prepiriforme	4	2	2	Media
TT	Tenia tecta	4	2	2	Media
Tu	Tubérculo olfatorio	4	2	2	Media

N° de áreas descritas en el corte	18
N° de áreas consideradas discordantes	0

Tabla 18. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma 3,20 mm

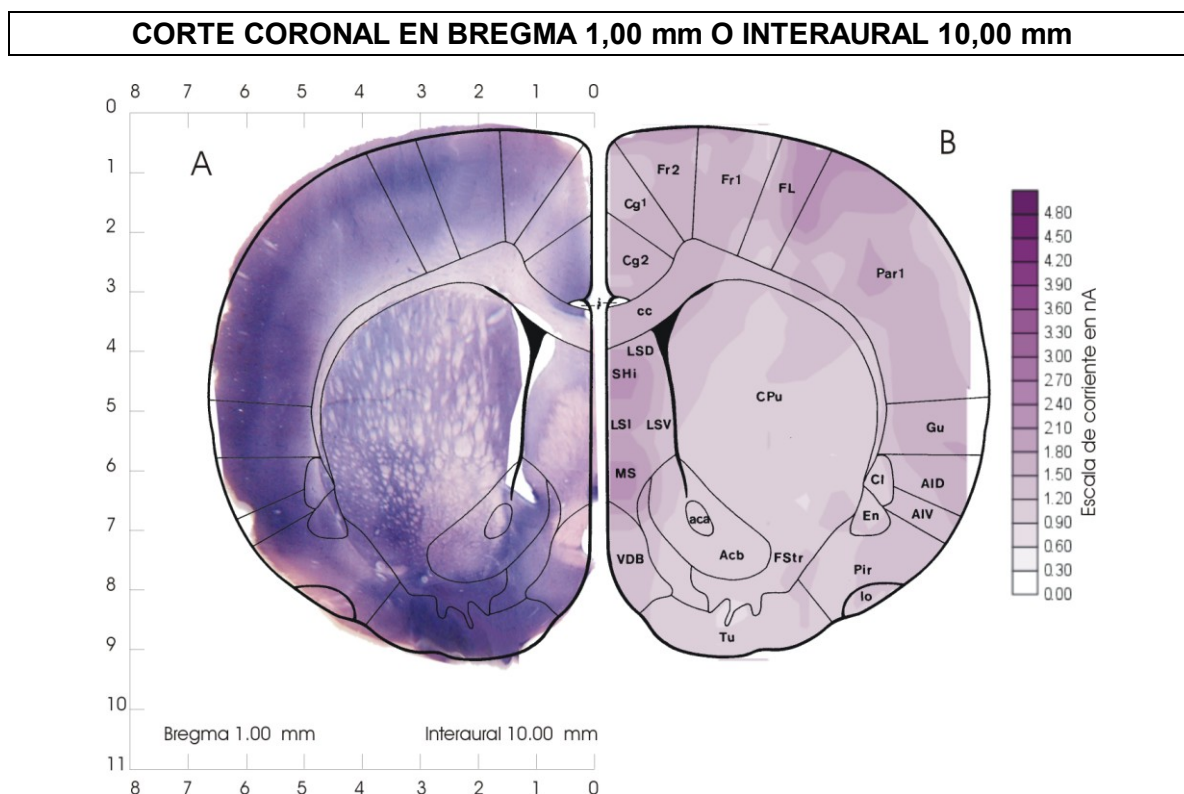


Figura 79. Corte Coronal en Bregma 1,00 mm o interaural 10,00 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
Cg1	Cortex cingular, área 1 (corteza media prefrontal)	3	5	-2	Medio
Fr2	Corteza frontal, área 2	2	4	-2	Medio
Fr1	Corteza frontal, área 1	3	4	-1	Alto
Cg2	Cortex cingular, área 2 (corteza media prefrontal)	2	4	-2	Medio
FL	área forelimbica	1	3	-2	Medio
Par1	Corteza parietal, área 1	2	2	0	Muy alto
cc	Cuerpo caloso	3	5	-2	Medio
LSD,LSI,LSV Shi MS	Núcleo septal lateral, parte dorsal, parte intermedia, parte ventral Núcleo septal hipocampal Núcleo septal medial	1	4	3	Bajo
VDB	Núcleo del brazo vertical de la banda diagonal de Broca	3	4	-1	Alto
aca	Comisura anterior, parte anterior	5	4	1	Muy alto
Acb	Núcleo accumbens	5	3	2	Medio
Tu	Tubérculo olfatorio	5	1	4	Muy bajo
FStr	Fundus striati	4	1	3	Muy alto
Cpu	Caudado putamen, estriado	5	4	1	Alto
Gu	Corteza gustativa	2	1	1	Alto
AID	Cortex agranular insular, parte dorsal	2	1	1	Alto
AIV	Cortex agranular insular, parte ventral	3	1	2	Medio
Cl	Claustro	5	3	2	Medio
En	Núcleo endopiriforme	4	2	2	Medio
Pir	Corteza prepiriforme	4	2	2	Medio
lo	Tracto olfatorio lateral	4	4	0	Muy alto

Nº de áreas comparadas en el corte (individualmente o agrupadas)	21
Nº de áreas consideradas discordantes	2

Tabla 19. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma 1,00 mm

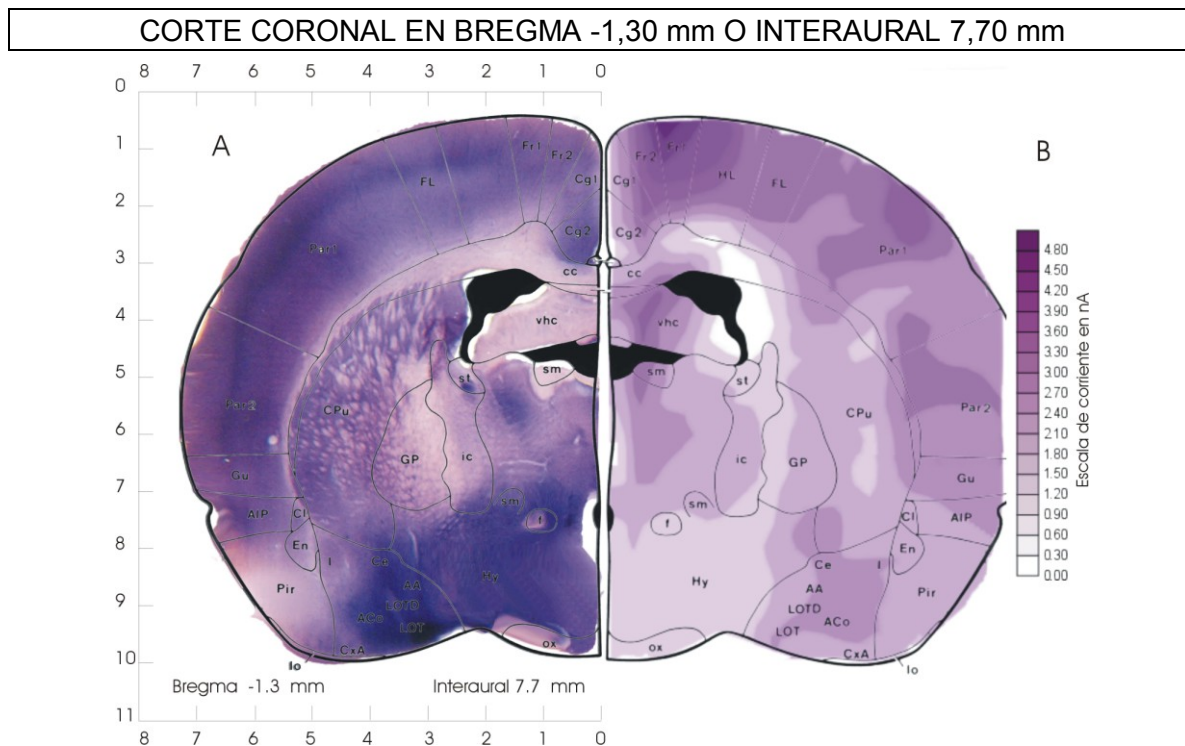


Figura 80. Corte Coronal en Bregma -1,30 mm o interaural 7,70 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
Cg1	Cortex cingular, área 1 (corteza media prefrontal)	2	3	-1	Alto
Fr2	Corteza frontal, área 2	1	2	-1	Alto
Fr1	Corteza frontal, área 1	1	2	-1	Alto
Cg2	Cortex cingular, área 2 (corteza media prefrontal)	3	2	1	Alto
HL	Área hinlimbica	1	2	-1	Alto
FL	área forelimbica	2	2	0	Muy alto
Par1	Corteza parietal, área 1	2	1	1	Alto
cc	Cuerpo caloso	5	5	0	Muy alto
vhc	Comisura hipocampal ventral	3	5	-2	Medio
st	Estría terminal	5	3	2	Medio
ic	Colículo inferior	5	4	1	Alto
GP	Globo pálido	4	4	0	Muy alto
Cpu	Caudado putamen, estriado	4	3	1	Alto
Th	Tálamo				
sm	Estría medular	4	2	2	Medio
f	Fornix				
Hy	Hipotálamo	5	1	4	Muy bajo
ox	Quiasma óptico	5	4	1	Alto
Par2	Corteza parietal, área 2	2	1	1	Alto
Gu	Corteza gustativa	3	1	2	Medio
AIP	Cortex agranular insular, parte posterior	3	1	2	Medio
Pir	Corteza prepiriforme	4	4	0	Muy alto
CI	Claustro	4	4	0	Muy alto
En	Núcleo endopiriforme	4	4	0	Muy alto
I	Núcleo intercalado de la amígdala				
Ce, Aco	Núcleo amigdalino central y cortical anterior				
AA	Area amigdalina anterior	3	1	2	Medio
LOT, LOTD	Núcleo del tracto olfatorio lateral, y parte dorsal				
CxA	Zona de transición corteza amigdalina				

Nº de áreas comparadas en el corte (individualmente o agrupadas)	23
Nº de áreas consideradas discordantes	1

Tabla 20. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -1,30 mm

CORTE CORONAL EN BREGMA -3,14 mm O INTERAURAL 5,86 mm

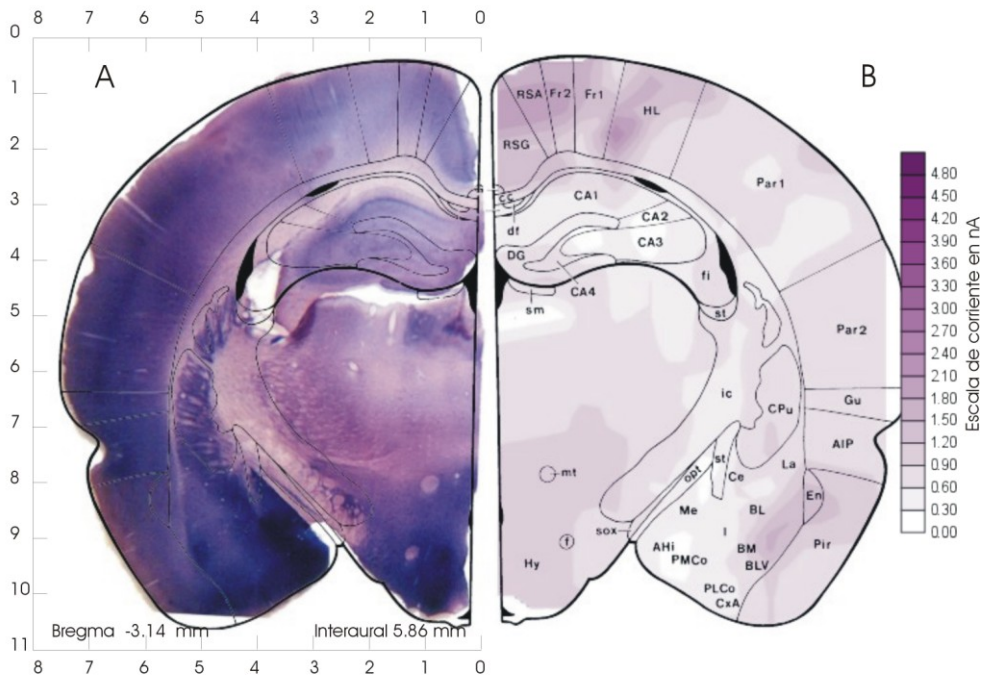


Figura 81. Corte Coronal en Bregma -3,14 mm o interaural 5,86 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
RSA	Corteza retrosplenial agranular	1	3	-2	Media
RSG	Corteza retrosplenial granular	1	3	-2	Media
Fr1	Corteza frontal, área 1	2	4	-2	Media
Fr2	Corteza frontal, área 2	1	3	-2	Media
HL	Área hinlimbica	2	4	-2	Media
Par1	Corteza parietal, área 1	5	2	3	Baja
Par2	Corteza parietal, área 2	4	1	3	Baja
cc	Cuerpo calloso	5	5	0	Muy alta
df	Fornix dorsal	5	5	0	Muy alta
CA1	Campo CA1 del Asta de Ammon	4	5	-1	Alta
CA2	Campo CA2 del Asta de Ammon	4	4	0	Muy alta
CA3	Campo CA3 del Asta de Ammon	5	4	1	Alta
CA4	Campo CA4 del Asta de Ammon	5	4	1	Alta
DG	Giro dentado	4	4	0	Muy alta
sm	Estría medular	5	3	2	Media
fi	Fimbria del hipocampo	4	3	1	Alta
st	Estría terminal	4	2	2	Media
GU	Corteza gustativa	4	1	3	Baja
AIP	Cortex agranular insular, parte posterior	4	1	3	Baja
Cpu	Caudado putamen, estriado	4	2	2	Media
ic	Colículo inferior	5	4	1	Alta
Th	Tálamo	5	4	1	Alta
mt, f	Tracto mamilotalámico y Fornix				
Hy	Hipotálamo	3	1	2	Media
sox	Decusación supraóptica	5	4	1	Alta
opt	Tracto óptico	4	4	0	Muy alta
st	Estría terminal	5	4	1	Alta
Pir	Corteza prepiriforme	4	1	3	Baja
En	Núcleo endopiriforme	1	1	0	Muy alta
La, Ce, Me BL, BLV I, BM PMCo, PLCo AHí, CxA	Núcleo amigdalino lateral, central y medial Núcleo amigdalino basolateral y basolateral parte ventral Núcleos intercalado de la amígdala y amigdalino basomedial Núcleo amigdalino cortical posteromedial y posterolateral Area amigdalohipocampal, Zona de transición corteza amígdala	4	1	3	Baja
Nº de áreas comparadas en el corte (individualmente o agrupadas)		29			
Nº de áreas consideradas discordantes		6			

Tabla 21. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -3,14 mm

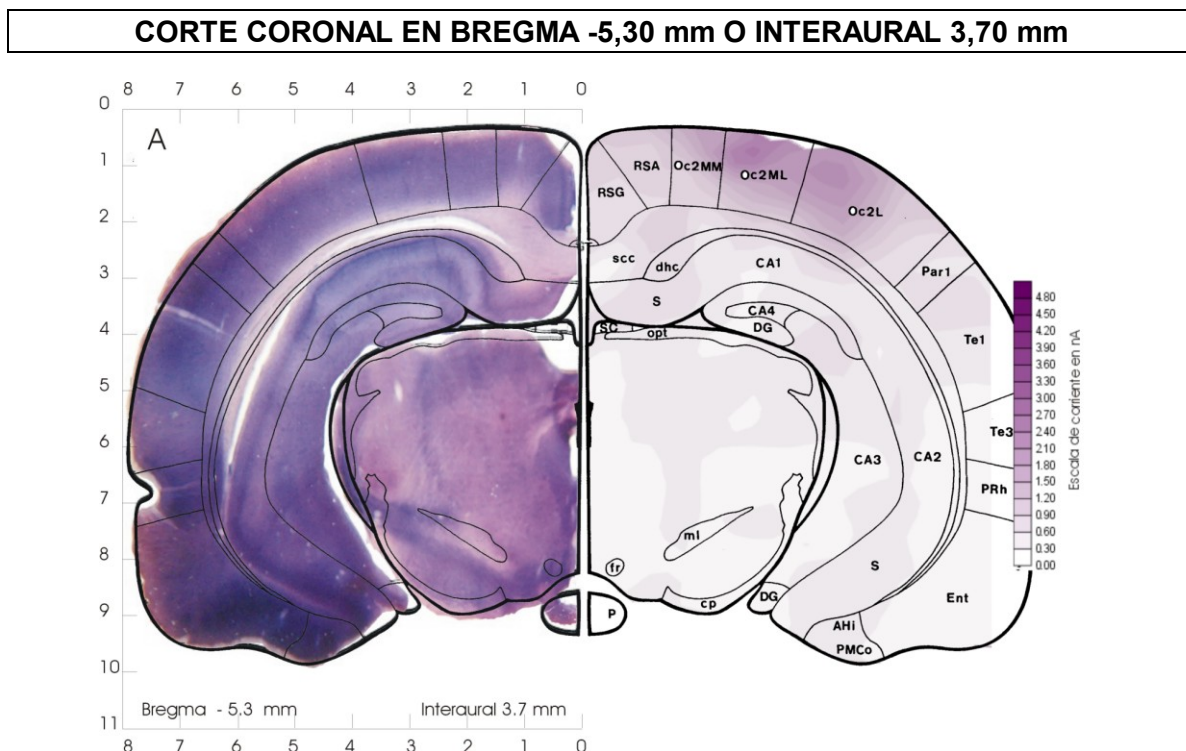


Figura 82. Corte Coronal en Bregma -5,30 mm o interaural 3,70 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
RSA	Corteza retrosplenial agranular	2	3	-1	Alta
RSG	Corteza retrosplenial granular	3	3	0	Muy alta
Oc2MM	Corteza occipital, área 2 parte mediomedial	2	3	-1	Alta
Oc2ML	Corteza occipital, área 2 parte mediolateral	1	3	-2	Media
Oc2L	Corteza occipital, área 2 parte lateral	1	3	-2	Media
Par1	Corteza parietal, área 1	4	2	2	Media
Te1	Corteza temporal, área 1	4	2	2	Media
Te3	Corteza temporal, área 3	5	2	3	Baja
PRh	área perirrinal	5	1	4	Muy baja
Ent	Área entorinal	5	1	4	Muy baja
AHi	Area amigdalohipocampal	4	1	3	Baja
PMCo	Núcleo amigdalino posteromedial cortical	4	1	3	Baja
scc	Espleno del cuerpo caloso	4	5	-1	Alta
dhc	Comisura dorsal del hipocampo	3	5	-2	Media
S	Subiculum	4	2		Media
CA1 y CA2	Campo CA1 y CA2 del Asta de Ammon	5	2	2	Baja
CA3	Campo CA3 del Asta de Ammon	5	2	3	Baja
CA4	Campo CA4 del Asta de Ammon	5	4	1	Alta
DG	Giro dentado	4	2	2	Media
SC	Colículo Superior	5	3	2	Media
MB	Mesencéfalo	5	3	2	Media
Th	Tálamo	5	4	1	Alta
ml	lemnisco medial	5	4	1	Alta
fr	Fascículo retroflexo	5	4	1	Alta
cp	Pedunculo cerebral	5	3	2	Media

Nº de áreas comparadas en el corte (individualmente o agrupadas)	25
Nº de áreas consideradas discordantes	6

Tabla 22. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -5,30 mm

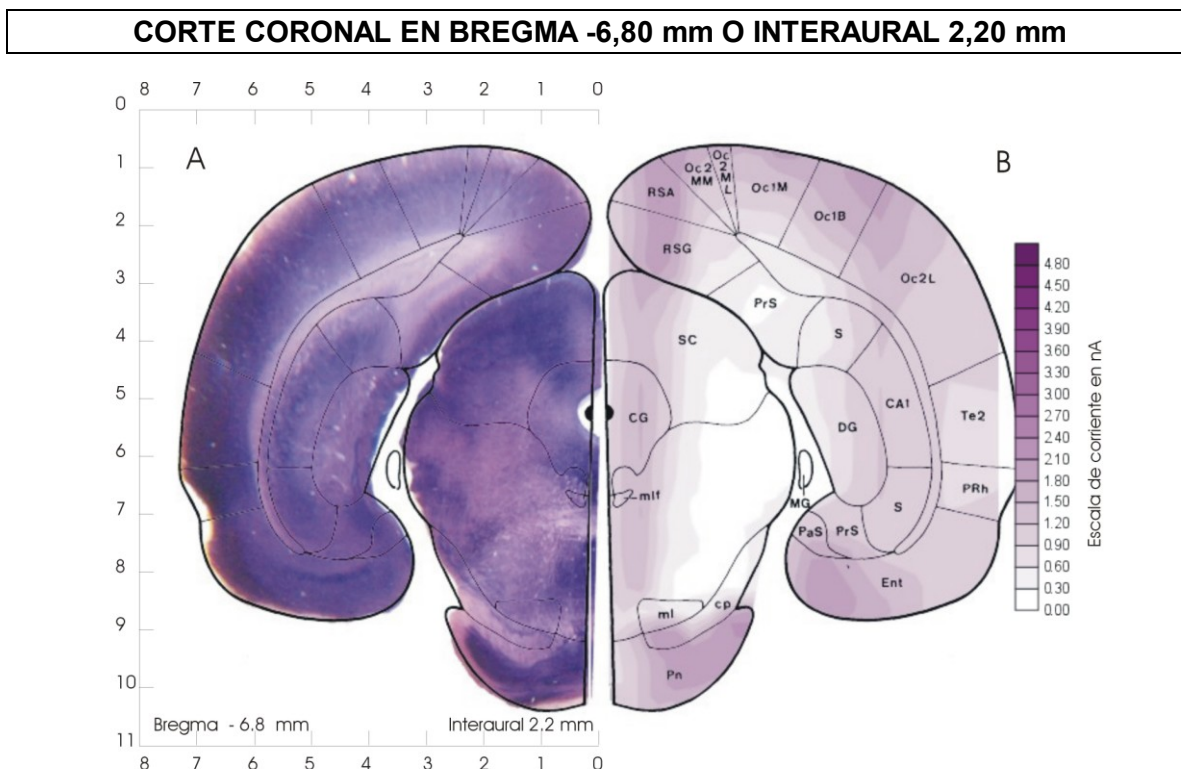


Figura 83. Corte Coronal en Bregma -6,80 mm o interaural 2,20 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
RSA	Corteza retrosplenial agranular	1	3	-2	Media
RSG	Corteza retrosplenial granular	1	3	-2	Media
Oc2MM	Corteza occipital, área 2 parte mediomedial	2	4	-2	Media
Oc2ML	Corteza occipital, área 2 parte mediolateral	2	5	-3	Baja
Oc1M	Corteza occipital, área 1 parte media	3	4	-1	Alta
Oc1B	Corteza occipital, área 1 parte basal	2	4	-2	Media
Oc2L	Corteza occipital, área 2 parte lateral	3	2	1	Alta
PrS	Presubiculum	5	4	1	Alta
PrS	Presubiculum	2	2	0	Muy alta
S	Subiculum	5	4	1	Alta
S	Subiculum	4	2	2	Media
CA1	Campo CA1 del Asta de Ammon	3	3	0	Muy alta
DG	Giro dentado	5	3	2	Media
PaS	Área parasubicular	1	2	-1	Alta
SC	Colículo superior	4	2	2	Media
CG	Sustancia gris central periacueductal	2	3	-1	Alta
MB	Mesencéfalo	4	3	1	Alta
mlf	Fascículo longitudinal medial	2	4	-2	Media
ml	Lemnisco medial	3	3	0	Muy alta
cp	Pedunculo cerebral	3	5	-2	Media
Pn	Núcleo protuberancial	1	1	0	Muy alta
Te2	Área TE2 de Seltzer	4	1	3	Baja
PRh	Área perirrinal	4	1	3	Baja
Ent	Área entorinal	2	1	1	Alta

Nº de áreas comparadas en el corte (individualmente o agrupadas)	24
Nº de áreas consideradas discordantes	3

Tabla 23. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -6,80 mm

CORTE CORONAL EN BREGMA -8,80 mm O INTERAURAL 0,20 mm

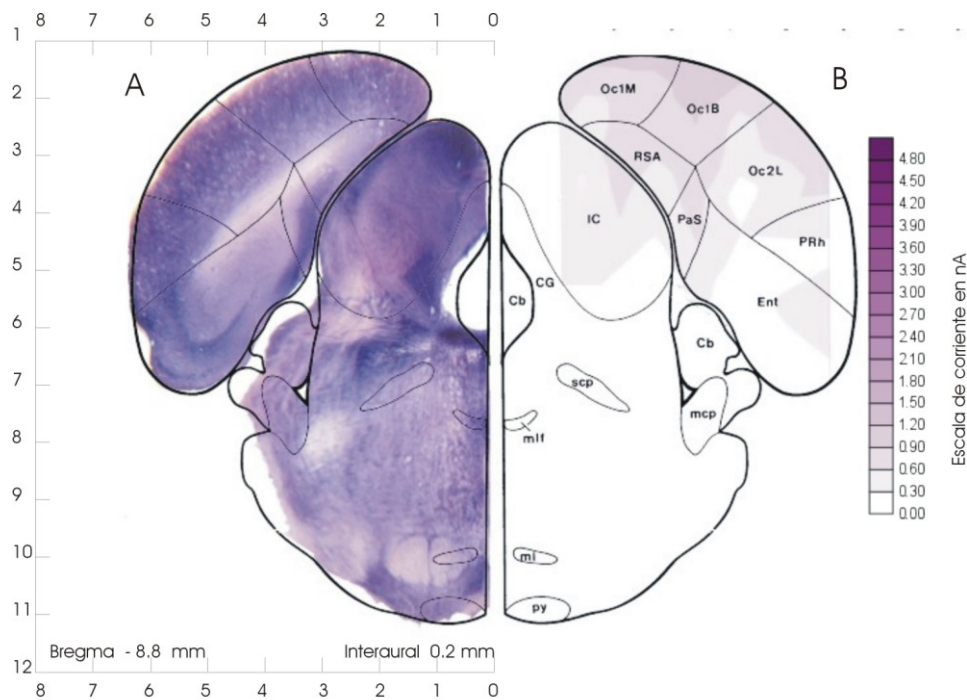


Figura 84. Corte Coronal en Bregma -8,80 mm o interaural 0,20 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
RSA	Corteza retrosplenial agranular	2	4	-2	Media
Oc1M	Corteza occipital, área 1 parte media	1	3	-2	Media
Oc1B	Corteza occipital, área 1 parte basal	1	3	-2	Media
Oc2L	Corteza occipital, área 2 parte lateral	3	2	1	Alta
PRh	área perirrinal	5	1	4	Muy baja
Ent	Área entorinal	5	4	1	Alta
IC	Colículo inferior	4	1	3	Baja

Nº de áreas descritas en el corte	7
Nº de áreas consideradas discordantes	2

Tabla 24. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -8,80 mm

CORTE CORONAL EN BREGMA -11,00 mm O INTERAURAL -2,00 mm

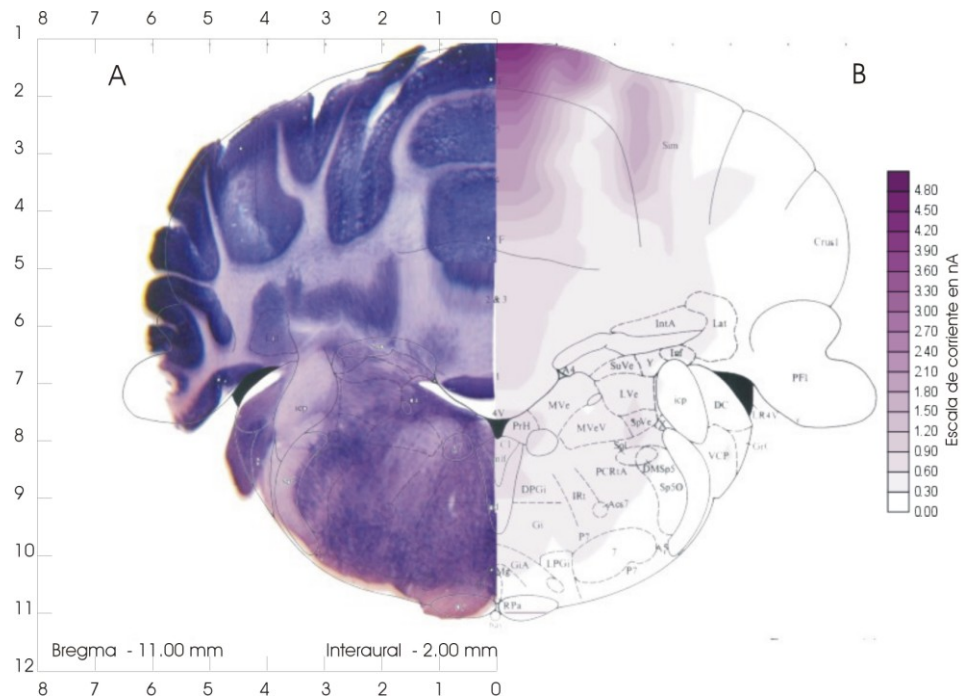


Figura 85. Corte Coronal en Bregma -11,00 mm o interaural -2,00 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
Lob6	Lobulos 6	1	1	0	Muy alta
SIM	Lobulo simple	2	3	-1	alta
Lob4,5	Lobulos 4,5	1	1	0	Muy alta
Lob2,3	Lobulos 2,3	3	4	-1	alta
Lob1	Lobulos 1	4	2	2	Media
MY	Bulbo raquideo	5	3	2	Media

Nº de áreas descritas en el corte	6
Nº de áreas consideradas discordantes	0

Tabla 25. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -11,00 mm

CORTE CORONAL EN BREGMA -12,30 mm O INTERAURAL -3,30 mm

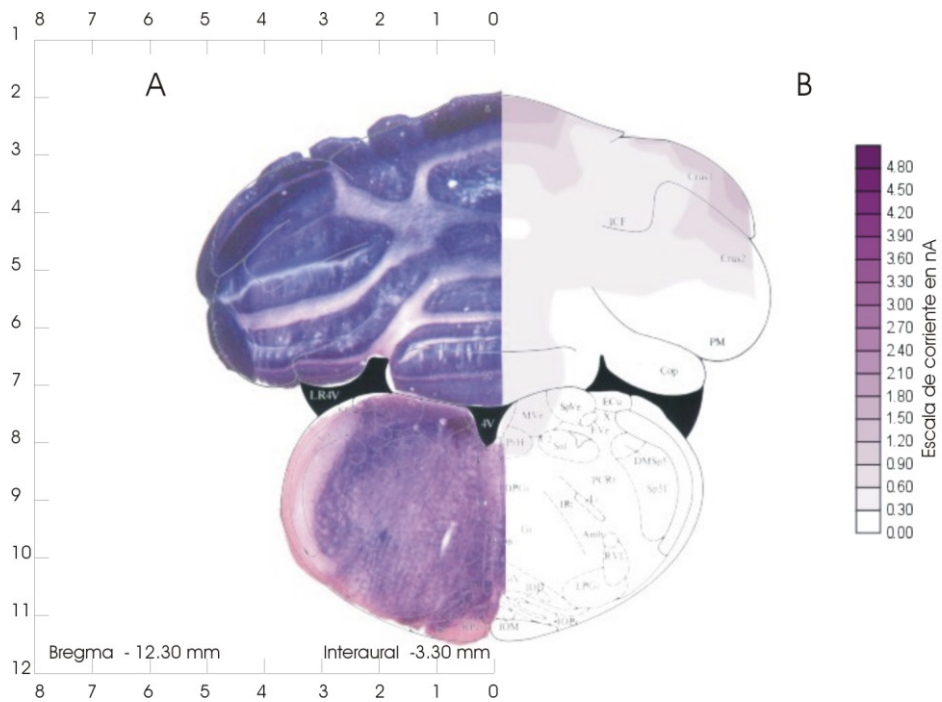


Figura 86. Corte Coronal en Bregma -12,30 mm o interaural -3,30 mm

Abr.	Área	mNO	mDIA	Dif	Concor.
Lob6	Lóbulos 6	1	1	0	Muy alta
Lob7	Lóbulos 7	3	1	2	Media
Lob8	Lóbulos 8	5	1	3	Muy Baja
Lob9	Lóbulos 9	5	1	3	Muy Baja
Lob10	Lóbulos 10	5	1	3	Muy Baja
SIM	Lóbulo simple	5	1	4	Muy Baja
CRUS1	Lóbulo ansiforme crus1	1	1	0	Muy alta
CRUS2	Lóbulo ansiforme crus2	2	2	0	Muy alta
arb	Árbol de la vida	5	5	0	Muy alta
MY	Bulbo raquideo	5	3	2	Media

Nº de áreas descritas en el corte	10
Nº de áreas consideradas discordantes	4

Tabla 26. Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -12,30 mm

A modo de resumen, podemos concluir que hemos comparado 163 áreas de las cuales en 25 hemos tipificado discordancias (15,3%).

Si analizamos discordancias en áreas iguales en cortes diferentes continuos, solamente observamos las siguientes:

Área entorinal entre los cortes -5,30 y -6,80

Lóbulo simple entre los cortes -11,00 y -12,30

Específicamente se pueden valorar para una misma área, los resultados obtenidos en láminas diferentes.

1) Telencéfalo

- a) *Corteza frontal, área forelímica y área hincímbica*: Tanto los niveles de NO como la expresión NOS son moderados y van aumentando hacia niveles altos (fundamentalmente NO) al avanzar en sentido caudal.
- b) *Corteza agranular y corteza gustativa*: Tienen una densidad de neuronas con actividad NOS muy alta, sin embargo la concentración de NO es moderada y la concordancia entre ambos es media.
- c) *Corteza occipital y corteza parietal*: Tanto la densidad de neuronas con actividad NOS como la concentración de NO son moderadas-altas y consecuentemente también la concordancia entre ambas.
- d) *Corteza peririnal*: Tiene una densidad de neuronas con actividad NOS muy alta, sin embargo la concentración de NO es baja y la concordancia entre ambos es muy baja.
- e) *Corteza parietal*: Hay bajo nivel de NO y una moderada expresión de NOS. La concordancia es baja.
- f) *Corteza prepiriforme, Núcleo endopiriforme*: Hay bajo nivel de NO y expresión de NOS en la *corteza prepiriforme* y el *núcleo endopiriforme* excepto a nivel de la localización bregma – 3,14 mm donde la concentración de NO y la actividad NOS es alta y consecuentemente la concordancia es muy alta.
- g) *Bulbo y núcleos olfatorios*: Los niveles de NO son bajos, sin embargo, la expresión de NOS es moderada/alta excepto en el *tracto olfatorio lateral* que es baja.
- h) *Taenia tecta*: Tiene una densidad alta de neuronas con actividad NOS. La concentración de NO es media y la concordancia entre ambos es media.

- i) *Núcleo acumben*: Presenta una densidad media de neuronas con actividad NOS en un denso plexo varicoso. La concentración de NO es baja y la concordancia entre ambos es media.
 - j) *Estriado*: Tanto la densidad de neuronas con actividad NOS distribuidas en un plexo intersticial varicoso, como la concentración de NO son media/baja y hay concordancia entre ambos.
 - k) *Hipocampo*: Tiene una distribución de densidad de neuronas con actividad NOS media/baja igual que la concentración de NO y la concordancia entre ambos es consecuentemente media/alta. En el *Giro dentado* hay una moderada presencia de neuronas NOS y una baja concentración de NO al igual que en el *Subiculum*. En el área del *Asta de Ammon*, ambas (NO y NOS) son bajas.
 - l) *Amígdala*: Tiene una densidad muy alta de neuronas con actividad NOS, sin embargo la concentración de NO es baja y la concordancia entre ambos es baja
- 2) *Mesencéfalo*: Tanto los niveles de NO como la expresión NOS son moderadamente bajos excepto en el *Núcleo protuberancial* que tiene ambos (NO y NOS) en niveles muy altos.
- 3) *Diencéfalo*
- a) *Hipotálamo*: Tiene una densidad de neuronas con actividad NOS muy alta, sin embargo la concentración de NO es moderada a baja y la concordancia entre ambos es muy baja
 - b) *Tálamo*: Tanto la densidad de neuronas con actividad NOS y la concentración de NO es media baja y consecuentemente tienen una alta concordancia.
- 4) *Cerebelo*:

El cerebelo tiene los niveles más altos de NO sintasa y de NO del cerebro, concentrado esencialmente en la sustancia gris de la corteza de los lóbulos. En el área del árbol de la vida, la materia blanca del cerebelo, los niveles de NO y de NOS son bajos.

Por razones de accesibilidad, no hemos podido abordar el bulbo aunque en los tramos medidos las concentraciones tanto de NO como la expresión de NOS son bajas.

IV 7 UTILIZACIÓN EN APLICACIONES CLÍNICAS

Se han estudiado muestras de 66 pacientes obtenidas en la sala de extracción del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria mediante una selección aleatoria entre los pacientes ambulatorios dado que no presentan una patología complicada. Previamente, se han descartado aquellos con patologías metabólicas reconocidas según el diagnóstico.

La muestra la constituyen 66 adultos distribuidos en 36 mujeres y 30 hombres con edades entre 20 y 73 años. Hemos utilizado sangre total por punción venosa reciente y se ha analizado de manera inmediata. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 27.

Rango de edad (años)	Total de individuos	NO (nA)	Total mujeres	NO (nA) mujeres	Total hombres	NO (nA) hombres
20-30	14	1,110	7	1,179	7	1,040
30-40	10	1,295	7	1,339	3	1,193
40-50	17	1,696	8	1,660	9	1,727
50-60	11	1,444	6	1,524	5	1,349
> a 60	14	1,232	8	1,203	6	1,271
Total	66	1,370	36	1,380	30	1,359

Tabla 27. Valores de NO venosa (nA) frente a edad de pacientes adultos

Valores medios de NO (nA) en sangre periférica

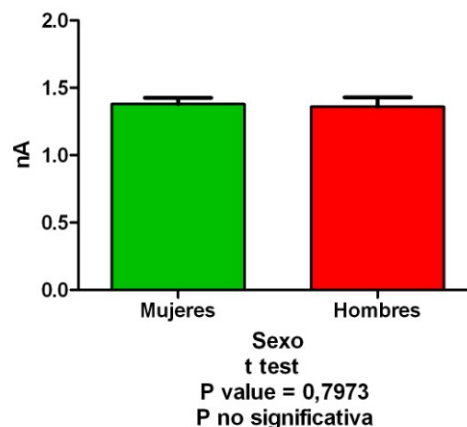


Figura 87. Relación entre sexo y NO

No se han encontrado diferencias significativas en razón del sexo para los datos medios totales (figura 87). Sí se han observado diferencias según edad (figura 88), con un pico máximo en torno a los 45 años tanto para hombres como para mujeres y describiendo una distribución que asemeja una gaussiana.

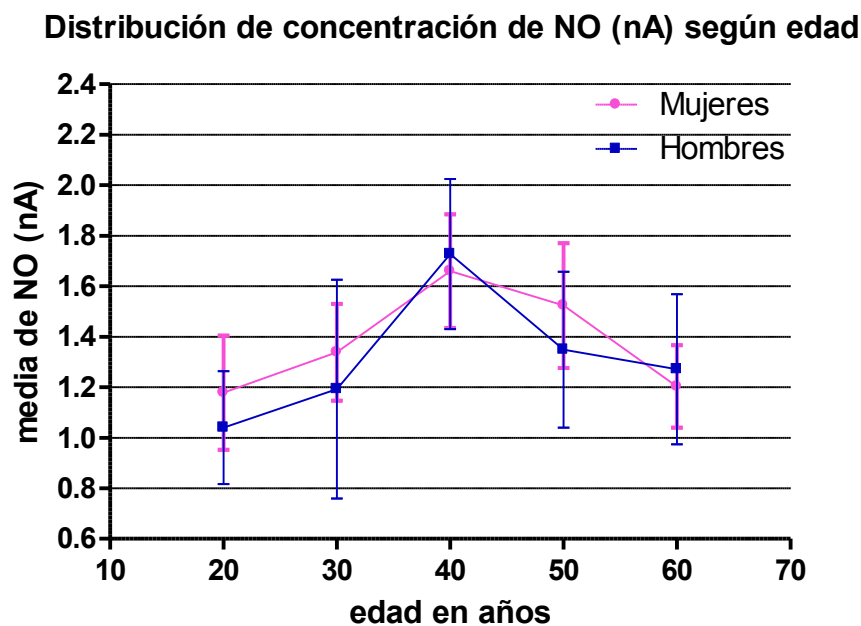


Figura 88. Relación entre edad y NO (nA)

Los datos obtenidos se diferencian de los descritos en la bibliografía por métodos directos: 225 nmol/L. por DPV [Rievaj et al., 2004], 253±82 nmol/L por medición de reacción con oxihemoglobina tras microdiálisis [Martin et al., 2007], posiblemente tanto por la metodología y tiempo de análisis como por la muestra empleada.

Para valorar el efecto de los componentes de la sangre, se realizó un hemograma a los pacientes, no encontrando correlación (siempre R^2 inferior a 0,1) con los hematíes, leucocitos, hematocrito o hemoglobina.

Crítica y limitaciones del método: El método ha demostrado ser apropiado para análisis de NO en muestras biológicas de sangre venosa. La utilización de sangre total frente a plasma o muestras dializadas, minimiza el retraso de tiempo para el análisis y por tanto el efecto de degradación del NO. Sin embargo, habría que establecer un riguroso protocolo temporal para la realización de las medidas.

Especialmente prometedor sería la aplicación del método para la determinación *in vivo* de NO ya que excluiría algunas fuentes de errores, como el tiempo retraso entre el análisis de muestras y su efecto en la cinética de degradación, cambios en la temperatura de la muestra de sangre o la inclusión de oxígeno del aire en la muestra analizada por el sellado no seguro de vial.

V CONCLUSIONES

1

Se ha diseñado y fabricado un microelectrodo de carbono con diferentes tratamientos y electrodeposición de porfirina níquel capaz de cuantificar NO adecuadamente y sin interferencias en el sistema nervioso central de ratas. Cuantifica además DA y 5-HT simultáneamente. Este electrodo es sensible y estable y permite ser calibrado y comparado en varios animales de experimentación.

Se han probado varios tratamientos electroquímicos previos así como diferentes formas de depositar las porfirinas y el Nafion® obteniéndose un método de fabricación reproducible.

Como resultado final, el electrodo óptimo es el siguiente:

- Fibra de carbono de 12 μm .
- Pretatamiento previo al estudio con un tratamiento electroquímico que mejora las prestaciones de la fibra de carbono.
- Depósito de porfirina níquel mediante un método de electrodeposición electroquímica.
- Cobertura de nafión al 5% y secado a temperatura ambiente.
- Selección de aquellos que tienen respuesta en el tratamiento previo superior a 7,5 nA en una solución de PBS.

El electrodo desarrollado requiere una estabilización de 10 minutos previos a su uso para obtener una señal estable.

2

Se ha desarrollado y puesto a punto un calibrador estable de NO en medio anaerobio que puede ser preparado en cualquier laboratorio sin grandes problemas de fabricación.

3

El estudio de diferentes moléculas, que creemos pueden encontrarse en el espacio extracelular, indica que éstas no tienen un potencial de oxidación próximo al potencial de oxidación de NO. Además las que lo tienen próximo, no están presentes a la concentración de detección del método en el espacio extracelular. Todo lo cual garantiza, en cierta medida, que no hay interferencia en la medida de NO por otros posibles interferentes biológicos.

4

Las conclusiones anteriores junto con las pruebas farmacológicas siguientes demuestran, sin lugar a grandes dudas, que las moléculas que cuantificamos son NO, DA y 5-HT, dado que se comportan como tal. Así pues:

4.1.- La administración de L-arginina local en estriado de rata produjo una reducción de los niveles de NO probablemente debido a una disminución de la actividad NOS producida por la actividad de dimetil arginina asimétrica (ADMA). El incremento de 5-HT (250%) tras la administración exógena de L-arginina local en estriado de rata se debe probablemente a un fenómeno de regulación inversa concentración dependiente entre 5HT y NO. La administración exógena de L-arginina local en estriado de rata generó un efecto bifásico sobre la liberación de DA (disminución inicial e incremento posterior). Este efecto ha sido documentado por otros autores y posiblemente se debe a interacción entre el sistema serotoninérgico y dopaminérgico.

4.2.- La administración exógena de SNP a concentración de 10 nmoles/0,5 μ l de PBS produjo un incremento en los niveles de NO en el espacio extracelular del estriado de rata. Los niveles de DA y 5HT se redujeron un 80% a los 2 minutos de la inyección. Estos resultados coinciden con estudios realizados en sinaptosomas de estriado de rata, realizados por otros autores, donde se observó una disminución del transporte de ambos neurotransmisores.

4.3.- La administración en estriado de otro donante de NO, el SNAP, a dosis de 2,5 nmoles en 0,5 μ l de PBS en estriado incrementó los niveles de NO y DA y redujo los de serotonina. Estos resultados son coherentes con los publicados por otros autores. El efecto bifásico de la DA con un gran incremento inicial y una drástica reducción a los 6 minutos está ligado a la concentración de SNAP en el intersticio tras la administración.

4.4.- Los efectos del Glutámico y de NMDA son similares, incrementando ambos los niveles de DA, 5HT y NO durante 4 minutos y son consistentes con estudios de otros autores.

4.5.- La administración de 20 μ g en 0,5 μ l de PBS de Anfetamina (un potente liberador de DA) incrementó los niveles de DA y 5HT pero redujo los niveles de NO lo que podría justificar el efecto vasoconstrictor publicado por nuestro grupo.

4.8.- La administración de inhibidores de la NOS tiene diferentes efectos:

4.8.1.- Los efectos de los inhibidores inespecíficos de la NOS como el L-NAME muestran que el sensor desarrollado detecta selectivamente NO observándose un incremento de 5HT y reducción de DA. Resultados concordantes con los descritos en la literatura por otros autores.

4.8.2.- El efecto de los inhibidores específicos es claro: Sobre iNOS (L-NIL) es pequeño (del orden de 10%) de reducción. Sobre la eNOS (L-NIO) es más importante del orden del 25 %. Sobre la nNOS (7-NINA) es del 50% y más prolongado.

5

Se ha confeccionado un atlas 3D del sistema nervioso de rata con las concentraciones de NO basales. Este resultado es el primero descrito según nuestros datos. Los resultados son reproducibles inter-ratas en un 83% y con una significación del 1/10.000

6

Se compararon los datos de NO obtenidos por medida directa en el espacio extracelular y los obtenidos con tinción de diaforasa, observándose que aunque hay una alta correlación en general hay áreas o regiones que muestran discordancias. Esto indica que la NOS no es necesariamente una medida fiable dado que puede existir NOS pero no estar en forma funcionalmente activa en la rata anestesiada y presumiblemente en la rata despierta.

7

La aplicación del microelectrodo y la técnica de medida de NO desarrollada para la clínica humana (concretamente en medidas de sangre) son robustas y permite ser utilizada de forma rutinaria tanto en sujetos sanos como en determinadas patologías.

No se han encontrado diferencias en NO sanguínea entre sexos y se muestra una distribución gaussiana en torno a los 45 años.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	Esquema de la síntesis de óxido nítrico.....	8
Figura 2.....	Componentes de la Célula electroquímica.....	28
Figura 3.....	Gráfico de la variación de los pulsos en DDPV.....	29
Figura 4.....	Voltamograma originado por DDPV donde se muestran los picos DA, 5-HT y NO ..	29
Figura 5.....	Moléculas potencialmente cuantificables por voltametría	30
Figura 6.....	Electrodo de trabajo	37
Figura 7.....	Voltamogramas del recubrimiento del microsensor de trabajo selectivo a NO.	39
Figura 8.....	Esquema del procedimiento explicado en el texto y empleado sobre electrodo de trabajo para electrodepositar las coberturas de porfirina Níquel y de Nafion®.	40
Figura 9.....	Esquema del dispositivo de fabricación del calibrador de NO.....	43
Figura 10....	Esquema del sistema de detección de NO por quimioluminiscencia	45
Figura 11....	Estructura 3D, que perfila el contorno del cerebro obtenida con SURFER®	53
Figura 12....	Sistema desarrollado para inyección local de fármacos en el área próxima al microelectrodo selectivo a NO.	54
Figura 13....	Instrumento estereotáxico	55
Figura 14....	Medidas del cráneo de la rata tomadas del Atlas de Paxino y Watson.....	57
Figura 15....	Colocación de la rata en estereotáxico-Incisión de la piel	57
Figura 16....	Separación de la piel y limpieza de la herida	58
Figura 17....	Cráneo de la rata donde se observan los puntos bregma y lambda	58
Figura 18....	Perforación con taladro eléctrico del cráneo de la rata.....	59
Figura 19....	Dispositivo para la medición de NO en muestras sanguíneas.....	61
Figura 20....	Efecto del tratamiento eléctrico previo sobre la corriente registrada.	65
Figura 21....	Respuesta en tratamiento previo frente a respuesta en el cerebro de rata	67
Figura 22....	Tratamientos de depósito de porfirina frente a respuesta al NO en cerebro de rata	68
Figura 23....	Efecto de la concentración de Nafion® en la respuesta en intensidad de corriente .	69
Figura 24....	Efecto de la temperatura de secado de la cobertura de Nafion® en la respuesta de NO en cerebro de rata.....	70
Figura 25....	Diferencias en la respuesta según el diámetro de la fibra de carbono	71
Figura 26....	Variabilidad inter-electrodos	72
Figura 27....	Variación de la señal en el tiempo de distintas concentraciones de NO	73
Figura 28....	Comparación de 7 calibradores medidos con el mismo electrodo	74

Figura 29. ... Comparación de la aparición de picos voltamétricos para NO y nitritos	75
Figura 30. ... Voltamogramas de aminoácidos.....	77
Figura 31. ... Cambios producidos en la señal basal de NO registrada en el cerebro de rata anestesiada por la inyección de volúmenes crecientes de PBS. Los valores se representan como media \pm ES	78
Figura 32. ... Reducción porcentual de la señal basal de NO frente a μ litros de PBS inyectados en el cerebro de rata anestesiada.....	79
Figura 33. ... Esquema de las vías bioquímicas de la dimetil arginina asimétrica (ADMA).....	80
Figura 34. ... Cambios de DA, 5-HT y NO tras la inyección local de L-arginina en estriado.....	81
Figura 35. ... Efecto de la administración de Nitroprusiato sódico (SNP) 10 nmol/0,5 μ l de PBS en estriado de rata adulta, inyectado localmente cerca del electrodo.	85
Figura 36. ... Efectos de la inyección de S-nitroso-N-acetil-dl-penicilamina(SNAP), un donante de NO, en estriado de rata.....	87
Figura 37. ... Efectos de la inyección local de ácido glutámico en 0,5 μ l de PBS en estriado de rata. Se observa un incremento de DA de 5-HT y NO de forma transitoria durante 6 minutos. ..	88
Figura 38. ... Cambios en NO, serotonina y dopamina tras la inyección de 10 nmoles/0.5 μ l de PBS de NMDA en estriado de rata.	89
Figura 39. ... linyección local de anfetamina (20 μ g/0,5 μ l) en estriado de rata.	90
Figura 40. ... Efecto de la inyección local de L-NAME en estriado de rata.	92
Figura 41. ... Efecto sobre la liberación de NO de la inyección local de L-NIL (20 nmoles/0,2 μ l) en la corteza cerebral de rata.	94
Figura 42. ... Efecto de la inyección local de L-NIO 40 nmoles en 0,2 μ l de PBS en estriado de rata.....	95
Figura 43. ... Efecto de la inyección local de 7-NINA en estriado de rata	96
Figura 44. ... Imagen de las concentraciones de NO en la superficie del cerebro de rata.....	98
Figura 45. ... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma 3,20	100
Figura 46. ... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma 3,20	100
Figura 47. ... Distribución de NO en el corte coronal Bregma 3,20 mm.....	101
Figura 48. ... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma 1,00 mm	102
Figura 49. ... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma 1,00 mm.	102
Figura 50. ... Imagen de distribución de NO en Bregma 1,00 mm.....	103
Figura 51. ... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -1,30 mm	104
Figura 52. ... Correlación entre datos de N (nA) inter-ratas para Bregma -1,30 mm.....	104
Figura 53. ... Imagen de distribución de NO en Bregma -1,30 mm.....	105

Figura 54.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -3,14 mm.....	106
Figura 55.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -3,14 mm.	106
Figura 56.... Imagen de distribución de NO en Bregma -3,14 mm.	107
Figura 57.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -5,30 mm.....	108
Figura 58.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -5,30 mm.	108
Figura 59.... Imagen de distribución de NO en Bregma -5,30 mm.	109
Figura 60.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -6,80 mm.....	110
Figura 61.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -6,80 mm.	110
Figura 62.... Imagen de distribución de NO en Bregma -6,80 mm.	111
Figura 63.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -8,80 mm.....	112
Figura 64.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -8,80 mm.	112
Figura 65.... Imagen de distribución de NO en Bregma -8,80 mm.	113
Figura 66.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -11,00 mm.....	114
Figura 67.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -11,00 mm.	114
Figura 68.... Imagen de distribución de NO en Bregma -11,00 mm.	115
Figura 69.... Perfil comparativo entre medidas de NO(nA) para la superficie del cerebro y las medidas para el Corte Coronal en Bregma -12,30 mm.....	116
Figura 70.... Correlación entre datos de NO (nA) inter-ratas para Bregma -12,30 mm.	116
Figura 71.... Imagen de distribución de NO en Bregma -12,30 mm.	117
Figura 72.... Imagen anteroposterior en 3D de distribución de NO.....	118
Figura 73.... Imagen lateral en 3D de distribución de NO.....	118
Figura 74.... Imagen del despliegue lateral en 3D de distribución de NO.....	119
Figura 75.... Imagen del despliegue horizontal en 3D de distribución de NO.....	119
Figura 76.... Imagen del despliegue coronal en 3D de distribución de NO.....	120
Figura 77.... Tratamiento de cuantificación de la intensidad de color con CorelDRAW.....	122
Figura 78.... Corte Coronal en Bregma 3,20 mm o interaural 12,00 mm.....	124
Figura 79.... Corte Coronal en Bregma 1,00 mm o interaural 10,00 mm.....	125
Figura 80.... Corte Coronal en Bregma -1,30 mm o interaural 7,70 mm.....	126
Figura 81.... Corte Coronal en Bregma -3,14 mm o interaural 5,86 mm.....	127

Figura 82. ... Corte Coronal en Bregma -5,30 mm o interaural 3,70 mm	128
Figura 83. ... Corte Coronal en Bregma -6,80 mm o interaural 2,20 mm	129
Figura 84. ... Corte Coronal en Bregma -8,80 mm o interaural 0,20 mm	130
Figura 85. ... Corte Coronal en Bregma -11,00 mm o interaural -2,00 mm	131
Figura 86. ... Corte Coronal en Bregma -12,30 mm o interaural -3,30 mm	132
Figura 87. ... Relación entre sexo y NO	135
Figura 88. ... Relación entre edad y NO (nA)	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1..... Características de las isoformas NOS	7
Tabla 2..... Métodos de medición de óxido nítrico.....	26
Tabla 3..... Aminoácidos medidos por voltametría	47
Tabla 4..... Soluciones alcohólicas y tiempo de aplicación.....	49
Tabla 5..... Pico en el voltamograma y sensibilidad de aminoácidos	76
Tabla 6..... Lecturas de NO en nA obtenidas en la superficie del cerebro.	97
Tabla 7..... Peso promedio de ratas usadas en los ensayos.....	99
Tabla 8..... Valores de NO (nA) en Bregma 3,20 mm	101
Tabla 9..... Valores de NO (nA) en Bregma 1,00 mm	103
Tabla 10... Valores de NO (nA) en Bregma -1,30 mm	105
Tabla 11... Valores de NO (nA) en Bregma -3,14 mm	107
Tabla 12... Valores de NO (nA) en Bregma -5,30 mm	109
Tabla 13... Valores de NO (nA) en Bregma -6,80 mm	111
Tabla 14... Valores de NO (nA) en Bregma -8,80 mm	113
Tabla 15... Valores de NO (nA) en Bregma -11,00 mm	115
Tabla 16... Valores de NO (nA) en Bregma -12,30 mm	117
Tabla 17... Tipo de Concordancia para las diferencias de marcas.	122
Tabla 18... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma 3,20 mm	124
Tabla 19... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma 1,00 mm	125
Tabla 20... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -1,30 mm	126
Tabla 21... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -3,14 mm	127
Tabla 22... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -5,30 mm	128
Tabla 23... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -6,80 mm	129
Tabla 24... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -8,80 mm	130
Tabla 25... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -11,00 mm	131
Tabla 26... Asignación de concordancia en el corte coronal Bregma -12,30 mm	132
Tabla 27... Valores de NO venosa (nA) frente a edad de pacientes adultos.....	135

BIBLIOGRAFÍA

- Abekawa, T., Ohmori, T., Honda, M., Ito, K., and Koyama, T. (2001) Effect of low doses of L-NAME on methamphetamine-induced dopaminergic depletion in the rat striatum. *J Neural Transm* **108**: 1219-1230.
- Abu-Soud, H. M., Feldman, P. L., Clark, P., and Stuehr, D. J. (23-12-1994) Electron transfer in the nitric-oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem* **269**: 32318-32326.
- Aktan, F. (25-6-2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**: 639-653.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (1-8-2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.
- Allawi, H. S., Wallace, P., Pitcher, A., Gaffen, Z., Bland-Ward, P. A., and Moore, P. K. (1994) Effect of 7-nitro indazole on neurotransmission in the rat vas deferens: mechanisms unrelated to inhibition of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* **113**: 282-288.
- Allen, A., Flemstrom, G., Garner, A., and Kivilaakso, E. (1993) Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev* **73**: 823-857.
- Amado, J. A., Berrazueta, J. R., and Salas, E. (1995) ¿Está implicado el óxido nítrico en la patogenia de las complicaciones tardías de la diabetes mellitus? *Med Clin* **105**: 185-190.
- Anggard, E. (14-5-1994) Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* **343**: 1199-1206.
- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3203-3207.
- Austin, A. T. (1967) The chemistry of the higher oxides of nitrogen as related to the manufacture, storage and administration of nitrous oxide. *Br J Anaesth* **39**: 345-350.
- Barberis, C. and Tribollet, E. (1996) Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* **10**: 119-154.
- Bassenge, E. (1996) Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis* **39**: 209-228.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1620-1624.

Benz, S., Schnabel, R., Weber, H., Pfeffer, F., Wiesner, R., von Breitenbuch, P., Nizze, H., Schareck, W., Hopt, U.T. (1998) The nitric oxide donor sodium nitroprusside is protective in ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Transplantation*. **66(8)**:994-9.

Berg, A., Redeen, S., Grenegard, M., Ericson, A. C., and Sjostrand, S. E. (2005) Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G1061-G1066.

Bermudez, V., Bermudez, F., Acosta, G., Acosta, A., Anez, J., Andara, C., Leal, E., Cano, C., Manuel, V., Hernandez, R., and Israili, Z. (2008) Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition. *Am J Ther* **15**: 326-333.

Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., West, M. A., Bentz, B. G., and Simmons, R. L. (1-4-1989) An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* **169**: 1467-1472.

Black, M. D., Matthews, E. K., and Humphrey, P. P. (1994) The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. *Neuropharmacology* **33**: 1357-1365.

Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**: 907-916.

Böger, R. H. (2004) Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* **134**: 2842S-2847S.

Bohme, G. A., Bon, C., Stutzmann, J. M., Doble, A., and Blanchard, J. C. (9-7-1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* **199**: 379-381.

Bon, C. L. and Garthwaite, J. (1-3-2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **23**: 1941-1948.

Boulton, C. L., Southam, E., and Garthwaite, J. (1995) Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* **69**: 699-703.

Brady, A. J., Warren, J. B., Poole-Wilson, P. A., Williams, T. J., and Harding, S. E. (1993) Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* **265**: H176-H182.

- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9030-9033.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 682-685.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., and Snyder, S. H. (27-6-1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**: 714-718.
- Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., and Snyder, S. H. (1991a) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* **7**: 615-624.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**: 3-11.
- Bredt, D. S. (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* **31**: 577-596.
- Brown, G. C. and Borutaite, V. (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* **52**: 189-195.
- Brown, J. F., Hanson, P. J., and Whittle, B. J. (13-11-1992) Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *Eur J Pharmacol* **223**: 103-104.
- Brown, J. F., Keates, A. C., Hanson, P. J., and Whittle, B. J. (1993) Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* **265**: G418-G422.
- Bruhwyler, J., Chleide, E., Liegeois, J. F., and Carreer, F. (1993) Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* **17**: 373-384.
- Bruning, G. (8-8-1993) Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J Comp Neurol* **334**: 192-208.
- Bryan, N. S. (1-9-2006) Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med* **41**: 691-701.
- Buckner, C. K., Saban, R., Castleman, W. L., and Will, J. A. (1988) Analysis of leukotriene receptor antagonists on isolated human intralobar airways. *Ann N Y Acad Sci* **524**: 181-186.
- Bult, H., Boeckstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maercke, Y. M., and Herman, A. G. (24-5-1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**: 346-347.

Burnett, A. L., Nelson, R. J., Calvin, D. C., Liu, J. X., Demas, G. E., Klein, S. L., Kriegsfeld, L. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Snyder, S. H. (1996) Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med* **2**: 288-296.

Burnett, A. L. (1997) Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *J Urol* **157**: 320-324.

Buwalda, B., Nyakas, C., Gast, J., Luiten, P. G., and Schmidt, H. H. (1995) Aldehyde fixation differentially affects distribution of diaphorase activity but not of nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain. *Brain Res Bull* **38**: 467-473.

Buyukuysal, R. L. (1997) Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. I: Requirement to antioxidants in the medium. *Fundam Clin Pharmacol* **11**: 519-527.

Buyukuysal, R. L. (1997a) Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. II: The role of voltage-dependent sodium channels, calcium channel activation, reverse transport mechanism, guanylate cyclase and endogenous glutamate. *Fundam Clin Pharmacol* **11**: 528-536.

Cai, H. and Harrison, D. G. (10-11-2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**: 840-844.

Calandra, T., Baumgartner, J. D., Grau, G. E., Wu, M. M., Lambert, P. H., Schellekens, J., Verhoef, J., and Glauser, M. P. (1990) Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *J Infect Dis* **161**: 982-987.

Calandra, T., Gerain, J., Heumann, D., Baumgartner, J. D., and Glauser, M. P. (1991) High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med* **91**: 23-29.

Calatayud, S., Sanz, M. J., Canet, A., Bello, R., de Rojas, F. D., and Esplugues, J. V. (1999) Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *Br J Pharmacol* **127**: 1111-1118.

Cavas, M. and Navarro, J. F. (2006) Effects of selective neuronal nitric oxide synthase inhibition on sleep and wakefulness in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**: 56-67.

Cepeda, C., Andre, V. M., Jocoy, E. L., and Levine, M. S. (2009) NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems. In *Biology of the NMDA Receptor*. Van Dongen AM, editor.

Chanrion, B., Mannoury, la Cour, Bertaso, F., Lerner-Natoli, M., Freissmuth, M., Millan, M. J., Bockaert, J., and Marin, P. (8-5-2007) Physical interaction between the serotonin

transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8119-8124.

Chen, L. Y. and Mehta, J. L. (1996) Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* **27**: 154-158.

Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V., and Jothianandan, D. (1982) Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 2106-2110.

Chien, W. L., Liang, K. C., Teng, C. M., Kuo, S. C., Lee, F. Y., and Fu, W. M. (2003) Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. *Mol Pharmacol* **63**: 1322-1328.

Choi, Y. B., Tenneti, L., Le, D. A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H. S., and Lipton, S. A. (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* **3**: 15-21.

Chollet-Martin, S., Gatecel, C., Kermarrec, N., Gougerot-Pocidallo, M. A., and Payen, D. M. (1996) Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* **153**: 985-990.

Chu, Y. and Heistad, D. D. (10-12-2010) No answer to Alzheimer's disease? *Circ Res* **107**: 1400-1402.

Clark, L. C., Jr. and Lyons, C. (31-10-1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* **102**: 29-45.

Collard, K. J. (1995) On the role of nitric oxide as a cellular messenger in brain. *Mol Cell Biochem* **149-150**: 249-256.

Contestabile, A. and Ciani, E. (2004) Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int* **45**: 903-914.

Cork, R. J., Perrone, M. L., Bridges, D., Wandell, J., Scheiner, C. A., and Mize, R. R. (1998) A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain. *Prog Brain Res* **118**: 37-50.

Court, O., Kumar, A., Parrillo, J. E., and Kumar, A. (2002) Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* **6**: 500-508.

Cui, X., Besch, V., Khaibullina, A., Hergen, A., Quezado, M., Eichacker, P., and Quezado, Z. M. (2007) Neuronal nitric oxide synthase deficiency decreases survival in bacterial peritonitis and sepsis. *Intensive Care Med* **33**: 1993-2003.

Damas, P., Reuter, A., Gysen, P., Demonty, J., Lamy, M., and Franchimont, P. (1989) Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* **17**: 975-978.

Datta, S., Patterson, E. H., and Siwek, D. F. (1997) Endogenous and exogenous nitric oxide in the pedunculo-pontine tegmentum induces sleep. *Synapse* **27**: 69-78.

Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M., and Snyder, S. H. (1-9-1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7797-7801.

De Vente, J., Hopkins, D. A., Markerink-Van Ittersum, M., Emson, P. C., Schmidt, H. H., and Steinbusch, H. W. (1998) Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience* **87**: 207-241.

Deguchi, T. (10-11-1977) Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* **252**: 7617-7619.

Del Arco, A., Gonzalez-Mora, J. L., Armas, V. R., and Mora, F. (1999) Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology* **38**: 943-954.

Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1-9-1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* **333**: 49-58.

Desai, K. M., Sessa, W. C., and Vane, J. R. (6-6-1991) Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**: 477-479.

Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., and Snyder, S. H. (10-5-1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4214-4218.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**: 7-61.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**: 391-397.

Dominguez, J. M., Muschamp, J. W., Schmich, J. M., and Hull, E. M. (2004) Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. *Neuroscience* **125**: 203-210.

Durante, W., Sen, A. K., and Sunahara, F. A. (1988) Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* **94**: 463-468.

Escrig, A., Gonzalez-Mora, J. L., and Mas, M. (1-4-1999) Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J Physiol* **516 (Pt 1)**: 261-269.

Feelisch, M. and Stamler, J. S. (1996) *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.

Fernandez, A. P., Serrano, J., Castro, S., Salazar, F. J., Lopez, J. C., Rodrigo, J., and Nava, E. (2003) Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **21**: 2375-2388.

Forstermann, U., Gorsky, L. D., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., and Murad, F. (30-4-1990) Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 727-732.

Forstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M., and Murad, F. (24-10-1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**: 1849-1857.

Forstermann, U. and Munzel, T. (4-4-2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**: 1708-1714.

Friedemann, M. N., Robinson, S. W., and Gerhardt, G. A. (1-8-1996) o-Phenylenediamine-modified carbon fiber electrodes for the detection of nitric oxide. *Anal Chem* **68**: 2621-2628.

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (27-11-1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.

Furfin, E. S., Harmon, M. F., Paith, J. E., and Garvey, E. P. (24-8-1993) Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine. *Biochemistry* **32**: 8512-8517.

Galajda, P., Martinka, E., Mukan, M., and Kubisz, P. (1-1-1997) Endothelial markers in diabetes mellitus. *Thromb Res* **85**: 63-65.

Garthwaite, J., Charles, S. L., and Chess-Williams, R. (24-11-1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**: 385-388.

Garthwaite, J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**: 60-67.

Garthwaite, J. and Boulton, C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**: 683-706.

Garvey, E. P., Tuttle, J. V., Covington, K., Merrill, B. M., Wood, E. R., Baylis, S. A., and Charles, I. G. (1994) Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Arch Biochem Biophys* **311**: 235-241.

Gerrard, W. (1980) Gas Solubilities Widespread Applications. *Pergamon Press, Oxford, UK*.

Getting, S. J., Segieth, J., Ahmad, S., Biggs, C. S., and Whitton, P. S. (22-4-1996) Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res* **717**: 196-199.

Giorgetti, M., Hotsenpiller, G., Ward, P., Teppen, T., and Wolf, M. E. (15-8-2001) Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats. *J Neurosci* **21**: 6362-6369.

Giovanelli, J., Campos, K. L., and Kaufman, S. (15-8-1991) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7091-7095.

Giulli, G., Luzi, A., Poyard, M., and Guellaen, G. (16-9-1994) Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and NO synthase during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* **81**: 269-283.

Gomez-Jimenez, J., Salgado, A., Mourelle, M., Martin, M. C., Segura, R. M., Peracaula, R., and Moncada, S. (1995) L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* **23**: 253-258.

Gonon, F. G., Fombarlet, C. M., Buda, M. J., and Pujol, J. F. (1981) Electrochemical treatment of pyrolytic carbon fiber electrodes. *Anal Chem* **53**: 1386-1389.

Gonzalez-Mora, J. L., Guadalupe, T., and Mas, M. (1990) In vivo voltammetry study of the modulatory action of prolactin on the mesolimbic dopaminergic system. *Brain Res Bull* **25**: 729-733.

Gonzalez-Mora, J. L., Martin, F. A., Rojas-Diaz, D., Hernandez, S., Ramos-Perez, I., Rodriguez, V. D., and Castellano, M. A. (30-9-2002) In vivo spectroscopy: a novel approach for simultaneously estimating nitric oxide and hemodynamic parameters in the rat brain. *J Neurosci Methods* **119**: 151-161.

Gonzalez-Mora, J. L., Sanchez-Bruno, J. A., and Mas, M. (21-3-1988) Concurrent on-line analysis of striatal ascorbate, dopamine and dihydroxyphenylacetic acid concentrations by in vivo voltammetry. *Neurosci Lett* 1988 Mar 21;86(1):61-6 **86**: 61-66.

Good, P. F., Hsu, A., Werner, P., Perl, D. P., and Olanow, C. W. (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 338-342.

- Gosgnach, W., Messika-Zeitoun, D., Gonzalez, W., Philipe, M., and Michel, J. B. (2000) Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: C1880-C1888.
- Greenacre, S. A. and Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* **34**: 541-581.
- Griffith, O. W. and Stuehr, D. J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**: 707-736.
- Griffith, O. W. and Kilbourn, R. G. (1996) Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol* **268**: 375-392.
- Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C., and Henderson, A. H. (12-4-1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* **308**: 645-647.
- Gross, S. S. and Wolin, M. S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* **57**: 737-769.
- Guarner, C., Soriano, G., Tomas, A., Bulbena, O., Novella, M. T., Balanzo, J., Vilardell, F., Mourelle, M., and Moncada, S. (1993) Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* **18**: 1139-1143.
- Guevara-Guzman, R., Emson, P. C., and Kendrick, K. M. (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* **62**: 807-810.
- Guix, F. X., Uribealago, I., Coma, M., and Munoz, F. J. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* **76**: 126-152.
- Hall, S., Milne, B., and Jhamandas, K. (15-6-1998) Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltammetric study. *Brain Res* **796**: 176-186.
- Handy, R. L., Wallace, P., Gaffen, Z. A., Whitehead, K. J., and Moore, P. K. (1995) The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse. *Br J Pharmacol* **116**: 2349-2350.
- Hars, B. (16-1-1999) Endogenous nitric oxide in the rat pons promotes sleep. *Brain Res* **816**: 209-219.
- Hartung, H., Threlfell, S., and Cragg, SJ. (2011) Nitric oxide donors enhance the frequency dependence of dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2011 Aug;36(9):1811-22 **36(9)**: 1811-1822.
- Harvey, BH., Duvenhage, I., Viljoen, F., Scheepers, N., Malan, SF., Wegener, G., Brink, CB., and Petzer, JP. (15-11-2010) Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase

and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. *Biochem Pharmacol* **80**: 1580-1591.

Hedlund, P., Ny, L., Alm, P., and Andersson, K. E. (2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol* **164**: 868-875.

Hevel, J. M., White, K. A., and Marletta, M. A. (5-12-1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* **266**: 22789-22791.

Hibbs, J. B., Jr., Vavrin, Z., and Taintor, R. R. (15-1-1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* **138**: 550-565.

Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z., and Rachlin, E. M. (30-11-1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 87-94.

Hogan, J. C., Lewis, M. J., and Henderson, A. H. (1988) In vivo EDRF activity influences platelet function. *Br J Pharmacol* **94**: 1020-1022.

Hogman, M., Frostell, C., Arnberg, H., and Hedenstierna, G. (26-6-1993) Bleeding time prolongation and NO inhalation. *Lancet* **341**: 1664-1665.

Hollenberg, S. M., Broussard, M., Osman, J., and Parrillo, J. E. (14-4-2000) Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res* **86**: 774-778.

Hope, B. T. and Vincent, S. R. (1989) Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J Histochem Cytochem* **37**: 653-661.

Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., and Vincent, S. R. (1-4-1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2811-2814.

Huet, O., Obata, R., Aubron, C., Spraul-Davit, A., Charpentier, J., Laplace, C., Nguyen-Khoa, T., Conti, M., Vicaut, E., Mira, J. P., and Duranteau, J. (2007) Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med* **35**: 821-826.

Huszka, M., Kaplar, M., Rejto, L., Tornai, I., Palatka, K., Laszlo, P., and Udvardy, M. (15-4-1997) The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thromb Res* **86**: 173-180.

Huttunen, R., Hurme, M., Laine, J., Eklund, C., Vuento, R., Aittoniemi, J., Huhtala, H., and Syrjanen, J. (2009) Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP)

polymorphism is associated with hypotension in patients with E. coli bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism. *Shock* **31**: 448-453.

Iesaki, T., Gupte, S. A., Kaminski, P. M., and Wolin, M. S. (1999) Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol* **277**: H978-H985.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9265-9269.

Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., Wood, K. S., Fukuto, J. M., and Rajfer, J. (31-7-1990) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 843-850.

Ignarro, L. J. (1-7-1993) Nitric oxide-mediated vasorelaxation. *Thromb Haemost* **70**: 148-151.

Ikeda O., Yoshinaga K., and Lei J (2005) Nitric Oxide Detection with Glassy Carbon Electrodes Coated with Charge-different Polymer Films. *Sensors* **5**: 161-170.

Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., and Snyder, S. H. (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* **3**: 193-197.

Jenner, P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* **13**: 24-34.

Jijun, L., Zaiwang, L., Anyuan, L., Shuzhen, W., Fanghua, Q., Lin, Z., and Hong, L. (2010) Abnormal expression of dopamine and serotonin transporters associated with the pathophysiologic mechanism of Tourette syndrome. *Neurol India* **58**: 523-529.

Jimenez, W. (6-5-1995) [Endothelin, nitric oxide and the control of vascular tone: their physiopathological significance in liver cirrhosis]. *Med Clin (Barc)* **104**: 671-675.

John, CE. and Jones, SR. (2007) Voltammetric characterization of the effect of monoamine uptake inhibitors and releasers on dopamine and serotonin uptake in mouse caudate-putamen and substantia nigra slices. *Neuropharmacology* 2007 Jun;52(8):1596-605 Epub 2007 Mar 16 **52**: 1596-1605.

Kadokami, T., Egashira, K., Kuwata, K., Fukumoto, Y., Kozai, T., Yasutake, H., Kuga, T., Shimokawa, H., Sueishi, K., and Takeshita, A. (15-7-1996) Altered serotonin receptor subtypes mediate coronary microvascular hyperreactivity in pigs with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* **94**: 182-189.

Kaehler, S. T., Singewald, N., Sinner, C., and Philippu, A. (24-7-1999a) Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res* **835**: 346-349.

Kaehler, S. T., Singewald, N., and Philippu, A. (1999) Release of serotonin in the locus coeruleus of normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 460-465.

Kelm, M. and Schrader, J. (18-10-1988) Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. *Eur J Pharmacol* **155**: 317-321.

Kelm, M., Dahmann, R., Wink, D., and Feelisch, M. (11-4-1997) The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction. *J Biol Chem* **272**: 9922-9932.

Kerwin, J. F., Jr., Lancaster, J. R., Jr., and Feldman, P. L. (27-10-1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* **38**: 4343-4362.

Khalil, R. A. (2005) Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension* **46**: 249-254.

Kilbourn, R. G., Gross, S. S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O. W., Levi, R., and Lodato, R. F. (1990) NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3629-3632.

Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Levi, R., Adams, J., and Lodato, R. F. (15-11-1990a) Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 1132-1138.

Kilbourn, R. G., Gross, S. S., Lodato, R. F., Adams, J., Levi, R., Miller, L. L., Lachman, L. B., and Griffith, O. W. (1-7-1992) Inhibition of interleukin-1-alpha-induced nitric oxide synthase in vascular smooth muscle and full reversal of interleukin-1-alpha-induced hypotension by N omega-amino-L-arginine. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1008-1016.

Kishimoto, J., Spurr, N., Liao, M., Lizhi, L., Emson, P., and Xu, W. (1992) Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* **14**: 802-804.

Klabunde, R. E. and Ritger, R. C. (15-8-1991) NG-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1135-1140.

Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1-7-1990) Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J* **269**: 207-210.

Knowles, R. G. and Moncada, S. (1-3-1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298 (Pt 2)**: 249-258.

Kobzik, L., Bredt, D. S., Lowenstein, C. J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbaker, D., and Stamler, J. S. (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* **9**: 371-377.

- Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S., and Stamler, J. S. (8-12-1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**: 546-548.
- Koshland, D. E., Jr. (18-12-1992) The molecule of the year. *Science* **258**: 1861.
- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D. N. (1-6-1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4651-4655.
- Laine, L., Takeuchi, K., and Tarnawski, A. (2008) Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* **135**: 41-60.
- Lancaster, J. R., Jr. (16-8-1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8137-8141.
- Landin, L., Lorente, J. A., Renes, E., Canas, P., Jorge, P., and Liste, D. (1994) Inhibition of nitric oxide synthesis improves the vasoconstrictive effect of noradrenaline in sepsis. *Chest* **106**: 250-256.
- Langrehr, J. M., Murase, N., Markus, P. M., Cai, X., Neuhaus, P., Schraut, W., Simmons, R. L., and Hoffman, R. A. (1992) Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J Clin Invest* **90**: 679-683.
- Lantoine F., Trevin S., Bedioui F., and Devynck J. (1995) Selective and sensitive electrochemical measurement of nitric oxide in aqueous solution: discussion and new results. *J Electroanal Chem* 85-93.
- Laufs, U. (2003) Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* **58**: 719-731.
- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., Jr., and Ratan, R. R. (15-4-2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4843-4848.
- Li, F. and Tsien, J. Z. (16-7-2009) Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med* **361**: 302-303.
- Lin, HC., Kang, BH., Wong, CS., Mao, SP., and Wan, FJ. (10-12-1999) Systemic administration of D-amphetamine induced a delayed production of nitric oxide in the striatum of rats. *Neurosci Lett* 1999 Dec 10;276(3):141-4 **276**: 141-144.
- Lin, P. J., Chang, C. H., and Chang, J. P. (1994) Reversal of refractory hypotension in septic shock by inhibitor of nitric oxide synthase. *Chest* **106**: 626-629.
- Lipton, S. A., Singel, D. J., and Stamler, J. S. (1994) Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain Res* **103**: 359-364.

Liu, L. and Stamler, J. S. (1999) NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ* **6**: 937-942.

Liu, Y. and Zhang, J. (2000) Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* **113**: 948-956.

Lonart, G., Wang, J., and Johnson, K. M. (22-9-1992) Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* **220**: 271-272.

Lorente, J. A., Landin, L., de Pablo, R., Renes, E., and Liste, D. (1993) L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* **21**: 1287-1295.

Lorente, J. A., Landin, L., Renes, E., de Pablo, R., Jorge, P., Rodena, E., and Liste, D. (1993a) Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med* **21**: 759-767.

Lorrain, D. S. and Hull, E. M. (25-10-1993) Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* **5**: 87-89.

Lowry, JP. , Fillenz, M. (2001) Real-time monitoring of brain energy metabolism in vivo using microelectrochemical sensors: the effects of anesthesia. *Bioelectrochemistry* **54**: 39-47.

López-Jaramillo P., Terán E.Y., and de Felix M. (1995) Alteraciones del endotelio vascular en dislipidemias y aterosclerosis: implicaciones terapéuticas. In *La vía de L-arginina:óxido nítrico, de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas*. P.Lopez-Jaramillo. (ed.) Ediciones Científicas. Quito., pp. 89-135.

López-Talavera, J. C. and Groszmann, R. J. (1995) Síndrome circulatorio hiperdinámico de la hepatopatía crónica: fisiopatología de una entidad multiorgánica. *Med Clin (Barc)* **105**: 13-15.

Lue, T. F. (15-6-2000) Erectile dysfunction. *N Engl J Med* **342**: 1802-1813.

Lyons, C. R., Orloff, G. J., and Cunningham, J. M. (25-3-1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **267**: 6370-6374.

Malinski, T. and Taha, Z. (20-8-1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**: 676-678.

Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M., and Tomboulis, P. (30-6-1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 1076-1082.

Malinski, T. and Czuchajowski, L. (1996) Nitric oxide measurement by electrochemical methods. In *Methods in Nitric Oxide Research*. Feelisch, M. and Stamler, J. S. (eds.) Chichester, UK: John Wiley & Sons, pp. 319-339.

Mannick, E. E., Bravo, L. E., Zarama, G., Realpe, J. L., Zhang, X. J., Ruiz, B., Fontham, E. T., Mera, R., Miller, M. J., and Correa, P. (15-7-1996) Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* **56**: 3238-3243.

Mannick, J. B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K., and Gaston, B. (17-9-2001) S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* **154**: 1111-1116.

Marks, J. D., Marks, C. B., Luce, J. M., Montgomery, A. B., Turner, J., Metz, C. A., and Murray, J. F. (1990) Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* **141**: 94-97.

Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D., and Wishnok, J. S. (29-11-1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**: 8706-8711.

Marletta, M. A. (15-6-1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**: 12231-12234.

Martin, C., Schulz, R., Post, H., Boengler, K., Kelm, M., Kleinbongard, P., Gres, P., Skyschally, A., Konietzka, I., and Heusch, G. (1-4-2007) Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ: NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* **74**: 46-55.

Martin, M. J., Jimenez, M. D., and Motilva, V. (2001) New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* **7**: 881-908.

Mas, M., Gonzalez-Mora, J.L., and Hernandez, L. (1996) In vivo monitoring of brain neurotransmitter release for the assessment of neuroendocrine interactions. *Cell Mol Neurobiol* **16**: 383-396.

Maskus, M., Pariente, F., Wu, Q., Toffanin, A., Shapleigh, J. P., and Abruna, H. D. (15-9-1996) Electrocatalytic reduction of nitric oxide at electrodes modified with electropolymerized films of $[\text{Cr}(\text{v-tpy})_2]^{3+}$ and their application to cellular NO determinations. *Anal Chem* **68**: 3128-3134.

Matejovic, M., Krouzecky, A., Martinkova, V., Rokyta, R., Jr., Kralova, H., Treska, V., Radermacher, P., and Novak, I. (2004) Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock* **21**: 458-465.

Matejovic, M., Krouzecky, A., Rokyta, R., Jr., Radej, J., Kralova, H., Treska, V., Radermacher, P., and Novak, I. (2007) Effects of combining inducible nitric oxide synthase inhibitor and radical scavenger during porcine bacteremia. *Shock* **27**: 61-68.

Matsumoto, T., Nakane, M., Pollock, J. S., Kuk, J. E., and Forstermann, U. (28-5-1993) A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett* **155**: 61-64.

Melino, G., Bernassola, F., Knight, R. A., Corasaniti, M. T., Nistico, G., and Finazzi-Agro, A. (31-7-1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* **388**: 432-433.

Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L., and Kadowitz, P. J. (1981) Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**: 946-955.

Mendez, A., Fernandez, M., Barrios, Y., Lopez-Coviella, I., Gonzalez-Mora, J. L., Del Rivero, M., Salido, E., Bosch, J., and Quintero, E. (1997) Constitutive NOS isoforms account for gastric mucosal NO overproduction in uremic rats. *Am J Physiol* **272**: G894-G901.

Merrill, J. E. and Benveniste, E. N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* **19**: 331-338.

Michie, H. R., Manogue, K. R., Spriggs, D. R., Revhaug, A., O'Dwyer, S., Dinarello, C. A., Cerami, A., Wolff, S. M., and Wilmore, D. W. (9-6-1988) Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* **318**: 1481-1486.

Middleton, S. J., Shorthouse, M., and Hunter, J. O. (20-2-1993) Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* **341**: 465-466.

Millan, M. J., Newman-Tancredi, A., Lochon, S., Touzard, M., Aubry, S., and Audinot, V. (2002) Specific labelling of serotonin 5-HT(1B) receptors in rat frontal cortex with the novel, phenylpiperazine derivative, [3H]GR125,743. A pharmacological characterization. *Pharmacol Biochem Behav* **71**: 589-598.

Miller, K. J. and Hoffman, B. J. (4-11-1994) Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem* **269**: 27351-27356.

Mitchell, J. A., Forstermann, U., Warner, T. D., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., and Murad, F. (15-5-1991) Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 1417-1423.

Mohaupt, M. G., Elzie, J. L., Ahn, K. Y., Clapp, W. L., Wilcox, C. S., and Kone, B. C. (1994) Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* **46**: 653-665.

Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142.

- Moncada, S., Higgs, A., and Furchgott, R. (1997) International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* **49**: 137-142.
- Moore, P. K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S. L., and Babbedge, R. C. (1993) Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* **110**: 219-224.
- Moore, P. K., Babbedge, R. C., Wallace, P., Gaffen, Z. A., and Hart, S. L. (1993a) 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* **108**: 296-297.
- Moore, W. M., Webber, R. K., Jerome, G. M., Tjoeng, F. S., Misko, T. P., and Currie, M. G. (11-11-1994) L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* **37**: 3886-3888.
- Morin, M. J., Karr, S. M., Faris, R. A., and Gruppuso, P. A. (2001) Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G552-G559.
- Murphy, S. (1-1-2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* **29**: 1-13.
- Musial, A. and Eissa, N. T. (29-6-2001) Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* **276**: 24268-24273.
- Myers, P. R., Minor, R. L., Jr., Guerra, R., Jr., Bates, J. N., and Harrison, D. G. (10-5-1990) Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* **345**: 161-163.
- Nakane, M., Mitchell, J., Forstermann, U., and Murad, F. (14-11-1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **180**: 1396-1402.
- Nakane, M. (2003) Soluble guanylyl cyclase: physiological role as an NO receptor and the potential molecular target for therapeutic application. *Clin Chem Lab Med* **41**: 865-870.
- Nava, E., Palmer, R. M., and Moncada, S. (21-12-1991) Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet* **338**: 1555-1557.
- Nowak, P., Brus, R., Oswiecimska, J., Sokola, A., and Kostrzewa, RM. (2002) 7-Nitroindazole enhances amphetamine-evoked dopamine release in rat striatum. an in vivo microdialysis and voltammetric study. *J Physiol Pharmacol* 2002 Jun;**53**(2):251-63 **53**: 251-263.
- Nussler, A. K., Di Silvio, M., Billiar, T. R., Hoffman, R. A., Geller, D. A., Selby, R., Madariaga, J., and Simmons, R. L. (1-7-1992) Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* **176**: 261-264.

Oguro, T., Kaneko, E., Numazawa, S., Imaoka, S., Funae, Y., and Yoshida, T. (1997) Induction of hepatic heme oxygenase and changes in cytochrome P-450s in response to oxidative stress produced by stilbenes and stilbene oxides in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **280**: 1455-1462.

Ohkuma, S., Katsura, M., Chen, D. Z., Narihara, H., and Kuriyama, K. (1996) Nitric oxide-evoked [3H] gamma-aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res* **36**: 137-144.

Pabon, M. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Gemma, C., and Bickford, P. C. (2011) CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **8**: 9.

Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**: 315-424.

Palacios-Callender, M., Quintero, M., Hollis, V. S., Springett, R. J., and Moncada, S. (18-5-2004) Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7630-7635.

Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z., and Wilcox, C. S. (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H3227-H3245.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (11-6-1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.

Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., and Moncada, S. (30-6-1988a) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* **153**: 1251-1256.

Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S. (16-6-1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**: 664-666.

Patel, R. P. (15-5-2000) Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: implications for Hb-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med* **28**: 1518-1525.

Paxinos G. and Watson C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney.

Perovic, B., Jovanovic, M., Miljkovic, B., and Vezmar, S. (2010) Getting the balance right: Established and emerging therapies for major depressive disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat* **6**: 343-364.

Petrinec, J., Guadalupe, T., Fumero, B., Viejo, E., Gonzales-Mora, JL., Mas, M. (1996) Effects of different anaesthetics on striatal dopaminergic activity as assessed by in vivo

voltammtery, in: J.L.L. Gonzales-Mora, R. Borges, M. Mas Eds. Monitoring Molecules in Neuroscience. University of La Laguna, pp. 293–294.

Petros, A., Bennett, D., and Vallance, P. (21-12-1991) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* **338**: 1557-1558.

Petros, A., Lamb, G., Leone, A., Moncada, S., Bennett, D., and Vallance, P. (1994) Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* **28**: 34-39.

Phillis, J. W. and O'Regan, M. H. (2003) The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol* **15**: 61-90.

Pinsky, M. R., Vincent, J. L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R. J., and Dupont, E. (1993) Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* **103**: 565-575.

Pique, J. M., Whittle, B. J., and Esplugues, J. V. (19-12-1989) The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* **174**: 293-296.

Pogun, S., Baumann, M. H., and Kuhar, M. J. (28-3-1994) Nitric oxide inhibits [3H]dopamine uptake. *Brain Res* **641**: 83-91.

Prast, H., Tran, M. H., Fischer, H., and Philippu, A. (1998) Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem* **71**: 266-273.

Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (7-11-1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**: 1057-1058.

Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5193-5197.

Raij, L. (21-2-1991) Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors. *Am J Med* **90**: 13S-18S.

Rajfer, J., Aronson, W. J., Bush, P. A., Dorey, F. J., and Ignarro, L. J. (9-1-1992) Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* **326**: 90-94.

Rand, M. J. and Li, C. G. (1995) Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* **57**: 659-682.

Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F., and Moncada, S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **101**: 746-752.

Riccio, A., Alvania, R. S., Lonze, B. E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., Dawson, T. M., Snyder, S. H., and Ginty, D. D. (20-1-2006) A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* **21**: 283-294.

Rievaj, M., Lietava, J., and Bustin, D. (2004) Electrochemical Determination of Nitric Oxide in Blood Samples. *Chem Pap* **58**: 306-310.

Rivot, J. P., Barraud, J., Montecot, C., Jost, B., and Besson, J. M. (31-10-1997) Nitric oxide (NO): in vivo electrochemical monitoring in the dorsal horn of the spinal cord of the rat. *Brain Res* **773**: 66-75.

Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Bentura ML, Santacana M, and Serrano J (1998a) Postnatal modification of cerebral expression of nitric oxide synthase in rats subjected to intrauterine hypoxia before delivery. In *Nitric Oxide: From Discovery to the Clinic*. Moncada S and Lamas S (eds.) Madrid: Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones.

Rodrigo, J., Springall, D. R., Uttenthal, O., Bentura, M. L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martínez-Murillo, R., Polak, J. M., and Moncada, S. (29-7-1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**: 175-221.

Rodrigo, J., Riveros-Moreno, V., Bentura, M. L., Uttenthal, L. O., Higgs, E. A., Fernandez, A. P., Polak, J. M., Moncada, S., and Martínez-Murillo, R. (24-2-1997) Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* **378**: 522-534.

Rodrigo, J., Uttenthal, L. O., Peinado, M. A., Esteban, F. J., Fernandez, A. P., Serrano, J., Martínez, de, V, Santacana, M., Bentura, M. L., Martínez-Murillo, R., and Pedrosa, J. A. (10-6-1998) Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst* **70**: 164-179.

Rodrigo, J., Alonso, D., Fernandez, A. P., Serrano, J., Richart, A., Lopez, J. C., Santacana, M., Martínez-Murillo, R., Bentura, M. L., Ghiglione, M., and Uttenthal, L. O. (3-8-2001) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* **909**: 20-45.

Sabeti, J., Gerhardt, GA., Zahniser, NR. (29-5-2003) Chloral hydrate and ethanol, but not urethane, alter the clearance of exogenous dopamine recorded by chronoamperometry in striatum of unrestrained rats. *Neurosci Lett*. **343(1)**:9-12.

Salter, M., Knowles, R. G., and Moncada, S. (7-10-1991) Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* **291**: 145-149.

Salum, C., Issy, A., Brandão, M., Guimãres, F., and Del Bel, E. (13-9-2010) Nitric oxide modulates dopaminergic regulation of prepulse inhibition in the basolateral amygdala. *J Psychopharmacol*.

- Samama, C. M., Diaby, M., Fellahi, J. L., Mdhafar, A., Eyraud, D., Arock, M., Guillosson, J. J., Coriat, P., and Rouby, J. J. (1995) Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* **83**: 56-65.
- Sanders, K. M. and Ward, S. M. (1992) Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* **262**: G379-G392.
- Santacana, M., Uttenthal, L. O., Bentura, M. L., Fernandez, A. P., Serrano, J., Martinez, de, V, Alonso, D., Martinez-Murillo, R., and Rodrigo, J. (7-12-1998) Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **111**: 205-222.
- Schulz, R., Nava, E., and Moncada, S. (1992) Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* **105**: 575-580.
- Segieth, J., Fowler, L., Whitton, P., and Pearce, B. (14-2-2000) Nitric oxide-mediated regulation of dopamine release in the hippocampus in vivo. *Neuropharmacology* **39**: 571-577.
- Segieth, J., Pearce, B., Fowler, L., and Whitton, P. S. (2001) Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**: 302-306.
- Sessa, W. C., Harrison, J. K., Luthin, D. R., Pollock, J. S., and Lynch, K. R. (1993) Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* **21**: 934-938.
- Sessa, W. C. (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* **31**: 131-143.
- Shibuki, K. and Okada, D. (24-1-1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**: 326-328.
- Silva, M. T., Rose, S., Hindmarsh, J. G., Jenner, P., and Marsden, C. D. (5-1-1998) L-arginine produces NO-independent increases in dopamine efflux in rat striatum. *Neuroreport* **9**: 149-152.
- Silva, M. T., Rose, S., Hindmarsh, J. G., Jenner, P. (2003) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases dopamine efflux from rat striatum. *J Neural Transm.* **110(4)**:353-62
- Simpson, K. L., Waterhouse, B. D., and Lin, R. C. (24-11-2003) Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: neurochemical identification of dorsal raphe inputs to rodent trigeminal somatosensory targets. *J Comp Neurol* **466**: 495-512.

Singh, S., Kumar, S., and Dikshit, M. (2010) Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Rep* **15**: 115-122.

Sobreviela, T. and Mufson, E. J. (31-7-1995) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase/nitric oxide synthase profiles in the human hippocampal formation and perirhinal cortex. *J Comp Neurol* **358**: 440-464.

Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Buttery, L., Suburo, A., Bishop, A. E., Merrett, M., Moncada, S., and Polak, J. M. (1992) Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* **98**: 259-266.

Stadler, K., Bonini, M. G., Dallas, S., Jiang, J., Radi, R., Mason, R. P., and Kadiiska, M. B. (15-9-2008) Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* **45**: 866-874.

Stamler, J. S., Singel, D. J., and Loscalzo, J. (18-12-1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898-1902.

Stanarius, A., Uckert, S., Machtens, S. A., Stief, C. G., Wolf, G., and Jonas, U. (2001) Immunocytochemical distribution of nitric oxide synthase in the human corpus cavernosum: an electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Urol Res* **29**: 168-172.

Stern, J. E. (2004) Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration? *Prog Biophys Mol Biol* **84**: 197-215.

Stewart, T. E., Valenza, F., Ribeiro, S. P., Wener, A. D., Volgyesi, G., Mullen, J. B., and Slutsky, A. S. (1995) Increased nitric oxide in exhaled gas as an early marker of lung inflammation in a model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 713-718.

Stewart, T. L., Michel, A. D., Black, M. D., and Humphrey, P. P. (1996) Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [3H] dopamine from rat striatum in vitro. *J Neurochem* **66**: 131-137.

Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R., and Nathan, C. F. (1-3-1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* **169**: 1011-1020.

Stuehr, D. J. and Griffith, O. W. (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **65**: 287-346.

Sud, N., Wells, S. M., Sharma, S., Wiseman, D. A., Wilham, J., and Black, S. M. (2008) Asymmetric dimethylarginine inhibits HSP90 activity in pulmonary arterial endothelial cells: role of mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**: C1407-C1418.

Sultana, R., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Merchant, M., Klein, J. B., Markesbery, W. R., and Butterfield, D. A. (2006) Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* **22**: 76-87.

Sundrani, R., Easington, C. R., Mattoo, A., Parrillo, J. E., and Hollenberg, S. M. (2000) Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. *Crit Care Med* **28**: 2898-2903.

Tenneti, L., D'Emilia, D. M., and Lipton, S. A. (7-11-1997) Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett* **236**: 139-142.

Terenghi, G., Riveros-Moreno, V., Hudson, L. D., Ibrahim, N. B., and Polak, J. M. (1993) Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat. *J Neurol Sci* **118**: 34-37.

Thomas, E., Pearce, A. G. (2-1-1964) The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. *Acta Neuropathol* **3**: 238-249.

Tiina Kääriäinen. Interaction of the Dopaminergic and Serotonergic Systems in Rat Brain. 2008. Department of Pharmacology and Toxicology, University of Kuopio, Finland. Ref Type: Thesis.

Todoroki, S., Goto, S., Urata, Y., Komatsu, K., Sumikawa, K., Ogura, T., Matsuda, I., and Kondo, T. (1998) High concentration of L-arginine suppresses nitric oxide synthase activity and produces reactive oxygen species in NB9 human neuroblastoma cells. *Mol Med* **4**: 515-524.

Toga, A. W., Santori, E. M., Hazani, R., and Ambach, K. (1995) A 3D digital map of rat brain. *Brain Res Bull* **38**: 77-85.

Toni, R., Malaguti, A., Benfenati, F., and Martini, L. (2004) The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *J Endocrinol Invest* **27**: 73-94.

Trabace, L. and Kendrick, K. M. (2000) Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* **75**: 1664-1674.

Tsigos, C. and Chrousos, G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**: 865-871.

Tsikas, D., Boger, R. H., Sandmann, J., Bode-Boger, S. M., and Frolich, J. C. (28-7-2000) Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* **478**: 1-3.

Tsuneyoshi, I., Kanmura, Y., and Yoshimura, N. (1996) Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. *Crit Care Med* **24**: 1083-1086.

Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H., and Corbin, J. D. (1999) Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol Pharmacol* **56**: 124-130.

Vallance, P. and Moncada, S. (30-3-1991) Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* **337**: 776-778.

Vallance, P. and Collier, J. (13-8-1994) Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* **309**: 453-457.

Van Waes, V., Beverley, J., Marinelli, M., and Steiner, H. (2010) Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants potentiate methylphenidate (Ritalin)-induced gene regulation in the adolescent striatum. *Eur J Neurosci* **32**: 435-447.

Vanderwinden, J. M., Mailleux, P., Schiffmann, S. N., Vanderhaeghen, J. J., and De Laet, M. H. (20-8-1992) Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* **327**: 511-515.

Vanhoutte, P. M. (1991) Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J* **12 Suppl E**: 25-32.

Vaziri, N. D., Wang, X. Q., Oveisi, F., and Rad, B. (2000) Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* **36**: 142-146.

Vincent, S. R. and Kimura, H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* **46**: 755-784.

Vincent, S.R. (1995) *Nitric Oxide in the Nervous System*. Editor(S): Jenner & Vincent.

Wallace, J. L. and Tigley, A. W. (1995) Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. *Aliment Pharmacol Ther* **9**: 227-235.

Wallace, J. L. (1997) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* **112**: 1000-1016.

Wallace, J. L. and Miller, M. J. (2000) Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* **119**: 512-520.

Weiner, C. P., Lizasoain, I., Baylis, S. A., Knowles, R. G., Charles, I. G., and Moncada, S. (24-5-1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5212-5216.

West, A. R. and Galloway, M. P. (1996) Intrastratial infusion of (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an in vivo microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats. *J Neurochem* **66**: 1971-1980.

West, A. R. and Galloway, M. P. (1997) Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology* **36**: 1571-1581.

Whishaw, I. Q., Cioe, J. D., Previsich, N., and Kolb, B. (1977) The variability of the interaural line vs the stability of bregma in rat stereotaxic surgery. *Physiol Behav* **19**: 719-722.

Wiklund, N. P., Cellek, S., Leone, A. M., Iversen, H. H., Gustafsson, L. E., Brundin, L., Furst, V. W., Flock, A., and Moncada, S. (15-1-1997) Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res* **47**: 224-232.

Wolf, G., Henschke, G., and Wurdig, S. (14-10-1993) Glutamate agonist-induced hippocampal lesion and nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase: a light and electron microscopical study in the rat. *Neurosci Lett* **161**: 49-52.

Wright, C. D., Mulsch, A., Busse, R., and Osswald, H. (28-4-1989) Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 813-819.

Wright, C. E., Rees, D. D., and Moncada, S. (1992) Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* **26**: 48-57.

Wu, G. and Meininger, C. J. (1995) Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* **269**: H1312-H1318.

Xu, W., Gorman, P., Sheer, D., Bates, G., Kishimoto, J., Lizhi, L., and Emson, P. (1993) Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-->24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **64**: 62-63.

Xu, W., Charles, I. G., Moncada, S., Gorman, P., Sheer, D., Liu, L., and Emson, P. (15-5-1994) Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* **21**: 419-422.

Yamada, J., Sugimoto, Y., Yoshikawa, T., and Horisaka, K. (28-11-1996) Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT-induced hyperphagia in rats. *Eur J Pharmacol* **316**: 23-26.

Yan, X. X. and Ribak, C. E. (1997) Prenatal development of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity in the human hippocampal formation. *Hippocampus* **7**: 215-231.

Yaqoob, M., Patrick, A. W., McClelland, P., Stevenson, A., Mason, H., White, M. C., and Bell, G. M. (1993) Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* **85**: 557-562.

Young, JS., Rayhrer, CS., Edmisten, TD., Cephas, GA., Tribble, CG., Kron. IL. (2000) Sodium nitroprusside mitigates oleic acid-induced acute lung injury. *Ann Thorac Surg* **69(1)**:224-7.

Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., and Kawai, C. (5-7-1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* **266**: 12544-12547.

Zhou, P., Qian, L., and Iadecola, C. (2005) Nitric oxide inhibits caspase activation and apoptotic morphology but does not rescue neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 348-357.

Zhu, C. B., Hewlett, W. A., Feoktistov, I., Biaggioni, I., and Blakely, R. D. (2004) Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. *Mol Pharmacol* **65**: 1462-1474.

Zilles K. (1985) *The Cortex of the Rat: A Stereotaxic Atlas*.

ANEXOS

Distribución de niveles extracelulares de NO en el sistema nervioso central de la rata adulta utilizando técnicas voltamétricas:

Bregma 3,20 mm

mm VERTICAL	LATERAL																												
	0,00	0,19	0,37	0,56	0,74	0,93	1,11	1,30	1,48	1,67	1,85	2,04	2,22	2,41	2,59	2,78	2,96	3,15	3,33	3,52	3,70	3,89	4,07	4,26	4,44	4,63	4,81	5,00	
9,30							0,606	0,678	0,751	0,823	0,895																		
9,17					0,775	0,685	0,693	0,765	0,866	0,985	1,019	0,992	0,986	0,978	0,970	0,962	0,954												
9,05			1,041	0,951	0,863	0,820	0,875	0,994	1,113	1,091	1,058	1,032	1,027	1,020	1,012	1,005	0,997	1,007											
8,92		1,238	1,195	1,152	1,110	1,067	1,121	1,195	1,163	1,131	1,098	1,072	1,067	1,063	1,055	1,047	1,039	1,050	1,065										
8,79	1,335	1,326	1,317	1,308	1,298	1,289	1,267	1,235	1,203	1,170	1,138	1,112	1,107	1,103	1,097	1,089	1,081	1,092	1,107	1,122									
8,67	1,353	1,344	1,335	1,326	1,316	1,313	1,301	1,275	1,243	1,210	1,178	1,151	1,147	1,143	1,139	1,132	1,124	1,134	1,149	1,165	1,180								
8,54	1,371	1,362	1,353	1,344	1,341	1,339	1,327	1,309	1,283	1,250	1,218	1,191	1,187	1,183	1,179	1,174	1,166	1,177	1,192	1,207	1,222	1,230							
8,41	1,390	1,380	1,371	1,369	1,367	1,365	1,353	1,335	1,317	1,290	1,258	1,231	1,227	1,223	1,218	1,214	1,208	1,219	1,234	1,238	1,238	1,237	1,257						
8,29	1,408	1,400	1,398	1,395	1,393	1,391	1,379	1,361	1,343	1,325	1,298	1,271	1,267	1,263	1,258	1,254	1,249	1,246	1,245	1,245	1,245	1,245	1,264						
8,16	1,423	1,425	1,424	1,422	1,419	1,417	1,405	1,387	1,369	1,351	1,333	1,311	1,307	1,298	1,287	1,275	1,263	1,256	1,252	1,252	1,252	1,252	1,272	1,321					
8,03	1,431	1,445	1,444	1,442	1,441	1,440	1,402	1,384	1,366	1,348	1,330	1,323	1,325	1,313	1,301	1,289	1,277	1,271	1,265	1,260	1,259	1,259	1,279	1,328					
7,91	1,440	1,457	1,464	1,462	1,461	1,460	1,403	1,353	1,334	1,316	1,298	1,292	1,334	1,327	1,315	1,304	1,292	1,285	1,280	1,274	1,269	1,266	1,286	1,336	1,385				
7,78	1,448	1,466	1,483	1,483	1,481	1,480	1,424	1,330	1,303	1,285	1,267	1,261	1,303	1,342	1,330	1,318	1,306	1,299	1,294	1,288	1,283	1,278	1,293	1,343	1,392				
7,66	1,457	1,474	1,491	1,503	1,501	1,500	1,444	1,350	1,272	1,254	1,236	1,230	1,271	1,313	1,344	1,332	1,321	1,314	1,308	1,303	1,297	1,283	1,296	1,350	1,400	1,449			
7,53	1,466	1,483	1,500	1,517	1,521	1,520	1,464	1,370	1,277	1,222	1,204	1,198	1,240	1,282	1,323	1,347	1,335	1,328	1,323	1,314	1,299	1,285	1,298	1,353	1,407	1,456			
7,40	1,474	1,491	1,509	1,526	1,542	1,540	1,484	1,390	1,297	1,204	1,173	1,167	1,209	1,250	1,292	1,334	1,349	1,343	1,331	1,316	1,301	1,287	1,300	1,355	1,410	1,464			
7,28	1,483	1,500	1,517	1,534	1,552	1,560	1,504	1,411	1,317	1,224	1,142	1,136	1,177	1,219	1,261	1,302	1,349	1,347	1,332	1,318	1,303	1,289	1,302	1,357	1,412	1,467	1,520		
7,15	1,491	1,509	1,526	1,543	1,560	1,577	1,524	1,431	1,337	1,244	1,151	1,104	1,146	1,197	1,248	1,300	1,352	1,350	1,334	1,320	1,305	1,290	1,304	1,359	1,414	1,469	1,524		
7,02	1,500	1,517	1,534	1,552	1,564	1,574	1,543	1,449	1,356	1,263	1,170	1,102	1,148	1,200	1,252	1,304	1,356	1,353	1,337	1,322	1,307	1,292	1,305	1,361	1,416	1,471	1,527	1,584	
6,90	1,508	1,518	1,528	1,537	1,547	1,557	1,535	1,467	1,374	1,281	1,188	1,120	1,155	1,203	1,255	1,307	1,359	1,357	1,341	1,325	1,309	1,294	1,307	1,362	1,419	1,476	1,533	1,590	
6,77	1,488	1,501	1,511	1,521	1,531	1,541	1,519	1,476	1,392	1,299	1,206	1,138	1,173	1,207	1,259	1,311	1,362	1,360	1,344	1,328	1,313	1,297	1,311	1,368	1,425	1,482	1,539	1,597	
6,64	1,469	1,482	1,495	1,505	1,514	1,524	1,503	1,460	1,410	1,317	1,224	1,156	1,191	1,225	1,262	1,314	1,366	1,363	1,348	1,332	1,318	1,322	1,338	1,374	1,432	1,489	1,546	1,603	
6,52	1,449	1,463	1,476	1,488	1,498	1,508	1,486	1,443	1,400	1,335	1,242	1,174	1,209	1,243	1,278	1,317	1,369	1,367	1,351	1,345	1,349	1,353	1,368	1,401	1,438	1,495	1,552	1,609	
6,39	1,430	1,443	1,457	1,470	1,482	1,491	1,470	1,427	1,384	1,341	1,260	1,192	1,227	1,261	1,296	1,331	1,373	1,370	1,371	1,375	1,380	1,384	1,399	1,431	1,463	1,501	1,558	1,615	
6,26	1,410	1,424	1,437	1,451	1,464	1,475	1,453	1,410	1,368	1,325	1,278	1,210	1,245	1,279	1,314	1,349	1,388	1,398	1,402	1,406	1,410	1,415	1,430	1,462	1,494	1,526	1,565	1,622	
6,14	1,391	1,404	1,418	1,431	1,445	1,458	1,437	1,394	1,351	1,308	1,265	1,228	1,264	1,305	1,345	1,386	1,426	1,434	1,433	1,437	1,441	1,445	1,461	1,493	1,525	1,557	1,589	1,628	
6,01	1,404	1,418	1,431	1,445	1,458	1,470	1,445	1,402	1,359	1,316	1,273	1,252	1,302	1,343	1,383	1,424	1,464	1,472	1,471	1,470	1,472	1,476	1,492	1,524	1,556	1,588	1,632	1,684	
5,88	1,432	1,445	1,459	1,472	1,484	1,490	1,464	1,420	1,377	1,334	1,291	1,270	1,334	1,381	1,421	1,462	1,503	1,510	1,509	1,508	1,507	1,507	1,522	1,554	1,605	1,657	1,709	1,761	
5,76	1,459	1,472	1,486	1,497	1,504	1,510	1,485	1,438	1,395	1,352	1,309	1,288	1,352	1,416	1,459	1,500	1,541	1,548	1,547	1,546	1,545	1,544	1,577	1,629	1,681	1,734	1,786	1,838	
5,63	1,486	1,500	1,511	1,518	1,524	1,530	1,505	1,459	1,413	1,370	1,327	1,305	1,370	1,434	1,498	1,538	1,579	1,586	1,585	1,584	1,576	1,547	1,582	1,706	1,758	1,810	1,863	1,915	
5,50	1,513	1,525	1,532	1,538	1,544	1,550	1,525	1,479	1,432	1,388	1,345	1,323	1,388	1,452	1,516	1,576	1,617	1,624	1,623	1,605	1,576	1,547	1,582	1,713	1,835	1,887	1,939	1,992	
5,38	1,529	1,545	1,552	1,558	1,564	1,570	1,545	1,499	1,453	1,406	1,363	1,341	1,405	1,470	1,534	1,598	1,655	1,662	1,634	1,605	1,576	1,547	1,582	1,713	1,844	1,964	2,016	2,068	
5,25	1,491	1,523	1,554	1,578	1,584	1,590	1,565	1,519	1,473	1,427	1,380	1,359	1,423	1,488	1,552	1,615	1,666	1,663	1,634	1,605	1,576	1,547	1,582	1,713	1,844	1,975	2,093	2,145	
5,12	1,453	1,484	1,516	1,548	1,580	1,610	1,585	1,539	1,493	1,447	1,401	1,377	1,434	1,486	1,537	1,589	1,640	1,643	1,632	1,605	1,576	1,547	1,582	1,713	1,844	1,975	2,106	2,222	
5,00	1,414	1,446	1,478	1,510	1,541	1,572	1,548	1,501	1,455	1,409	1,363	1,342	1,408	1,460	1,511	1,563	1,614	1,617	1,607	1,597	1,576	1,547	1,582	1,713	1,844	1,975	2,130		
4,87	1,376	1,408	1,440	1,471	1,502	1,532	1,507	1,450	1,404	1,358	1,312	1,291	1,372	1,434	1,486	1,537	1,589	1,591	1,581	1,571	1,561	1,547	1,582	1,716	1,876	2,035	2,194		
4,74	1,338	1,370	1,402	1,433	1,462	1,492	1,466	1,404	1,353	1,307	1,261	1,240	1,321	1,402	1,460	1,511	1,563	1,565	1,555	1,545	1,535	1,525	1,622	1,781	1,940	2,099			
4,62	1,300	1,332	1,363	1,392	1,422	1,452	1,426	1,364	1,302	1,255	1,209	1,189	1,270	1,351	1,432	1,485	1,537	1,539	1,529	1,519	1,533	1,589	1,686	1,845	2,004				
4,49	1,262	1,293	1,323	1,352	1,382	1,412	1,386	1,324	1,261	1,204	1,158	1,137	1,219	1,300	1,381	1,460	1,511	1,513	1,503	1,541	1,597	1,653	1,750	1,909	2,068				
4,37	1,265	1,253	1,282	1,312	1,342	1,371	1,346	1,284	1,221	1,159	1,107	1,086	1,167	1,249	1,330	1,411	1,485	1,494	1,550	1,605	1,661	1,717	1,814	1,973					
4,24	1,379	1,341	1,303	1,272	1,302	1,331	1,306	1,243	1,181	1,119	1,056	1,035	1,116	1,197	1,279	1,363	1,450	1,558	1,614	1,670	1,725	1,781	1,878	2,037					
4,11	1,493	1,455	1,417	1,379	1,341	1,303	1,266	1,203	1,141	1,078	1,016	0,984	1,070	1,158	1,245	1,333	1,420	1,537	1,662	1,734	1,789	1,845	1,942						
3,99	1,606	1,568	1,530	1,493	1,455	1,406	1,275	1,210	1,148	1,086	1,023	0,981	1,040	1,128	1,215	1,303	1,390	1,507	1,632	1,757									

Bregma 1,00 mm

mm	LATERAL																																	
VERTICAL	0,00	0,19	0,38	0,57	0,76	0,95	1,14	1,33	1,52	1,71	1,90	2,09	2,28	2,47	2,66	2,85	3,04	3,23	3,42	3,61	3,80	3,99	4,18	4,37	4,56	4,75	4,94	5,13	5,32	5,51				
9,90																																		
9,72										0,967	0,973	0,987	1,002	0,986																				
9,53								0,954	0,953	0,958	0,973	0,987	1,002	1,017	1,041	1,002	0,980																	
9,35						0,984	0,945	0,943	0,937	0,943	0,957	0,987	1,002	1,017	1,091	1,151	1,111	1,070	1,014															
9,17					1,132	0,984	0,945	0,943	0,937	0,894	0,902	0,933	0,982	1,017	1,091	1,175	1,220	1,117	1,014	1,072	1,059													
8,98			1,333	1,279	1,132	0,984	0,945	0,943	0,937	0,894	0,852	0,877	0,943	1,033	1,091	1,175	1,220	1,117	1,014	1,072	1,165	1,111												
8,80	1,333	1,333	1,333	1,279	1,132	0,994	0,993	0,992	0,982	0,924	0,881	0,898	0,985	1,075	1,131	1,180	1,220	1,117	1,000	1,065	1,247	1,179	1,163											
8,61	1,333	1,333	1,333	1,283	1,151	1,018	1,031	1,079	1,070	0,991	0,934	0,951	1,034	1,118	1,175	1,228	1,232	1,082	0,964	1,028	1,226	1,422	1,194	1,214	1,290									
8,43	1,369	1,369	1,369	1,318	1,180	1,043	1,055	1,119	1,157	1,079	1,000	1,001	1,032	1,063	1,205	1,288	1,293	1,115	0,937	0,995	1,207	1,420	1,357	1,209	1,266	1,341								
8,25	1,407	1,407	1,407	1,356	1,217	1,071	1,051	1,113	1,167	1,122	1,043	0,985	0,959	0,991	1,133	1,296	1,353	1,170	0,983	1,013	1,207	1,420	1,357	1,279	1,236	1,318	1,393							
8,06	1,438	1,438	1,438	1,387	1,242	1,095	1,076	1,101	1,154	1,124	1,077	1,019	0,985	0,959	1,039	1,190	1,292	1,209	1,022	1,053	1,241	1,406	1,360	1,285	1,230	1,264	1,357	1,445	1,520					
7,88	1,442	1,442	1,442	1,391	1,253	1,115	1,096	1,122	1,145	1,115	1,084	1,075	1,070	1,065	1,028	1,060	1,162	1,081	0,999	1,047	1,183	1,319	1,309	1,291	1,236	1,226	1,292	1,385	1,479	1,572				
7,70	1,445	1,445	1,445	1,394	1,264	1,141	1,097	1,109	1,133	1,134	1,103	1,110	1,159	1,171	1,133	1,090	1,066	1,112	1,157	1,160	1,130	1,231	1,222	1,236	1,250	1,233	1,227	1,320	1,414	1,579				
7,51	1,571	1,571	1,571	1,491	1,292	1,169	1,125	1,109	1,120	1,122	1,123	1,130	1,178	1,204	1,109	1,024	1,002	1,216	1,336	1,338	1,298	1,166	1,231	1,260	1,274	1,257	1,256	1,392	1,582	1,772				
7,33	1,832	1,832	1,832	1,751	1,532	1,260	1,150	1,134	1,117	1,109	1,112	1,119	1,142	1,168	1,060	0,930	0,908	1,123	1,340	1,360	1,229	1,097	1,172	1,259	1,301	1,320	1,340	1,476	1,666	1,820				
7,14	2,093	2,093	2,093	2,012	1,652	1,288	1,175	1,155	1,138	1,103	1,097	1,104	1,116	1,131	1,024	0,908	0,847	1,039	1,258	1,279	1,154	1,027	1,116	1,239	1,338	1,384	1,424	1,543	1,672	1,801				
6,96	2,159	2,159	2,159	2,029	1,675	1,316	1,203	1,180	1,158	1,124	1,090	1,090	1,113	1,143	1,094	0,989	0,929	1,047	1,177	1,197	1,101	1,012	1,132	1,257	1,356	1,403	1,486	1,540	1,654	1,783				
6,78	2,162	2,162	2,162	2,032	1,678	1,313	1,210	1,187	1,164	1,139	1,105	1,105	1,140	1,170	1,121	1,058	1,010	1,111	1,138	1,150	1,107	1,019	1,138	1,268	1,395	1,482	1,570	1,624	1,662	1,764				
6,59	2,161	2,161	2,161	2,029	1,660	1,292	1,190	1,183	1,160	1,143	1,117	1,117	1,156	1,195	1,153	1,094	1,029	0,972	0,999	1,011	1,013	1,017	1,172	1,330	1,467	1,560	1,652	1,707	1,745	1,784				
6,41	2,011	2,011	2,011	1,895	1,580	1,264	1,170	1,164	1,156	1,139	1,121	1,128	1,163	1,198	1,186	1,142	1,077	0,988	0,898	0,903	0,973	1,044	1,224	1,403	1,540	1,627	1,703	1,757	1,801	1,844				
6,23	1,862	1,862	1,862	1,746	1,458	1,250	1,167	1,155	1,150	1,147	1,130	1,136	1,166	1,201	1,189	1,168	1,126	1,023	0,919	0,921	1,001	1,071	1,251	1,441	1,599	1,674	1,751	1,805	1,809	1,778				
6,04	1,796	1,796	1,796	1,705	1,482	1,275	1,191	1,151	1,141	1,143	1,140	1,145	1,176	1,200	1,195	1,175	1,137	1,035	0,931	0,933	1,013	1,071	1,296	1,492	1,650	1,725	1,793	1,761	1,730	1,698				
5,86	1,914	1,914	1,914	1,823	1,577	1,325	1,214	1,175	1,136	1,133	1,134	1,143	1,163	1,182	1,187	1,184	1,147	1,044	0,946	0,909	0,957	1,004	1,262	1,531	1,701	1,748	1,786	1,733	1,650	1,619				
5,68	2,032	2,032	2,032	1,941	1,657	1,356	1,240	1,196	1,157	1,121	1,120	1,129	1,146	1,164	1,169	1,172	1,174	1,106	1,039	0,980	0,929	0,938	1,195	1,498	1,715	1,744	1,780	1,726	1,630	1,539				
5,49	2,103	2,103	2,103	1,991	1,688	1,387	1,271	1,221	1,177	1,142	1,107	1,114	1,135	1,169	1,172	1,180	1,183	1,168	1,132	1,074	1,012	0,935	1,212	1,516	1,734	1,762	1,779	1,716	1,621	1,526				
5,31	2,141	2,141	2,141	2,030	1,726	1,413	1,297	1,247	1,194	1,143	1,108	1,118	1,160	1,193	1,194	1,190	1,192	1,177	1,164	1,118	1,043	0,965	1,242	1,539	1,747	1,756	1,766	1,704	1,608	1,494				
5,12	2,180	2,180	2,180	2,065	1,743	1,421	1,309	1,268	1,215	1,138	1,088	1,098	1,158	1,217	1,218	1,214	1,207	1,193	1,181	1,135	1,066	0,995	1,265	1,551	1,747	1,750	1,753	1,679	1,558	1,438				
4,94	2,022	2,022	2,022	1,933	1,692	1,429	1,317	1,280	1,236	1,159	1,082	1,079	1,134	1,188	1,232	1,237	1,230	1,214	1,198	1,153	1,100	1,048	1,283	1,554	1,750	1,751	1,735	1,630	1,503	1,382				
4,76	1,834	1,834	1,834	1,746	1,504	1,429	1,326	1,288	1,253	1,216	1,139	1,095	1,100	1,155	1,199	1,241	1,253	1,240	1,230	1,202	1,158	1,105	1,341	1,593	1,741	1,723	1,707	1,602	1,457	1,326				
4,57	1,669	1,669	1,669	1,659	1,585	1,511	1,408	1,296	1,262	1,246	1,207	1,162	1,154	1,138	1,183	1,237	1,279	1,277	1,267	1,240	1,199	1,174	1,359	1,581	1,726	1,704	1,683	1,574	1,429	1,284				
4,39	1,638	1,638	1,638	1,628	1,602	1,575	1,492	1,378	1,271	1,256	1,240	1,205	1,155	1,105	1,181	1,259	1,301	1,300	1,314	1,326	1,337	1,443	1,566	1,711	1,685	1,655	1,546	1,401	1,256					
4,21	1,607	1,607	1,607	1,597	1,602	1,649	1,591	1,483	1,371	1,285	1,269	1,219	1,130	1,072	1,147	1,247	1,326	1,343	1,361	1,410	1,482	1,501	1,607	1,681	1,697	1,657	1,627	1,518	1,357	1,189				
4,02	1,571	1,571	1,571	1,608	1,689	1,736	1,678	1,582	1,475	1,382	1,298	1,248	1,159	1,088	1,215	1,349	1,450	1,425	1,428	1,477	1,548	1,655	1,637	1,681	1,697	1,656	1,613	1,458	1,290	1,121				
3,84	1,530	1,530	1,530	1,566	1,666	1,768	1,759	1,664	1,557	1,440	1,347	1,299	1,235	1,167	1,309	1,485	1,586	1,561	1,507	1,594	1,701	1,809	1,765	1,713	1,697	1,652	1,606	1,440	1,222	1,054				
3,66	1,488	1,488	1,488	1,525	1,632	1,740	1,774	1,735	1,628	1,426	1,313	1,265	1,266	1,245	1,388	1,558	1,660	1,560	1,458	1,551	1,784	1,963	1,902	1,774	1,675	1,639	1,599	1,433	1,211	0,989				
3,47	1,502	1,502	1,502	1,532	1,613	1,713	1,746	1,753	1,699	1,497	1,296	1,231	1,231	1,229	1,345	1,498	1,599	1,505	1,410	1,502	1,731	1,956	1,868	1,744	1,645	1,609	1,533	1,365	1,158	0,951				
3,29	1,540	1,540	1,540	1,570	1,651	1,703	1,725	1,732	1,727	1,572	1,370	1,228	1,189	1,187	1,303	1,441	1,539	1,449	1,420	1,480	1,664	1,890	1,802	1,696	1,594	1,509	1,424	1,255	1,048	0,847				
3,10	1,579	1,579	1,579	1,595	1,635	1,675	1,699	1,715	1,710	1,605	1,448	1,306	1,230	1,153	1,314	1,524	1,657	1,545	1,517	1,576	1,701	1,825	1,754	1,670	1,573	1,449	1,324	1,149	0,948					
2,92	1,552	1,552	1,552	1,567	1,607	1,648	1,671	1,689	1,693	1,589	1,484	1,388	1,338	1,287	1,574	1,832	1,965	1,805	1,645	1,657	1,729	1,801	1,733	1,655	1,558	1,420	1,242	1,049	0,877					
2,74	1,524	1,524	1,524	1,539	1,587	1,670	1,651	1,660	1,6																									

Distribución de niveles extracelulares de NO en el sistema nervioso central de la rata adulta utilizando técnicas voltamétricas:

Bregma -1,30 mm

mm	LATERAL																																		
VERTICAL	0,00	0,22	0,43	0,65	0,87	1,08	1,30	1,52	1,73	1,95	2,17	2,38	2,60	2,82	3,03	3,25	3,47	3,68	3,90	4,12	4,33	4,55	4,77	4,98	5,20	5,42	5,63	5,85	6,07	6,28	6,50				
9,60			0,520	0,477	0,414	0,398	0,434	0,471	0,508	0,545	0,581	0,618	0,655	0,692	0,728	0,765	0,954	0,940	0,887	0,816	0,746	0,741	0,678	0,689											
9,41		0,520	0,520	0,477	0,414	0,391	0,409	0,425	0,441	0,457	0,473	0,490	0,506	0,522	0,561	0,758	0,954	0,940	0,887	0,821	0,855	0,850	0,717	0,689											
9,21	0,520	0,520	0,520	0,477	0,414	0,391	0,420	0,435	0,451	0,467	0,484	0,500	0,516	0,503	0,561	0,758	0,954	0,947	0,907	0,925	0,963	0,958	0,826	0,693	0,718										
9,02	0,520	0,520	0,520	0,477	0,414	0,391	0,429	0,446	0,461	0,478	0,494	0,510	0,484	0,503	0,561	0,717	0,871	0,975	0,963	0,981	1,049	1,065	0,887	0,709	0,703										
8,82	0,520	0,520	0,520	0,477	0,414	0,391	0,429	0,458	0,473	0,488	0,501	0,473	0,467	0,493	0,531	0,633	0,776	0,879	0,973	1,030	1,073	1,066	0,893	0,716	0,703	0,763									
8,62	0,539	0,539	0,539	0,493	0,426	0,391	0,429	0,466	0,480	0,494	0,483	0,464	0,460	0,476	0,513	0,616	0,719	0,828	0,940	1,020	1,073	1,066	0,893	0,737	0,707	0,743									
8,43	0,561	0,561	0,561	0,514	0,469	0,437	0,429	0,466	0,480	0,494	0,483	0,464	0,460	0,475	0,500	0,599	0,701	0,811	0,922	1,003	1,058	1,074	0,939	0,789	0,720	0,723	0,807								
8,23	0,580	0,580	0,580	0,554	0,517	0,484	0,470	0,466	0,480	0,494	0,483	0,474	0,460	0,470	0,495	0,589	0,684	0,794	0,911	0,981	1,032	1,048	0,949	0,840	0,772	0,718	0,787								
8,04	0,593	0,593	0,593	0,567	0,552	0,544	0,510	0,498	0,509	0,523	0,525	0,517	0,503	0,484	0,491	0,600	0,715	0,806	0,920	0,989	1,017	1,022	0,941	0,866	0,808	0,752	0,767	0,851							
7,84	0,606	0,606	0,606	0,610	0,639	0,631	0,564	0,537	0,546	0,558	0,560	0,558	0,546	0,516	0,510	0,642	0,759	0,849	0,936	0,995	0,980	0,969	0,968	0,892	0,832	0,752	0,760	0,831	0,916						
7,64	0,601	0,601	0,601	0,636	0,686	0,704	0,637	0,574	0,579	0,589	0,598	0,598	0,576	0,533	0,527	0,660	0,779	0,897	0,985	0,968	0,894	0,883	0,882	0,903	0,832	0,752	0,760	0,822	0,896						
7,45	0,593	0,593	0,593	0,627	0,700	0,728	0,676	0,613	0,599	0,606	0,626	0,642	0,620	0,572	0,536	0,630	0,736	0,898	1,037	1,020	0,914	0,826	0,865	0,903	0,832	0,791	0,798	0,822	0,884	0,960					
7,25	0,611	0,611	0,611	0,652	0,721	0,750	0,702	0,652	0,638	0,624	0,643	0,672	0,655	0,600	0,562	0,621	0,692	0,855	1,026	1,041	0,906	0,813	0,859	0,903	0,881	0,879	0,887	0,900	0,913	0,947					
7,06	0,715	0,715	0,715	0,756	0,804	0,809	0,774	0,726	0,689	0,675	0,703	0,737	0,718	0,636	0,588	0,638	0,678	0,803	0,974	0,994	0,885	0,800	0,850	0,903	0,924	0,942	0,962	0,975	0,988	1,001	1,017				
6,86	0,819	0,819	0,819	0,843	0,851	0,857	0,857	0,817	0,764	0,731	0,760	0,801	0,783	0,700	0,627	0,620	0,661	0,785	0,925	0,942	0,828	0,762	0,852	0,905	0,926	0,965	0,989	1,002	1,017	1,037	1,057				
6,67	0,744	0,744	0,744	0,782	0,835	0,907	0,907	0,899	0,842	0,789	0,811	0,850	0,837	0,760	0,688	0,677	0,655	0,755	0,888	0,882	0,763	0,697	0,794	0,912	0,953	0,992	1,016	1,036	1,056	1,076	1,097				
6,47	0,588	0,588	0,588	0,626	0,811	0,961	0,967	0,960	0,860	0,807	0,842	0,893	0,881	0,809	0,732	0,677	0,625	0,713	0,836	0,830	0,706	0,668	0,827	0,986	1,026	1,058	1,069	1,076	1,096	1,116	1,136				
6,27	0,453	0,453	0,453	0,625	0,863	1,013	1,022	1,020	0,920	0,824	0,859	0,920	0,921	0,845	0,767	0,672	0,595	0,682	0,798	0,794	0,690	0,659	0,873	1,061	1,104	1,140	1,152	1,148	1,145	1,156	1,176				
6,08	0,449	0,449	0,449	0,622	0,875	1,039	1,042	1,049	0,983	0,882	0,842	0,894	0,905	0,870	0,801	0,701	0,585	0,712	0,841	0,826	0,687	0,650	0,869	1,095	1,159	1,210	1,213	1,209	1,206	1,202	1,211				
5,88	0,444	0,444	0,444	0,625	0,910	1,074	1,045	1,049	1,020	0,947	0,902	0,873	0,879	0,846	0,802	0,688	0,572	0,706	0,885	0,869	0,721	0,656	0,887	1,114	1,178	1,131	1,105	1,102	1,099	1,155	1,211				
5,69	0,485	0,485	0,485	0,677	0,953	1,104	1,075	1,047	1,018	0,989	0,936	0,880	0,848	0,829	0,784	0,671	0,558	0,683	0,853	0,871	0,730	0,665	0,898	1,132	1,084	1,024	0,998	1,044	1,099	1,155	1,211				
5,49	0,559	0,559	0,559	0,750	1,008	1,117	1,040	1,012	0,997	0,968	0,891	0,819	0,787	0,785	0,769	0,661	0,554	0,646	0,801	0,819	0,704	0,678	0,925	1,171	1,104	1,023	1,008	1,044	1,100	1,155	1,211				
5,29	0,633	0,633	0,633	0,802	1,047	1,156	1,045	0,978	0,963	0,946	0,869	0,778	0,730	0,733	0,723	0,644	0,550	0,642	0,770	0,795	0,726	0,729	0,967	1,211	1,162	1,116	1,101	1,106	1,110	1,156	1,211				
5,10	0,711	0,711	0,711	0,875	1,112	1,201	1,087	0,975	0,913	0,899	0,872	0,788	0,726	0,689	0,675	0,598	0,557	0,662	0,798	0,832	0,778	0,781	1,017	1,230	1,224	1,200	1,194	1,198	1,203	1,207	1,211				
4,90	0,789	0,789	0,789	0,954	1,198	1,288	1,130	1,018	0,884	0,834	0,819	0,801	0,739	0,691	0,634	0,637	0,596	0,699	0,828	0,862	0,799	0,790	1,012	1,226	1,220	1,233	1,245	1,250	1,254	1,218	1,172				
4,71	0,822	0,797	0,797	0,990	1,268	1,374	1,216	1,061	0,927	0,793	0,749	0,727	0,691	0,622	0,565	0,596	0,628	0,724	0,832	0,846	0,769	0,760	0,990	1,221	1,259	1,284	1,297	1,270	1,224	1,178	1,133				
4,51	0,806	0,748	0,728	0,921	1,233	1,408	1,278	1,115	0,916	0,782	0,675	0,628	0,591	0,537	0,496	0,547	0,597	0,677	0,780	0,794	0,728	0,734	1,001	1,269	1,313	1,314	1,264	1,231	1,185	1,139	1,094				
4,31	0,790	0,732	0,673	0,894	1,241	1,416	1,316	1,176	0,960	0,769	0,662	0,563	0,495	0,455	0,433	0,513	0,571	0,651	0,737	0,745	0,684	0,714	1,043	1,323	1,321	1,174	1,124	1,134	1,145	1,100	1,055				
4,12	0,763	0,754	0,696	0,916	1,259	1,420	1,319	1,216	1,028	0,812	0,603	0,487	0,413	0,386	0,364	0,443	0,537	0,699	0,811	0,782	0,645	0,675	1,004	1,355	1,214	1,034	0,983	0,994	1,004	1,015	1,016				
3,92	0,736	0,736	0,721	0,941	1,300	1,462	1,315	1,212	1,087	0,890	0,637	0,397	0,323	0,298	0,319	0,409	0,506	0,710	0,906	0,877	0,725	0,668	1,019	1,374	1,233	1,062	1,006	1,016	1,027	1,036	1,045				
3,73	0,792	0,792	0,792	1,018	1,344	1,506	1,352	1,208	1,083	0,958	0,714	0,445	0,284	0,289	0,310	0,393	0,476	0,686	0,937	0,937	0,759	0,703	1,047	1,392	1,266	1,102	1,045	1,055	1,064	1,073	1,082				
3,53	0,987	0,987	0,987	1,213	1,442	1,518	1,467	1,310	1,135	1,010	0,774	0,505	0,344	0,308	0,302	0,398	0,498	0,774	1,033	1,032	0,815	0,738	0,986	1,222	1,140	1,035	1,083	1,092	1,101	1,110	1,119				
3,33	1,182	1,182	1,182	1,276	1,333	1,409	1,515	1,436	1,239	1,071	0,835	0,566	0,403	0,350	0,322	0,428	0,528	0,804	1,113	1,130	0,935	0,785	0,786	1,011	0,963	0,889	1,137	1,136	1,138	1,147	1,156				
3,14	1,092	1,092	1,092	1,138	1,205	1,282	1,387	1,486	1,335	1,139	0,856	0,568	0,402	0,372	0,344	0,449	0,560	0,820	1,122	1,207	1,078	0,928	0,929	0,906	1,018	1,142	1,190	1,190	1,190	1,190	1,193				
2,94	0,940	0,940	0,940	0,987	1,047	1,121	1,218	1,317	1,341	1,169	0,867	0,547	0,381	0,357	0,371	0,488	0,603	0,844	1,122	1,207	1,106	1,046	1,002	0,966	1,078	1,157	1,171	1,171	1,171	1,187					
2,75	0,804	0,804	0,804	0,835	0,887	0,960	1,056	1,148	1,172	1,196	0,898	0,557	0,384	0,383	0,401	0,525	0,647	0,887	1,142	1,269	1,222	1,168	1,091	1,026	1,081	1,119	1,134	1,143	1,181						
2,55	0,708	0,708	0,708	0,74																															

Bregma -3,14 mm

mm	LATERAL																												
VERTICAL	0,00	0,24	0,48	0,72	0,96	1,20	1,44	1,69	1,93	2,17	2,41	2,65	2,89	3,13	3,37	3,61	3,85	4,09	4,33	4,57	4,81	5,06	5,30	5,54	5,78	6,02	6,26	6,50	
9,39																	0,902	0,854	0,806	0,758	0,717	0,853	0,819						
9,17										0,998	0,950	0,902	0,855	0,807	0,759	0,711	0,663	0,615	0,800	0,901	0,853	0,819	0,830						
8,96			1,143	1,095	1,047	1,004	0,974	0,944	0,914	0,884	0,855	0,825	0,795	0,718	0,630	0,557	0,522	0,634	0,800	0,901	0,851	0,812	0,830						
8,74	1,188	1,188	1,188	1,188	1,166	1,136	1,077	0,990	0,903	0,816	0,729	0,647	0,578	0,508	0,438	0,434	0,557	0,634	0,800	0,893	0,835	0,796	0,824	0,841					
8,53	1,188	1,188	1,188	1,188	1,188	0,956	0,682	0,652	0,696	0,614	0,529	0,459	0,389	0,320	0,347	0,537	0,559	0,650	0,831	0,915	0,819	0,781	0,808	0,836	0,852				
8,31	1,174	1,182	1,188	1,188	1,188	0,956	0,682	0,652	0,696	0,605	0,460	0,338	0,215	0,253	0,432	0,557	0,598	0,689	0,865	0,947	0,813	0,765	0,792	0,820	0,848				
8,10	1,141	1,148	1,156	1,163	1,171	0,947	0,680	0,652	0,696	0,605	0,454	0,325	0,210	0,253	0,432	0,557	0,621	0,775	1,076	1,203	0,943	0,749	0,776	0,804	0,832	0,860			
7,89	1,107	1,115	1,122	1,130	1,137	0,913	0,714	0,705	0,749	0,625	0,454	0,325	0,210	0,253	0,432	0,545	0,588	0,823	1,366	1,518	1,182	0,894	0,870	0,846	0,822	0,844	0,871		
7,67	1,074	1,081	1,089	1,096	1,104	0,955	0,765	0,756	0,802	0,678	0,482	0,366	0,285	0,228	0,365	0,480	0,540	0,778	1,252	1,654	1,339	1,051	1,027	1,003	0,979	0,955	0,931	0,883	
7,46	1,040	1,047	1,055	1,063	1,070	0,928	0,806	0,802	0,847	0,772	0,588	0,492	0,437	0,380	0,342	0,410	0,507	0,659	0,969	1,372	1,496	1,209	1,184	1,160	1,136	1,070	0,967	0,863	
7,24	1,031	1,031	1,031	1,031	1,037	0,954	0,882	0,871	0,890	0,814	0,685	0,598	0,546	0,443	0,354	0,386	0,532	0,684	0,912	1,088	1,414	1,366	1,342	1,258	1,155	1,051	0,947	0,844	
7,03	1,031	1,031	1,031	1,031	1,031	0,984	0,931	0,926	0,934	0,822	0,677	0,622	0,582	0,453	0,276	0,308	0,487	0,574	0,637	0,798	1,127	1,415	1,342	1,239	1,135	1,031	0,928	0,824	
6,81	1,032	1,032	1,031	1,031	1,031	0,988	0,948	0,942	0,948	0,824	0,648	0,593	0,595	0,485	0,277	0,296	0,531	0,618	0,480	0,527	0,946	1,259	1,217	1,174	1,116	1,012	0,908	0,805	
6,60	1,036	1,035	1,034	1,034	1,033	1,002	0,965	0,960	0,964	0,847	0,676	0,606	0,622	0,479	0,234	0,254	0,539	0,698	0,655	0,556	0,791	1,104	1,061	1,019	0,976	0,934	0,889	0,785	
6,39	1,033	1,039	1,038	1,037	1,036	1,005	0,983	0,972	0,974	0,895	0,747	0,674	0,662	0,518	0,236	0,208	0,487	0,723	0,889	0,810	0,635	0,948	0,906	0,863	0,821	0,778	0,767	0,766	
6,17	0,939	0,960	0,981	1,002	1,023	1,025	1,004	0,993	0,985	0,905	0,789	0,727	0,701	0,626	0,389	0,314	0,449	0,668	0,845	0,941	0,836	0,793	0,755	0,753	0,752	0,750	0,748	0,747	
5,96	0,845	0,866	0,887	0,908	0,929	0,937	0,983	0,948	0,940	0,912	0,799	0,736	0,708	0,633	0,515	0,473	0,544	0,650	0,831	0,927	0,824	0,748	0,738	0,734	0,732	0,731	0,729	0,727	
5,74	0,793	0,801	0,809	0,817	0,835	0,893	0,978	0,929	0,863	0,834	0,797	0,747	0,708	0,653	0,544	0,498	0,539	0,645	0,824	0,919	0,824	0,748	0,738	0,728	0,717	0,712	0,710	0,708	
5,53	0,756	0,764	0,773	0,781	0,789	0,868	0,957	0,920	0,831	0,820	0,813	0,729	0,662	0,627	0,586	0,541	0,566	0,611	0,756	0,864	0,824	0,748	0,738	0,728	0,717	0,707	0,697	0,689	
5,31	0,738	0,736	0,736	0,744	0,752	0,826	0,895	0,884	0,817	0,826	0,866	0,782	0,651	0,583	0,564	0,551	0,553	0,598	0,708	0,793	0,809	0,748	0,738	0,728	0,717	0,711	0,704	0,698	
5,10	0,749	0,747	0,744	0,742	0,739	0,784	0,837	0,822	0,786	0,803	0,844	0,807	0,666	0,588	0,568	0,554	0,547	0,595	0,732	0,815	0,779	0,749	0,743	0,736	0,730	0,723	0,717	0,711	
4,89	0,758	0,757	0,755	0,752	0,750	0,795	0,842	0,777	0,733	0,742	0,777	0,746	0,672	0,596	0,573	0,560	0,556	0,615	0,775	0,861	0,805	0,755	0,752	0,749	0,743	0,736	0,730	0,723	
4,67	0,751	0,753	0,754	0,756	0,758	0,799	0,846	0,780	0,681	0,688	0,717	0,676	0,599	0,633	0,644	0,619	0,573	0,627	0,766	0,867	0,810	0,760	0,757	0,754	0,751	0,748	0,743	0,736	
4,46	0,744	0,746	0,747	0,749	0,751	0,792	0,835	0,781	0,682	0,654	0,685	0,625	0,521	0,556	0,685	0,693	0,614	0,598	0,706	0,807	0,816	0,766	0,763	0,760	0,757	0,754	0,750	0,747	
4,24	0,525	0,591	0,658	0,725	0,743	0,777	0,814	0,764	0,682	0,654	0,658	0,593	0,477	0,515	0,666	0,699	0,602	0,586	0,682	0,749	0,785	0,771	0,768	0,765	0,761	0,757	0,752	0,748	
4,03	0,228	0,294	0,361	0,428	0,495	0,588	0,729	0,724	0,649	0,644	0,643	0,574	0,460	0,505	0,683	0,717	0,613	0,565	0,641	0,706	0,737	0,771	0,771	0,766	0,762	0,758	0,754	0,750	
3,81	0,202	0,116	0,064	0,131	0,198	0,367	0,768	0,701	0,571	0,583	0,622	0,553	0,441	0,486	0,662	0,737	0,647	0,598	0,629	0,668	0,717	0,755	0,759	0,762	0,764	0,760	0,755	0,751	
3,60	0,584	0,498	0,412	0,327	0,241	0,501	0,824	0,740	0,534	0,517	0,584	0,576	0,481	0,484	0,616	0,691	0,647	0,611	0,586	0,619	0,701	0,739	0,743	0,746	0,750	0,754	0,757	0,753	
3,39	0,935	0,880	0,794	0,708	0,623	0,883	0,864	0,740	0,541	0,520	0,584	0,581	0,533	0,537	0,625	0,658	0,635	0,588	0,504	0,531	0,685	0,723	0,727	0,730	0,734	0,738	0,748	0,761	
3,17	0,857	0,875	0,892	0,910	0,927	0,879	0,815	0,690	0,547	0,527	0,579	0,578	0,528	0,559	0,641	0,668	0,636	0,588	0,495	0,469	0,606	0,707	0,712	0,724	0,737	0,750	0,762	0,775	
2,96	0,780	0,797	0,814	0,832	0,849	0,803	0,651	0,667	0,524	0,395	0,410	0,475	0,517	0,549	0,650	0,682	0,639	0,569	0,463	0,437	0,566	0,656	0,714	0,738	0,751	0,764	0,776	0,789	
2,74	0,634	0,672	0,711	0,749	0,772	0,610	0,368	0,437	0,513	0,385	0,263	0,306	0,420	0,526	0,619	0,658	0,626	0,555	0,444	0,378	0,477	0,567	0,626	0,684	0,743	0,778	0,790	0,803	
2,53	0,465	0,503	0,541	0,579	0,617	0,397	0,161	0,247	0,409	0,355	0,225	0,258	0,385	0,489	0,577	0,616	0,593	0,654	0,677	0,550	0,389	0,479	0,537	0,596	0,655	0,713	0,772	0,817	
2,31	0,374	0,368	0,371	0,409	0,448	0,286	0,250	0,284	0,402	0,336	0,175	0,209	0,345	0,456	0,553	0,600	0,593	0,654	0,823	0,794	0,370	0,391	0,449	0,508	0,566	0,652	0,742	0,831	
2,10	0,402	0,396	0,390	0,383	0,377	0,357	0,335	0,373	0,428	0,348	0,206	0,215	0,372	0,479	0,560	0,607	0,596	0,649	0,806	0,821	0,520	0,309	0,399	0,488	0,578	0,667	0,757	0,846	
1,89	0,460	0,424	0,418	0,412	0,405	0,386	0,412	0,559	0,630	0,494	0,319	0,322	0,415	0,521	0,586	0,621	0,621	0,666	0,781	0,793	0,574	0,439	0,471	0,503	0,593	0,682	0,771	0,861	
1,67	0,927	0,822	0,717	0,612	0,507	0,469	0,502	0,649	0,830	0,695	0,471	0,415	0,491	0,568	0,635	0,666	0,654	0,698	0,721	0,853	0,718	0,582	0,614	0,646	0,678	0,710	0,786	0,876	
1,46	1,393	1,288	1,183	1,079	0,974	0,914	0,658	0,811	0,992	0,836	0,595	0,503	0,530	0,606	0,683	0,715	0,702	0,598	0,435	0,567	0,861	0,725	0,757	0,789	0,821	0,853	0,884		
1,24	1,398	1,435	1,471	1,508	1,440	1,130	0,677	0,866	1,190	1,034	0,729	0,627	0,613	0,615	0,674	0,726	0,748	0,643	0,392	0,346	0,771	0,869	0,900	0,932	0,914	0,896			
1,03	1,236	1,272	1,309	1,345	1,382	1,039	0,655	1,037	1,418	1,191	0,867	0,689	0,652	0,637	0,635	0,687	0,734	0,763	0,607	0,569	0,830	0,945	0,927	0,909	0,891				
0,81	1,285	1,203	1,146	1,183	1,219	0,927	0,715	1,316	1,892	1,560	0,980	0,802	0,717	0,678	0,678	0,690	0,755	0,785	0,749	0,757	0,852	0,922	0,904	0,886					
0,60	1,653	1,570	1,488	1,405	1,322	1,072	0,791	1,376	2,222	1,993	1,285																		

Bregma -6,80 mm

mm	LATERAL																														
	0,00	0,24	0,48	0,72	0,96	1,20	1,44	1,69	1,93	2,17	2,41	2,65	2,89	3,13	3,37	3,61	3,85	4,09	4,33	4,57	4,81	5,06	5,30	5,54	5,78	6,02	6,26	6,50			
9,60								1,859	1,733																						
9,40					2,039	1,814	1,665	1,609	1,587	1,547	1,777	2,177																			
9,21				1,914	2,204	1,922	1,620	1,515	1,528	1,505	1,462	1,692	1,964	1,937	1,749																
9,01			1,596	1,923	2,226	1,945	1,495	1,394	1,407	1,398	1,375	1,475	1,635	1,608	1,593	1,664	1,773														
8,82		1,218	1,570	1,897	2,233	1,804	1,324	1,223	1,243	1,234	1,248	1,327	1,431	1,505	1,571	1,642	1,751	1,860	1,969	1,524											
8,62		1,192	1,544	1,871	2,272	1,802	1,167	1,058	1,079	1,108	1,150	1,230	1,247	1,320	1,440	1,596	1,698	1,801	1,907	1,931	1,766	1,601									
8,42	0,819	1,166	1,518	1,874	2,312	1,816	1,137	0,997	0,964	0,970	1,025	1,044	1,062	1,164	1,366	1,521	1,624	1,732	1,841	1,865	1,701	1,536	1,371	1,248							
8,23	0,806	1,148	1,491	1,874	2,251	1,757	1,087	0,917	0,810	0,815	0,834	0,853	0,888	1,043	1,282	1,448	1,557	1,666	1,775	1,800	1,635	1,470	1,337	1,230							
8,03	0,793	1,135	1,512	1,809	2,164	1,671	1,017	0,783	0,676	0,656	0,643	0,679	0,736	0,891	1,132	1,331	1,480	1,600	1,709	1,734	1,569	1,442	1,319	1,212	1,197						
7,84	0,780	1,122	1,547	1,844	2,127	1,577	0,920	0,687	0,664	0,646	0,585	0,572	0,613	0,746	0,983	1,182	1,332	1,481	1,631	1,672	1,548	1,424	1,301	1,194	1,179						
7,64	0,767	1,157	1,582	1,879	2,090	1,522	0,824	0,654	0,654	0,600	0,498	0,485	0,537	0,672	0,877	1,018	1,162	1,307	1,486	1,613	1,511	1,407	1,283	1,176	1,161	1,146					
7,44	0,762	1,192	1,616	1,890	2,053	1,482	0,772	0,609	0,594	0,511	0,410	0,412	0,463	0,578	0,696	0,826	0,971	1,180	1,409	1,537	1,434	1,332	1,230	1,153	1,143	1,128					
7,25	0,780	1,217	1,651	1,800	1,838	1,392	0,717	0,547	0,503	0,420	0,357	0,364	0,402	0,444	0,506	0,645	0,874	1,104	1,333	1,460	1,358	1,256	1,173	1,111	1,111	1,110	1,095				
7,05	0,797	1,235	1,627	1,524	1,545	1,099	0,597	0,469	0,425	0,370	0,309	0,306	0,325	0,367	0,453	0,604	0,800	1,027	1,256	1,383	1,281	1,203	1,130	1,069	1,069	1,069	1,069				
6,86	0,815	1,252	1,572	1,469	1,331	0,967	0,558	0,430	0,392	0,337	0,283	0,269	0,271	0,331	0,443	0,594	0,790	0,987	1,183	1,307	1,233	1,161	1,088	1,027	1,027	1,027	1,029	1,039			
6,66	0,832	1,204	1,517	1,414	1,207	0,876	0,520	0,396	0,360	0,315	0,276	0,263	0,341	0,420	0,481	0,577	0,770	0,962	1,158	1,275	1,196	1,119	1,046	0,985	0,985	0,993	1,003	1,012			
6,47	0,841	1,149	1,462	1,342	1,079	0,757	0,465	0,370	0,340	0,310	0,271	0,335	0,435	0,505	0,469	0,538	0,731	0,931	1,135	1,252	1,173	1,093	1,013	0,948	0,957	0,967	0,976	0,986			
6,27	0,814	1,106	1,406	1,228	1,033	0,736	0,442	0,349	0,337	0,307	0,348	0,432	0,506	0,474	0,430	0,499	0,703	0,908	1,112	1,229	1,149	1,070	0,996	0,938	0,938	0,940	0,950	0,960			
6,07	0,786	1,078	1,406	1,237	1,043	0,745	0,429	0,344	0,333	0,385	0,444	0,502	0,487	0,455	0,441	0,532	0,680	0,885	1,089	1,206	1,126	1,054	0,986	0,928	0,928	0,928	0,928	0,934			
5,88	0,759	1,051	1,446	1,277	1,059	0,743	0,416	0,332	0,303	0,354	0,429	0,443	0,448	0,502	0,551	0,641	0,780	0,919	1,066	1,183	1,113	1,044	0,976	0,918	0,918	0,918	0,918	0,920			
5,68	0,731	1,077	1,487	1,318	1,054	0,730	0,403	0,307	0,267	0,301	0,326	0,339	0,358	0,447	0,591	0,733	0,857	0,981	1,106	1,178	1,104	1,034	0,966	0,908	0,908	0,909	0,911	0,912			
5,49	0,707	1,118	1,528	1,351	1,041	0,717	0,389	0,283	0,251	0,249	0,244	0,249	0,274	0,363	0,557	0,720	0,844	0,974	1,110	1,182	1,108	1,035	0,961	0,898	0,900	0,902	0,903	0,905			
5,29	0,727	1,152	1,568	1,338	1,031	0,701	0,373	0,266	0,273	0,272	0,246	0,237	0,239	0,340	0,544	0,707	0,841	0,978	1,114	1,186	1,112	1,039	0,962	0,894	0,894	0,894	0,894	0,896	0,898		
5,09	0,748	1,172	1,586	1,332	1,025	0,694	0,359	0,287	0,295	0,274	0,240	0,226	0,203	0,305	0,508	0,687	0,845	0,982	1,118	1,190	1,117	1,039	0,958	0,889	0,889	0,889	0,889	0,891			
4,90	0,768	1,193	1,580	1,326	1,020	0,683	0,340	0,267	0,271	0,251	0,224	0,202	0,172	0,257	0,444	0,623	0,793	0,963	1,123	1,194	1,115	1,034	0,953	0,885	0,885	0,885	0,885	0,886			
4,70	0,788	1,195	1,575	1,321	0,970	0,646	0,321	0,245	0,245	0,228	0,218	0,195	0,174	0,248	0,398	0,561	0,737	0,914	1,090	1,195	1,111	1,030	0,949	0,880	0,880	0,881	0,883	0,885			
4,51	0,809	1,189	1,569	1,313	0,906	0,582	0,300	0,236	0,237	0,230	0,213	0,198	0,184	0,258	0,394	0,548	0,724	0,905	1,093	1,198	1,114	1,030	0,947	0,876	0,878	0,880	0,882	0,883			
4,31	0,806	1,184	1,563	1,249	0,858	0,582	0,309	0,246	0,257	0,249	0,225	0,205	0,192	0,255	0,382	0,535	0,719	0,908	1,096	1,200	1,117	1,033	0,949	0,877	0,877	0,878	0,880	0,882			
4,11	0,804	1,181	1,561	1,222	0,835	0,565	0,316	0,264	0,276	0,260	0,231	0,212	0,214	0,278	0,394	0,538	0,722	0,910	1,098	1,203	1,119	1,035	0,951	0,879	0,879	0,879	0,879	0,881			
3,92	0,801	1,178	1,567	1,220	0,812	0,546	0,303	0,257	0,277	0,284	0,249	0,238	0,237	0,300	0,416	0,561	0,739	0,918	1,101	1,206	1,121	1,037	0,952	0,880	0,880	0,880	0,880	0,886			
3,72	0,798	1,180	1,573	1,226	0,744	0,508	0,294	0,252	0,284	0,294	0,278	0,274	0,271	0,469	0,473	0,583	0,777	0,983	1,189	1,200	1,123	1,038	0,953	0,882	0,882	0,884	0,893	0,901			
3,53	0,795	1,186	1,579	1,232	0,635	0,399	0,262	0,261	0,293	0,298	0,297	0,274	0,408	0,608	0,723	0,821	1,027	1,192	1,195	1,173	1,099	1,024	0,950	0,883	0,891	0,900	0,908	0,917			
3,33	0,797	1,192	1,584	1,132	0,563	0,383	0,275	0,274	0,293	0,298	0,297	0,344	0,544	0,744	0,944	1,071	1,164	1,166	1,168	1,147	1,073	0,998	0,931	0,909	0,909	0,915	0,923	0,932			
3,13	0,800	1,194	1,583	1,129	0,589	0,406	0,288	0,277	0,293	0,298	0,297	0,480	0,688	0,907	1,126	1,170	1,137	1,140	1,142	1,121	1,046	0,987	0,960	0,938	0,938	0,938	0,939	0,947			
2,94	0,803	1,197	1,554	1,119	0,615	0,427	0,298	0,280	0,281	0,274	0,285	0,652	0,992	1,210	1,429	1,473	1,314	1,154	1,116	1,094	1,043	1,016	0,989	0,967	0,967	0,967	0,967	0,962			
2,74	0,806	1,185	1,525	1,090	0,554	0,412	0,301	0,277	0,252	0,245	0,256	0,623	0,991	1,358	1,725	1,776	1,617	1,440	1,254	1,112	1,072	1,045	1,018	0,996	0,996	0,994	0,986	0,977			
2,55	0,809	1,156	1,496	1,061	0,457	0,316	0,275	0,254	0,229	0,232	0,245	0,642	1,023	1,404	1,785	1,904	1,719	1,534	1,354	1,214	1,160	1,106	1,053	1,025	1,018	1,009	1,000	0,991			
2,35	0,798	1,127	1,466	0,976	0,376	0,279	0,268	0,247	0,257	0,265	0,277	0,686	1,094	1,498	1,878	1,998	1,815	1,636	1,456	1,316	1,262	1,208	1,151	1,032	1,032	1,024	1,015	1,006			
2,16	0,784	1,113	1,406	0,941	0,369	0,272	0,262	0,266	0,290	0,297	0,309	0,718	1,126	1,531	1,930	2,096	1,917	1,738	1,558	1,417	1,364	1,293	1,151	1,032	1,032	1,032	1,029	1,020			
1,96	0,769	1,098	1,028	0,730	0,363	0,278	0,322	0,349	0,578	0,940	0,940	0,926	1,086	1,486	1,886	2,052	1,944	1,837	1,660	1,519	1,434	1,293	1,151	1,032	1,032	1,032	1,032				
1,76	0,755	0,946	0,649	0,504	0,778	0,432	0,424	0,520	1,284	1,670	1,823	1,808	1,794	1,779	1,841	2,007	1,900	1,792	1,681	1,569	1,434	1,293	1,151	1,032	1,032	1,032					
1,57	0,740	0,740	1,014	1,289	1,563	1,217	0,743	1,194	1,959	2,108	2,102	2,088	2,073	2,059	1,979	1,879	1,778	1,678	1,578	1,477	1,377	1,266	1,151	1,032							
1,37</																															

Bregma -11,00 mm

mm	LATERAL																											
VERTICAL	0,00	0,22	0,34	0,45	0,67	0,90	1,12	1,35	1,46	1,57	1,80	2,02	2,24	2,47	2,69	2,92	3,14	3,37	3,59	3,82	4,04	4,27	4,49	4,71	4,94	5,16	5,39	5,50
9,00	4,721	4,796	4,803	4,766	4,433	3,988	3,653	3,388	3,219	2,990	2,400	1,834	1,440	1,173	0,955	0,767	0,625	0,537	0,486	0,457	0,439	0,429	0,422	0,418	0,416	0,414	0,413	0,412
8,63	4,053	4,166	4,177	4,111	3,679	3,124	2,947	3,066	3,024	2,819	2,019	1,267	1,042	0,952	0,775	0,521	0,356	0,308	0,294	0,287	0,286	0,290	0,295	0,301	0,306	0,311	0,314	0,316
8,25	3,500	3,593	3,593	3,505	2,977	2,276	2,116	2,495	2,602	2,427	1,568	1,010	1,143	1,391	1,210	0,749	0,426	0,299	0,238	0,206	0,200	0,206	0,215	0,223	0,230	0,235	0,240	0,242
7,88	2,988	3,074	3,090	3,036	2,567	1,876	1,382	1,046	0,873	0,743	0,584	0,677	1,277	1,880	1,747	1,213	0,727	0,389	0,210	0,166	0,171	0,179	0,183	0,186	0,188	0,188	0,189	0,190
7,51	2,374	2,444	2,456	2,415	2,133	1,693	1,186	0,714	0,537	0,408	0,317	0,542	1,161	1,681	1,680	1,310	0,826	0,409	0,190	0,163	0,193	0,194	0,189	0,182	0,173	0,165	0,158	0,155
7,13	2,090	2,149	2,161	2,122	1,811	1,322	0,902	0,639	0,551	0,482	0,454	0,716	1,296	1,756	1,607	1,092	0,618	0,302	0,159	0,164	0,199	0,221	0,218	0,201	0,180	0,158	0,140	0,133
6,76	2,013	2,064	2,064	2,013	1,681	1,154	0,745	0,512	0,429	0,386	0,438	0,726	1,269	1,653	1,431	0,852	0,441	0,277	0,240	0,286	0,331	0,322	0,283	0,239	0,197	0,160	0,128	0,116
6,39	1,810	1,844	1,854	1,841	1,674	1,412	1,073	0,721	0,589	0,499	0,450	0,614	0,993	1,302	1,156	0,769	0,480	0,340	0,314	0,381	0,433	0,387	0,318	0,257	0,206	0,164	0,131	0,118
6,02	1,289	1,294	1,296	1,291	1,286	1,235	1,041	0,756	0,635	0,543	0,451	0,459	0,552	0,635	0,705	0,701	0,576	0,407	0,315	0,313	0,326	0,308	0,271	0,230	0,191	0,158	0,130	0,119
5,64	0,881	0,873	0,879	0,881	0,876	0,835	0,761	0,665	0,613	0,567	0,495	0,430	0,341	0,316	0,469	0,638	0,614	0,439	0,298	0,245	0,223	0,215	0,203	0,185	0,164	0,143	0,123	0,115
5,27	0,778	0,768	0,770	0,767	0,720	0,634	0,611	0,654	0,661	0,632	0,505	0,393	0,334	0,341	0,456	0,596	0,585	0,449	0,326	0,250	0,204	0,181	0,168	0,156	0,144	0,131	0,118	0,112
4,90	0,763	0,753	0,759	0,767	0,746	0,712	0,651	0,562	0,524	0,498	0,464	0,432	0,422	0,436	0,434	0,426	0,435	0,429	0,377	0,295	0,226	0,184	0,160	0,146	0,136	0,127	0,119	0,114
4,52	0,627	0,630	0,630	0,627	0,642	0,637	0,577	0,494	0,466	0,456	0,477	0,491	0,425	0,346	0,337	0,359	0,396	0,430	0,404	0,313	0,226	0,185	0,162	0,147	0,135	0,127	0,119	0,115
4,15	0,758	0,766	0,770	0,765	0,698	0,590	0,481	0,398	0,380	0,382	0,429	0,463	0,437	0,391	0,355	0,350	0,373	0,404	0,390	0,323	0,255	0,203	0,171	0,151	0,138	0,128	0,118	0,113
3,78	0,832	0,854	0,855	0,837	0,704	0,516	0,384	0,318	0,307	0,330	0,430	0,481	0,436	0,366	0,322	0,308	0,316	0,328	0,318	0,276	0,227	0,191	0,168	0,153	0,141	0,130	0,121	0,115
3,40	0,708	0,723	0,728	0,718	0,590	0,403	0,364	0,480	0,530	0,536	0,472	0,434	0,411	0,363	0,311	0,253	0,238	0,272	0,282	0,238	0,191	0,175	0,167	0,157	0,146	0,134	0,121	0,114
3,03	0,520	0,530	0,530	0,520	0,525	0,526	0,484	0,421	0,390	0,360	0,300	0,317	0,512	0,654	0,475	0,191	0,106	0,187	0,247	0,240	0,216	0,204	0,192	0,177	0,160	0,141	0,122	0,113
2,66	0,683	0,682	0,686	0,688	0,664	0,613	0,512	0,363	0,301	0,273	0,310	0,431	0,630	0,744	0,566	0,266	0,127	0,158	0,221	0,260	0,273	0,260	0,236	0,209	0,181	0,153	0,127	0,116
2,28	0,695	0,701	0,702	0,696	0,649	0,577	0,518	0,488	0,479	0,456	0,406	0,443	0,588	0,672	0,541	0,316	0,186	0,174	0,221	0,283	0,316	0,302	0,268	0,231	0,197	0,166	0,138	0,126
1,91	0,597	0,613	0,613	0,602	0,557	0,482	0,443	0,447	0,447	0,447	0,447	0,463	0,509	0,512	0,395	0,233	0,160	0,175	0,222	0,279	0,311	0,293	0,261	0,228	0,196	0,167	0,141	0,129
1,54	0,665	0,665	0,668	0,669	0,614	0,545	0,491	0,456	0,452	0,460	0,502	0,522	0,444	0,342	0,255	0,190	0,174	0,201	0,229	0,238	0,235	0,232	0,220	0,201	0,180	0,157	0,135	0,125
1,17	0,465	0,474	0,475	0,470	0,456	0,437	0,425	0,427	0,428	0,429	0,416	0,368	0,291	0,205	0,163	0,160	0,188	0,236	0,255	0,229	0,203	0,193	0,185	0,174	0,159	0,142	0,124	0,115
0,79	0,412	0,420	0,420	0,411	0,362	0,301	0,310	0,385	0,414	0,418	0,366	0,301	0,243	0,197	0,174	0,168	0,186	0,216	0,227	0,213	0,192	0,179	0,168	0,156	0,142	0,127	0,111	0,103
0,42	0,450	0,456	0,461	0,458	0,367	0,249	0,239	0,311	0,333	0,327	0,258	0,206	0,221	0,258	0,242	0,204	0,197	0,214	0,222	0,211	0,193	0,175	0,159	0,144	0,129	0,114		
0,05	0,256	0,264	0,264	0,258	0,241	0,221	0,220	0,232	0,224	0,198	0,104	0,049	0,142	0,252	0,255	0,210	0,195	0,207	0,211	0,199	0,181	0,164	0,147	0,131	0,116	0,102		
-0,33	0,225	0,220	0,223	0,225	0,222	0,216	0,208	0,191	0,173	0,147	0,083	0,055	0,105	0,170	0,194	0,186	0,178	0,178	0,176	0,169	0,158	0,144	0,130	0,116	0,102			
-0,70	0,249	0,243	0,243	0,242	0,233	0,220	0,207	0,191	0,179	0,161	0,116	0,093	0,102	0,125	0,142	0,149	0,151	0,150	0,146	0,141	0,132	0,122	0,110					

Bregma -12,30 mm

mm	LATERAL																									
	0,00	0,18	0,37	0,55	0,73	0,92	1,10	1,29	1,47	1,65	1,84	2,02	2,20	2,39	2,57	2,76	2,94	3,12	3,31	3,49	3,67	3,86	4,04	4,22	4,41	4,50
8,00	1,475	1,475	1,475	1,483	1,513	1,544																				
7,65	1,344	1,344	1,344	1,352	1,358	1,334	1,143	0,820	0,850	1,064																
7,31	1,086	1,086	1,086	1,079	1,055	1,071	0,910	0,586	0,416	0,386	0,380	0,374	0,440	0,836	1,433											
6,96	0,743	0,743	0,743	0,755	0,798	0,840	0,810	0,662	0,513	0,483	0,477	0,471	0,453	0,401	0,385	0,425	0,465	0,706	1,205							
6,62	0,538	0,538	0,538	0,550	0,635	0,744	0,763	0,708	0,610	0,580	0,531	0,479	0,427	0,376	0,359	0,400	0,440	0,480	0,520	0,575	0,753	0,938	1,192	1,575		
6,27	0,413	0,413	0,413	0,443	0,552	0,614	0,607	0,558	0,572	0,536	0,491	0,445	0,400	0,350	0,334	0,385	0,442	0,500	0,557	0,615	0,793	0,978	1,163	1,340	1,412	1,448
5,92	0,331	0,331	0,331	0,345	0,397	0,448	0,479	0,493	0,506	0,471	0,425	0,380	0,363	0,372	0,395	0,442	0,489	0,540	0,597	0,655	0,833	0,970	1,042	1,114	1,187	1,223
5,58	0,262	0,262	0,262	0,277	0,372	0,475	0,501	0,464	0,441	0,418	0,426	0,435	0,443	0,452	0,475	0,522	0,569	0,616	0,645	0,630	0,690	0,755	0,820	0,889	0,961	0,998
5,23	0,331	0,331	0,331	0,360	0,462	0,504	0,503	0,459	0,397	0,411	0,441	0,471	0,501	0,530	0,552	0,536	0,521	0,506	0,491	0,476	0,536	0,601	0,666	0,720	0,755	0,772
4,88	0,417	0,417	0,417	0,429	0,471	0,492	0,462	0,404	0,342	0,357	0,387	0,417	0,427	0,433	0,428	0,403	0,378	0,353	0,337	0,322	0,382	0,426	0,461	0,495	0,530	0,547
4,54	0,457	0,457	0,457	0,461	0,388	0,316	0,285	0,288	0,288	0,290	0,297	0,303	0,310	0,316	0,311	0,286	0,261	0,236	0,229	0,230	0,242	0,254	0,267	0,280	0,304	0,322
4,19	0,466	0,466	0,466	0,446	0,368	0,271	0,230	0,221	0,199	0,197	0,199	0,200	0,202	0,203	0,206	0,207	0,207	0,208	0,209	0,210	0,222	0,234	0,247	0,253	0,253	0,254
3,85	0,480	0,480	0,480	0,453	0,356	0,272	0,232	0,211	0,161	0,160	0,171	0,181	0,183	0,185	0,186	0,187	0,187	0,188	0,189	0,190	0,202	0,203	0,204	0,204	0,205	0,205
3,50	0,503	0,503	0,503	0,485	0,421	0,358	0,294	0,231	0,167	0,158	0,160	0,161	0,163	0,165	0,166	0,167	0,167	0,169	0,175	0,181	0,177	0,172	0,168	0,163	0,159	0,157
3,15	0,503	0,503	0,503	0,485	0,423	0,362	0,300	0,230	0,157	0,145	0,146	0,146	0,146	0,147	0,150	0,157	0,163	0,169	0,175	0,181	0,177	0,172	0,168	0,145		
2,81	0,477	0,477	0,477	0,460	0,400	0,334	0,278	0,218	0,146	0,134	0,134	0,132	0,127	0,122	0,124	0,137	0,150	0,163	0,175	0,181	0,172	0,146	0,120	0,127		
2,46	0,426	0,426	0,426	0,407	0,337	0,267	0,223	0,177	0,132	0,117	0,112	0,107	0,102	0,097	0,099	0,111	0,124	0,133	0,140	0,146	0,121	0,095	0,105			
2,12	0,329	0,329	0,329	0,310	0,275	0,260	0,228	0,193	0,158	0,141	0,128	0,115	0,102	0,088	0,073	0,070	0,076	0,082	0,088	0,094	0,070	0,083	0,111			
1,77	0,285	0,285	0,285	0,281	0,266	0,246	0,233	0,218	0,184	0,167	0,154	0,137	0,120	0,103	0,087	0,076	0,065	0,053	0,042	0,043	0,060	0,091				
1,42	0,260	0,260	0,260	0,255	0,233	0,212	0,203	0,197	0,193	0,184	0,169	0,152	0,134	0,117	0,102	0,090	0,079	0,066	0,053	0,041	0,069	0,093				
1,08	0,209	0,209	0,209	0,203	0,190	0,178	0,170	0,173	0,176	0,166	0,154	0,140	0,126	0,116	0,111	0,101	0,088	0,075	0,062	0,049	0,075					
0,73	0,211	0,211	0,211	0,208	0,195	0,171	0,162	0,161	0,148	0,135	0,121	0,119	0,118	0,116	0,111	0,101	0,090	0,079	0,069	0,058						
0,38	0,217	0,217	0,217	0,210	0,186	0,163	0,148	0,136	0,124	0,121	0,121	0,119	0,118	0,116	0,111	0,101	0,090	0,079	0,069	0,058						
0,04	0,200	0,200	0,200	0,193	0,175	0,157	0,142	0,130	0,118	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	0,111	0,101	0,090	0,079								
-0,31	0,162	0,162	0,162	0,157	0,144	0,147	0,142	0,122	0,095	0,094	0,098	0,103	0,107	0,112	0,090											
-0,65	0,140	0,140	0,140	0,141	0,144	0,141	0,129	0,106	0,079	0,080	0,088	0,087														
-1,00	0,140	0,140	0,140	0,137	0,125	0,112	0,100	0,088	0,076																	