

**SEÑALIZACIÓN ANTERÓGRADA MEDIADA POR ÓXIDO
NÍTRICO PRODUCIDO EN FIBRAS PREMOTORAS DEL
NÚCLEO MOTOR DEL TRIGÉMINO**

Dra. Adriana Fernández Alvarez, MD, MSc

Tesis de Doctorado

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología – Subárea Neurociencias

Universidad de la República

Montevideo-Uruguay

Año 2011

Tutora: Dra. Verónica Abudara

Co-tutor: Dr. Ruben Budelli

Tribunal de Tesis:

Dr. Omar Macadar (Presidente)

Dra. Ana Denicola (Vocal)

Dra. Patricia Cassina (Vocal)

INDICE

1.	RESUMEN DEL PROBLEMA SOBRE EL QUE VERSA LA TESIS	8
2.	ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	9
2.1.	Contextualización histórica. Evidencias recientes para interrogantes antiguas: de los postulados de Cajal y Golgi a la transmisión por cableado y en volumen de Agnati y Fuxe	9
2.2.	La evolución del concepto de la transmisión por cableado y en volumen	15
2.2.1.	El avance en el perfil de las definiciones de WT y VT	15
2.2.2.	Nuevos criterios para clasificar la comunicación intercelular en el SNC: de las redes celulares a las redes moleculares	17
2.3.	El óxido nítrico (NO): un mensajero en volumen para la transmisión "NO sináptica" en el SNC	25
2.3.1.	Los criterios que definen a un neurotransmisor	26
2.3.2.	Las características fisico-químicas del NO lo convierten en un neurotransmisor atípico	28
2.3.3.	Algunos de los blancos moleculares del NO	32
2.3.4.	El cese de la acción mensajera del NO	36
2.3.5.	Las características de las redes de comunicación del NO como neurotransmisor en volumen en el SNC	38
2.4.	Una cuestión central de la transmisión en volumen: ¿Cuánto y cómo difunde el NO desde sus fuentes en el SNC?	40
2.4.1.	Valores obtenidos empíricamente para concentración y difusión de NO en el SNC	40
2.4.2.	Modelos matemáticos para predecir la difusión de NO	43
2.5.	El NO en el núcleo motor del trigémino: ¿una señal espacial que coordina la actividad neural?	48
2.5.1.	El NO de origen exógeno modula las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas trigeminales	48
2.5.2.	En el NMT las fuentes nitrérgicas neurales son fibras premotoras de pequeño diámetro	50
2.5.3.	El NO como mensajero anterógrado en el NMT	52

3.	HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO Y PREGUNTA QUE TRATA DE RESPONDER EL TRABAJO DE TESIS	55
4.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	58
4.1.	Objetivo general	58
4.2.	Objetivos específicos	58
5.	ESTRATEGIA METODOLÓGICA DESARROLLADA	60
5.1.	Puntualizaciones	60
5.2.	Estrategia desarrollada	62
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	65
6.1.	Identificación de las motoneuronas trigeminales mediante marcado retrógrado	65
6.2.	Preparación de rodajas de tallo cerebral de cobayo	68
6.3.	Incubación y carga de las rodajas de tronco encefálico con DAF-2 DA	69
6.4.	Monitorización indirecta de la concentración intracelular de NO en rodajas de tejido vivo mediante el indicador DAF-2 DA	70
6.5.	Microscopía de epifluorescencia, sistema de captación y procesamiento de imágenes	74
6.6.	Análisis computacional de las variaciones de fluorescencia para DAF-2T en experimentos dinámicos	77
6.7.	Inmunohistoquímica para detección de GMPc	80
6.8.	Microscopía confocal	81
6.9.	Tratamiento de las rodajas. Soluciones y drogas	83
6.10.	Análisis estadístico	85

7.	RESULTADOS	87
7.1.	Indagar la existencia de producción de NO endógeno en situación basal (Objetivo específico 1)	87
7.1.1.	Las motoneuronas trigeminales pueden ser identificadas en rodajas de tejido vivo por marcado retrógrado con CM-DiI	87
7.1.2.	El NO endógeno es detectado en motoneuronas trigeminales carentes de NOSn en condiciones basales	90
7.1.3.	Existen diferentes patrones de distribución del NO en condiciones basales dentro del NMT	91
7.2.	Demostar que ante la depolarización de múltiples fibras nitrérgicas delgadas el NO endógeno liberado incluye a las motoneuronas trigeminales en su dominio de influencia (Objetivo específico 2)	95
7.2.1.	La perfusión con alto-[K ⁺] _o aumenta la producción y difusión de NO en el NMT con respecto a la situación basal	85
7.2.2.	El incremento de la señal DAF-2T en las motoneuronas inducido por la depolarización con alto-[K ⁺] _o efectivamente está vinculado con la producción de NO endógeno	104
7.2.3.	La dinámica de incremento en la concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es diferente si el NO es generado endógenamente o es aplicado exógenamente	110
7.3.	Evidenciar que el NO endógeno al difundir ingresa a las motoneuronas trigeminales en concentraciones biológicamente efectivas que permitan activar a la GCs presente en ellas (Objetivo específico 3)	115
7.3.1.	La administración de NO exógeno incrementa la inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas trigeminales	115
7.3.2.	La depolarización con alto-[K ⁺] _o aumenta la señal de inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas que expresan la GCs	118
7.4.	Identificar los mecanismos que subyacen y modulan a la transmisión nitrérgica en el NMT (Objetivo específico 4)	120
7.4.1.	Desde la estimulación de las fuentes nitrérgicas premotoras a la producción post-sináptica de GMPc en las motoneuronas: una secuencia que subyace a la transmisión anterógrada mediada por el NO en el NMT	120

7.4.2.	La transmisión anterógrada entre las fibras nitrérgicas premotoras y las motoneuronas trigeminales requiere de activación neural	121
7.4.3.	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere de la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes presinápticos y del ingreso de Ca^{2+} extracelular a las terminales	123
7.4.4.	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere la activación de la NOSn y la producción de NO en las fibras nitrérgicas premotoras	125
7.4.5.	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere la difusión de NO desde las fibras y su ingreso al interior de las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas	126
7.4.6.	Resumen de los resultados obtenidos correspondientes al cuarto bloque	128
8.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	130
8.1.	Las fuentes nitrérgicas que responden al estímulo con alto- $[\text{K}]_o$ en el NMT	131
8.2.	Eventuales fuentes productoras de NO en condiciones basales	133
8.3.	En el NMT la extensión de la señal de NO permite el reclutamiento de grupos de motoneuronas	136
8.4.	Posibles efectos de la activación de la vía NO/GMPc sobre la actividad neuronal	138
8.5.	La segregación espacial entre las terminales axónicas premotoras y las fuentes somatodendríticas le confiere propiedades funcionales particulares a la señalización por NO en el NMT	141
8.6.	Conclusiones generales	145
9.	RESUMEN DE LA TESIS	146
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
11.	ENDOGENOUS PRESYNAPTIC NITRIC OXIDE SUPPORTS AN ANTEROGRADE SIGNALING IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM (Fernández Alvarez et al., 2011, J. Neurochem. 118: 546-557)	163

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de las propuestas de Golgi, de Cajal y de Agnati y Fuxe para la comunicación intercelular en el SNC	14
TABLA I	Diferentes tipos de comunicación intercelular en el SNC	15
TABLA II	Propiedades diferenciales entre los circuitos de WT y VT	17
Figura 2	Concepto de redes de redes	18
TABLA III	Posibles criterios informáticos para la clasificación de las redes de comunicación en el SNC	20
TABLA IV	Resumen de los diferentes tipos de WT y VT que integran las redes de comunicación en el SNC	22
Figura 3	Características básicas de la WT y la VT	23
Figura 4	Representación esquemática de distintos ejemplos de VT en el SNC	24
Figura 5	Esquema general de la síntesis de NO por la NOS a partir de Arginina y O ₂	28
Figure 6	Regulación de la señalización de NO a través de proteínas adaptadoras	30
Figure 7	Vía de transducción NO/GMPc	34
Figura 8	Dibujo del contorno de la zona de concentración umbral de NO efectiva para la vía NO/cGMP	45
Figura 9	La eficacia de señalización de una única fibra nitrérgica depende de su diámetro y es posible obtener mayores concentraciones de NO si múltiples fibras delgadas actúan cooperativamente	47
Figura 10	Registros electrofisiológicos intracelulares de la actividad de motoneuronas trigeminales en rodajas de tronco encefálico de cobayo, efectos de los dadores de NO	49
Figura 11	Registros electrofisiológicos intracelulares de la actividad de motoneuronas trigeminales en rodajas de tronco encefálico de cobayo, efectos dependientes del GMPc	49
Figura 12	Fibras nitrérgicas delgadas inervan a las motoneuronas trigeminales	51

Figura 13	Características del marcador retrógrado	66
Figura 14	Esquema que ilustra la estructura molecular del DAF2-DA y del DAF2	70
Figura 15	Mecanismo propuesto para la detección de NO por el DAF-2 en presencia de O ₂	72
Figura 16	Representación esquemática de los sucesos que acontecen una vez que se incuba el tejido vivo con el marcador DAF-2 DA	72
Figura 17	Espectros de excitación y emisión para DAF-2T	73
Figura 18	Ejemplo de solapamiento del espectro de dos fluoróforos e influencia del mismo en el fenómeno de "bleedthrough"	77
Figura 19	Microfotografías que ilustran la inmunofluorescencia para GMPc a través del conjugado Alexa 488 en motoneuronas trigeminales identificadas con CM-DiI	83
Figura 20	Identificación de motoneuronas trigeminales por marcado retrógrado en rodajas de tejido vivo	88
Figura 21	Monitorización de NO intracelular en el NMT de rodajas de tejido vivo cargadas con el indicador indirecto DAF-2 DA	90
Figura 22	Producción y difusión de NO endógeno en condiciones basales en el NMT	93
Figure 23	La perfusión con alto-[K ⁺] _o induce un aumento en los niveles de NO endógeno en el NMT	96
Figura 24	La perfusión con alto-[K ⁺] _o induce un aumento en los niveles de NO endógeno en las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas	98
Figura 25	Curso temporal de las variaciones de la fluorescencia intracelular para DAF-2T en motoneuronas trigeminales durante la perfusión con alto-[K ⁺] _o	100
Figura 26	La señal fluorescente para DAF-2T es originada tanto por el NO endógeno generado por activación de la nNOS ante la depolarización como por el NO exógeno liberado por dadores de NO	105
Figura 27	Distribución de frecuencia de valores máximos de señal fluorescente DAF-2T en las motoneuronas trigeminales ante distintos tratamientos recibidos por las rodajas de tejido vivo	107

Figura 28	La latencia a la máxima concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es diferente en las rodajas tratadas con alto-[K ⁺] _o y con DETA/NO	111
Figura 29	La dinámica de incremento de la concentración de NO dentro de las motoneuronas trigeminales es diferente si el NO es generado endógenamente o si el NO es aplicado exógenamente	112
Figura 30	El incremento de la concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es inducido también en experimentos estáticos al depolarizar y al administrar un agonista glutamatérgico	114
Figura 31	La administración exógena de NO incrementa la señal de inmunofluorescencia para GMPc en motoneuronas trigeminales con respecto a la situación control	117
Figura 32	El NO endógeno alcanza a las motoneuronas trigeminales postsinápticas en concentraciones biológicamente efectivas para activar a la GCs	119
Figura 33	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural	122
Figura 34	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere del influjo de Ca ²⁺ extracelular a la fuente nitrérgica a través de canales de Ca ²⁺	124
Figura 35	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere la activación de la NOSn presináptica	126
Figura 36	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere de la difusión extracelular de NO desde fuentes extramotoneuronales	127
Figura 37	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural y requiere del influjo de Ca ²⁺ y apertura de CCVDs presinápticos	128
Figura 38	La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural y requiere de Ca ²⁺ extracelular, de la activación de la NOSn presináptica, de la difusión de NO y de la activación de la GCs	129

1.- RESUMEN DEL PROBLEMA SOBRE EL QUE VERSA LA TESIS

La capacidad de señalización espacial intra e interneuronal que le confieren sus propiedades físico - químicas, hacen del óxido nítrico (NO) un neurotransmisor en volumen. Esta tesis plantea un problema científico central inherente a la señalización espacial: la capacidad de difusión biológicamente efectiva del NO en el sistema nervioso central (SNC). Los reportes experimentales relativos a la cuantificación directa de la difusión del NO en tejido vivo son escasos. Los modelos teóricos y matemáticos intentan compensar esta ausencia de información. En la mayoría de los casos ambos tipos de aproximaciones consideran al soma neuronal como fuente principal de NO. En esta tesis se aborda en rodajas de tronco encefálico, el estudio de la difusión de NO endógeno y los mecanismos subyacentes a la modulación de dicha difusión en el núcleo motor del trigémino (NMT) del cobayo; en este sistema la fuente nitrérgica está representada por fibras premotoras finas y la transmisión de información es anterógrada, o sea que el NO liberado desde dichas fibras modula motoneuronas postsinápticas. El patrón de conexiones en el sistema nervioso es determinante en la especificidad de transferencia de la información. El diseño de "conexiones" mediadas por el NO está moldeado por el patrón espaciotemporal de la difusión de NO. Éste patrón a su vez es determinado, entre otros factores, por las características de la fuente nitrérgica. De confirmarse en nuestro modelo que el NO endógeno, generado por activación de la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (NOS_n) presente en las fibras delgadas promotoras, ingresa en concentraciones biológicamente efectivas a las motoneuronas trigeminales (blancos post-sinápticos propuestos), se aportarían elementos para el mapeo de una red difusional nitrérgica en dicho núcleo. Si además el volumen de difusión de NO fuera modificable por acciones farmacológicas específicas se evidenciaría que el patrón témporo - espacial de estas redes difusionales nitrérgicas es transitorio, dinámico y modulable.

2.- ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Los antecedentes y el marco teórico serán abordados de lo general a lo particular. Se iniciará con una contextualización histórica referida al problema de la comunicación en el SNC, se pasará luego a abordar los conceptos de transmisión por cableado y en volumen, posteriormente se analizarán diferentes aspectos de la transmisión en volumen mediada por NO y por último se harán aportes con respecto a la transmisión mediada por NO en el NMT del cobayo.

2.1.- Contextualización histórica. Evidencias recientes para interrogantes antiguas: de los postulados de Cajal y Golgi a la transmisión por cableado y en volumen de Agnati y Fuxe

Entre fines del S XIX e inicios del S XX, se debatían dos concepciones opuestas y fundamentales acerca de la transmisión de la información en el sistema nervioso central: la doctrina de la neurona del español Santiago Ramón y Cajal y la teoría reticularista del italiano Camillo Golgi. Mientras Cajal postulaba que la comunicación interneuronal se establecía por contigüidad, siendo las neuronas unidades definidas independientes (teoría de la neurona), Golgi alegaba, basado en la observación de preparaciones teñidas con su técnica (1891a,b), que dicha comunicación se producía por continuidad, como en una especie de red continua o sincitio (teoría reticular). Ambos investigadores realizaron los primeros mapas detallados de circuitos neuronales en el SNC y desarrollaron la atinada idea de que la descripción

estructural de la red neural tenía sentido funcional sólo analizándola conjuntamente con los modos de comunicación entre las neuronas, por tanto estructura y comunicación constituían dos aspectos inseparables de la función del sistema nervioso. La repercusión de sus estudios, basados en evidencias exclusivamente morfológicas, determinó que dichos científicos compartieran en 1906 el galardón del Premio Nóbel en Fisiología y Medicina *"a pesar de defender posiciones tan diferentes y conflictivas con respecto a la organización neural en el SNC"* (De Carlos y Borrell, 2007). Durante varias décadas la teoría de la neurona de Cajal fue tomando rasgos de paradigma. Simultáneamente, ante el importante desarrollo del conocimiento sobre la transmisión sináptica (incluidos la definición y los aportes de Sherrington), la concepción de Golgi se fue dejando paulatinamente de lado y *"en los libros de neurofisiología era planteada como un gran error, pero... ¿realmente lo era?"* (Agnati et al., 2007).

En la década de los '80 del siglo XX las ideas de Golgi fueron revaloradas, recontextualizadas y ampliadas en vistas de la existencia de distintas evidencias morfológicas y funcionales publicadas durante los '70 y '80, lo cual llevó a varios autores a sugerir la existencia de vías para la comunicación interneuronal alternativas a la transmisión sináptica (Kiss y Vizi, 2001). Entre estas evidencias se encontraban: el mapeado de las redes monoaminérgicas portadoras de un gran porcentaje de varicosidades liberadoras de neurotransmisores en ausencia de sinapsis (Fuxe et al., 1967; Fuxe y Jonsson, 1973; Descarries et al. 1975; Kalia et al., 1984), la descripción de otras sinapsis "en passant" en el SNC (Kalia y Richter, 1985), el "spillover" de neurotransmisores actuando en receptores extrasinápticos (Alger

y Nicoll, 1982), el descubrimiento de "mismatches" entre neurotransmisores y receptores como por ejemplo en el sistema opioide (McLean *et al.*, 1987; Herkenham, 1987), la neuromodulación por monoaminas (Cheramy *et al.*, 1981) péptidos (De Wied y Jolles, 1982) y otros novedosos neurotransmisores (Fuxe *et al.*, 1977; 1980) y la detección de potenciales sinápticos tardíos de varios minutos de duración (Dingledine y Korn, 1985).

Diferentes propuestas surgieron para indicar que otros modos de comunicación podrían funcionar en el cerebro además de la transmisión sináptica. Dichas vías alternativas de comunicación interneuronal recibieron diferentes denominaciones como: transmisión no sináptica entre neuronas (Vizi, 1984), transmisión neuronal no clásica (Cuello, 1983) o transmisión parasináptica operando en paralelo con los circuitos sinápticos (Schmitt, 1984). Sin embargo todas estas denominaciones pasaban por alto la importancia de la comunicación glia-glia y glia-neurona y la comunicación punto a punto que involucra a las uniones gap y a la yuxtaposición de membranas en el SNC. Es así que basados en estos y otros antecedentes Agnati y Fuxe postulan la existencia de dos mecanismos complementarios de comunicación intercelular en el SNC: la ya bien conocida "transmisión por cableado" y la "transmisión en volumen"; considerando como la transmisión en volumen de las señales aquella que se desarrolla a través del espacio extracelular y a través del líquido cefalorraquídeo (Agnati *et al.*, 1986; Fuxe *et al.*, 1988). En concordancia la confirmación de evidencias y el afianzamiento de ciertos conceptos que no encajaban en el paradigma de Cajal¹ y/o que no daban cuenta de la

¹ que comenzaba a sufrir una especie de "crisis Kunheana" (Agnati *et al.*, 2007)

conceptualización de la sinapsis química clásica, pero que sí quedaban contemplados por la propuesta de Agnati y Fuxe, fueron en aumento. Entre dichas evidencias experimentales se incluyen: la amplia distribución de uniones gap en el SNC de los mamíferos (Bennett y Goodenough, 1978), la descripción de comunicación glia-glia y glia-neurona tanto por "cableado" como en "volumen" (Ventura y Harris, 1999; Fields y Stevens-Graham, 2002), la existencia de algunas respuestas fisiológicas de lenta aparición y desaparición como por ejemplo el sueño, el hambre o la respuesta sexual (Pfaus, 1999), así como también la existencia de neurotransmisores no convencionales como por ejemplo gases (Gally *et al.*, 1990). El principal criterio para la clasificación que divide la transmisión por cableado y la transmisión en volumen son las características de la vía o canal utilizado para la comunicación (Agnati *et al.*, 2010):

- con fronteras físicamente bien delimitadas en la transmisión por cableado (axones y sus sinapsis, uniones gap) y
- sin delimitación física clara en la transmisión en volumen (el fluido extracelular que llena el tortuoso espacio extracelular y el líquido cefalorraquídeo que llena el espacio ventricular y el espacio subaracnoideo).

Efectivamente la transmisión por cableado (WT, por "wiring transmission") se define por la presencia de vías de comunicación físicas dentro de circuitos neuronales, la comunicación ocurre como si en un cableado representado por estructuras relativamente fijas se produjera la rápida y segura conducción de los potenciales de acción. El prototipo de la WT es la

transmisión sináptica clásica con la transferencia punto a punto de señales químicas en la hendidura sináptica representando una transmisión discreta con baja a moderada divergencia y plasticidad y que se ha involucrado preferentemente en la elaboración elemental de acciones de corto término (Fuxe *et al.*, 2007).

En cuanto a la transmisión en volumen (VT, por "volume transmission") se define como la comunicación entre células nerviosas y/o glías entre sí y/o con células endoteliales y endodiales, caracterizada por la difusión de señales químicas (neurotransmisores, neuromoduladores y factores tróficos) y el flujo de corrientes iónicas (señales electrotónicas) en el fluido del espacio extracelular del SNC (Agnati *et al.*, 1986; Agnati y Fuxe, 2000). Esta transmisión involucra además vías de traslado a larga distancia en el líquido cefalorraquídeo (Nicholson, 1999) y a lo largo de vías o canales extracelulares delineados por el empaquetado de la masa de las glías y neuronas y por la arquitectura vascular. Para la VT se ha propuesto un papel preferencial en acciones de largo término y en la elaboración holística de la información, con participación en la modulación de largo plazo de grandes redes neurogliales para el manejo de la información y el trofismo.

La teoría de que las redes neurogliales del cerebro están organizadas en dos modos complementarios de comunicación para el manejo de la información, VT y WT interactuando una con otra (Figura 1), resolvería el conflicto entre las visiones opuestas de Golgi y Cajal sobre la comunicación en el sistema nervioso (Agnati *et al.*, 2007). Al decir de Fuxe *et al.* (2010): "*the output of a neuronal network is not the sound of a soloist (one chemical*

signal), but most of the times of an orchestra since many VT and WT signals interact according to precise chemical, temporal and spatial patterns”.

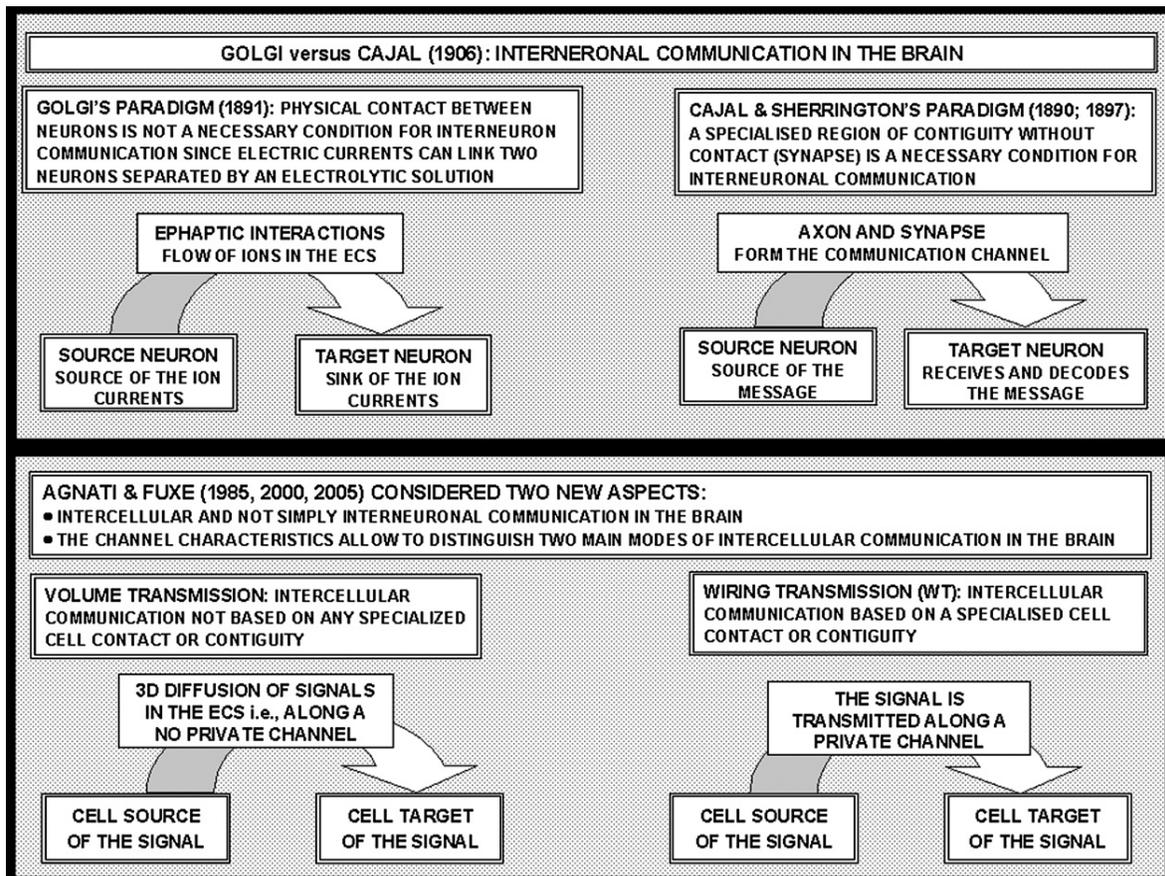


Figura 1: Representación esquemática de las propuestas de Golgi, de Cajal y de Agnati y Fuxe para la comunicación intercelular en el SNC. Es de destacar la importancia que Agnati y Fuxe le otorgan al proceso de comunicación entre todos los tipos celulares presentes en el SNC y a la propuesta de la existencia de dos modos diferentes de comunicación intercelular: VT y WT, según cual sea la vía o canal a través de la cual esta se realiza (Tomado de Agnati et al., 2007).

2.2.- La evolución del concepto de la transmisión por cableado y en volumen

2.2.1.- El avance en el perfil de las definiciones de WT y VT

En 1998 y 1999, Zoli *et al.* proponen una clasificación más detallada de los distintos tipos de comunicación intercelular en el sistema nervioso central manteniendo la división entre WT y VT (véase la TABLA I). Los criterios elegidos para el establecimiento de las categorías en la clasificación fueron: a) la relación numérica fuente / blanco, entendiendo como fuente las estructuras subcelulares que producen la señal y como blanco las estructuras subcelulares que reconocen la señal, b) la distancia entre la fuente y el blanco y c) el tiempo de retardo entre la producción de la señal en la fuente y la acción en el blanco.

TABLA I - Diferentes tipos de comunicación intercelular en el SNC
(Tomada de Zoli *et al.*, 1998)

Different types of intercellular communication in the central nervous system			
Transmission type	<i>S/T</i> ratio	<i>S/T</i> distance	<i>S/T</i> delay
<i>Wiring transmission</i>			
1. Quasi-continuity			
Gap-junction	1:1	2–3 nm	μs
2. Contiguity			
Membrane juxtaposition	1:1	2–10 nm	ms
Closed synaptic transmission	1:1	20–50 nm	ms
<i>Volume transmission</i>			
1. Diffusion-based			
Local ion currents	1:n, n > 1–n ≫ 1	100 nm–mm	ms–s
Paracrine transmission			
Open synaptic transmission	1:n, n > 1–n ≫ 1	100 nm–mm	ms–min
Non-synaptic source ^a	1:n, n ≫ 1	μm–mm	s–min
Para-axonal transmission ^b	1:n, n ≫ 1	mm	min
2. Convection-based			
Para-vascular transmission ^c	1:n, n ≫ 1	mm–cm	min
Intra-CSF transmission	1:n, n ≫ 1	mm–cm	min

Abbreviations: CSF = cerebro-spinal fluid, *S/T* = source/target.

^a Note that all transmitters of nonneuronal (e.g., astroglial) origin acting on neighboring cells belong to this transmission type.

Dichos autores² definen la transmisión en volumen en forma más detallada como una modalidad de transmisión no sináptica y difusa, que tiene una relación fuente / blanco menor a 1 (menos fuentes que blancos), pudiendo ser la fuente una terminal presináptica o cualquier otro sector de una neurona u otro tipo celular del sistema nervioso. Este tipo de transmisión con alta divergencia prescinde de sofisticadas uniones intercelulares (como las sinapsis) y no tiene limitaciones espaciales, permitiendo comunicar todas las fuentes con todos los blancos, en forma verdaderamente multidireccional, y a mayor distancia (μm a cm) que la de la hendidura sináptica (nm). En general la concentración de la sustancia señal que llega al blanco es baja (nM) mientras que la afinidad con los receptores capaces de su detección y decodificación es alta (pM a pocos nM). El retardo de la transmisión se encuentra en el orden de los segundos a minutos y los efectos biológicos en los que interviene son principalmente de tipo tónico.

La clasificación básicamente dicotómica de la comunicación intercelular en el SNC es aún considerada válida y las propiedades diferenciales más notables entre WT y VT se resumen en la TABLA II, pero recientes evidencias sobre la existencia de inesperadas estructuras especializadas para la comunicación intercelular (como exosomas y túneles de nanotúbulos³), plantean la necesidad de refinar el modelo de clasificación.

² Integrantes del equipo de Agnati y Fuxe

³ Que permitirían la comunicación intercelular de proteínas, mtDNA and RNA en microvesículas en el primer caso y hasta de mitocondrias enteras en el segundo. Si bien queda mucho por demostrar y verificar al respecto de la presencia y función de estos nuevos mecanismos no es posible desconocer la potencial importancia de dichos hallazgos.

TABLA II – Propiedades diferenciales entre los circuitos de WT y VT
(Tomada de Fuxe *et al.*, 2007)

Table 3 – Differential properties of WT and VT circuits		
	WT	VT
Cell composition	Mainly between neurons and between astrocytes	Any cell type in the CNS
Divergence	Low	Potentially high
Type of connectivity	Preferentially serial	Preferentially parallel
Space filling	High	Low
Time scale	ms to s	s to min
Biological effect	Typically phasic	Typically tonic

2.2.2.-Nuevos criterios para clasificar la comunicación intercelular en el SNC: de las redes celulares a las redes moleculares

Las adaptaciones propuestas a la clasificación de WT y VT se basan en criterios extraídos de la informática que se adaptan para clasificar las redes de comunicación en el SNC y trata de incluir los novedosos hallazgos que permiten la identificación de nuevas subclases de WT y VT⁴.

Los circuitos neuronales se caracterizan entonces como redes informáticas en las que se identifican como componentes: a) los elementos computacionales o nodos, b) las vías o canales de comunicación entre los nodos y c) las señales y procesos que permiten su transmisión a lo largo de dichos canales. A veces estos componentes no son fácilmente separables en el SNC donde se identifican varios niveles jerárquicos computacionales dentro del

⁴ Si bien no se profundizará aquí sobre dichas subclases, sí se analizarán los criterios de la informática que permiten refinar la clasificación original.

circuito neuronal y frecuentemente un nodo puede ser resuelto dentro de una red de mayor miniaturización tal como se representa en la Figura 2 que ilustra el concepto de “redes de redes”. De acuerdo a esta línea de pensamiento el cerebro es considerado como una red de neuronas conectada por axones y las neuronas son consideradas ellas mismas como una red de moléculas conectadas por reacciones bioquímicas (Agnati *et al.*, 2004). Cada circuito neuronal estaría formado por una jerarquía de redes con diferentes grados de miniaturización (celular, molecular, submolecular) trabajando a veces en paralelo y a veces en serie.

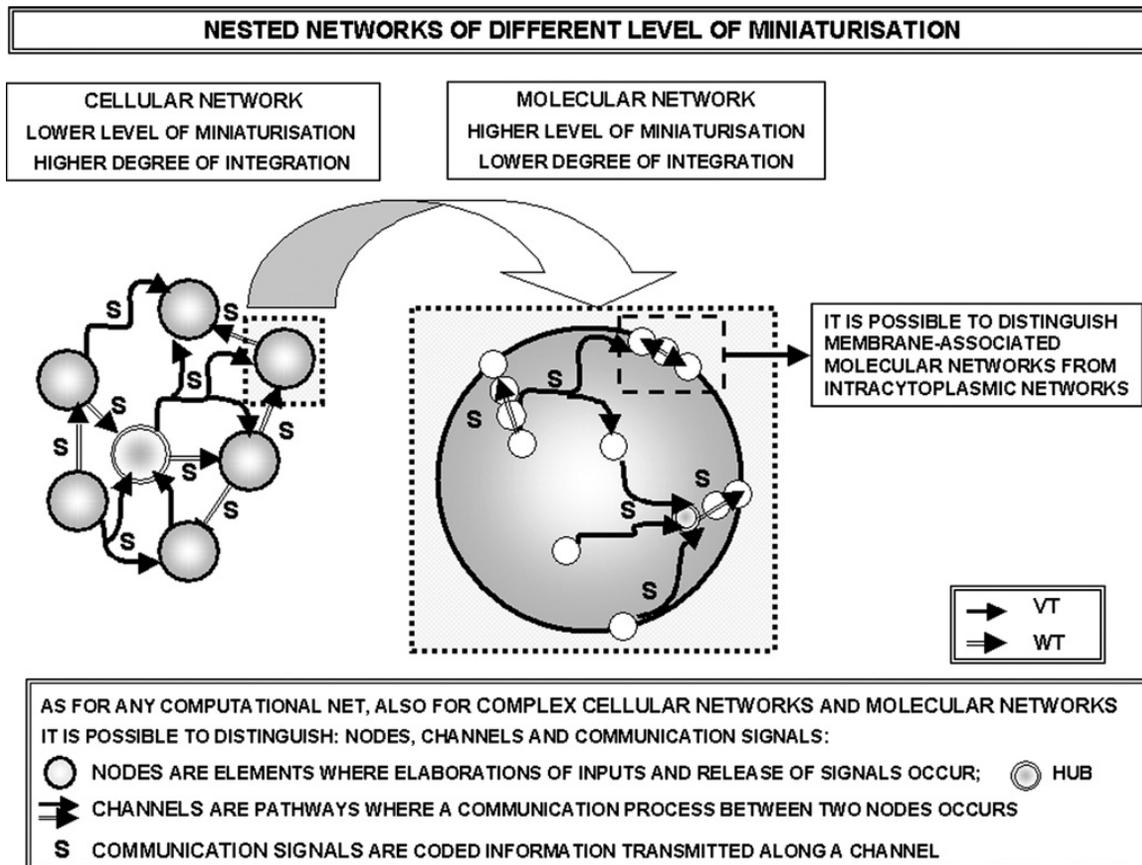
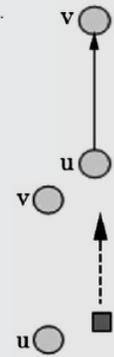


Figura 2 - Concepto de redes de redes. Representación esquemática de una red celular y de una red molecular contenida en ella. El esquema permite deducir los principios de la miniaturización y de jerarquización (Tomada de Agnati *et al.*, 2007).

Por lo tanto además de los dos modos de comunicación propuestos en el SNC (VT y WT), pueden distinguirse dos tipos de redes: celulares y moleculares (más allá de que modo de comunicación internodo esté involucrada). Dado que las acciones de integración en el SNC depende de todos los tipos celulares presentes en él Agnati y Fuxe, (2000) han introducido el concepto de ***“red celular compleja”*** definida como el grupo de células de cualquier tipo que intercambia señales en cierto volumen de tejido cerebral y gracias a ese intercambio es capaz de integrar las entradas de información de forma de dar salidas adecuadas. Considerando lo antes expuesto aunque el principal y único criterio para diferenciar WT y VT es el de los límites físicos de los canales de transmisión (bien delineados en la WT pero no en la VT), es posible realizar una clasificación de los tipos de comunicación intercelular más detallada tomando en cuenta también las características de la señal y los procesos que permiten su transmisión a lo largo de dichos canales. Se considerarán los siguientes criterios de la comunicación tomados de la informática (Agnati *et al.*, 2010): a) la conectividad, b) la privacidad y c) la seguridad tal como se plantea en la TABLA III.

TABLA III – Posibles criterios informáticos para la clasificación de las redes de comunicación en el SNC. (Tomada de Agnati *et al.*, 2010)

Table 1 – Possible informatics criteria to classify communication networks of CNS.		
Network feature	Types	Description
Connectivity	Static	The network structure does not change with time. From a formal point of view it can be defined as: $G = (V, E)$ where G is a graph, i.e., a 2-ple composed by $V = \{ v_i, 1 \leq i \leq N \}$ the set of vertices (nodes) $E = \{ (u, v) : u, v \in V \}$ the set of edges (connections)
	Dynamic	The network has a time-varying structure At a particular instant of time t it can be described as: $G(t) = (V(t), E(t))$ Where: $E(t) = \{ (u, v) : u, v \in V(t) \text{ and communicating at time } t \}$
Signal privacy	Reserved	Signal needing a specific "decoder" to be decrypted Neurotransmitters and, more generally, signals using specific receptor systems are of this type
	Broadcast	"Public" signal, i.e., interpreted by all the involved elements Physical quantities or membrane permeable molecules are of this type
Signal safety	Unsafe	The signal can be altered during its travel from the source node to the destination node
	Safe	The signal comes to the destination node without alteration
Channel (Main criterion to distinguish volume transmission from wiring transmission)	Private	Physically delimited pathway between two nodes of the network. This type of channel characterizes WT
	Diffuse	The whole available space between the network nodes is potentially used to exchange signals. Thus, no end-to-end path is present between two communicating nodes, but there is a temporally ordered sequence of events that connects the two nodes. This type of channel characterizes VT



a) En cuanto a la conectividad, si la conexión entre células puede ser rápidamente formada o removida constituye una "red dinámica", pero si la estructura de una red de comunicación tiene un patrón estable en el tiempo constituye una "red estática".

b) Una señal tiene máxima privacidad (es "reservada") cuando solamente las células dotadas con un aparato específico de reconocimiento y decodificación de la señal (por ejemplo un receptor específico) pueden tener

acceso a ella. En forma contraria una señal cuenta con baja privacidad (es de "banda ancha") cuando cualquier célula alcanzada por la señal tiene acceso a ella. El más frecuente decodificador para la transmisión en volumen es la proteína G acoplada a receptores extrasinápticos ubicados en la superficie de la membrana de las neuronas y las células gliales pero además enzimas y canales iónicos también son blancos de la transmisión en volumen con diferentes grados de privacidad. La mayoría de las señales de la transmisión en volumen son reservadas a excepción de los potenciales de campo⁵ y el CO₂ que son dos típicos ejemplos de señales de banda ancha por tener un código abierto.

c) Una señal "segura" es aquella que no es alterada durante su conducción desde la fuente hacia el blanco. Una señal es "insegura" si puede ser alterada durante este recorrido, este sería el caso de algunas señales que pueden ser destruidas o modificadas por acción enzimática en el espacio intercelular.

Con la base de estos conceptos puede elaborarse una caracterización más detallada de la WT, la VT y sus subtipos tal como lo representa la TABLA IV (véase atentamente la definición de términos en el sector inferior de dicha TABLA).

⁵ Una célula nerviosa podría por medio de su actividad eléctrica modular otra célula dentro de un rango de micrómetros a través del flujo iónico en el fluido extracelular.

TABLA IV - Resumen de los diferentes tipos de WT y VT que integran las redes de comunicación en el SNC (Tomada de Agnati *et al.*, 2010)

Table 2 – Summary of the different types of wiring transmission and volume transmission forming the communication networks of the brain (see Table 1).				
Network	Signal privacy	Signal safety	Channel	Connectivity
Synaptic transmission (Section 1.1)	Reserved	Safe	Private (WT)	Static and/or dynamic ^a
Gap junctions (Section 1.2)	Broadcast	Safe	Private (WT)	Dynamic
Ephaptic transmission (Section 2.1)	Broadcast	Safe	Diffuse (VT)	Dynamic ^b
Perisynaptic transmission (Section 2.2)	Reserved	Unsafe	Diffuse (VT)	Dynamic
Classical volume transmission (beyond the perisynaptic region) (Section 2.3)	Reserved (common) or broadcast (rare)	Unsafe	Diffuse (VT)	Dynamic
TNT (Section 3.1)	Broadcast	Safe	Private (WT)	Dynamic
Roamer type of VT (Section 23.2)	Reserved or Broadcast	Safe	Diffuse (VT)	Dynamic

Definitions of the terms:

- Reserved: a specialized receptor apparatus is needed to decode the message
- Broadcast: no specialized receptor apparatus is needed to decode the message
- Private: the channel transmit signals along a conductor with clear cut physical boundaries
- Diffuse: the channel transmits signals along a conductor without clear cut physical boundaries, hence signals can potentially migrate in any direction
- Safe: the signal is not altered during its conduction from the source to the target
- Static: the connection between the source and the target is maintained for relatively long periods of time (sometimes for a life-long period)
- Dynamic: the connection between the source and the target can be rapidly formed and/or removed.

^a Synaptic transmission is endowed with a potential high plasticity; hence it could give rise to neural networks characterized by different types of connectivity. They include networks that once established exhibit an almost stable (static) configuration (as, for instance in the primary visual cortex; Hensch, 2005), as well as dynamic networks in which a number of connections are *ex novo* established (see, for instance, the neural circuitry responsible for seasonal breeding in several species; Adams *et al.*, 2006) or re-activated (see Kerchner and Nicoll, 2008 for a review on 'silent synapses') whenever needed.

^b Ephaptic transmission is highly dependent on the volume fraction of the ECS and the composition of the ECM, which can affect the diffusion pathways of ion currents (see also the text).

Por lo tanto se podría decir que la WT se caracteriza por desarrollarse en una vía o canal de comunicación "privada" bien definida integrada por los complejos macromoleculares estructurales que funcionan como cableado que conecta en la red un nodo fuente con un nodo blanco. Dentro de la WT entre células del SNC se reconocen el modo de contacto físico (uniones gap) y el de casi contacto (sinapsis química). En cambio la VT se desarrolla por una vía de comunicación "difusa", pobremente definida desde el punto de vista estructural, en la cual todo el espacio disponible entre los dos nodos de la red es potencialmente utilizable para intercambiar la señal. La transmisión de las señales químicas o eléctricas tiene lugar por difusión y/o convección

tridimensional en el medio interpuesto entre los nodos a una distancia mayor que la hendidura sináptica (Figura 3). Si bien no hay una vía única en la red que finalice en cada uno de los nodos, existe una secuencia de eventos ordenada temporalmente que conecta ambos.

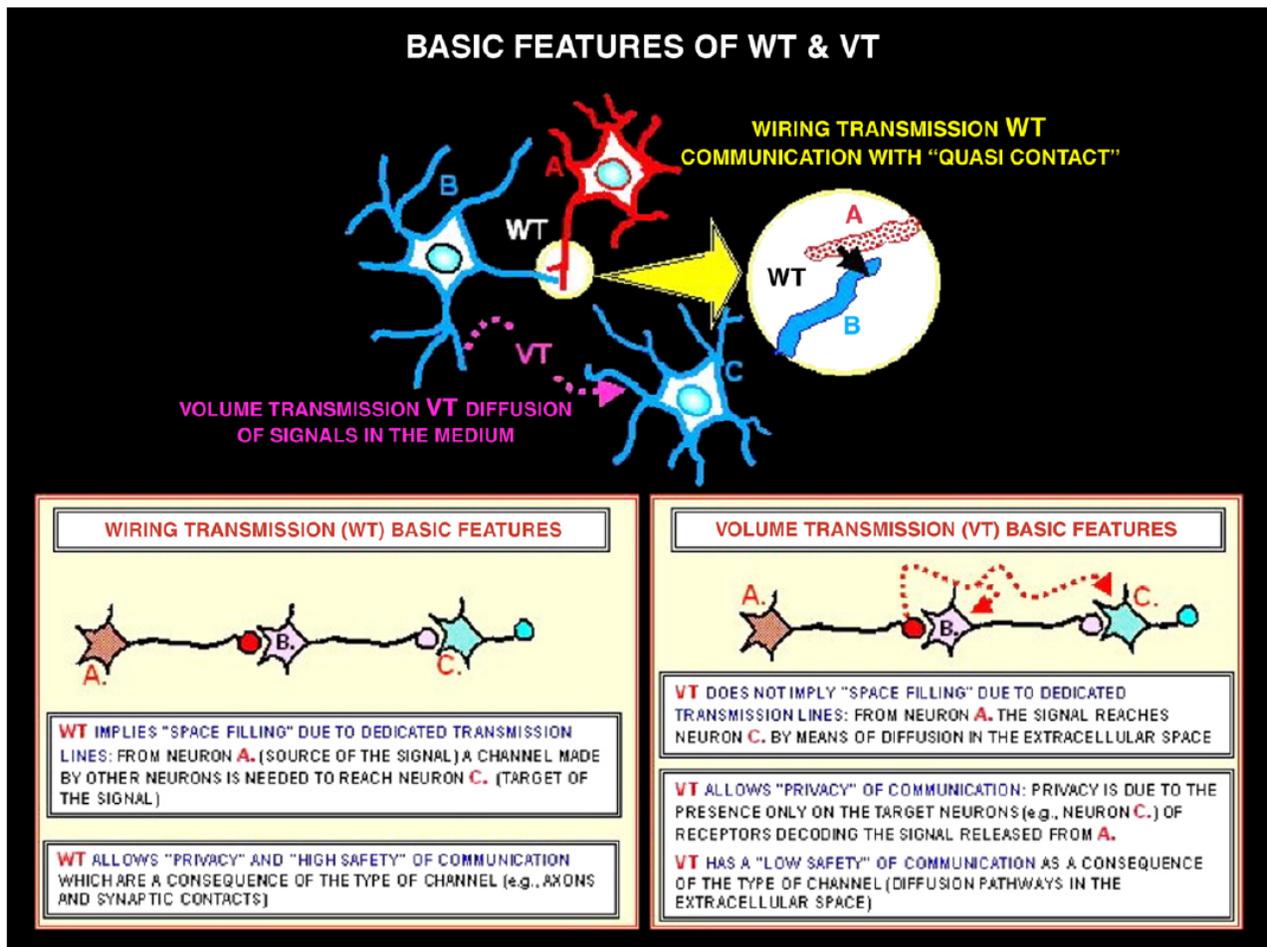


Figura 3: Características básicas de la WT y la VT. Panel superior: representación esquemática de la transmisión por cableado (WT) y la transmisión por volumen (VT). Panel inferior: Representación esquemática de las principales características de la transmisión por cableado (izquierda) y la transmisión en volumen (derecha) considerando algunos criterios de la comunicación informática. (Tomada de Fuxe *et al.*, 2007)

Las señales en VT pueden ser liberadas desde cualquier tipo de célula cerebral (astro, micro, oligodendroglia, células ependimales) y desde cualquier sector celular tanto desde dendritas, somas, terminales axónicas, varicosidades y/o lugares carentes de cualquier tipo de especialización sináptica u de otro tipo. La "privacidad de la señal" cuando está presente es en general dada por el código químico como por ejemplo la especificidad para un receptor. La ausencia de un "cableado" que comunique la fuente con el blanco de la señal en general reduce la seguridad de la misma. Las señales que migran por el fluido extracelular pueden ser detenidas si alcanzan un "camino ciego" (Hrabetová *et al.*, 2003), si son inactivadas por enzimas o aclaradas en los vasos sanguíneos (Jansson, 2000) o recaptadas a las células por transportadores (Rice y Cragg, 2008). En la Figura 4 a modo de cierre de este ítem se esquematizan algunos ejemplos de VT en el SNC.

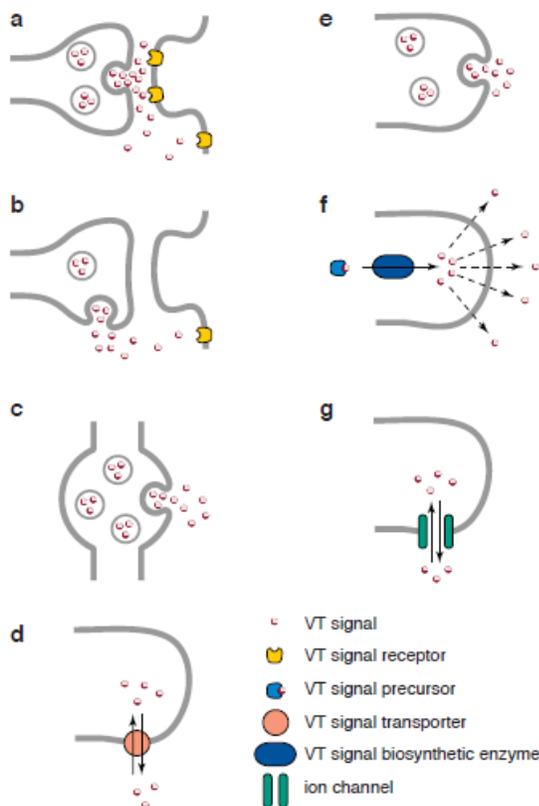


Figura 4: Representación esquemática de distintos ejemplos de VT en el SNC. Si bien el esquema no se ajusta a la clasificación más actual descrita anteriormente aporta ejemplos concretos de células liberadoras y mensajeros en cada caso **(a)** Transmisión sináptica abierta (neuronal) liberación intrasináptica del neurotransmisor por vesículas en la hendidura sináptica y difusión a una concentración efectiva para actuar en receptores extrasinápticos (ej. "spillover" de aminoácidos) **(b)** Transmisión sináptica abierta (neuronal) liberación extrasináptica del neurotransmisor directamente al fluido extracelular extra-hendidura sináptica (ej. liberación no sináptica de neuropéptidos) **(c)**: Transmisión parácrina (neuronal) liberación vesicular desde varicosidades extrasinápticas; éstas no poseen ni especializaciones presinápticas ni densidad postsináptica (ej. liberación difusa de catecolaminas). **(d)** Transmisión parácrina (neuronal o no neuronal) funcionamiento reverso de mecanismos de recaptación (ej. glutamato, D-serina y GABA desde astroglia y glutamato y dopamina desde neuronas) **(e)** Transmisión parácrina (no neuronal) liberación calcio dependiente de vesículas desde elementos celulares no neurales (ej. endotelina desde células endoteliales) **(f)** Transmisión parácrina (neuronal o no neuronal) liberación de "gasotransmisores" (ej. NO desde neuronas y endotelio) **(g)** corrientes iónicas locales inducidas por actividad de canales sensibles a neurotransmisores o voltaje dependientes neuronas o glias (Tomado de Zoli *et al.*, 1999)

2.3.- El óxido nítrico (NO): un mensajero en volumen para la transmisión “NO sináptica” en el SNC

Las señales de la VT se dividen en dos grandes grupos: (1) las señales físicas, como por ejemplo potenciales de campo, y (2) las señales químicas como por ejemplo neurotransmisores, factores de crecimiento, etc. Desde el punto de vista estructural las señales químicas de la VT presentan una gran diversidad (lo que les otorga también gran diversidad de peculiaridades en la transmisión) y por ser un tipo de transmisión difusa es importante distinguir las señales hidrofílicas de las lipofílicas. Las primeras tienen su volumen de difusión prácticamente confinado al espacio extracelular, es el caso de las monoaminas y los péptidos que difunden en el fluido extracelular como señales VT de corta y larga distancia y operan por la activación de receptores de membrana (Fuxe *et al.*, 2007). Las segundas por el contrario pueden difundir con facilidad a través de la estructura lipoproteica de las membranas celulares y por tanto tienen un amplio espacio de difusión, este es el caso de dos neurotransmisores no convencionales: el NO y el CO (Dawson y Snyder, 1994; Barañano *et al.*, 2001; Mustafa *et al.*, 2009) y será sobre el primero que se centrará el análisis.

A esta pequeña molécula “NO” le faltan reconocimientos; ya en 1992 la revista Science había seleccionado al NO como la “molécula del año” lo que demostraba el amplio interés de la comunidad científica en investigar sobre el tema. En 1998 nuevamente un neurotransmisor fue responsable del

otorgamiento de un premio Nóbel⁶, en este caso el premio Nóbel de Fisiología y Medicina fue otorgado en forma compartida a Ferid Murad, Robert Furchgott y Louis Ignarro por sus aportes independientes en la demostración de la actividad farmacológica del NO⁷.

2.3.1.- Los criterios que definen a un neurotransmisor

La demostración de que el NO es un mensajero biológico en el sistema nervioso, sintetizado en neuronas e involucrado en fenómenos como la plasticidad sináptica y la potenciación postsináptica de larga duración (Garthwaite *et al.*, 1988; Gally *et al.*, 1990; Snyder, 1992; Bredt y Snyder, 1992), contribuyó a consolidar la concepción “no clásica” de la neurotransmisión mediada por un “gas”⁸. Desde la mirada conceptual de la neurotransmisión química clásica para que una sustancia sea considerada como un neurotransmisor debe cumplir ciertos criterios establecidos *pos hoc* basados en los mecanismos conocidos de dicha neurotransmisión. Los principales criterios serían⁹: 1) La maquinaria biosintética de un neurotransmisor debe estar presente en la neurona presináptica; 2) La sustancia debe encontrarse almacenada en vesículas en la terminal presináptica; 3) La sustancia debe liberarse ante la estimulación nerviosa presináptica; 4) La administración exógena de la sustancia debe provocar una

⁶ Esto ya había acontecido en 1970 como se mencionará más adelante.

⁷ Se plantea que se excluyó injustamente de compartir el reconocimiento a Salvador Moncada, de amplia trayectoria en el tema, pero el límite de investigadores por premio era tres.

⁸ En realidad en condiciones biológicas el NO se encuentra disuelto en soluciones fisiológicas (Beckman y Koppenol, 1996).

⁹ Basados durante mucho tiempo en que cualquier neurotransmisor debiera asemejarse a la acetilcolina ya que era el neurotransmisor conocido (Boehning y Snyder, 2003)

respuesta, que imita la causada por la estimulación nerviosa presináptica; 5) Aquellas drogas que modifican la respuesta causada por la sustancia, deben provocar las mismas modificaciones en la respuesta causada por la estimulación nerviosa presináptica; 6) En la postsinápsis debe encontrarse el receptor específico para la sustancia candidata a transmisor y 7) En la sinapsis o en su cercanía deben encontrarse mecanismos que determinen el cese de la acción de dicha sustancia neurotransmisora sobre la postsinápsis. Varias sustancias fueron reconocidas como neurotransmisores a lo largo del Siglo XX por el cumplimiento de criterios que evolucionaban y se modificaban ante el surgimiento de diversas evidencias experimentales¹⁰, e incluso el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina de 1970 fue otorgado a Axelrod, Katz y von Euler¹¹ fundamentalmente por sus descubrimientos en torno a sustancias neurotransmisoras, su almacenamiento, liberación e inactivación (Snyder, 2009). En los '20 se identificó como neurotransmisor a la acetilcolina, la noradrenalina en los '40, los aminoácidos en los '60 y entre los '70 y '80 los neuropéptidos (Barañano *et al.*, 2001). Si bien la designación de una molécula como neurotransmisor depende de los criterios empleados y estos criterios inicialmente se basaban en las propiedades de la acetilcolina, con la aparición de cada nuevo candidato las reglas se iban modificando y ampliando (Boehning y Snyder, 2003) y en la década de los '90 el NO fue reconocido como el primer neurotransmisor de naturaleza "gaseosa" tanto a nivel periférico como central

¹⁰ Se puede consultar los criterios más actualizados y ajustados al nuevo estado del conocimiento de la neurobiología en los tratados especializados como por ejemplo *Fundamental Neuroscience* (Squire *et al.*, 2003, segunda edición)

¹¹ Axelrod fue honrado por su estudio del mecanismo involucrado en la inactivación de la noradrenalina, Katz por describir la liberación de cuantos de acetilcolina en la unión neuromuscular y von Euler por demostrar el papel de la noradrenalina como neurotransmisor en el sistema nervioso simpático.

(Gally *et al.*, 1990, Bult *et al.*, 1990; Snyder, 1992; Edelman y Gally, 1992; Dawson y Snyder, 1994; Garthwaite y Boulton, 1995; Rand y Li, 1995). Algunos autores prefirieron denominarle cautelosamente como mensajero neural mientras que otros más audaces acuñaron años más tarde el término de "gasotransmisor"¹².

2.3.2.- Las características físico-químicas del NO lo convierten en un neurotransmisor atípico

Este neurotransmisor "atípico" es atípico en su naturaleza química, su biosíntesis, su mecanismo de acción y su localización celular (Barañano *et al.*, 2001). Las Óxido Nítrico Sintetas (NOS) catalizan la oxidación de la L-arginina a L-citrullina y NO; la síntesis enzimática de NO es compleja y depende de la disponibilidad de cofactores como NADPH, FAD, FMN, hemo y, tetrahydrobiopterina (Figura 5, Alderton *et al.*, 2001; Mayer, 1995; Hill *et al.*, 2010).

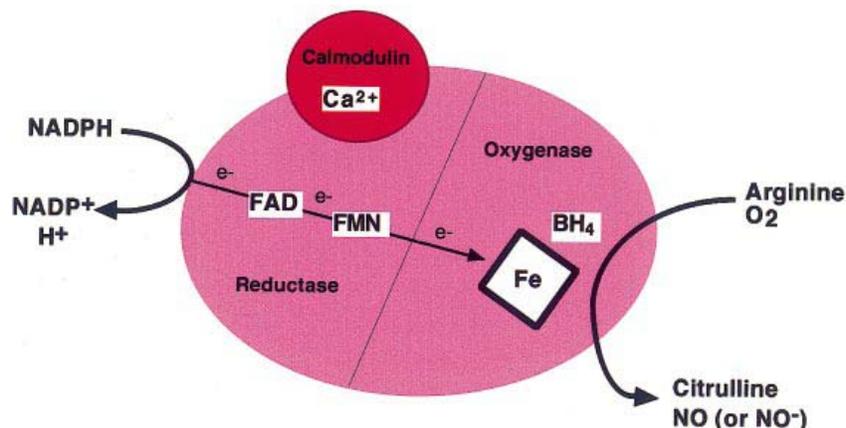


Figura 5: Esquema general de la síntesis de NO por la NOS a partir de Arginina y O₂ (Tomado de Alderton *et al.*, 2001).

¹² Principalmente el grupo de Solomon H. Snyder de Johns Hopkins University School of Medicine, USA.

Las propiedades físico-químicas del NO determinan características peculiares en la neurotransmisión nitrérgica; a diferencia de otros neurotransmisores el NO difunde fácilmente a través de las membranas biológicas (Denicola *et al.*, 1996) y no puede ser almacenado en vesículas sinápticas ni ser liberado por exocitosis desde las neuronas. Al no poder regularse su almacenamiento y liberación por exocitosis el NO debe ser producido *de novo* por la isoenzima óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) ante requerimientos funcionales y por esta razón la disponibilidad de NO es altamente regulada a nivel biosintético por múltiples mecanismos. La síntesis de NO por las isoenzimas NOS puede ser regulada por modificaciones post-translacionales de la NOS, el control de su ubicación dentro de las células, la disponibilidad de sustrato y cofactores y la presencia de otras proteínas con las que la NOS puede conformar complejos estables (Hill *et al.*, 2010). La isoenzima NOSn está presente en varios tipos neuronales (Bredt *et al.*, 1990) y su mapeo histoquímico en el SNC fue posible cuando se la identificó como la enzima responsable de la reacción histoquímica de la NADPH-diaforasa¹³ (Hope *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1991) lo que evidenció cuales poblaciones neuronales podrían operar vía la señal de NO (Vincent y Kimura, 1992). La NOSn es una isoenzima constitutiva de activación rápida que genera NO en concentración nanomolar baja (Derbyshire y Marletta, 2009), es regulada *in vivo* en forma Ca^{2+} /calmodulina-dependiente (Bredt y Snyder, 1990; Garthwaite y Boulton, 1995; James *et al.*, 2009) y por lo general se activa durante el influjo de Ca^{2+} a la célula a través de receptores glutamatérgicos de

¹³ fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido-diaforasa (NADPH-d)

tipo NMDA (*N*-Methyl-D-aspartato). La localización intracelular de la NOSn influye en la regulación de su actividad (Boehning y Snyder, 2003); en una suerte de compartimentalización en microdominios la NOSn está conectada al receptor NMDA por la proteína de densidad postsináptica PSD95 y por lo tanto la enzima es directamente expuesta al influjo de Ca^{2+} que entra por el canal activado del receptor glutamatérgico (Figura 6, Brenman *et al.*, 1996; Brenman y Bredt, 1997; Boehning y Snyder, 2003; Ishii *et al.*, 2006).

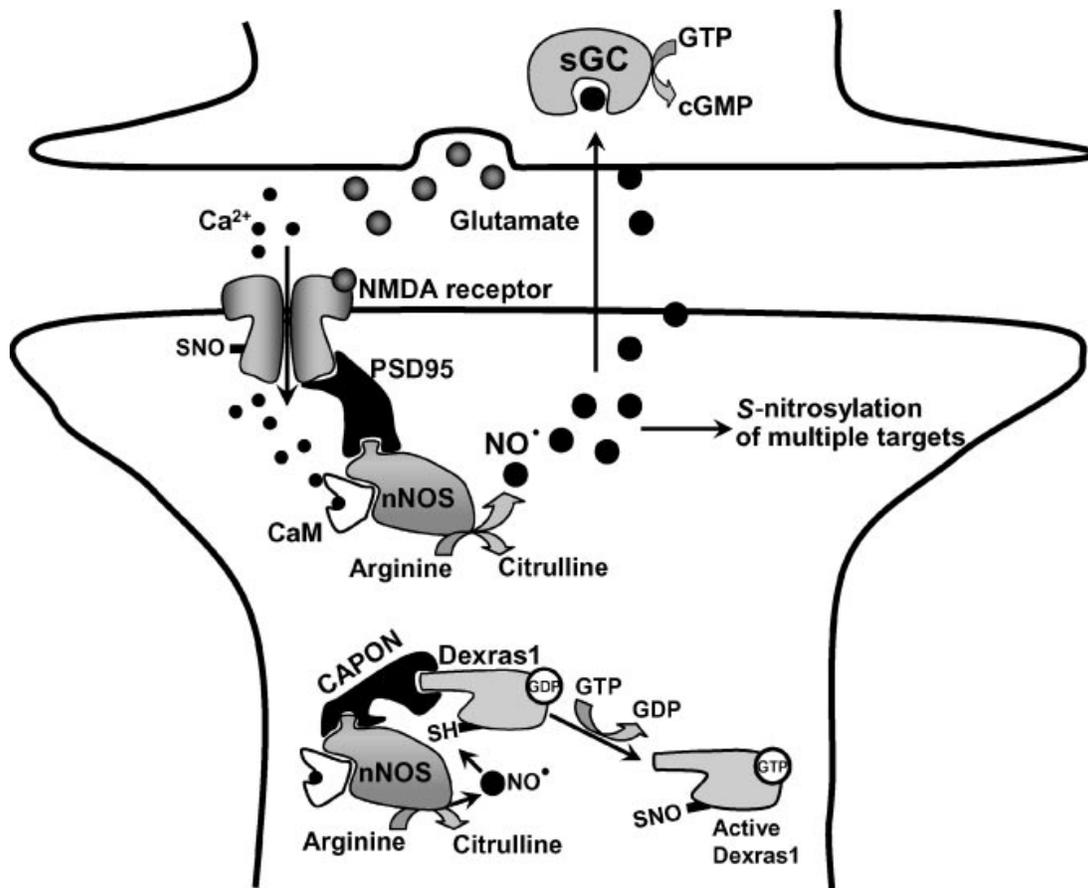


Figure 6: Regulación de la señalización de NO a través de proteínas adaptadoras. La NOSn es localizada cercanamente al receptor NMDA por su unión a través de la proteína adaptadora PSD95. El ingreso de calcio a través del receptor NMDA activa a la NOSn por un mecanismo calcio/calmodulina dependiente. El NO producido por la NOSn puede difundir a la célula vecina para activar la GCs o para modificar covalentemente residuos cisteína de otras proteínas blanco (*S*-nitrosilación). La nitrosilación de los receptores NMDA inhibe su actividad y por tanto provee de una posibilidad de retroalimentación negativa para la señalización a través del receptor glutamatérgico. La proteína CAPON compite con PSD95 por su unión a la NOSn y acerca a la NOSn a la pequeña proteína-G monomérica Dexras 1. Esto facilita la nitrosilación y consecuente activación de Dexras 1 (Tomado de Boehning y Snyder, 2003).

Esta no es una interacción estática ya que otra proteína adaptadora denominada CAPON compite por el dominio PDZ de la NOSn con la PSD95 y tiende a separarla del receptor NMDA lo que se presume pudiera reducir la capacidad de activación de la NOS por el influjo de Ca^{2+} a través del receptor NMDA¹⁴ (Jaffrey *et al.*, 1998; Boehning y Snyder, 2003; Mustafa *et al.*, 2009). A nivel presináptico CAPON se liga a las sinapsinas I, II y III lo que promueve la formación de un complejo NOSn-CAPON-sinapsinas (Jaffrey *et al.*, 1998; Jaffrey *et al.*, 2002; Boehning y Snyder, 2003); éstas últimas a su vez, están ubicadas en las zonas activas presinápticas cercanas a canales de calcio voltaje dependientes cuya apertura determina el incremento del Ca^{2+} intracelular (Photowala *et al.*, 2005) que podría activar a la NOSn. En forma similar a estos ejemplos la señalización por NO puede ser favorecida a través de proteínas adaptadoras que acoplen la NOSn a proteínas blanco específicas como otra forma más de regulación de la transmisión de la señal (Jaffrey *et al.*, 2002).

También por ser una molécula liposoluble y muy difusible tanto en medio acuoso como lipídico (Kelm y Schader, 1988; Denicola *et al.*, 1996; 2002; Moller *et al.*, 2005) la liberación del NO no se desarrolla necesaria y exclusivamente en las terminales sinápticas (Wiklund *et al.* 1997) sino que acontece desde cualquier parte de la neurona donde se exprese NOSn¹⁵ y esta enzima se active. Puede difundir a través de membranas celulares en forma isotrópica en múltiples direcciones a distancias de varios diámetros celulares desde su fuente según los gradientes de concentración existentes (Lancaster,

¹⁴ Estableciéndose una retroalimentación negativa.

¹⁵ Debe mencionarse que también se puede expresar la isoenzima NOSi en neuronas, pero nos centraremos exclusivamente en el papel de la NOSn.

1994; 1997) y en su trayecto activar efectores intracelulares ubicados en somas, procesos neurales o cualquier otro sector celular sin necesidad de contacto anatómico estrecho entre el elemento celular generador de NO y el blanco de su acción, por lo que sus efectos no están restringidos a, ni necesitan de, especialización sináptica alguna (Snyder, 1992; Bredt y Snyder, 1992). En forma similar el requerimiento de que el receptor para el neurotransmisor se encuentre en la membrana postsináptica tampoco es cumplido por el NO ya que sólo es necesario que difunda a través de la membranas al interior de la célula blanco para allí activar efectores intracelulares (Fernández Álvarez *et al.*, 1999). En la transmisión nitrérgica existe por tanto un claro ***desacople espacial*** entre el sitio de liberación de la señal y el de su detección. Un aspecto interesante en la bioquímica del NO es que su concentración y su localización son los determinantes claves de su capacidad de activar diferentes vías de señalización (Hill *et al.*, 2010). En concordancia, la especificidad y la localización de los efectos nitrérgicos están determinadas por la naturaleza y la distribución de las moléculas "receptoras" situadas en los elementos neurales incluidos en su espacio o volumen de difusión.

2.3.3.- Algunos de los blancos moleculares del NO

El NO es un radical libre de vida media corta y de la posesión de su electrón desapareado es que derivan su gran afinidad por los metales de transición (en particular hierro) y su rápida reacción con radicales libres

derivados del oxígeno, los cuales pueden explicar una gran parte de sus propiedades biológicas (Hill *et al.*, 2010). Dada su reactividad con otros radicales libres, grupos hemo, grupos tioles, entre otras moléculas (Stamler *et al.*, 1992; Gross y Wolin, 1995) los posibles blancos moleculares de acción del NO en células, membranas y el espacio extracelular, son muy variados, siendo el más estudiado la hemoproteína guanilato-ciclase soluble de ubicación citoplasmática (GCs) (Miki *et al.*, 1977; Arnold *et al.*, 1977; Dawson y Dawson, 1995; Bellamy y Garthwaite, 2002; Krumenacker *et al.*, 2004; Cary *et al.*, 2006). La interacción con diferentes blancos moleculares determinaría una decodificación diferente de la misma señal.

Estudios sobre la actividad de la GCs en tejido homogeneizado o con GCs purificada indican que la velocidad de activación de la GCs por el NO es del orden de milisegundos, en presencia de exceso de sustrato el GMPc es formado a velocidad constante y al remover el NO la inactivación de la GCs acontece lentamente en el rango de segundos a minutos (Bellamy y Garthwaite, 2002). El NO reacciona en forma rápida y reversible con el Fe⁺⁺ del grupo hemo de la GCs con una afinidad del orden nanomolar (Radi, 1996). Si bien la GCs no es estrictamente un receptor sino una enzima citoplasmática que sintetiza un mensajero intracelular (Snyder, 2009) igualmente es determinante en la especificidad de la acción de la señal ya que la decodificación de la señal nitrérgica acontece en el citoplasma por activación de dicha enzima (Figura 7; Derbyshire y Marletta, 2009; Agnati *et al.*, 2010).

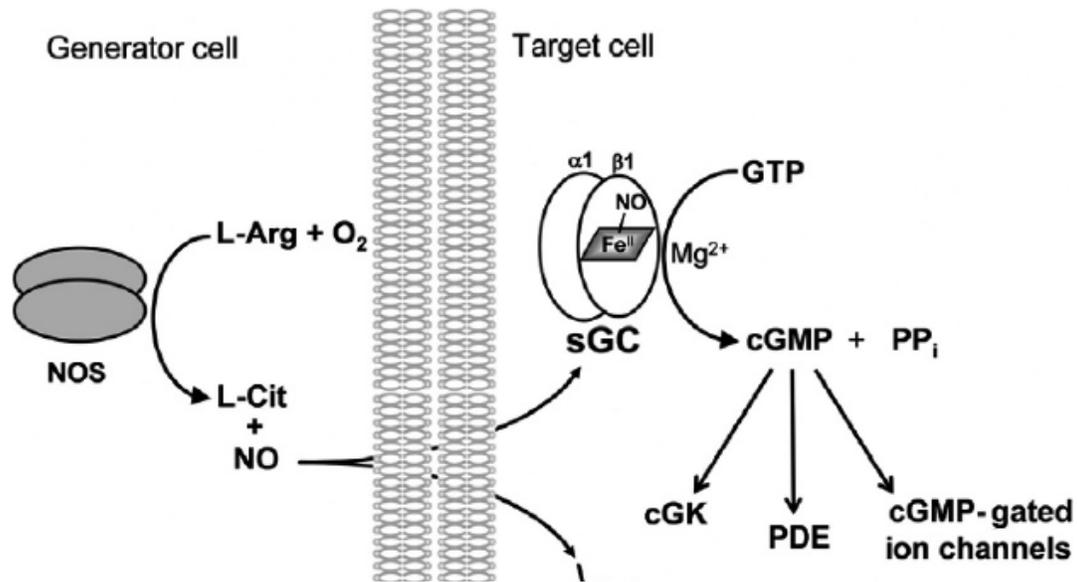


Figure 7: Vía de transducción NO/GMPc. El NO sintetizado por la NOS difunde a través de las membranas celulares hacia las células blanco. En el citoplasma activa a la GCs lo cual lleva a un incremento en la síntesis de GMPc y desencadena diferentes acciones. (Tomado de Derbyshire y Marletta, 2009)

Estudios de la actividad de la enzima en preparados celulares han demostrado que la GCs se comporta en cuanto a su actividad de forma análoga a la que opera un receptor de un neurotransmisor clásico: presenta un sitio de unión al ligando (grupo hemo), tiene un dominio de transducción, desarrolla una respuesta dependiente de la concentración del NO, la sensibilidad de la GCs al NO cambia con el tiempo de exposición¹⁶ y además la inactivación de la GCs al remover el NO es 25 veces más rápida en células (en el orden de subsegundos) que en los otros preparados experimentales (Bellamy y Garthwaite, 2001; Griffiths y Garthwaite, 2001; Bellamy y Garthwaite, 2002; Roy y Garthwaite, 2006). En células del SNC no se observa retardo entre la unión del NO a la GCs y el inicio de la actividad enzimática (con 20 ms de

¹⁶ Una exposición al NO del orden de milisegundos determina una actividad máxima de la GCs mayor que la exposición al NO durante segundos o minutos (Bellamy y Garthwaite, 2002).

tiempo de muestreo; Bellamy y Garthwaite, 2001); por otra parte ante la remoción del NO la actividad de la GCs decae con una vida media de 200 ms. Esta cinética no es muy diferente de la descrita en receptores glutamatérgicos de tipo NMDA o receptores metabotrópicos gabaérgicos y glutamatérgicos (Garthwaite, 2008). La activación de la GCs por el NO determina rápidamente en la célula blanco un incremento de 100 a 400 veces en la síntesis de GMPc a partir de GTP, que a su vez activará la proteínquinasa GMPc dependiente, regulará fosfodiesterasas, la fosforilación/desfosforilación de cascadas y por este medio la expresión génica y modulará la actividad de canales iónicos; de esta forma intervendrá en una gran gama de acciones fisiológicas (Gally *et al.*, 1990; Garthwaite y Boulton, 1995; Snyder y Bredt, 1991; Vincent, 1994; Vincent y Hope, 1992; Derbyshire y Marletta, 2009). Las diferentes actividades en las que están involucrados los canales iónicos activados por el GMPc en el sistema nervioso incluyen la plasticidad neuronal (Wei *et al.*, 1998), la expresión génica (Kraus-Friedmann, 2000) y por supuesto aquellas que siguen a la activación generada por la acción del NO (Leinders-Zufall, 1995; Garthwaite y Boulton, 1995). Si bien se han descrito una gran variedad de PDE capaces de hidrolizar el GMPc producido poco se sabe sobre que isoformas de la PDE son responsables de dicha hidrólisis en cada tipo celular del SNC (Garthwaite, 2008).

En otros casos los blancos moleculares del NO podrán ser otras hemoproteínas, grupos tioles de proteínas, etc. La S-nitrosilación¹⁷ selectiva y

¹⁷ S-nitrosylation ha emergido como un mecanismo importante para la regulación dinámica post-translacional de una vasta gama de proteínas, lo que amplía aún más la ubicua influencia del NO

reversible de residuos cisteína de proteínas podrá regular la función de canales iónicos, receptores de neurotransmisores, enzimas metabólicas, de forma que la habilidad del NO de modificar un vasto rango de blancos moleculares proteicos amplía notablemente su capacidad de transmisión de información (Stamler *et al.*, 1992, Montague *et al.*, 1994; Boehning y Snyder, 2003; Hess *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2009). Entre las posibles proteínas a ser reguladas por este mecanismo se encontrarían la bomba de sodio, la actina y la tubulina (Hess *et al.*, 2005; Snyder, 2009). Conceptualmente la idea de blanco molecular debe ir de la mano de la idea de especificidad, en el caso de la S-nitrosilación la compartimentalización en microdominios de señalización de la NOS promovería una cierta especificidad ya que las interacciones proteína-proteína facilitarían el acceso a los blancos de nitrosilación del NO, a modo de ejemplo obsérvese en la Figura 6 lo que acontece con Dexras1 (Jaffrey *et al.*, 1998; 2002; Boehning y Snyder, 2003). Como último ejemplo de molécula "receptora" de la señal de NO tan sólo se hará mención a la citocromo c oxidasa que es responsable del consumo mitocondrial de O₂ y que es inhibida por NO en forma competitiva con el O₂ (Bellamy *et al.*, 2002).

2.3.4.- El cese de la acción mensajera del NO

El NO tampoco es inactivado o recaptado como otros neurotransmisores para asegurar el cese de su acción sino que se va agotando a medida que reacciona con diferentes moléculas en su trayecto de difusión, (Vincent, 1994;

en la señalización celular (Hess *et al.*, 2005). Garthwaite (2008) plantea que la S-nitrosilación sería un mecanismo de señalización del NO involucrado principalmente en situaciones patológicas más que en fisiológicas.

1995). Sin embargo a bajas concentraciones del orden nanomolar y aún menores que corresponderían a situaciones fisiológicas la reactividad del NO no es alta. La reacción con el O₂ por ejemplo es importante en el rango micromolar de concentración de NO pero no en concentraciones nanomolares (Ford *et al.*, 1993). En esas concentraciones una forma de degradar al NO es través de la reacción con la hemoglobina circulante en los eritrocitos (Liu *et al.*, 1998). A pesar de que la hemoglobina permanece en el espacio extracelular (a la fuente de NO) el hecho de que el NO esté difundiendo rápida y permanentemente hacia y desde su compartimiento de síntesis permite que el "secuestrador" extracelular inevitablemente depleccione tanto el NO intracelular como el extracelular (Lancaster, 1997). Al parecer un mecanismo mucho más efectivo de consumo de NO descrito en rodajas de cerebelo estaría presente en el tejido nervioso (Hall y Garthwaite 2006), pero merece aún más estudio y podría ser diferente en distintas regiones del SNC (Garthwaite, 2008).

De lo hasta aquí expuesto sobre el papel del NO como mensajero queda claro que no cumple estrictamente todos los criterios necesarios para considerarlo un neurotransmisor clásico, esto no invalida se le considere un neurotransmisor no clásico. De hecho el acúmulo de las evidencias experimentales que demostraron sus novedosos mecanismos en el proceso de neurotransmisión permitió redimensionar el cumplimiento riguroso del conjunto de criterios determinados *a priori* (Vincent, 1995; Rand y Li, 1995). La transmisión nitrérgica constituye una forma particular de neurotransmisión y al decir de Mustafa *et al.*, 2009: "*The gasotransmitters have revolutionized*

our thinking about messenger molecules in multiple ways. Their mode of biosynthesis, storage, and release differs markedly from those of other hormones, neurotransmitters, and growth factors. Recent studies indicate that their modes of signaling also differentiate them from other chemical messengers."

2.3.5.- Las características de las redes de comunicación del NO como neurotransmisor en volumen en el SNC

Considerando la clasificación anteriormente expuesta de los tipos de comunicación en el SNC según Agnati y Fuxe (Agnati *et al.*, 2010) el NO sería un neurotransmisor en volumen que utiliza como canal de comunicación una vía difusa, donde si bien existe una secuencia de eventos temporalmente ordenados que "conectan" el "nodo fuente" y el "nodo blanco", todo el espacio existente entre ambos es potencialmente utilizable para el tránsito de la señal, de hecho como se mencionó anteriormente existe en la transmisión nitrérgica un evidente desacople espacial entre el sitio de liberación de la señal y el de su detección¹⁸. La **conectividad de las redes** en las que el NO interviene es **dinámica** ya que las conexiones entre la fuente y el blanco pueden ser rápidamente formadas o removidas. El NO es una **señal de privacidad reservada** ya que las células blanco deben poseer moléculas capaces de reconocerla y decodificarla (por ejemplo a través de la GCs) y es una **señal**

¹⁸ En el SNC la GCs presenta una distribución diferencial, siendo relativamente abundante en los núcleos estriado y accumbens, la sustancia negra (Hofmann *et al.* 1977), caudado-putamen, la neocorteza y el cerebelo (Ariano *et al.* 1982), el bulbo olfatorio y algunas zonas del tronco encefálico (Furuyama *et al.* 1993). En general, el elemento neural que produce NO se encuentra en las cercanías del elemento neural que posee la guanilatociclasa soluble (De Vente *et al.*, 1998) pero el contacto anatómico obviamente no es esencial. En este sentido, existe una complementariedad anatómica de estos elementos (Schmidt *et al.* 1992).

insegura dado que en el trayecto hacia un blanco molecular específico puede interactuar con otra moléculas (y por ejemplo ser “consumido o secuestrado” por hemoglobina, Joshi *et al.*, 2002). Retomando el concepto de redes (Figura 2; Agnati *et al.*, 2007) en un nivel molecular de alto grado de miniaturización y bajo grado de integración el NO, sus mecanismos de transducción y sus moléculas receptoras conformarían “*circuitos químicos*” que se encontrarían en la base de una red comunicacional que puede modificarse rápidamente: las *redes nitrérgicas serían transitorias y dinámicas*. Estas redes quedarían contenidas en un volumen o espacio de difusión de NO cuyo tamaño y forma se moldean entre otros factores, por la síntesis de NO. Si se asciende jerárquicamente al nivel celular con bajo grado de miniaturización y alto grado de integración el volumen de influencia del NO podría tener una extensión que incluya redes celulares. Activadores fisiológicos de la NOSn tales como el calcio citosólico, al igual que moléculas capaces de reaccionar con el NO, ubicadas tanto intra como extracelularmente, afectarán el grado de difusión del mensajero, y en consecuencia la extensión de la red funcional nitrérgica. A modo de ejemplo, *in vivo* la activación neuronal al aumentar la concentración intracelular de calcio en estructuras nitrérgicas modularía la difusión del NO por mecanismos de regulación análogos a los descritos para la liberación de neurotransmisor en la sinapsis clásica (Park *et al.*, 1998), pero la transmisión nitrérgica es multidireccional y puede afectar múltiples blancos de la “*red celular compleja*” para actuar a veces en paralelo y a veces en serie. Por tanto la señalización espacial VT mediada por el NO se superpone e interactúa

con la neurotransmisión mediada por los potenciales de acción y las sinapsis de los “*circuitos eléctricos*” clásicos.

2.4.- Una cuestión central de la transmisión en volumen: ¿Cuánto y cómo difunde el NO desde sus fuentes en el SNC?

Una característica fundamental de la transmisión en volumen es su capacidad de permitir la difusión del transmisor más allá de la hendidura sináptica en concentraciones de relevancia biológica (Boehning y Snyder, 2003; Sykova, 2004; Vizi *et al.*, 2004). Al ser la difusión del NO tridimensional y sin restricciones de compartimentos se generan una serie de interrogantes que debieran tratar de responderse en cada modelo de estudio: ¿qué tan lejos difunde en concentraciones biológicamente efectivas?, ¿cuál es el perfil de liberación desde sus fuentes?, ¿con cuales moléculas interacciona para realizar sus acciones? (Hall y Garthwaite, 2009).

2.4.1.- Valores obtenidos empíricamente para concentración y difusión de NO en el SNC

Para lograr una máxima comprensión de este tipo de señalización en el SNC es necesario poseer valores de concentración y difusión de NO en tiempo real pero su inestabilidad en solución y su reactividad con otras moléculas dificultan estas mediciones en sistemas biológicos.

Con respecto a la medición de la concentración de NO *in vivo*, una década atrás el valor de 1 μM medido con los primeros electrodos para NO parecía razonable teniendo en cuenta las estimaciones que existían sobre la potencia del NO por la GCs, pero desde aquel entonces han sido reportados un gran número de valores, a veces irreconciliables, obtenidos por medición con electrodos (Hall y Garthwaite, 2009). En compensación, otro tipo de aproximaciones han aportado información al respecto, entre ellas: el análisis cuantitativo de la activación de GCs por NO, modelos computacionales basados en dichos análisis, nuevas moléculas biosensoras para monitorizar producción y liberación de NO e incluso el uso de la GCs como un biosensor endógeno de NO. Todas estas líneas independientes de evidencias sugieren que la concentración fisiológica de NO tendría un rango de 100 pM (o menos) a aproximadamente 5 nM (Hall y John Garthwaite, 2009).

Con respecto a la caracterización de la difusión del NO la mayor parte de los trabajos asumen como válido el valor de la constante de difusión medida experimentalmente por Malinski *et al.* (1993) en la pared de aorta *in situ* con microsensores porfirínicos: $D = 3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y también tienden a asumir que ese valor se mantiene espacialmente invariable en todo el tejido. Un valor similar ($D = 3810 \mu\text{m}^2/\text{s}$) fue determinado en corteza de cerebro de rata por Meulemans (1994) demostrando que la velocidad de difusión es similar en tejidos y en agua. Según Lancaster (1997) la extensión de la difusión está influenciada no solamente por la difusibilidad del NO en un tejido específico (que refleja el valor de su constante de difusión), sino también por su

velocidad de producción, la velocidad con la cual es "consumido" por las moléculas con las que reacciona ("receptores", grupos tioles, etc.) y la velocidad con que es "secuestrado" por ejemplo por la hemoglobina (por lo cual el lugar donde se realiza la producción y difusión de NO también determina la extensión de la difusión). Son escasos y a veces hasta discordantes los datos experimentales que cuantifican directamente la difusión del NO generado endogenamente en el SNC.

Schuman y Madisson (1994) en rodajas de hipocampo en estudios de plasticidad sináptica demostraron que el NO inducía potenciación sináptica entre células y sinapsis separadas por una distancia de aproximadamente 100 μm pero no en células separadas por 500 μm . Estudios más recientes que emplearon microsensores selectivos para el NO evidenciaron en este mismo preparado que el NO evocado por estimulación con NMDA difunde desde el sitio de estimulación, en concentraciones detectables, hasta una distancia máxima de 400 μm y que la concentración máxima detectada varía en distintas regiones del hipocampo con máximos en el rango de 50 a 300nM (Ledo *et al.*, 2005). Cuando se comparó el resultado de la estimulación con NMDA y con AMPA (otro agonista glutamatérgico) si bien en ambos casos se obtuvo una producción de NO concentración-dependiente la respuesta con NMDA fue mayor y más rápida que con AMPA, siendo la concentración máxima de NO producida de 150 nM para el estímulo con NMDA y de 80 nM para el AMPA (Frade *et al.*, 2009).

2.4.2.- Modelos matemáticos para predecir la difusión de NO

Distintos modelos matemáticos que asumen a la difusión de NO como isotrópica, han intentado predecir el patrón de difusión de NO en el SNC (Buerk, 2001). Estas predicciones son consistentes con las deducciones experimentales obtenidas por Schuman y Madisson (1994)

Wood y Garthwaite (1994) fueron los primeros en establecer un modelo tridimensional de difusión de NO en el SNC por el cual predicen que, a partir de una fuente puntual única de NO que emite durante 1 a 10 s, se obtiene una esfera fisiológica de influencia de un diámetro aproximado de 200 μm . En esta distancia entrarían 2 millones de sinapsis (la densidad de sinapsis en el neuropilo de mamífero corresponde a 20 / 100 micras², en estudios en 2 dimensiones, o en términos de volumen en 5×10^8 por mm^3 (Rakic *et al.*, 1986; Napper y Harvey, 1988). La dimensión precisa del volumen de difusión dependerá de la duración de las salvas de estimulación administradas, de la vida media del NO (5 s según Moncada *et al.*, 1989), y de la concentración de NO efectiva umbral considerada (1 nM según Furchgott y Jothianandan, 1991). Con estas consideraciones el modelo tridimensional muestra que existe un solapamiento de las "nubes" de NO originadas en diferentes neuronas fuente cuando ellas se encuentran a distancias de entre 200 y 500 μm . Este tipo de solapamiento también había sido descrito en un modelo matemático no-tridimensional anterior diseñado específicamente para células de mamífero en sistemas que la producción de NO era sostenida, relativamente constante y

que consideraba la influencia de la presencia de hemoglobina en el cálculo de la difusión teórica del NO (Lancaster, 1994).

Philippides *et al.* (2000), basándose también en valores experimentales obtenidos *in vitro* por otros autores, conciben un modelo en 4 dimensiones (las 3 espaciales y el tiempo) que tiene en cuenta el coeficiente de difusión del gas ($3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, Malinski *et al.*, 1993), su velocidad de producción, su velocidad de degradación y el tamaño y la forma geométrica de la fuente (ya que a diferencia de modelos anteriores no considera la fuente de NO como puntual). En este modelo, la fuente de NO es una esfera ahuecada con diámetros internos y externos variables o una fuente de forma geométrica irregular, el territorio que rodea esta fuente es en principio homogéneo y la concentración de NO máxima en la superficie de la fuente (en el tiempo_{inicial}) es de $1 \mu\text{M}$ (Malinski *et al.*, 1993). Estos autores definen la distancia efectiva de difusión del NO como la distancia dentro de la cual la concentración de NO es mayor que la constante de disociación de la GCs ($0,25 \mu\text{M}$ según Stone y Marletta, 1996). En este modelo, para una esfera de $5 \mu\text{m}$ de radio, la distancia de difusión del NO fue 2 veces su radio, para una esfera de $15 \mu\text{m}$ de radio, la distancia de difusión del NO fue 3.2 veces su radio, para una esfera $100 \mu\text{m}$ de radio la distancia de difusión del NO fue 2.8 veces su radio y cuando el radio fue menor de $5 \mu\text{m}$ el volumen de difusión se aproximó al tamaño de la fuente. Por otra parte, las células que presentaron menor retardo (tiempo mínimo requerido para alcanzar la máxima difusión) fueron las de radio $15 - 20 \mu\text{m}$ y las que presentaron mayor retardo fueron las de 5 y $100 \mu\text{m}$ de radio. Un aspecto interesante de que las células del modelo sean huecas (además de

considerar la localización citoplasmática de las NOSn), es que el hueco de la esfera se convierte durante la síntesis en un reservorio de NO desde el cual el mensajero difunde hacia el exterior una vez que la síntesis cesa. En la búsqueda de aplicar el modelo en un ejemplo más afín a lo que acontecería en el SNC, los autores consideraron una fuente hipotética de NO de forma geométrica irregular similar a una neurona ubicada cerca de un sumidero de NO con forma análoga al corte transversal de un vaso sanguíneo (Figura 8).

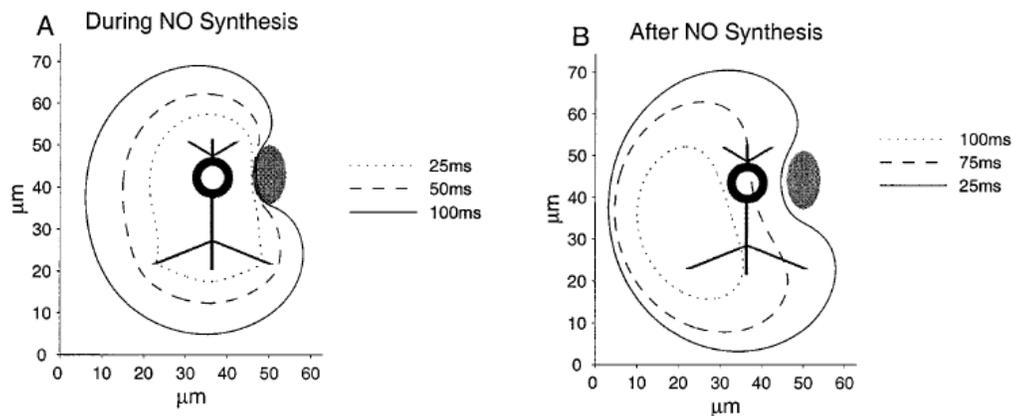


Figura 8: Dibujo del contorno de la zona de concentración umbral de NO efectiva para la vía NO/GMPc. Varios escalones temporales durante y después de 100 ms de síntesis se ilustran junto a la fuente en negro y el sumidero en gris. Para cada escalón temporal, el contorno define la región dentro de la cual la señal de NO puede tener efecto sobre la GCs. **(A)** Contornos de las concentraciones umbrales a los 25 y 50 ms posteriores al inicio de la síntesis y al finalizar la síntesis a los 100ms. **(B)** Contornos de las concentraciones umbrales a 25, 75 y 100 ms después del fin de la síntesis. Nótese la ubicación del área afectada rodeando el sumidero durante y justo al fin de la síntesis y luego de la síntesis el desplazamiento a la izquierda de la nube efectiva atribuible a la acción del sumidero en conjunción con la formación de un reservorio de NO en el centro de la célula durante la síntesis (Tomado de Philippides *et al.* 2000)

Ante la aplicación de un pulso de producción de NO de 100 ms el sumidero no se convirtió en una barrera infranqueable para la difusión de NO en el tejido durante su producción (salvo en su límite adyacente) y solamente luego que

ésta se detuvo generó un desplazamiento significativo del centro de la "nube de NO" biológicamente efectiva con respecto al centro de la fuente de NO (Philippides *et al.*, 2000).

Más recientemente, el mismo equipo (Philippides *et al.*, 2005) plantea por primera vez, un modelo matemático en cuatro dimensiones donde las fuentes nitrérgicas no son somas sino fibras nerviosas de diferentes diámetro y dispuestas con diferentes grados de dispersión. Los parámetros considerados en este modelo fueron: velocidad de producción del NO ($Q_p = 1,32 \times 10^{-4} \mu\text{M/s}$), el coeficiente de difusión del gas ($3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, Malinski *et al.*, 1993) y la vida media del NO (5 s según Moncada *et al.*, 1989). Como el valor de la concentración efectiva media (EC_{50}) del NO para su principal receptor la GCs no está certeramente definido, y el rango requerido para activar la GCs medido experimentalmente va desde 1 mM a 1 nM (Artz *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004), la distancia efectiva de difusión del NO es considerada según dicho rango. Algo similar ocurre con las mediciones de la vida media del NO por lo cual analizan las consecuencias de variar la vida media entre 1 ms y 5 s (el rango de la vida media extravascular del NO es de 0,09 a 2 s, según Thomas *et al.*, 2001, dependiendo de la concentración de O_2 y de la distancia de los vasos sanguíneos).

Este modelo predice que para fuentes únicas aisladas cuanto menor sea su diámetro, menor será la cantidad de NO producida y por lo tanto menor el volumen de acción del mensajero (Figura 9), ***es así que el tamaño y la dispersión de las fuentes nitrérgicas son factores determinantes de la difusión del NO.*** Incorpora además el concepto de que la densidad de

distribución de las fibras también puede determinar la eficiencia de la señal y plantea que de existir cooperación entre muchas fibras dispersas de baja eficacia individual (como por ejemplo las que integran un plexo) se puede obtener una señal más extensa, potente y significativamente más homogénea en espacio y tiempo que la obtenida por la activación de unas pocas fuentes de mayor tamaño (el modelo considera el diámetro de la fibras nitrérgicas desde 0 a 5 μm y la distancia entre ellas desde 0 hasta 35 μm).

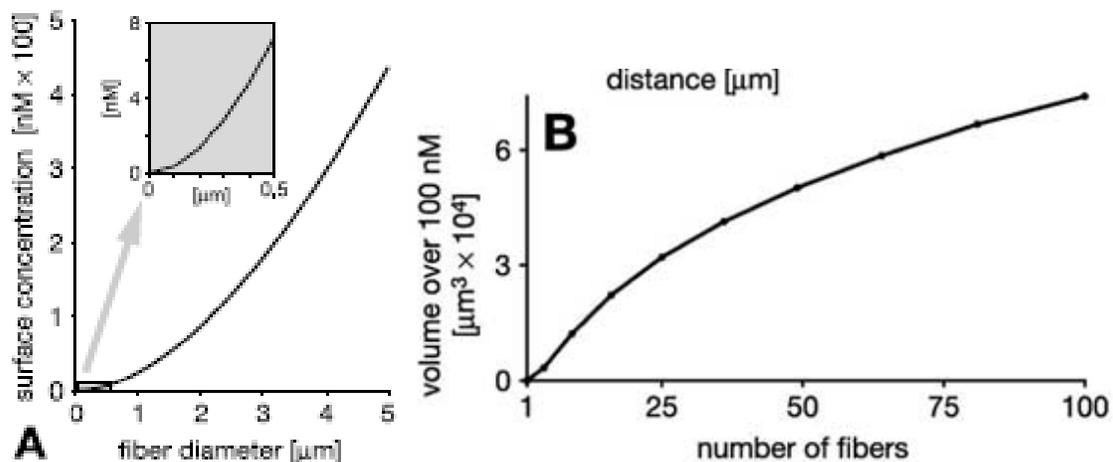


Figura 9: La eficacia de señalización de una única fibra nitrérgica depende de su diámetro y es posible obtener mayores concentraciones de NO si múltiples fibras delgadas actúan cooperativamente. **(A)** En la gráfica se observa que la concentración de NO en la superficie de la fibra fuente declina dramáticamente con el descenso del diámetro de la fibra y más aún en las fibras más finas tal como se observa en el inset. **(B)** A medida que el número de fibras se incrementa es mayor el volumen de tejido que alcanza una determinada concentración de NO en este caso 100 μM y con fibras de 2 μm de diámetro separadas entre sí 10 μm (Modificado de Philippides *et al.*, 2005).

2.5.- El NO en el núcleo motor del trigémino: ¿una señal espacial que coordina la actividad neural?

2.5.1.- El NO de origen exógeno modula las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas trigeminales

En el NMT del cobayo, el NO se ha incorporado como neurotransmisor a la larga lista de sustancias neuroactivas que regulan la actividad de las motoneuronas somáticas (Abudara *et al.*, 2002). En rodajas de tronco encefálico que contienen al NMT, al administrar exógenamente dadores de NO por perfusión, observamos depolarización y disminución de la rebase de las motoneuronas trigeminales, junto con un aumento de la amplitud y la frecuencia del ruido sináptico excitatorio e inhibitorio registrado en ellas en ausencia de estimulación a entradas sinápticas (Figura 10).

En las condiciones experimentales en que se obtuvieron los resultados mencionados, cualquier estructura presente en la rodaja que tuviera "receptores" para el NO podría haber sido afectada. En este sentido, se ha reportado la presencia de la enzima GCs en las motoneuronas trigeminales (Furuyama *et al.*, 1993; Southam y Garthwaite, 1993), lo cual junto con el hecho que los efectos de los dadores de NO fueron imitados por derivados del GMPc y bloqueados por inhibidores de la GCs como el ODQ (Figura 11), señalan a la motoneurona trigeminal como posible blanco celular directo del NO en el NMT (Abudara *et al.*, 2002). A este nivel, el NO causaría efectos

biológicos mediados al menos en parte por la activación de la GCs y producción de GMPc.

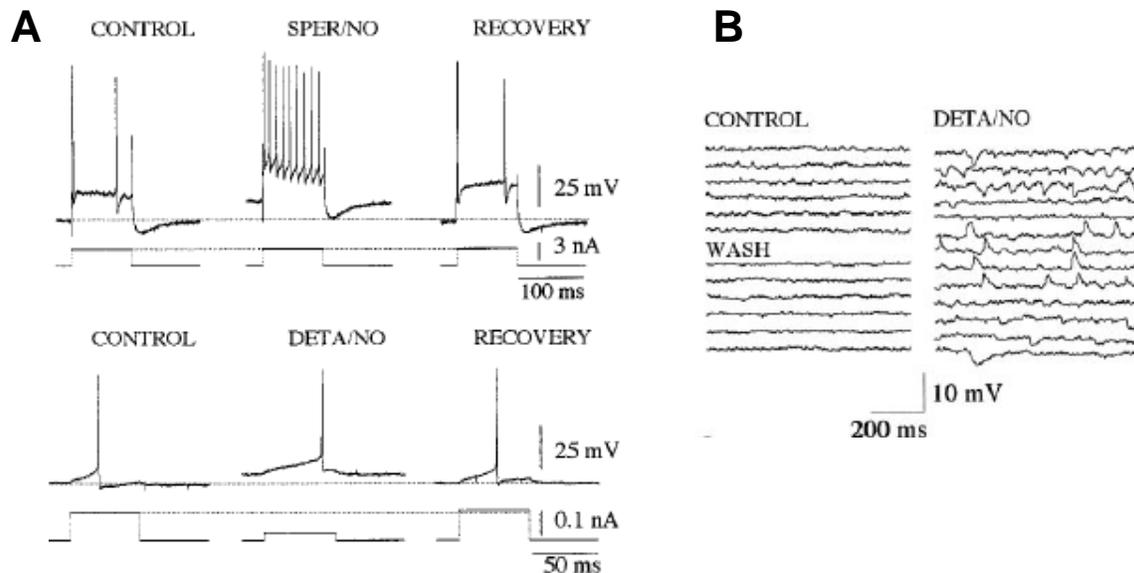


Figura 10: Registros electrofisiológicos intracelulares de la actividad de motoneuronas trigeminales en rodajas de tronco encefálico de cobayo, efectos de los dadores de NO. (A) En dos neuronas diferentes se observa el efecto depolarizante y de disminución de la reobase provocados por dadores de NO y la recuperación ante el lavado con solución fisiológica. (B) Efecto de un dador de NO sobre el ruido sináptico registrado en la motoneurona en ausencia de estimulación presináptica, nótese el incremento del ruido y la recuperación post-lavado (Modificado de Abudara *et al.*, 2002).

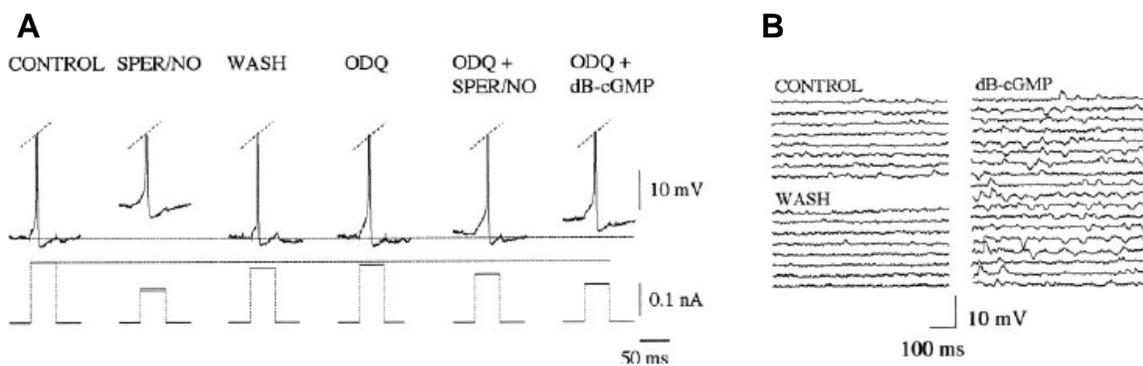


Figura 11: Registros electrofisiológicos intracelulares de la actividad de motoneuronas trigeminales en rodajas de tronco encefálico de cobayo, efectos dependientes del GMPc. (A) Efecto depolarizante y de disminución de la reobase provocados por dadores de NO, su recuperación ante el lavado con solución fisiológica, el bloqueo de ese efecto al aplicar el dador junto con un inhibidor de la GCs (ODQ) y la imitación del efecto del dador por un análogo del GMPc aplicado junto con ODQ. (B) Efecto de un análogo del GMPc sobre el ruido sináptico registrado en la motoneuronas en ausencia de estimulación presináptica, nótese el incremento del ruido y la recuperación post-lavado (Modificado de Abudara *et al.*, 2002).

Dado el amplio espectro de vías de transducción del NO y la organización estructural del NMT, existirían otros múltiples blancos probables (celulares y subcelulares) para el mensajero. Por ejemplo el NO aplicado exógenamente pudo haber ingresado en otras terminales pre-motoras vecinas al sitio de su síntesis para facilitar la liberación o la acción de otros neurotransmisores desde estas terminales. El aumento de la actividad sináptica que hemos registrado ante la aplicación de dadores de NO y de derivados del GMPc, es compatible con esta idea.

Estos experimentos farmacológicos tienen una correspondencia histológica ya que hemos reportado la presencia de NOSn en el NMT (Abudara *et al.*, 2002). Ignoramos si *in vivo*, la producción y difusión de NO endógeno reproduce los efectos observados ante la aplicación exógena de NO.

2.5.2.- En el NMT las fuentes nitrérgicas neurales son fibras premotoras de pequeño diámetro

Tal como se observa en la Figura 12, las fuentes nitrérgicas que contienen la enzima óxido nítrico-sintasa neuronal (NOSn - positivas) incluyen fibras varicosas y terminales botón-símiles en íntima aposición con procesos dendríticos y somas de motoneuronas que no producen NO (NOSn-negativos). No se detectaron somas NOSn positivos en el NMT (Figura 12).

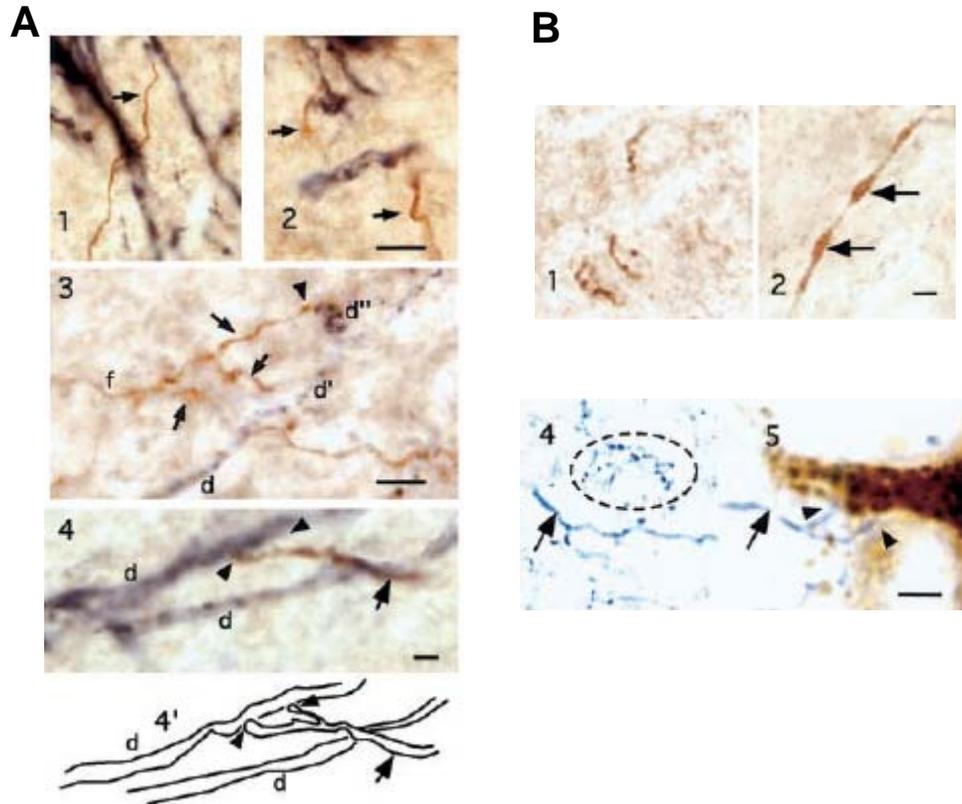


Figura 12: Fibras nitrérgicas delgadas inervan a las motoneuronas trigeminales. Las motoneuronas fueron identificadas por marcado retrógrado con CTb-HRP (cólera toxina subunidad b-peroxidasa de rábano, en negro). La presencia de NOSn fue detectada por inmunohistoquímica para anticuerpos anti-NOSn (en marrón) o por actividad NADPH-d (en azul). **(A)** En **A1** y **A2** las flechas señalan las fibras NOSn positivas en la cercanía de los procesos motoneuronales. En **A3** se observa una larga fibra nitrérgica con múltiples ramificaciones (d, d' y d'') que se indican con flechas. En **A4** se observan dos dendritas de motoneurona (d) y una fibra NOSn-positiva (flecha) que parece realizar contacto con una dendrita postsináptica mediante dos terminales botón-símiles (cabeza de flecha) tal como se ilustra en el dibujo de **A4'**. Barras de calibración: A1 y A2 10 μm ; A3 5 μm ; A4 2 μm . **(B)** En **B1** y **B2** las microfotografías corresponden a secciones del NMT contralateral a (A) en el que las motoneuronas no fueron marcadas en forma retrógrada con CTb-HRP. Se detectan fibras NOSn-positivas al igual que en (A) pero las motoneuronas no pueden ser observadas ya que fueron NOSn-negativas. Las flechas en B2 indican dos varicosidades en una fibra nitrérgica. En **B4** en el mismo núcleo que B1 y B2 se identifican las fibras nitrérgicas marcadas para actividad NADPH-d, el círculo de línea punteada encierra una serie de varicosidades en las ramas que parten de una fibra NADPH-d-positiva. La flecha señala otra rama nitrérgica en la misma sección. En **B5** se observa un corte del NMT contralateral, que sí presenta las motoneuronas marcadas con CTb-HRP, a alta magnificación. Las flechas señalan una fibra que se bifurca en dos ramas que finalizan en dos estructuras botón-símiles (cabezas de flecha) en aposición con la dendrita correspondiente a una motoneurona marcada retrógradamente. Nótese que la motoneurona no presenta actividad NADPH-d. Barras de calibración: B1, B2, B4 y B5 2 μm (Modificado de Abudara *et al.*, 2002).

En la mayoría de los casos observados, las fibras conteniendo NOSn, fueron muy finas (0,6 a 1,6 μm de diámetro) (Abudara *et al.*; 2002). Por otra parte

las fibras delgadas nitrérgicas del NMT se disponen dispersas en forma similar a un plexo laxo. Los somas de las células premotoras, que originan las fibras nitrérgicas que proyectan hacia el NMT, se han localizado en la formación reticular bulbar (Fabbiani *et al.*, 2005; Pose *et al.*, 2005) y en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (McGregor *et al.*, 2005) mediante técnicas de marcado retrógrado y tinción para NADPH-diaforasa y anticuerpos anti-NOSn. Por los tanto en el NMT, la única fuente neural de NO descrita corresponde a estas fibras finas.

2.5.3.- El NO como mensajero anterógrado en el NMT

Si bien cualquier compartimiento neuronal que contenga NOSn puede actuar como estructura fuente de NO y se ha demostrado difusión de NO desde somas, axones y dendritas de células nitrérgicas (Wiklund *et al.*, 1997; Olgart *et al.*, 2000; Cao y Eldred, 2001) la mayor parte de los estudios sobre neurotransmisión mediada por NO en el SNC consideran su papel como mensajero retrógrado. En esta situación los somas nitrérgicos postsinápticos ("esféricos" de 10 a 100 μm de diámetro) son considerados como fuentes y las terminales nerviosas presinápticas ("cilíndricas" de 0,1 a 5 μm diámetro) como blancos del NO (Sanchez y Leonard, 1994; Schuman y Madison, 1994; Arancio *et al.*, 1996; Tao y Poo, 2001; Bon y Garthwaite, 2001) aunque el NO podría actuar tanto pre como post-sinápticamente (Garthwaite, 2008). En dicho escenario tanto la relación entre el tamaño de la fuente postsináptica y el blanco presináptico como la distancia entre ellos garantiza que varias

estructuras blanco subcelulares y/o celulares estén incluidas en el volumen o "dominio" de influencia del NO, tal como se esperaría en la VT (Bredt y Snyder, 1992; Zoli *et al.*, 1998). Además, muchas veces ese modelo de estudio considera la formación de NO como consecuencia de la acción glutamatérgica sobre receptores NMDA que están unidos a la NOSn postsináptica a través de la PSD95 lo que favorece la activación de la NOSn por el influjo de calcio acontecido a través los receptores NMDA (Christopherson *et al.*, 1999, Ishii *et al.*, 2006). Por el contrario la fisiología de la liberación del NO desde la presinápsis ha sido menos investigada en el SNC habiéndose reportado estudios en mamíferos (Mariño y Cudeiro, 2003; Okada *et al.*, 2004; West y Grace, 2004) e invertebrados (Park *et al.*, 1998). En cuanto al papel del NO como neuromodulador anterógrado en motoneuronas existen además de nuestros antecedentes en el NMT (Abudara *et al.*, 2002) estudios en motoneuronas de hipogloso (Montero *et al.*, 2008).

Como se ha mencionado la distancia a la cual el NO difunde en una concentración eficaz, depende del tamaño de los elementos neurales que lo producen y de la cantidad de NO producida, así como también de la densidad o distribución espacial de las estructuras que lo producen (Lancaster, 1994; 1997; Wood y Garthwaite, 1994; Philippides *et al.*, 2000; 2005). Dado el pequeño tamaño de las fibras NOSn positivas premotoras en el NMT (0,6 a 1,6 μm de diámetro) cada fibra o terminal individual produciría menos NO que un soma nitrérgico y en consecuencia, la difusión efectiva de NO desde estas terminales o fibras sería menor que la asociada a cuerpos celulares. En vistas de que las motoneuronas trigeminales contienen GCs (Furuyama *et al.*, 1993)

y que su excitabilidad es modulada por la aplicación exógena de NO a través de la activación de la GCs (Abudara *et al.*, 2002) es posible hipotetizar que el NO producido endogenamente por las fibras premotoras delgadas fuera un mensajero para las motoneuronas trigeminales postsinápticas. Se desconoce si una baja relación tamaño fuente/tamaño blanco provee de propiedades peculiares a la señalización por NO en el NMT. Es posible que la cantidad de NO sintetizada por cada fibra presináptica individual en el núcleo sea solo suficiente para actuar en aquellos elementos neurales postsinápticos más próximos a ellas y que según nuestros hallazgos corresponden a procesos dendríticos. Es más si aplicamos a nuestro preparado biológico el modelo propuesto por Philippides *et al.*, (2005), la predicción sería que una única fibra de entre 0,6 y 1,6 μm de diámetro podría alcanzar una producción máxima de 10 nM y 50 nM respectivamente y la concentración de NO podría declinar en un 50% de su máximo (5 nM y 25 nM respectivamente) a 4 μm y 6 μm desde la superficie de la fibra, lo cual si bien podría incluir en su dominio a estructuras subcelulares, no llegaría a cubrir el diámetro de las motoneuronas trigeminales (de 20 a 60 μm aproximadamente). Sin embargo, si varias fibras delgadas NOSn positivas se activaran simultáneamente podrían cooperar entre sí produciéndose mayores cantidades de NO para alcanzar una mayor distancia de difusión biológicamente efectiva. En estas circunstancias si varias motoneuronas trigeminales postsinápticas se incluyeran en el dominio de influencia del NO se modularían simultáneamente a pesar de que las fuentes nitrérgicas premotoras fueran fibras delgadas dispuestas en forma dispersa cuyos somas de origen no se ubican en la misma rodaja que el NMT.

3.- HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO Y PREGUNTA QUE TRATA DE RESPONDER EL TRABAJO DE TESIS

Debido a que el volumen de difusión del NO depende del tamaño, de la forma y de la distribución de sus fuentes de producción, y dado a que éstas en el NMT son fibras muy finas dispuestas en forma plexiforme laxa, se postula aquí que en circunstancias fisiológicas, la activación simultánea de un grupo de fibras nitrérgicas premotoras delgadas, podría generar una cantidad suficiente de NO endógeno, capaz de difundir en concentraciones biológicamente efectivas para de esa forma sincronizar y/o coordinar acciones en un conjunto elementos neurales dentro del NMT del cobayo.

La hipótesis general de trabajo aquí propuesta es que el NO endógeno es liberado ante la depolarización de las fibras nitrérgicas delgadas (únicas estructuras neurales generadoras de NO descritas en el NMT) según la siguiente secuencia de eventos: durante la actividad neural la depolarización de las fibras abriría canales de calcio voltaje dependientes ubicados en las terminales presinápticas (Huston *et al.*, 1995; Dobrev *et al.*, 1997, Photowala *et al.*, 2005) lo que resultaría en un influjo del catión y en un aumento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), con la consecuente activación de la NOSn calcio-calmodulina modulada (Bredt y Snyder, 1990). Desde las terminales premotoras, el NO producido difundiría en forma multidireccional dentro del núcleo para afectar, a través de la vía dependiente de la GCs y de otros diversos mecanismos de transducción alternativos, la actividad de más de una estructura neural celular (motoneuronas trigeminales, neuronas pre-

motoras) o subcelular (dendritas motoras, terminales pre-motoras) presentes en su dominio de influencia, sin necesidad de un contacto anatómico estrecho (ej. sináptico; nm) entre las estructuras fuente y las estructuras que contienen blancos moleculares para el NO. El desarrollo de esta secuencia de eventos, de acuerdo a nuestros antecedentes (Abudara *et al.*, 2002), resultaría en la modulación de la actividad eléctrica de las motoneuronas trigeminales y/o de la eficacia de sus entradas sinápticas.

Para que ocurra la secuencia de eventos descritos en la hipótesis de trabajo, se requiere que las estructuras blanco del NO en el NMT:

- (a) se encuentren incluidas en su volumen o espacio de difusión;
- (b) contengan al menos una de las múltiples potenciales moléculas "receptoras" para el NO, en tal sentido se ha reportado la presencia de GCs en las motoneuronas trigeminales (Furuyama *et al.*, 1993; Southam y Garthwaite, 1993) y
- (c) que la concentración de NO que alcance a los potenciales blancos dentro de dicho volumen sea biológicamente efectiva y por tanto suficiente para activar a la GCs (en acuerdo con (b)).

De esta manera el NO endógeno actuaría como un neuromodulador anterógrado entre un grupo de fibras premotoras que expresan la NOSn (productoras de NO) y las motoneuronas post-sinápticas que no expresan la

NOSn (no productoras de NO) pero que expresan la GCs (principal blanco molecular del NO).

Se desconoce si en el NMT, la secuencia de eventos de la hipótesis planteada se genera ante la depolarización de múltiples fibras y si, en el caso que así sea, el NO endógeno liberado desde dichas fibras nitrérgicas ingresa en concentraciones biológicamente efectivas a las motoneuronas trigeminales, blancos post-sinápticos propuestos para el NO. Esta es la pregunta base que trata de responder este trabajo de tesis.

4.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1.- Objetivo general

Demostrar que, en el NMT del cobayo, el NO endógeno producido en las fibras nitrérgicas premotoras difunde, **(a)** *incluyendo* a las motoneuronas trigeminales en su *dominio de influencia*, **(b)** *ingresando* a ellas en concentraciones *biológicamente efectivas* y **(c)** *extendiéndose* en un *volumen de difusión modulable* por diversos factores.

4.2.- Objetivos específicos

1.- *Indagar la existencia de producción de **NO endógeno** en situación **basal**.* Para cumplir con este objetivo se visualizará y analizará la producción y la difusión de NO endógeno en situación basal en el núcleo motor del trigémino.

2.- *Demostar que ante la **depolarización de múltiples fibras nitrérgicas delgadas** el **NO endógeno** liberado incluye a las **motoneuronas trigeminales** en su **dominio de influencia**.* Para cumplir con este objetivo, se visualizará y analizará la producción y difusión de NO endógeno en el NMT por la activación de las NOSn inducida ante estímulos depolarizantes sobre las fuentes nitrérgicas.

3.- Evidenciar que el **NO endógeno** al difundir **ingresa a las motoneuronas trigeminales en concentraciones biológicamente efectivas** que permitan activar a la **GCs** presente en ellas. En este objetivo se considera a la GCs de las motoneuronas trigeminales como blanco molecular de la acción del NO (sin descartar la existencia de otras posibles moléculas blanco).

4.- Identificar los **mecanismos que subyacen y modulan a la transmisión nitrérgica en el NMT**. Se intentará determinar la secuencia de eventos subyacente a la generación, difusión y acción celular de NO una vez producida la depolarización neural.

5.- ESTRATEGIA METODOLÓGICA DESARROLLADA

5.1.- Puntualizaciones

Para una mejor comprensión de la estrategia desarrollada es necesario realizar las siguientes puntualizaciones:

1.- El preparado biológico seleccionado consiste en rodajas coronales de tronco encefálico de cobayo que contienen el NMT. Esta preparación de tejido vivo preserva los circuitos básicos entre las neuronas y esto es fundamental para estudiar el dominio de difusión del NO en el NMT. Por otra parte, esta preparación *in vitro* permite manipular experimentalmente la composición del medio extracelular y facilita la administración de sustancias y la localización e identificación de las estructuras a estudiar.

2.- Se asume como única fuente neural de NO dentro del núcleo, a las fibras nitrérgicas descritas por nuestro equipo anteriormente (Abudara *et al.*, 2002). Las motoneuronas trigeminales carecen de la maquinaria sintética para producir NO, son NADPH-diaforasa negativas y NOSn negativas. Igualmente no se descarta a priori la formación de NO en el NMT desde otras fuentes no neurales y/o ante la activación de otras isoenzimas de la NOS.

3.- Los somas de origen de las fibras nitrérgicas no se localizan en la misma rodaja que contiene al NMT. Esto impide la estimulación somática para lograr la depolarización de las fibras NOSn positivas, pero favorece el estudio discriminado de la difusión del NO desde las mismas sin la influencia de la producción somática de NO.

4.- Por otra parte, en este preparado biológico la estimulación selectiva de las fibras nitrérgicas es sumamente dificultosa desde el punto de vista técnico por su pequeño diámetro (0,5-1,5 μm) y por no estar organizadas en haces sino en forma de plexo laxo. Debido a estas razones se utilizó la administración de solución con alta concentración de K^+ (alto- $[\text{K}^+]_o$) para lograr la depolarización simultánea de múltiples fibras nitrérgicas, lo cual además permite analizar la posible liberación cooperativa del mensajero simultáneamente desde varias fibras.

5.- Las motoneuronas trigeminales fueron consideradas como el blanco neural postsináptico propuesto para el NO en nuestro modelo de estudio, esto no quiere decir que se descarte o desconozca la existencia de otros potenciales blancos en el NMT. En este sentido se consideró a la GCs de las motoneuronas trigeminales como el principal blanco molecular de la acción del NO (sin descartar la existencia de otras posibles moléculas blanco incluso en las propias motoneuronas).

5.2. - Estrategia desarrollada

Para cumplir con los objetivos específicos planteados se desarrolló la siguiente estrategia (se detallarán posteriormente los materiales y métodos utilizados):

1.- Para *indagar la existencia de producción de NO endógeno en situación basal (Objetivo específico 1)*, se visualizó y analizó la producción y la difusión de NO endógeno basal mediante (1) la identificación de las motoneuronas trigeminales en rodajas de tronco encefálico de cobayo, en tejido vivo no fijado, por marcado retrógrado con un fluoróforo y la posterior observación por microscopía de epifluorescencia y/o confocal y (2) la monitorización indirecta de NO intracelular a través del marcador 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) por microscopía de epifluorescencia y/o confocal. A fin de robustecer las conclusiones, se realizaron controles de la técnica de monitorización mediante la administración de NO exógeno (dadores de NO) y de un inhibidor de la NOS los que, respectivamente, imitarían o bloquearían el aumento del contenido de NO en las motoneuronas.

2.- Para *demostrar que ante la depolarización de múltiples fibras nitrérgicas delgadas el NO endógeno liberado incluye a las motoneuronas trigeminales en su dominio de influencia*. Para *determinar si ante la depolarización de múltiples fibras nitrérgicas delgadas el NO endógeno liberado*

incluye a las motoneuronas trigeminales en su dominio de influencia (Objetivo específico 2), se visualizó y analizó la producción y la difusión de NO endógeno en el NMT ante la activación de la NOSn por estímulos depolarizantes mediante las mismas técnicas empleada para cumplir el objetivo 1. En experimentos dinámicos y estáticos, con tejido vivo y fijado respectivamente, se buscó especialmente la presencia de NO en las motoneuronas trigeminales (NOSn negativas) ante la depolarización de estructuras productoras de NO mediante perfusión con solución conteniendo alto-[K⁺]_o.

*3.- Para evidenciar que el NO endógeno al difundir ingresa a las motoneuronas trigeminales en concentraciones biológicamente efectivas que permitan activar a la GCs presente en ellas (Objetivo específico 3), se determinó si la depolarización induce un aumento del GMPc intracelular en dichas células mediante estudios inmunohistoquímicos y microscopía confocal (De Vente *et al.*, 1998). A fin de robustecer las conclusiones, se realizaron controles de la técnica de detección de GMPc mediante la administración de NO exógeno (dadores de NO). Para demostrar si las variaciones de los niveles de GMPc corresponden a variaciones en la producción de NO endógeno se utilizó un inhibidor específico de la GCs (la cual es activable por NO). Se exploró si el incremento en la concentración de GMPc en las motoneuronas era bloqueado por secuestradores de NO (que impiden su difusión) e inhibidores competitivos de la NOSn (que impiden la producción de NO desde las fibras finas que contienen la NOSn).*

4.- Para *identificar los mecanismos que subyacen y modulan a la transmisión nitrérgica en el NMT (Objetivo específico 4)*, se utilizaron las mismas técnicas empleadas para cumplir los objetivos 2 y 3. Se investigó si existen variaciones en el perfil de producción y difusión de NO endógeno (inducido por la depolarización), en presencia de inhibidores de la NOSn o secuestradores de NO, y ante modificaciones en la disponibilidad de Ca²⁺ extra o intracelular. Se buscó especialmente en cada caso, cambios en el patrón témporo-espacial de difusión y en el dominio de influencia del NO.

Para *procesar la información obtenida en las imágenes de las microfotografías digitales capturadas* se diseñó un software adaptado especialmente para nuestros experimentos dinámicos, en colaboración con la Sección Biomatemáticas de la Facultad de Ciencias. Se cuantificaron algunos parámetros de la fluorescencia: variación relativa de la intensidad de fluorescencia para la detección de NO y/o GMPc, tiempo necesario para alcanzar el pico de fluorescencia, etc.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales que se detallan a lo largo de esta tesis cumplen con los requerimientos determinados para el trabajo experimental con vertebrados por la "Comisión Honoraria de Experimentación Animal - CSIC, Universidad de la República" (CHEA). La tesista posee al día la acreditación expedida por dicha Comisión (categoría B, renovada en el año 2009). El protocolo experimental desarrollado fue aprobado por la Comisión de Experimentación Animal (Exp. N° 071140-000951-07) y refrendado por resolución del Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República en sesión ordinaria de fecha 1 de agosto de 2007 (resolución N° 11). Se realizaron los máximos esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

6.1.- Identificación de las motoneuronas trigeminales mediante marcado retrógrado

Los cobayos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg / Kg. peso intraperitoneal). Luego de desinfectar la piel, ésta y el tejido celular subcutáneo que cubre los músculos maseteros fueron rebatidos para inyectar el marcador en dichos músculos mediante la utilización de una jeringa Hamilton; posteriormente la piel fue suturada. Una vez que cesó el efecto anestésico se verificó que los animales ingirieran agua y alimentos en forma normal. Los cobayos permanecieron en recuperación durante un período de 7-

14 días para permitir que el marcador se transportara en forma retrógrada hacia las motoneuronas del NMT ubicado en el tallo cerebral.

El marcador utilizado fue el fluoróforo CM-DiI (Chlormethylbenzamido-1, 1 dioctadecyl-3, 3, 3', 3'- Tetramethylindocarbocyanina, Molecular Probes – Invitrogen, Figura 13A) y fue administrado al 0,08 % en etanol 95 % en un volumen total de 12 μ l repartido en varias inyecciones. El CM-DiI es un derivado análogo del DiI, algo más soluble en agua que éste último, pero al igual que otras carbocianinas de cadena larga es fuertemente fluorescente y bastante fotoestable cuando se incorpora en las membranas celulares. Este tipo de fluoróforo de muy baja toxicidad celular, ya que no afecta en forma apreciable la viabilidad celular, el desarrollo u otras propiedades fisiológicas básicas, es utilizado en forma exitosa como marcador neuronal retrógrado y/o anterógrado en preparados de tejido vivo (Honig y Hume, 1986; 1989a; 1989b), en marcado de duración prolongada en cultivos celulares (Ragnarson *et al.*, 1992). A diferencia de otros marcadores es bien retenido por las células luego de los pasos de fijación y permeabilización utilizados para técnicas de inmunohistoquímica (Matsubayashi *et al.*, 2008).

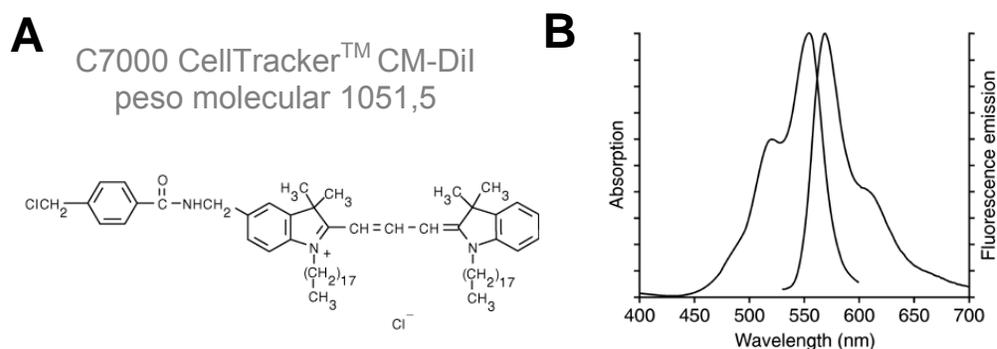


Figura 13: Características del marcador retrógrado (A) Estructura de la molécula de CM-DiI. **(B)** Espectro de absorción y emisión de fluorescencia del DiI₁₈(3) ("DiI") ligado a la bicapa fosfolipídica de las membranas celulares. (Tomado de Molecular Probes, Inc., 2005).

El espectro de absorción y de emisión de fluorescencia del CM-DiI determina que su visualización por microscopia sea compatible con filtros ópticos para rodamina (Figura 13B). La absorción máxima se produce a 553 nm y la emisión máxima¹⁹ a 570 nm (Molecular Probes, Inc., 2005). El mecanismo subyacente al transporte retrógrado es la incorporación pasiva del marcador (Köbbert *et al.*, 2000) ya que las membranas celulares proveen de un conducto conveniente para cargar el marcador lipofílico. Este se inserta en la capa externa de la membrana celular de los axones de las motoneuronas trigeminales que inervan los músculos maseteros que fueron inyectados y como parte del reciclaje lipídico los fragmentos de membrana celular son empaquetados en vesículas y son transportados en la célula llevando consigo las moléculas del marcador; además la difusión lateral dentro la membrana puede servir para lograr teñir la célula entera aún cuando el colorante sea aplicado localmente. Este mecanismo de captación es muy eficiente por lo que el fluoróforo puede en general utilizarse a bajas concentraciones. La fluorescencia observada generalmente es de tal intensidad que puede dificultar distinguir en detalle los procesos de menor tamaño. El "fotobleaching" no sería un problema mayor para la mayoría de los marcadores del tipo de las carbocianinas, así como tampoco son problemáticos en cuanto a su posible difusión o fuga al exterior de las células (Köbbert *et al.*, 2000). El marcador habitualmente no se transfiere desde una célula marcada a una no marcada a menos que la membrana de la célula no marcada se dañe (Hofmann y Bleckmann, 1999).

¹⁹ valores determinados en metanol y que son similares a los hallados en la membrana celular

6.2.- Preparación de rodajas de tallo cerebral de cobayo

Se emplearon cobayos de 180 - 220 g de peso (15 a 21 días de vida) previamente inyectados (7-14 días antes) con el marcador retrógrado CM-DiI. Los animales fueron decapitados y se obtuvieron rodajas coronales de tejido nervioso vivo tal como se describe en Abudara *et al.* (2002). Se seccionó la piel que recubre el cráneo, se removieron los músculos de la nuca y se retiraron los huesos occipitales y parietales, para posteriormente aspirar el cerebelo dejando expuesto el tronco encefálico. Rápidamente se seccionó el tronco encefálico rostralmente a los colículos superiores y aproximadamente 0,5 cm caudal a la sección anterior. El trozo de tronco cerebral así aislado fue sumergido en solución cerebroespinal artificial (CE-A, ver composición en numeral 6.9.-), pH 7,4, equilibrada con carbógeno (O₂ 95% / CO₂ 5%) y a 5 °C. El bloque de tejido fue adherido con cianocrilato a la plataforma de la cámara de un vibrátomo (Campden Instruments) y fue seccionado en rodajas de 200 µm siguiendo su eje coronal. Las 2 a 6 rebanadas rostrales a la aparición de las ramas descendentes del nervio facial, contenían el núcleo motor del trigémino (atlas estereotáxico de referencia Rapisarda y Bacchelli, 1977) y fueron las que se seleccionaron para los experimentos. Las rodajas que contienen el NMT fueron incubadas dentro de una caja de Petri, cada una en una camarita con fondo de red de nylon, en la misma solución CE-A equilibrada con carbógeno a temperatura ambiente por un período de estabilización de por lo menos 30 minutos.

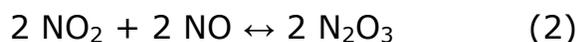
6.3.- Incubación y carga de las rodajas de tronco encefálico con DAF-2 DA

Para monitorizar la presencia de NO intracelular en las rodajas de tejido vivo se utilizó un indicador indirecto de NO membrana permeante: 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA, Calbiochem). Dado que la exposición a la luz produce un descenso en la fluorescencia en muestras de tejido cargadas con DAF-2 DA (Räthel *et al.*, 2003) es estrictamente necesario trabajar con este compuesto en un cuarto oscuro. Todas las etapas descritas de aquí en adelante se desarrollaron cumpliendo ese requerimiento.

Las rodajas de tejido vivo de tronco encefálico (200 μm de espesor) que contenían el NMT fueron sumergidas en 5 ml de solución 5 μM de DAF-2 DA en CE-A por 30 minutos a temperatura ambiente. Para minimizar los errores de autofluorescencia (Leikert *et al.*, 2001) se utilizaron concentraciones de DAF-2 DA 50% menores a las reportadas previamente por otros autores en rodajas de tejido nervioso (Kojima *et al.*, 1998b; 2001; Okada *et al.*, 2004). Posteriormente al período de incubación, las rodajas fueron lavadas 2 veces en solución CE-A fresca. Luego fueron colocadas de a una en la cámara donde se llevaron a cabo las maniobras experimentales.

El DAF-2 DA es un compuesto no fluorescente que permea la membrana celular y dentro de la célula es hidrolizado por esterasas citoplasmáticas a DAF-2, compuesto que permanece dentro de la célula por ser incapaz de atravesar la membrana celular (Figura 14).

intermedios requiriéndose la formación de N_2O_3 . El N_2O_3 es generado dentro de la célula según las siguientes reacciones:



De acuerdo con este esquema de reacciones la formación de N_2O_3 necesita de dos moléculas de NO, por lo que la relación estequiométrica DAF-2 y NO es de 1:2. La formación de NO_2 , reacción (1), en soluciones biológicas es una reacción lenta (Beckman y Koppenol, 1996) lo cual la convierte en un paso limitante en la velocidad de detección de la técnica. El N_2O_3 reacciona en forma irreversible con DAF-2 obteniéndose DAF-2T (Kojima *et al.*, 1998a). La secuencia detallada de reacciones necesarias para la formación del DAF-2T se muestra en la Figura 15 (Nakatsubo *et al.*, 1998), mientras que la Figura 16 esquematiza resumidamente los eventos que acontecen desde que se carga el tejido con DAF-2 DA hasta que se detecta fluorescencia para DAF-2T en la célula. El DAF-2T fluoresce intensamente en el espectro del verde, siendo máxima su excitación a 495 nm y máxima su emisión a 515 nm (Figura 17) por lo cual su visualización por microscopía es compatible con filtros ópticos para fluoresceína.

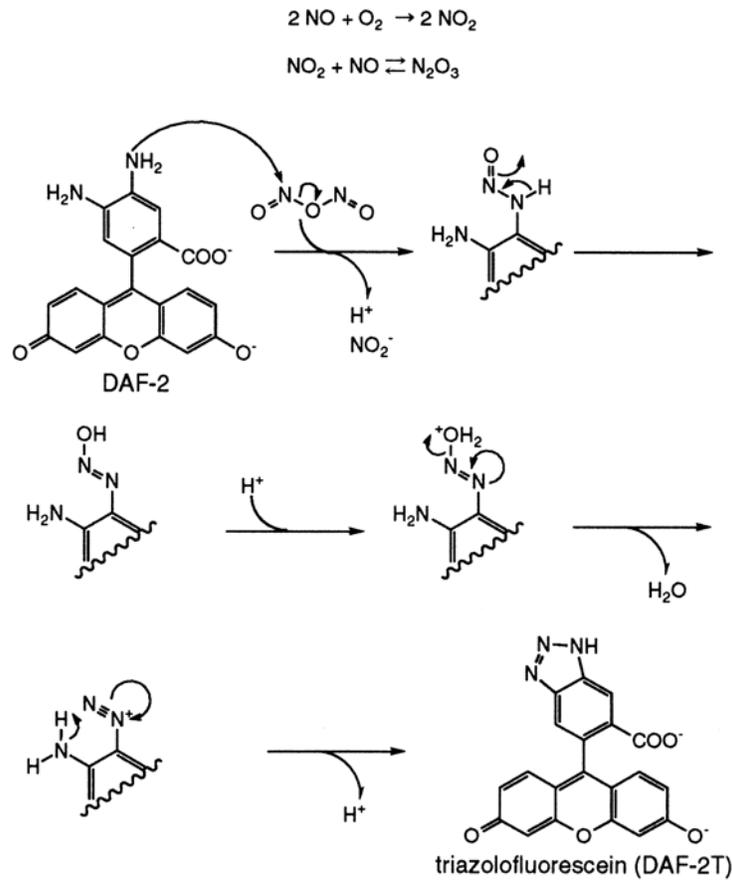


Figura 15: Mecanismo propuesto para la detección de NO por el DAF-2 en presencia de O₂. (Extraído de Nakatsubo *et al.*, 1998)

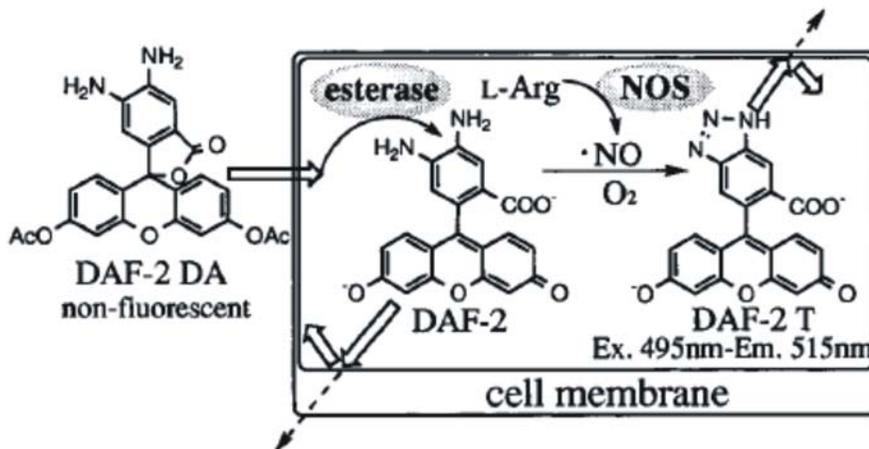


Figura 16: Representación esquemática de los sucesos que acontecen una vez que se incuba el tejido vivo con el marcador DAF-2 DA. Luego de permear la membrana celular es hidrolizado a DAF-2, el cual es retenido en la célula y posteriormente en presencia de NO y O₂ forma DAF-2T (extraído de Kojima *et al.*, 1998a).

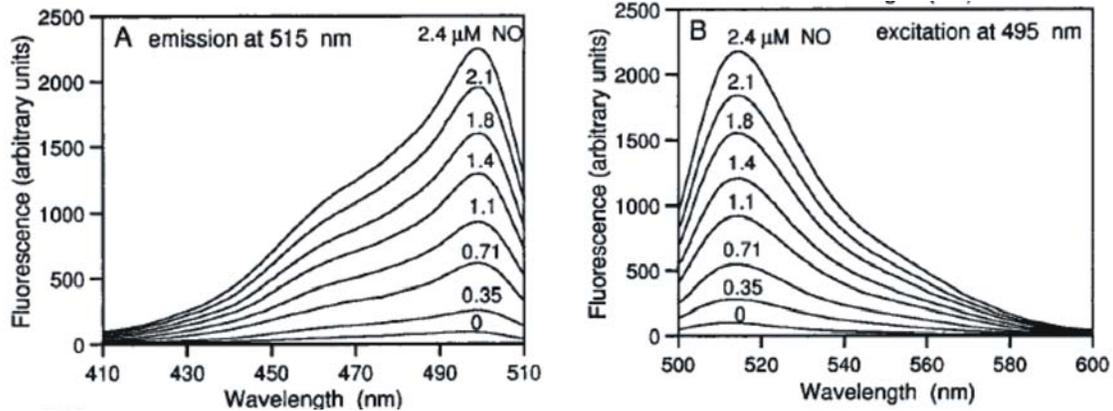


Figura 17: Espectros de excitación (A) y emisión (B) para DAF-2T a 37 °C en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) con valores de concentración de NO que van desde 0 a 2,4 μM. El NO fue adicionado bajo condiciones aeróbicas a una solución 10 μM de DAF-2 (extraído de Kojima *et al.*, 1998a).

La producción del fluoróforo DAF-2T aumenta como consecuencia de los aumentos de la concentración de NO y por tanto aumenta la detección de la señal fluorescente. La reacción del DAF-2 y el NO es completamente independiente de los niveles de Ca^{2+} and Mg^{2+} a concentraciones fisiológicas (Suzuki *et al.*, 2002).

Sin embargo es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones y controles antes de interpretar los datos obtenidos mediante esta técnica, ya que distintos factores podrían incidir en la intensidad de la señal fluorescente mencionada (von Bohlen und Halbach, 2003; Wardman, 2007; Hall y Garthwaite, 2009). A modo de ejemplo los ácidos ascórbico y dehidroascórbico pueden reaccionar con DAF-2 generando una señal fluorescente similar a la del DAF-2T (Zhang *et al.*, 2002). Por otra parte, en presencia de NO la fluorescencia del DAF-2T puede aumentar por exposición intensa a la luz (Broillet *et al.*, 2001), por iluminación ultravioleta (Rodríguez *et al.*, 2005) o por la oxidación del DAF-2 (Jourd'heuil, 2002; Espey *et al.*, 2002; Balcerczyk

et al., 2005). Al igual que Brown *et al.* (1999, 2000) para minimizar errores de autofluorescencia se utilizó una concentración de DAF-2 DA menor que las reportadas en otros preparados de rodajas cerebrales (Kojima *et al.*, 1998b; 2001; Okada *et al.*, 2004). Para corroborar si en este modelo los incrementos en la fluorescencia para DAF-2 T corresponden efectivamente a incrementos en el contenido intracelular de NO se realizaron experimentos de administración del dador DETA/NO (el cual libera NO espontáneamente en solución) y de bloqueo con el inhibidor de la NOS N⁶-Nitro-L-arginine-methyl ester.HCl (L-NAME) en las rodajas cargadas con DAF-2 DA. El análisis en profundidad de estos controles experimentales se realizará en el numeral 7.2.3.- de Resultados (Figuras 26 y 27). En nuestra cámara de perfusión una solución 2 mM de DETA/NO libera espontáneamente NO con un flujo de 1.54 μM / min determinado por espectrofotometría (Abudara *et al.*, 2002).

6.5.- Microscopía de epifluorescencia, sistema de captación y procesamiento de imágenes

La combinación de fluoróforos con espectros de emisión diferentes es una herramienta muy útil junto con la microscopía para permitir establecer ubicaciones celulares mediante marcado retrógrado así como también para determinar la existencia de colocalización de distintas sustancias, marcadores, neurotransmisores, enzimas, etc., (Köbbert *et al.*, 2000). En este estudio fue usada para combinar la identificación de las motoneuronas trigeminales y la

detección de las variaciones de la concentración de NO en ellas. Las variaciones del contenido de NO dentro de las motoneuronas trigeminales identificadas con CM-DiI se monitorearon indirectamente por medición de la intensidad de la señal para DAF-2T tanto en experimentos dinámicos como estáticos. En los experimentos dinámicos la rodaja de tejido vivo cargada con DAF-2 DA fue mantenida en la superficie inferior de un cubreobjetos que a su vez constituye la parte superior de una cámara de perfusión que fue montada en la platina de un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot). Cada rodaja se perfunde continuamente (1-1,5 ml/min) desde su cara inferior con CE-A equilibrada con una mezcla de 95% O₂ - 5% CO₂.

En el microscopio de epifluorescencia se utilizaron filtros ópticos adecuados a los espectros de excitación y emisión propios de cada fluoróforo. El filtro para fluoresceína (filtro de excitación 450 - 490 nm, espejo dicroico 510 y filtro de barrera 520 nm) fue utilizado en el caso del DAF-2T y el filtro para rodamina (filtro de excitación 510 - 560 nm espejo dicroico 580 y filtro de barrera 590 nm) en el caso del CM-DiI. Para identificar a las motoneuronas marcadas retrógradamente las rodajas fueron iluminadas a través del filtro para rodamina y a posteriori el mismo campo de observación se iluminó a través de un filtro para fluoresceína para detectar la señal DAF-2T. Se utilizaron objetivos de 10x, 20x y 40x. Las microfotografías se capturaron mediante una cámara digital (Kodak DC 290) conectada al microscopio. La cámara fue conectada a su vez a una computadora. Para el procesamiento de la fluorescencia para DAF-2T las imágenes fueron captadas cada 30 segundos con un tiempo de exposición de 0,5 segundos, manteniendo siempre los

mismos parámetros en el microscopio y la cámara, y fueron almacenadas utilizando un software adecuado para procesamiento de imágenes (Adobe Photoshop).

Los experimentos estáticos se realizaron en cámaras de incubación y las mediciones de la señal para DAF-2T correspondientes a cada maniobra experimental se realizaron en rodajas fijadas. Las rodajas fueron fijadas toda la noche a 4°C en formaldehído al 4 % (pH 7,4), lavadas en buffer fosfato (PBS) 0,1 M (pH 7,4) y montadas en glicerol para su observación en un microscopio confocal.

Un aspecto a considerar durante la visualización de las señales fluorescentes de DAF-2T y CM-DiI es la posibilidad de la ocurrencia del fenómeno de "bleedthrough" originado en el solapamiento de sus espectros de absorción y emisión (DAF-2T 495 nm - 515 nm y CM-DiI 553 nm - 570 nm). La figura 18 ejemplifica el fundamento de este fenómeno para otros dos fluoróforos de máximos de absorción y emisión similares a los usados en esta tesis. En este sentido los resultados obtenidos con respecto a los patrones de distribución de la fluorescencia para DAF-2T en el NMT en situación basal y su modificación con el inhibidor L-NAME van en contra de la posibilidad de que la fluorescencia detectada para CM-DiI sea consecuencia de la presencia de señal DAF-2T (ver numeral 7.1.3.- y Figura 22 de resultados).

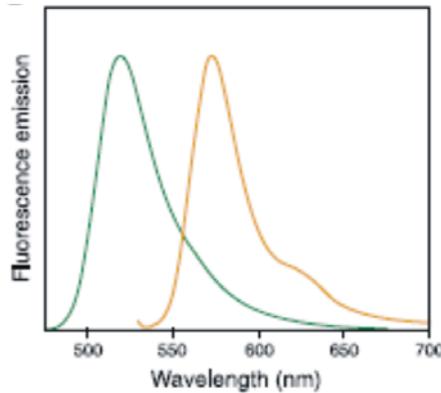


Figura18. Ejemplo de solapamiento del espectro de dos fluoróforos e influencia del mismo en el fenómeno de “bleedthrough” Espectro de emisión normalizado para los fluoróforos Alexa Fluor 488 (ex 495 – em 519) y Alexa Fluor 546 (ex 556 - em 573). Aunque el pico de emisión de estos fluoróforos se encuentra en colores que son fácilmente distinguibles por el ojo humano, existe un solapamiento moderado del espectro que indica una emisión significativa de Alexa Fluor 488 coincidente con el valor del pico de emisión de Alexa Fluor 546. Este “bleedthrough” de la señal puede dificultar la separación de la señal de los fluoróforos en las situaciones en que la intensidad de la señal para Alexa Fluor 488 sea mucho mayor que la intensidad de la señal para Alexa Fluor 546 (Tomado de Haugland, 2002)

6.6.- Análisis computacional de las variaciones de fluorescencia para DAF-2T en experimentos dinámicos

En las imágenes almacenadas de los experimentos dinámicos se cuantificó la fluorescencia relativa en función del tiempo durante las distintas maniobras experimentales, tomando como referente la situación inicial (la situación inicial de cada preparado será su propio control). Para ello se utilizó un programa especialmente diseñado en colaboración con la Sección Biomatemáticas del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias, tomando como base el programa de análisis Matlab.

Las fotografías capturadas con señal fluorescente para CM-DiI y para DAF-2T para cada experimento dinámico fueron procesadas según los siguientes pasos. Inicialmente fueron convertidas a escala de grises para

eliminar la información referente a los tonos y la saturación y conservar la referente a la luminancia. Con la finalidad de disminuir el costo del procesamiento computacional la resolución de las imágenes en escala de grises fue disminuida en un 45% usando el método de interpolación del vecino más próximo. Para eliminar ruidos de alta frecuencia las imágenes fueron tratadas con un filtro pasa bajos gaussiano bidimensional discreto.

Luego de este proceso inicial aplicado a todas las fotografías, las imágenes obtenidas con el filtro para rodamina de cada campo se procesaron a fin de obtener las áreas correspondientes a las motoneuronas marcadas con CM-DiI. Esta segmentación de la imagen que permitió distinguir entre aquellas estructuras correspondientes a motoneuronas y el resto del tejido fue realizada ubicando las regiones localmente conectadas cuyos valores de luminancia se encontraron por encima de un cierto umbral. Por esta operación las imágenes de intensidad de luminancia se transformaron en imágenes binarias blancas (motoneuronas) y negras (no motoneuronas) donde pueden identificarse regiones diferentes que posteriormente fueron sometidas a un proceso de selección manual para eliminar detecciones erróneas. Es de destacar que cada área detectada como CM-DiI positiva puede llegar a corresponder a una o más motoneuronas debido a que el solapamiento de las neuronas marcadas no puede ser resuelto por esta técnica.

Una vez que se separaron las áreas correspondientes a las estructuras motoneuronales, dichas áreas se utilizaron para seleccionar las regiones a ser procesadas en la secuencia de microfotografías adquiridas con el filtro de fluoresceína. Para hacer esto, cada imagen de dicha secuencia fue multiplicada

por la imagen binaria obtenida correspondiente a esa misma región obteniéndose así los valores de intensidad de luminancia para todas las áreas seleccionadas en cada una de las microfotografías. La suma de todos los valores de intensidad de cada región fueron divididos por el área de la región con la finalidad de obtener un valor de intensidad normalizado (o luminancia media) en cada área de cada fotografía de la secuencia. Luego de procesar toda la secuencia de imágenes se obtuvo como resultante la serie temporal del perfil de valores de fluorescencia por unidad de área para cada región del campo de la rodaja observado durante el experimento. Luego del procesamiento de todas las secuencias de imágenes se obtienen las series temporales de variación de fluorescencia para cada área determinada en cada campo observado durante cada experimento. Un procedimiento similar se llevó a cabo para normalizar la intensidad de fluorescencia del background: la luminancia de la región que no resultó marcada con CM-DiI fue integrada y dividida por su área. Al valor de intensidad de fluorescencia para cada región de cada fotografía de la secuencia se le restó dicho valor del background o autofluorescencia con el fin de eliminar cambios globales no específicos a lo largo de la serie fotográfica. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia en cada región-motoneurona (F) fueron divididos por el valor inicial de fluorescencia de esa región en el tiempo = 0 (F_0) obteniéndose el valor del cambio de fluorescencia para DAF-2T relativo al inicio del experimento (situación control). El cociente [F en cada motoneurona en cada fotografía / F_0 para dicha motoneurona] se graficó en función del tiempo en minutos.

A modo de resumen, como resultado de este procesamiento se obtienen para cada experimento N series temporales donde N es el número de distintas regiones identificadas y cada serie comienza desde 1 que es el valor de referencia inicial. Los valores máximos de intensidad de fluorescencia que se graficaron en los histogramas de frecuencias fueron obtenidos de estas series temporales. Para el análisis estadístico los valores de fluorescencia correspondientes a las 10 primeras fotografías fueron descartados para evitar errores introducidos por picos espurios que pudieran ocurrir previamente al arribo de la solución depolarizante a la rodaja. Solamente fueron considerados como picos o máximos verdaderos aquellos mayores de 5% con respecto al valor basal de fluorescencia. Las pendientes máximas para cada serie se obtuvieron tomando la máxima derivada primera. Del análisis computacional de los datos se generaron para cada experimento breves videos que permitieron visualizar las variaciones de fluorescencia en la secuencia fotográfica de cada campo escogido de manera más ilustrativa.

6.7.- Inmunohistoquímica para detección de GMPc

Después de cada experimento las rodajas fueron fijadas en formaldehído al 4 % (pH 7,4) durante toda la noche a 4°C, luego de lo cual fueron lavadas 3 veces durante 20 minutos en PBS 0,1 M (pH 7,4), y crioprotegidas en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 24 horas. A la solución crioprotectora se agregó azida de sodio al 0,1 %. Posteriormente las rodajas fueron sumergidas en medio protector para congelación (Jung, Leica

microsystems, Nussloch, Germany), congeladas y cortadas en el plano coronal en secciones de 30 μm de espesor utilizando un crióstato. Las secciones sucesivas fueron colocadas en forma seriada en una caja con múltiples divisiones y se lavaron 3 veces durante 20 minutos en PBS. Posteriormente los cortes fueron bloqueados durante 1 hora en albúmina de suero bovino al 2% en PBS. Después de 3 nuevos lavados en PBS las rodajas fueron incubadas a 4°C durante 24 hs con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GMPc (1:1000; #AB303, Chemicon, Temecula, CA) diluido en PBS conteniendo 0,1% Triton X100 (PBST). Al día siguiente los cortes fueron lavados 3 veces en PBST durante 10 minutos y fueron incubados durante 90 minutos con anticuerpo secundario de burro anticonejo conjugado con Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR) diluido en PBST. Varios cortes fueron incubados omitiéndose el anticuerpo primario, el secundario o ambos a fin de obtener controles negativos. Por último los cortes fueron lavados en PBS y montados en glicerol para ser observados por microscopía confocal.

6.8.- Microscopía confocal

Los cortes montados fueron observados con microscopia confocal (FV 300 Olympus, Tokyo, Japan) con objetivos de 20x (para los cortes de experimentos estáticos de determinación de fluorescencia para DAF-2T) o de 40x (para los cortes de determinación de inmunofluorescencia para GMPc). Las imágenes consecutivas a intervalos de 1-5 μm fueron adquiridas en forma secuencial con dos láseres Ar-Ion (488 nm) y He-Ne (543 nm) y utilizando el

programa Olympus Fluoview. Los parámetros del microscopio y la cámara fueron idénticos para aquellos experimentos en los que los datos fueron comparados. La fluorescencia fue evaluada en unidades arbitrarias (AU) utilizando el programa Image J. La intensidad de fluorescencia se calculó como la diferencia ($F - F_0$) entre la fluorescencia (F) de las motoneuronas y la fluorescencia del background (F_0) medido donde no se detectaron células marcadas. El cociente entre $F_{\text{tratamiento}}$ y F_{control} en las motoneuronas fue graficado para cada tratamiento (Dunn *et al.*, 1994). La señal fluorescente para DAF-2T y la inmunofluorescente para para GMPc fueron representadas en los gráficos de experimentos estáticos como el promedio de los cocientes entre los valores de la intensidad de la fluorescencia en las motoneuronas tratadas y en situación control evaluadas en unidades arbitrarias ($F_{\text{tratamiento}}/F_{\text{control}}$). En los gráficos la línea punteada en los gráficos representa el valor correspondiente a la situación control.

Al igual que para el DAF-2T y el CM-DiI, también para el Alexa 488 (ex 495 nm – em 519 nm) y el CM-DiI (exi 553 nm-em 570 nm) se consideró la posibilidad de ocurrencia del fenómeno de “bleedthrough”. La Figura 19 ejemplifica dos casos típicos en los que a pesar de no existir señal para el conjugado Alexa 488 igualmente se detectó la presencia de señal para CM-DiI en varias motoneuronas, por lo que la causa de la señal detectada con CM-DiI no sería la presencia de una señal de fluorescencia intensa para el Alexa 488. También se observaron casos de células que a pesar de desarrollar alta intensidad de la señal para Alexa 488 no mostraron fluorescencia para CM-DiI probablemente por no haber captado el marcador retrógrado.

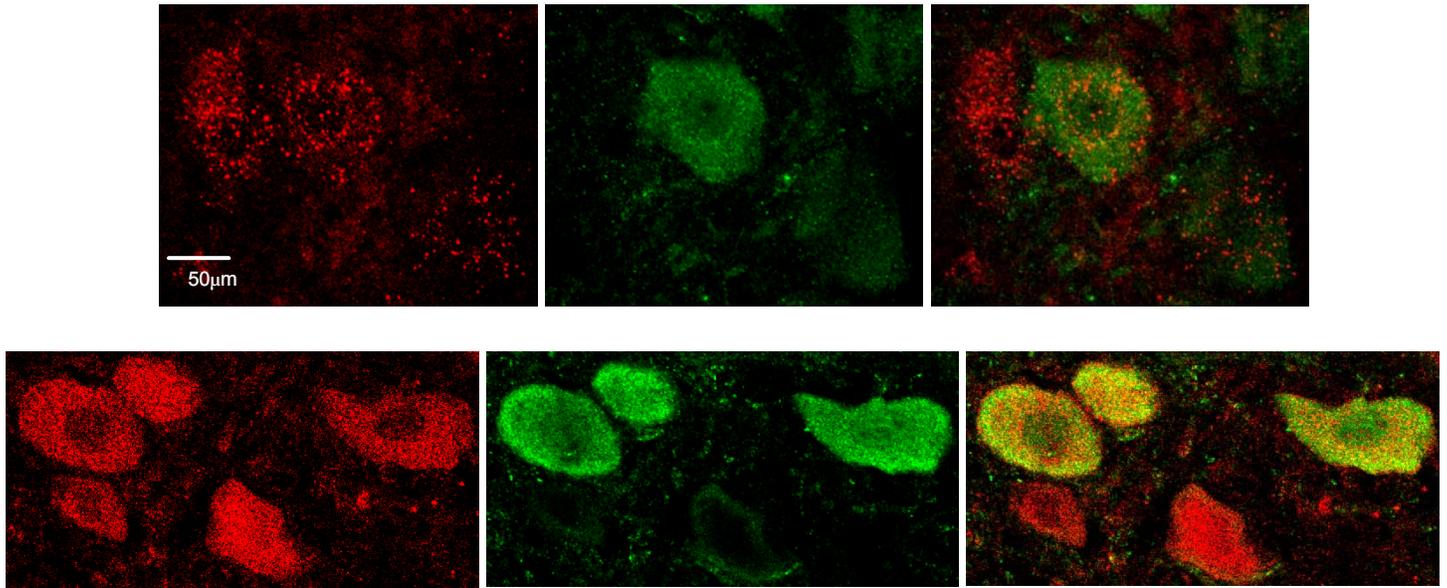


Figura 19: Microfotografías que ilustran la inmunofluorescencia para GMPc a través del conjugado Alexa 488 en motoneuronas trigeminales identificadas con CM-DiI. Los dos tríos de microfotografías presentados corresponden cada uno a un mismo campo del NMT. Cada campo fue observado con dos sets de láseres diferentes: uno para las motoneuronas marcadas con CM-DiI (He-Ne, 543 nm, fotografías a la izquierda, en rojo) y otro para la detección de inmunofluorescencia para GMPc a través del conjugado Alexa 488 (Ar-Ion, 488 nm, fotografías al centro, en verde). Las microfotografías de un mismo campo obtenidas con cada uno de los láseres fueron superpuestas con la finalidad de detectar la colocalización de ambos marcadores y por lo tanto evidenciar la presencia de GMPc dentro de las motoneuronas (fotografías de la derecha). Nótese que existen motoneuronas que no presentaron señal fluorescente para Alexa 488 pero si fueron identificadas como motoneuronas por medio del marcador retrógrado CM-DiI. Barra de calibración: 50 μ m.

6.9.- Tratamiento de las rodajas. Soluciones y drogas

Las rodajas fueron perfundidas (1 – 1,5 ml / min) o incubadas con CE-A equilibrada con 95% O₂ - 5% CO₂ a temperatura ambiente. La composición de la solución CE-A fue (en mM): NaCl, 130; KCl, 3,0; CaCl₂, 2,4; MgSO₄, 1,3; NaHCO₃, 20; KH₂PO₄, 1,25; D-glucosa, 10. En diferentes tratamientos experimentales se modificó la composición de la solución CE-A o se

incorporaron drogas a esta solución. El estímulo depolarizante fue desarrollado mediante la administración de solución CE-A modificada (alto-[K⁺]_o; 13-30 min) en la cual el KCl fue incrementado a 43-60 mM realizando la correspondiente sustitución del NaCl a fin de mantener la osmolaridad de la solución. Las diluciones de las diferentes drogas se prepararon en el día protegiéndolas de la exposición a la luz en el caso de ser fotosensibles.

En los experimentos con L-NAME este bloqueante fue incluido en forma continua en la CE-A desde etapas iniciales antes de cargar el tejido con DAF-2 DA. En el resto de los experimentos de bloqueo las rodajas fueron tratadas previamente (20 minutos antes) y durante la exposición al alto-[K⁺]_o con alguno de los bloqueantes mencionados en la tabla presentada a continuación.

Propiedad	Nombre completo	Abreviatura	Dosis
Inhibidor de la NOS	N ^G -Nitro-L-arginine-methyl ester.HCl	L-NAME	0,3-1 mM
Inhibidor selectivo de la NOSn	Vinyl-L-NIO, N ⁵ -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine	L-VNIO	1 μM
"Secuestrador" de NO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, potassium salt	c-PTIO	30 μM
Bloqueante de la GCs	H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one	ODQ	5-10 μM
Bloqueante de canales de Na ⁺ voltaje dependientes	tetrodotoxin	TTX	1 μM
Bloqueante de canales de Ca ²⁺ voltaje dependientes presinápticos tipo N, P y Q	ω-Conotoxin MVIIC	ω-ctx-MVIIC	1 μM

Para determinar la influencia del Ca^{2+} extracelular sobre el aumento de la señal fluorescente para GMPc inducida por alto- $[\text{K}^+]_o$, las rodajas fueron incubadas previamente (20 minutos) y durante la exposición al alto- $[\text{K}^+]_o$ en una solución CE-A modificada con bajo $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -alto- $[\text{K}^+]_o$ cuya composición fue igual a la de la solución depolarizante alto- $[\text{K}^+]_o$ con los siguientes cambios: Ca^{2+} (0,2 mM), Mg^{2+} (4 mM) y presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA (2 mM).

El dador de NO diethylenetriamine/nitric oxide adduct 2,2'-(Hydroxynitrosohidrazono)bis-ethanimine (DETA/NO; 2 mM) y el agonista glutamatérgico NMDA (*N*-Methyl-D-aspartato, 10 μM) se administraron disueltos en solución CE-A.

L-NAME y L-VNIO fueron adquiridos en Alexis (Plymouth Meeting, PA); c-PTIO, ODQ, TTX, ω -Conotoxin MVIIC y NMDA fueron adquiridos en Tocris (Ellisville, MO) y el EGTA, y DETA/NO fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO).

6.10.- Análisis estadístico

Salvo que se especifique lo contrario, los valores de los resultados de todos los análisis se expresan como la media \pm ES y el valor de n representa el número de motoneuronas. Para comparar los efectos de los diferentes tratamientos experimentales se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney U-test de dos colas dado que los datos obtenidos no presentaron una distribución normal. En los experimentos dinámicos para comparar el cociente entre la máxima amplitud y la pendiente de ascenso de las curvas de intensidad de

fluorescencia para DAF-2T ante diferentes tratamientos, en primer lugar se identificaron las curvas de regresión lineal de mejor ajuste para cada grupo de datos. Posteriormente, se aplicó a las rectas un análisis estándar de covarianza. Para todos los experimentos el nivel de significancia considerado fue $p < 0,05$, si bien se indicó con códigos de asteriscos el valor de p en cada caso. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows. Los gráficos se realizaron utilizando los programas SPSS 15.0 para Windows y Corel DrawX3 (2005).

7.- RESULTADOS

La presentación de los resultados obtenidos se desarrolla siguiendo su orden de vinculación con los objetivos específicos planteados.

7.1.- Indagar la existencia de producción de NO endógeno en situación basal (Objetivo específico 1)

7.1.1.- Las motoneuronas trigeminales pueden ser identificadas en rodajas de tejido vivo por marcado retrógrado con CM-Dil

Las motoneuronas trigeminales se proponen como el blanco neural postsináptico del NO a estudiar en este trabajo. Por lo tanto para analizar la difusión del NO y visualizar su eventual ingreso a dichas células fue preciso identificarlas correctamente dentro del NMT en tejido vivo.

Los núcleos motores del V^o par fueron identificados visualmente bajo lupa en las rodajas vivas de tronco encefálico como estructuras simétricas, densas, ovals y opacas de ubicación medial al núcleo sensorial del trigémino y ventro-lateral a la sustancia gris periacueductal (esquema Figura 20A).

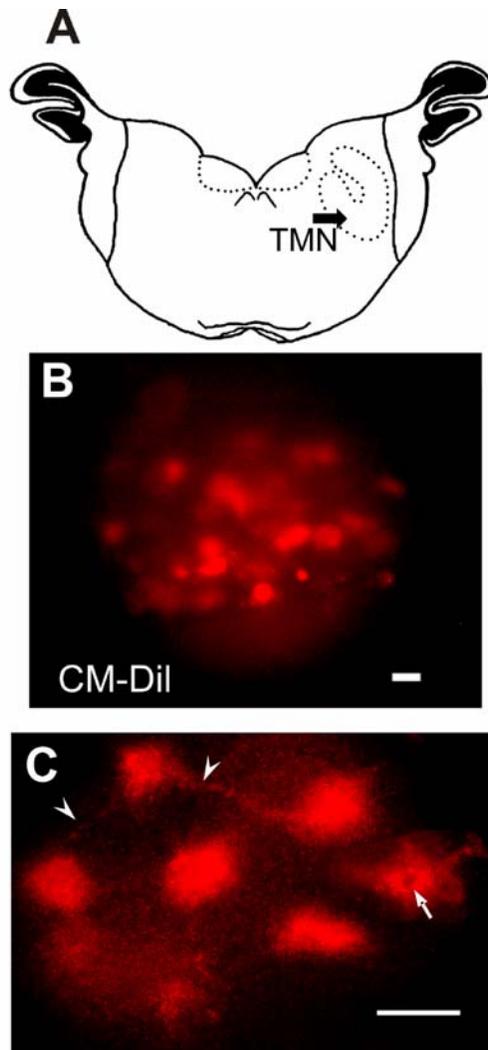


Figura 20: Identificación de motoneuronas trigeminales por marcado retrógrado en rodajas de tejido vivo. (A) Esquema de una rodaja coronal de tronco encefálico donde se indica la localización del NMT (flecha). (B) y (C) Microfotografías de dos grupos de motoneuronas en el NMT marcadas retrógradamente con CM-DiI, que corresponden a dos rodajas diferentes (200 μm de espesor) observadas a baja (B) y alta (C) magnificación. En (C) las cabezas de flecha señalan dos procesos dendríticos claramente identificables. Un núcleo celular que no es invadido por el fluoróforo se indica con una flecha. La observación se realizó con filtro óptico para rodamina. Barra de calibración: 50 μm en (B) y en (C).

El uso de CM-DiI como marcador retrógrado fluorescente inyectado en los músculos maseteros permitió una adecuada identificación de las motoneuronas trigeminales en tejido vivo no fijado de rodajas de tronco encefálico de cobayo. El NMT fue localizado en las rodajas por microscopía a baja magnificación (Figura 20B). A mayor magnificación (20x) los cuerpos

celulares mostraron una fluorescencia intensa, granular y de color rojo que es típica del marcado con este derivado soluble de la carbocianina lipofílica (Figura 20C). La señal fluorescente se localizó en el citoplasma somático, el pericarion, respetando el núcleo celular y en segmentos iniciales de procesos dendríticos. Las motoneuronas presentaron somas de formas trapezoides y multipolares, con diámetros en un rango de 20 a 60 μm (promedio 35 μm ; n = 82).

Las células identificadas con CM-DiI coinciden en su ubicación con la del NMT (Uemura-Sumi *et al.*, 1982) y su morfología concuerda con las descripciones previas de motoneuronas trigeminales (Shigenaga *et al.*, 1988). Esto permite descartar el marcado de estructuras no neuronales, por ejemplo interneuronas o glías, como consecuencia de la difusión del fluoróforo desde cuerpos neuronales seccionados durante la preparación de las rodajas (Honig y Hume, 1989a; 1989b). Debido a que se ha reportado la existencia de resultados falso-negativos en el uso de marcadores fluorescentes inyectados para su migración en forma retrógrada (Richmond *et al.*, 1994), es probable que estructuras celulares presentes en el NMT y que no se marcaron con CM-DiI pudieran corresponder a motoneuronas trigeminales que no captaron el fluoróforo. A pesar de ello, solamente se consideraron como motoneuronas trigeminales aquellas estructuras que presentaron fluorescencia para CM-DiI (CM-DiI positivas).

Como se detallará más adelante, también fueron identificadas exitosamente motoneuronas trigeminales marcadas retrógradamente CM-DiI positivas en rodajas de tronco encefálico sometidas a fijación.

7.1.2.- El NO endógeno es detectado en motoneuronas trigeminales carentes de NOSn en condiciones basales

La monitorización del NO en las rodajas vivas de tronco encefálico que contienen el NMT mediante DAF-2 DA fue puesta a punto en forma exitosa tal como lo muestra la Figura 21 donde se observa la fluorescencia de color verde para DAF-2T localizada en distintos sectores de las motoneuronas trigeminales en ausencia de estimulación. También se aplicó en forma efectiva ésta técnica en rodajas de tronco sometidas a fijación (ver Figuras 31 y 32).

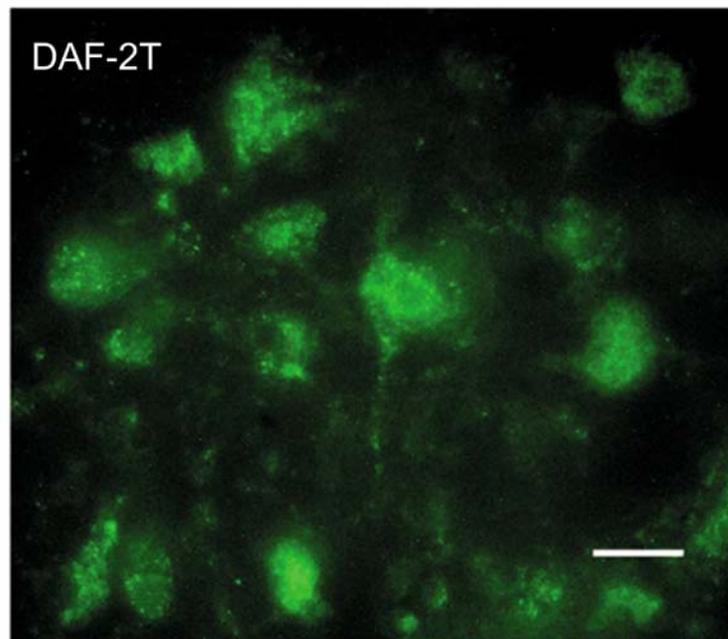


Figura 21: Monitorización de NO intracelular en el NMT de rodajas de tejido vivo cargadas con el indicador indirecto DAF-2 DA. Obsérvese la fluorescencia para DAF-2T en el citoplasma, núcleo y prolongaciones de las motoneuronas trigeminales en rodajas de tejido vivo. El fluoróforo es detectado intracelularmente en todas aquellas estructuras que contengan NO en concentraciones superiores al umbral de detección. La observación se realizó con filtro para fluoresceína. Barra de calibración: 50 μ m.

Dado que ni las motoneuronas ni otras somas expresan NOSn o tienen actividad NADPH-d en el NMT (Abudara *et al.*, 2002), la fluorescencia para DAF-2T sólo podrá ser detectada en las motoneuronas postsinápticas si el NO es sintetizado en fuentes diferentes a ellas y si difunde desde allí hasta alcanzarlas. De este modo mediante la detección de DAF-2T en las motoneuronas se evidenció la producción y difusión de NO desde fuentes endógenas extramotoneuronales hacia las motoneuronas en ausencia de estimulación (condiciones basales).

7.1.3.- Existen diferentes patrones de distribución del NO en condiciones basales dentro del NMT

La localización que presentó la fluorescencia para DAF-2T fue diferente en distintas rodajas en condiciones basales identificándose tres patrones de distribución del fluoróforo. Dentro del patrón I fueron incluidas aquellas rodajas en las que no se detectó fluorescencia para DAF-2T en el NMT (26 rodajas, 38%, Figura 22A, a, a' y a''). En el patrón II se identificaron estructuras DAF-2T positivas / CM-DiI negativas granulares y similares a fibras, cercanas a somas neuronales DAF-2T negativos (y que por ende no contienen NO) / CM-DiI positivos (y que por ende corresponden a motoneuronas) (12 rodajas, 17%, Figura 22Ab, b' y b''). Aunque la fuente de origen del NO no fue investigada en estas rodajas, las mencionadas estructuras podrían corresponder a las fibras neurales delgadas pre-sinápticas nitrérgicas, dado que (a) las estructuras DAF-2T positivas similares a fibras del patrón II hacen

recordar la morfología, el tamaño y la relación espacial con las motoneuronas trigeminales, de la inervación nitrérgica descrita por nuestro grupo en cortes fijados de 15 μm de espesor (Abudara *et al.*, 2002) y (b) debido a que el L-NAME, inhibidor de NOS, disminuye su visualización (ver párrafo siguiente y Figura 22B). El resto de las rodajas mostraron somas neuronales DAF-2T positivos y fueron incluidas en el patrón III (31 rodajas, 45 %, Figura 22Ac, c' y c''). En este patrón se constató la presencia de zonas con doble marcado DAF-2T y CM-DiI positivas (en amarillo en Figura 22 c''), muchas de ellas de contornos celulares claramente delineados, indicadoras de la presencia de NO dentro de las motoneuronas en condiciones basales, lo que permite concluir que el NO endógeno liberado desde una fuente externa a las motoneuronas difunde, las alcanza e ingresa a ellas. Al igual que en las rodajas del patrón II, también en rodajas pertenecientes al patrón III se detectaron procesos DAF-2T positivos, similares a fibras en adyacencia con motoneuronas DAF-2T negativas (véase cabezas de flecha en la Figura 22Ab'' y c''). La producción basal de NO por las fibras delgadas no sería en esos casos suficiente para alcanzar a las células DAF-2T negativas (Philippides *et al.*, 2005).

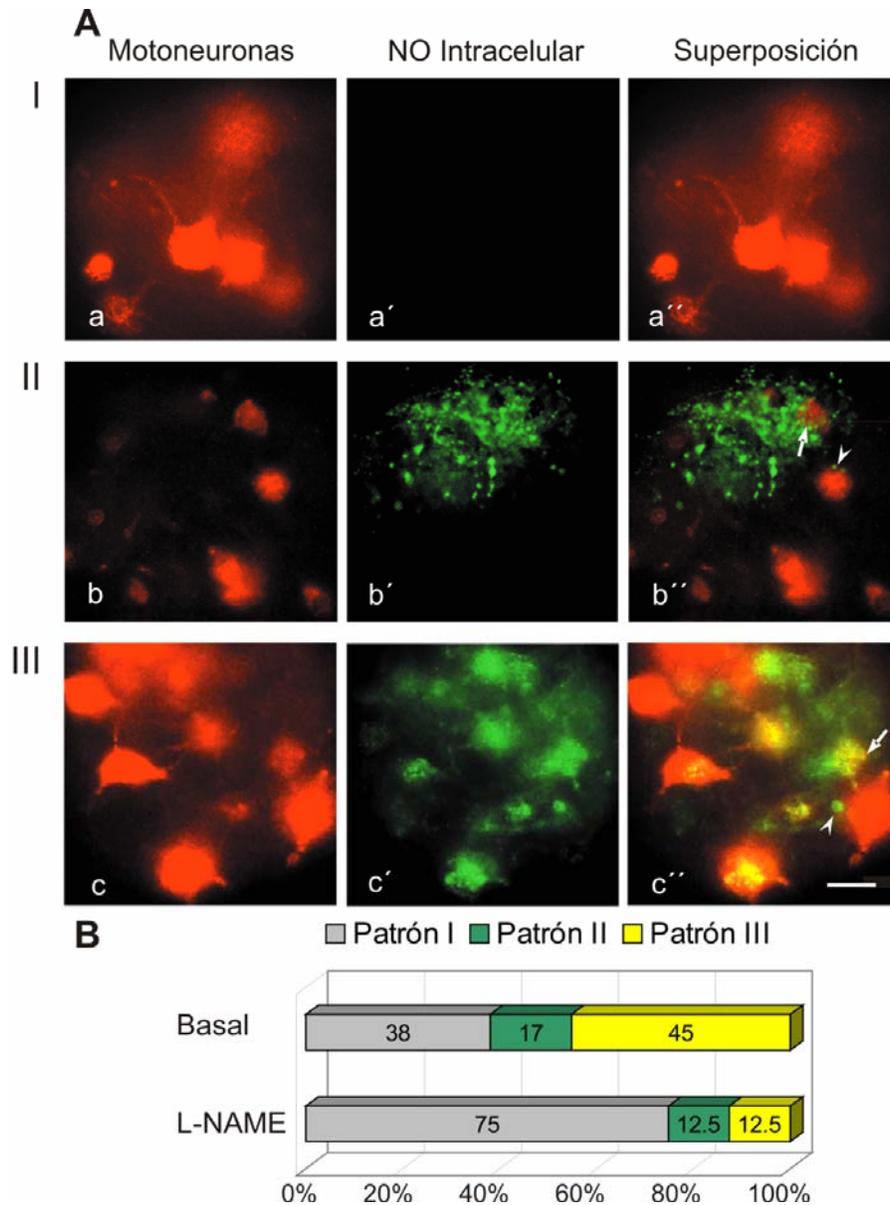


Figura 22: Producción y difusión de NO endógeno en condiciones basales en el NMT. (A) Patrones de distribución de fluorescencia para DAF-2T en rodajas vivas de tronco encefálico de cobayo en condiciones basales en el NMT. Cada trío de microfotografías de cada fila (a, a', a"; b, b', b" y c, c', c") corresponde a un mismo campo. Las rodajas fueron observadas con dos sets de filtros ópticos diferentes: uno para motoneuronas marcadas con CM-DiI (rodamina, primera columna, en rojo) y otro para detección intracelular de NO por DAF-2T (fluoresceína, segunda columna, en verde). Las microfotografías obtenidas con cada uno de los filtros fueron superpuestas para detectar colocalización de marcadores (superposición, tercera columna, colocalización en amarillo). Se encontraron tres patrones de señal DAF-2T: (I) Ausencia de fluorescencia DAF-2T (a', a"), (II) Estructuras granulares similares a fibras DAF-2T positivas/CM-DiI negativas (b', b") y (III) Fluorescencia DAF-2T en somas mayoritariamente identificadas como motoneuronas CM-DiI positivas (c', c"). La flecha en b" señala estructuras similares a fibras neurales, que no son parte de motoneuronas y son DAF-2T positivas (verdes) rodeando a una motoneurona DAF-2T negativa (roja). Las cabezas de flecha en b" y c" señalan procesos DAF-2T positivos que no corresponden a motoneuronas en adyacencia con motoneuronas DAF-2T negativas. La flecha en c" indica una motoneurona DAF-2T positiva en proximidad con otra motoneurona DAF-2T negativa (indicando ausencia de "bleedthrough" entre las señales fluorescentes). Barra de calibración: 50 μ m. **(B)** Distribución de frecuencia (porcentaje de rodajas) de los patrones de fluorescencia para DAF-2T en el NMT en condiciones basales y en presencia de L-NAME. Obsérvese como ante la administración de solución L-NAME (0,3 – 1 mM) aumenta la frecuencia del patrón I en detrimento de II y III.

En la figura 22B se representa la distribución de frecuencia de los tres patrones de localización de fluorescencia para DAF-2T en el NMT en situación basal. La perfusión de las rodajas con solución conteniendo el inhibidor de la NOS: L-NAME (0,3–1 mM) (Rees *et al.*, 1990; Boer *et al.*, 2000, Alderton *et al.*, 2001) disminuyó el porcentaje de ocurrencia de los patrones II y III sumados de un 62 % a un 25 % (Figura 22B). Esto último y el hecho de que el NO sea detectado dentro de las motoneuronas trigeminales en ausencia de estimulación exógena (Figuras 21 y 22Ac' y c'') robustecen el concepto de que en el NMT el NO endógeno se genera y difunde basalmente. Si bien la mayoría de las motoneuronas fueron DAF-2T negativas en condiciones basales, al ser alcanzadas por la liberación tónica de NO endógeno podría modularse su actividad tal como lo indican: (1) el incremento de la actividad sináptica generada en ellas ante la administración de dadores de NO (Abudara *et al.*, 2002) o (2) la modificación de su rebase y potencial de membrana frente al bloqueo de la NOS y la GCs por azul de metileno (Fernández-Alvarez *et al.*, 2011).

Sobre los resultados hasta aquí expuestos se sustenta el cumplimiento del primer objetivo planteado en esta tesis de determinar si en situación basal existe producción de NO endógeno en el NMT. Por otra parte es importante destacar que en un 45 % de las rodajas la producción basal de NO endógeno difunde y alcanza a las motoneuronas trigeminales incluyéndolas en su dominio de influencia.

7.2.- Demostar que ante la depolarización de múltiples fibras nitrérgicas delgadas el NO endógeno liberado incluye a las motoneuronas trigeminales en su dominio de influencia (Objetivo específico 2)

7.2.1.- La perfusión con alto-[K⁺]_o aumenta la producción y difusión de NO en el NMT con respecto a la situación basal

El influjo de Ca²⁺ al interior neuronal y el incremento de la [Ca²⁺]_i libre vinculados a la actividad neural constituyen los eventos que típicamente disparan la producción neuronal de NO por activación de la isoenzima Ca²⁺-calmodulina dependiente NOSn (Bredt y Snyder, 1990; Garthwaite y Boulton, 1995). De acuerdo a la hipótesis de trabajo expuesta, la depolarización abriría canales de Ca²⁺ voltaje dependientes (CCVDs) situados en las terminales nerviosas generando el influjo de Ca²⁺ necesario para permitir la activación de la NOSn. Por lo tanto se investigará el efecto de la depolarización sobre la generación de NO en rodajas cargadas con DAF-2 DA. Tal como se ha planteado en las puntualizaciones metodológicas, se utilizó como estímulo depolarizante la perfusión de las rodajas con solución fisiológica con alta concentración de K⁺ (alto-[K⁺]_o, (Kimura *et al.*, 1995) que produciría una entrada de Ca²⁺ a través de canales de CCVDs localizados en las terminales presinápticas (Huston *et al.*, 1995; Dobrev *et al.*, 1997; Photowala *et al.*, 2005).

La Figura 23 muestra el curso temporal de la distribución de NO en el NMT en una rodaja viva del tronco encefálico del cobayo durante la aplicación del estímulo depolarizante. El campo observado permite identificar los somas de 4 motoneuronas CM-DiI positivas. El área de fluorescencia para el DAF-2T se expande en el campo visual seleccionado de la rodaja durante la aplicación de solución con alto-[K⁺]_o llegando a superponerse con las motoneuronas 1, 2 y 3 en el plano estudiado, pero no alcanza a la motoneurona 4.

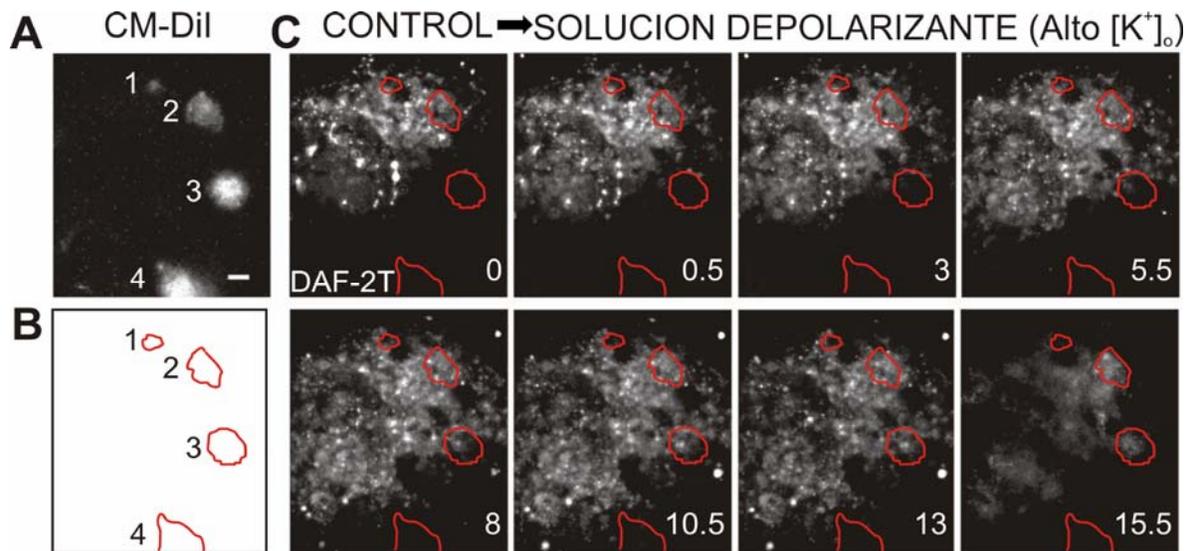


Figure 23: La perfusión con alto-[K⁺]_o induce un aumento en los niveles de NO endógeno en el NMT. (A) Microfotografía de un campo del NMT en el cual se detectan 4 motoneuronas identificadas por marcado retrógrado con el fluoróforo CM-DiI (filtro para rodamina). **(B)** Dibujo en cámara clara del mismo campo que en (A) donde se han contorneado con rojo los límites de las estructuras celulares para discernir con mayor claridad los límites de las mismas. **(C)** Variaciones de la fluorescencia intracelular para DAF-2T en motoneuronas trigeminales durante la perfusión con alto-[K⁺]_o en el mismo campo que (A) y (B) (filtro para fluoresceína). El campo seleccionado muestra fluorescencia para DAF-2T en condiciones basales (control, tiempo 0). En la secuencia fotográfica el tiempo transcurrido luego de la aplicación del alto -[K⁺]_o, (flecha) se indica en cada foto abajo a la derecha (min). Cada una de las fotos de la secuencia se ha superpuesto con la figura (B) a fin de evidenciar si la señal DAF-2T alcanza a las motoneuronas identificadas. La señal para DAF-2T aumentó en intensidad y extensión, las motoneuronas 1 y 2 parecen ser alcanzadas por la “nube” de fluorescencia desde los primeros minutos del experimento, la neurona 3 a partir de los 8 minutos y la neurona 4 no sería alcanzada. Barra de calibración: 20 μm.

Un aumento en la *intensidad* de la fluorescencia indicaría una mayor concentración del NO porque las estructuras fluorescentes producen ellas mismas NO o porque están recibiendo NO desde otras estructuras fuente. Un aumento en el *área* de fluorescencia (i.e., la aparición de fluorescencia en sectores del campo previamente negativos) señalaría que nuevas estructuras contienen NO, ya sea porque dichas estructuras han producido NO (estructuras fuente) ya sea porque han recibido NO desde afuera (estructuras blanco). El aumento en área e intensidad de la señal fluorescente indica que existió producción de NO pero no permite afirmar que también ocurrió difusión. En nuestro modelo podemos afirmar que existió además difusión de NO cuando las motoneuronas trigeminales (carentes de NOSn) inicialmente negativas para el DAF-2-DA, adquieren la fluorescencia para el fluoróforo de manera tal que ésta permite delinear el contorno celular y marcar su interior.

En el ejemplo de la Figura 24, el alto-[K⁺]_o aumentó en forma significativa la fluorescencia para DAF-2T en las motoneuronas identificadas con CM-DiI lo que sugiere que la depolarización incrementa el contenido de NO en las motoneuronas. El estudio del curso temporal de las variaciones de fluorescencia para DAF-2T se evaluó antes y durante la perfusión con alto-[K⁺]_o, tal como se detalla para este experimento representativo.

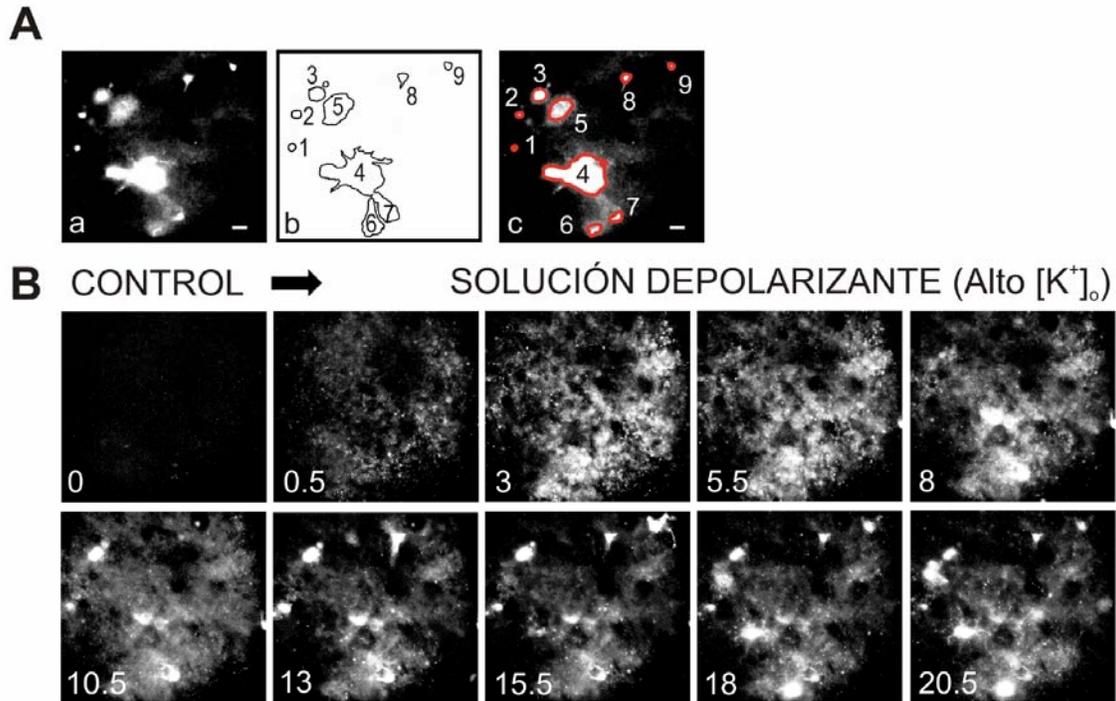


Figura 24: La perfusión con alto-[K⁺]_o induce un aumento en los niveles de NO endógeno en las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas. (A) Microfotografías del campo seleccionado en el NMT donde se distinguen motoneuronas. **(a)** Las imágenes fluorescentes corresponden a las motoneuronas trigeminales identificadas por marcado retrógrado utilizando CM-DiI. **(b)** El dibujo en cámara clara de las estructuras fluorescentes fotografiadas en (a) permite discernir con mayor claridad los límites de las mismas (n = 9). **(c)** Los contornos rojos que se superponen a las motoneuronas de la microfotografía (a) representan la identificación automática que realiza de dichas células el software de medición de fluorescencia para DAF-2T a fin de seleccionar la zona a monitorear en el transcurso del experimento. **(B)** Variaciones de la fluorescencia intracelular para DAF-2T en motoneuronas trigeminales durante la perfusión con alto-[K⁺]_o. El campo seleccionado no muestra fluorescencia para DAF-2T en condiciones basales (control, tiempo 0) pero el estímulo depolarizante la induce. En la secuencia fotográfica el tiempo transcurrido luego de la aplicación de alto-[K⁺]_o (flecha) se indica en cada foto abajo a la izquierda (min). Inicialmente se detecta un incremento difuso de la fluorescencia (0,5 a 3 min), después del cual la señal tiende a ubicarse con mayor intensidad en zonas discretas (3 a 8 min) para luego delimitar las estructuras correspondientes a las motoneuronas que se tornan DAF-2T positivas (8 a 20,5 min). La delimitación de la estructura neuronal por el fluoróforo brinda evidencia a favor de que el NO realmente ingresó a las motoneuronas trigeminales. Barras de calibración: 20 μm.

Las motoneuronas fueron identificadas en cada campo mediante marcado retrógrado (Figura 24A). El campo del ejemplo corresponde al patrón basal I ya que no puede detectarse NO en situación basal (control DAF-2T negativo, Figura 24B, 0 min). La perfusión con alto-[K⁺]_o, induce inicialmente

un extenso y simultáneo incremento de la señal fluorescente para DAF-2T (0,5 a 3 min, Figura 24B). Posteriormente la señal comienza a distribuirse en forma más localizada y con mayor intensidad, en zonas discretas cuya forma y ubicación coinciden con las motoneuronas NOSn negativas que en el tiempo 0 eran DAF-2T-negativas (3 a 20,5 min, Figura 24B). Esto sugiere que fuentes nitrérgicas ajenas a las motoneuronas liberan NO endógeno el cual difunde hasta las motoneuronas e ingresa a ellas. Si la forma de la motoneurona puede definirse por el contenido de NO entonces el NO entró a la célula y la llenó.

Para evidenciar con mayor claridad las zonas de colocación de los fluoróforos DAF-2T y CM-DiI, en la Figura 25A se superpuso la versión en color verde de la secuencia fotográfica que muestra el curso temporal de las variaciones de la fluorescencia DAF-2T (observada en la figura 24B) con la versión en color rojo que muestra la identificación de las motoneuronas con CM-DiI (de la fotografía 24Aa). A partir de los 3 min y hasta los 20,5 min las zonas donde coinciden ambos fluoróforos aparecen en amarillo y representan la presencia de NO en las motoneuronas trigeminales, esto se hace más evidente en los casos en que el NO "invade" en forma completa a las células y por tanto el borde de las zonas amarillas se delinea con la forma de las motoneuronas. Obsérvese a modo de ejemplo el caso de las motoneuronas que han sido identificadas con los números 1, 3, 8 y 9 en la Figura 24A y en el inset del gráfico 25B.

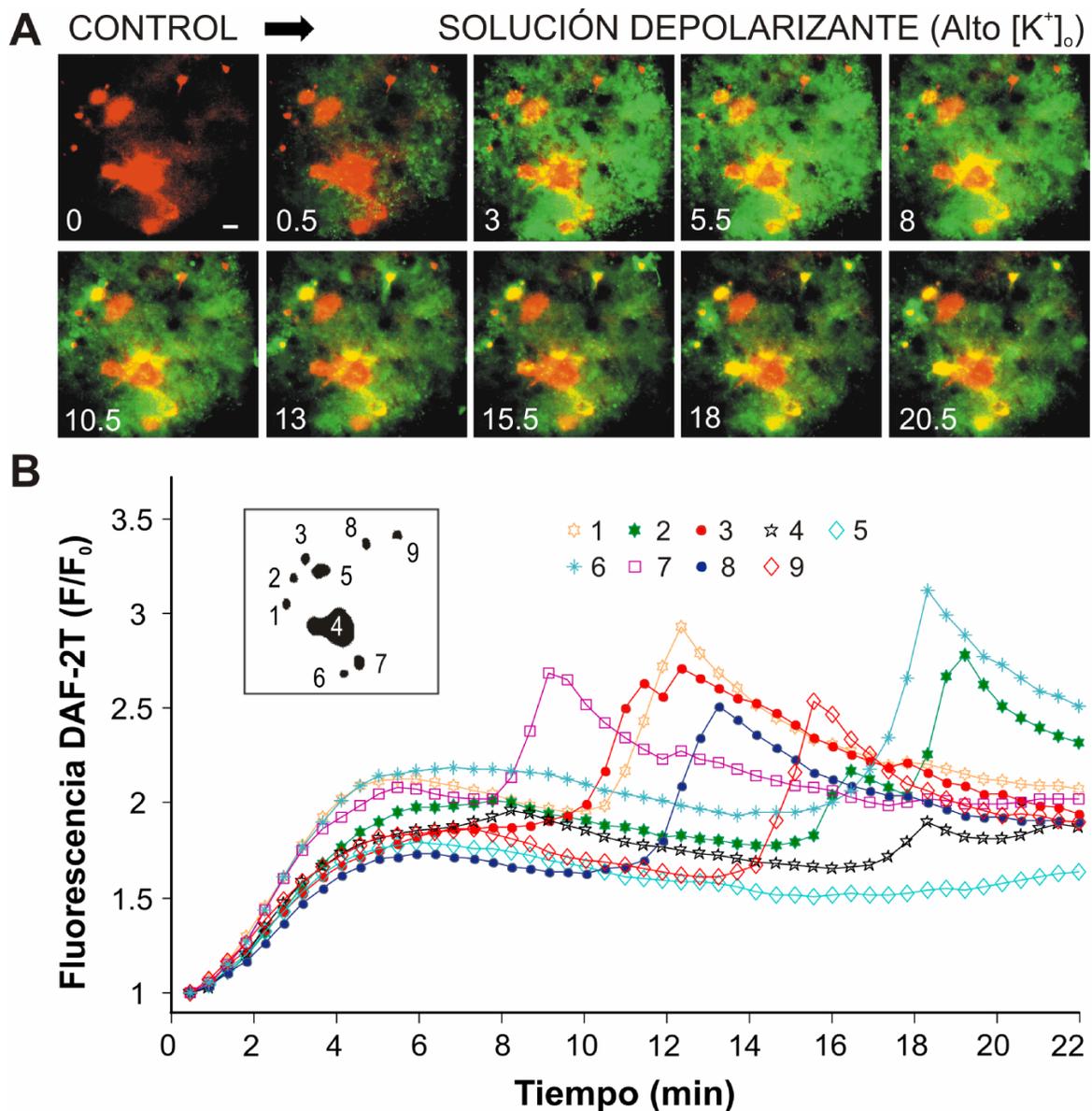


Figura 25: Curso temporal de las variaciones de la fluorescencia intracelular para DAF-2T en motoneuronas trigeminales durante la perfusión con alto- $[\text{K}^+]_o$. (A) Representación a color correspondiente al experimento de la Figura 24 que evidencia con mayor claridad la evolución de la presencia de NO endógeno en las motoneuronas. A las imágenes en color de la secuencia fotográfica registrada en 24B se les superpuso la imagen en color de la fotografía de identificación de motoneuronas con CM-DiI en el mismo campo del NMT de la Figura 24Aa. En rojo se observan las motoneuronas marcadas retrógradamente con CM-DiI. En verde se identifican las zonas con marcado intracelular para DAF-2T. En amarillo se detectan las zonas de colocalización de ambos fluoróforos que evidencian la presencia de NO endógeno en las motoneuronas inducida por la depolarización. (B) Gráfico del curso temporal de la señal fluorescente para DAF-2T en el mismo experimento que (A). La señal fluorescente se expresa como el cociente entre la intensidad de la fluorescencia dentro de cada área identificada como motoneurona en cada tiempo de la curva y el valor inicial de fluorescencia en el tiempo 0 en esa misma área (F/F_0). En el inset se representan las zonas detectadas y numeradas automáticamente como estructuras motoneuronales CM-DiI positivas ($n = 9$). Nótese que los máximos o picos de las curvas en (B) están temporalmente correlacionados con la emergencia de estructuras en color amarillo en (A). Barra de calibración: 20 μm .

Los cambios de intensidad de la señal fluorescente para DAF-2T en cada motoneurona identificada fueron graficados en función del tiempo para cada experimento; en el caso ejemplificado en las figuras 24B y 25A la gráfica se observa en la Figura 25B. En las curvas consignadas pueden distinguirse dos fases. El primer componente podría corresponderse con el inicio de la síntesis simultánea de NO en múltiples fibras y el comienzo del ingreso de NO a las motoneuronas (primeros 5 min; Figura 25B). El segundo componente (8 -19 min; Figura 25B) muestra los picos máximos de la señal fluorescente que pueden correlacionarse con el máximo ingreso de NO a las motoneuronas, tal como se observaba en las motoneuronas DAF-2T positivas en las figuras 24B y 25A.

De acuerdo con las propiedades de difusión del NO en medios lipídicos y acuosos (Kelm y Schrader, 1988; Denicola *et al.*, 1996; Moller *et al.*, 2005) es esperable que el NO pudiera reclutar a células cercanas a las fuentes nitrérgicas en un lapso no mayor a unos pocos minutos a medida que difunde desde sus fuentes. Consecuentemente se podría pronosticar que cuanto más cercanas estuvieran las células entre sí menor sería el retardo existente entre ellas en el arribo del NO; sin embargo las latencias de inicio al ingreso de NO en las motoneuronas no se relacionaron directamente con la distancia entre dichas células. A modo de ejemplo obsérvense las curvas de la Figura 25B. Para las células vecinas número 6 y número 7 las latencias de inicio fueron de 16 y 8 minutos respectivamente (intervalo entre la latencia de una y otra de 8 minutos), y en el caso de la célula número 3 la latencia de inicio fue de 10 minutos, existiendo un intervalo entre su latencia y la de la distante célula 7 de

2 minutos, que resulta 4 veces menor que en el caso de las células vecinas 6 y 7. Adicionalmente, en la motoneurona ubicada en el centro del área 4 (área que claramente involucra a más de una motoneurona) no se detecta el ingreso de NO a pesar de estar cercanamente rodeada por neuronas que a diferentes tiempos se tornan DAF-2T positivas, tal como lo muestra la aparición de sucesivas áreas amarillas que le son adyacentes en la secuencia fotográfica de la figura 25A. Tampoco se detecta incremento de fluorescencia en la célula número 5 a pesar de que se encuentra muy cercana a la célula número 3 que se "carga" de NO. Por lo tanto si bien se esperaría que el campo de difusión alcanzara células adyacentes esto no necesariamente acontece, lo que refleja en parte la complejidad del modelo biológico utilizado (ver en discusión y conclusiones numeral 8.5.).

El retardo requerido para generar la señal intracelular DAF-2T puede ser determinado por las propiedades del marcador u otros aspectos metodológicos y también factores biológicos. Para la detección de DAF-2T se han reportado en la bibliografía latencias del rango de varios minutos (Kojima *et al.*, 1998b; 2001; Okada *et al.*, 2004), lo cual depende en parte de la existencia de pasos intermedios para su producción; alguno de ellos lentos como la formación de NO₂ (ver métodos). El tiempo de arribo de la solución con alto-[K⁺]_o a las fuentes nitrérgicas también puede retardar la aparición de señal DAF-2T en las motoneuronas ya que una vez en la cámara de registro el alto-[K⁺]_o perfunde la superficie inferior de la rodaja para luego atravesar todo su espesor hasta alcanzar la zona de las motoneuronas trigeminales del campo observado por microscopía que corresponde a la superficie superior de la rodaja (ver

métodos). Además en este modelo la acumulación intracelular de NO es el resultado neto de la influencia de factores que facilitan o reducen la llegada del mensajero a las motoneuronas por lo cual el retardo también puede incluir el tiempo necesario para alcanzar la concentración de NO correspondiente al umbral de detección del fluoróforo (Kojima *et al.*, 1998a). En este sentido la disponibilidad de NOSn y de su posibilidad de activación, la densidad de inervación, la disipación y "secuestro" del NO y la cercanía de las motoneuronas a los vasos sanguíneos podrían afectar la disponibilidad del mensajero y por tanto el tiempo de generación de DAF-2T. Particularmente en el NMT la delgadez y separación entre las fibras nitrérgicas demorarían la obtención de la concentración umbral de detección de NO (Philippides *et al.*, 2005; Ott *et al.*, 2007) y además no se conoce la efectividad del influjo de Ca^{2+} a través de los CCVDs presinápticos para activar la NOSn. Si bien todo lo anterior debe considerarse en forma global probablemente los argumentos biológicos tengan menos impacto en la explicación del retardo total de detección de la señal fluorescente para el DAF-2T que los aspectos metodológicos y los vinculados a las propiedades del fluoróforo.

En suma si bien la interpretación de estos experimentos debe ser cuidadosa, entre otras cosas porque analizan la difusión del NO en una sección bidimensional (el plano focal) de la rodaja tridimensional, ellos evidencian que la dinámica difusional ocurre en forma multidireccional y que la producción de NO es suficiente para que varias estructuras sean alcanzadas por el mensajero sin necesidad aparente de contacto anatómico estrecho²⁰ entre las fuentes

²⁰ nm en las sinapsis químicas

nitrérgicas y las motoneuronas trigeminales. Por lo tanto los resultados aquí expuestos apoyan la teoría de una transmisión en volumen mediada por el NO en el NMT en este caso inducida ante la depolarización simultánea y cooperativa de varias fuentes nitrérgicas.

7.2.2.- El incremento de la señal DAF-2T en las motoneuronas inducido por la depolarización con alto-[K⁺]_o efectivamente está vinculado con la producción de NO endógeno

Los picos máximos de la señal para DAF-2T descritos ante la depolarización con alto-[K⁺]_o no se detectaron en las motoneuronas trigeminales en experimentos en situación control (al perfundirse con solución fisiológica), ni durante la inhibición de la NOS cuando la perfusión con alto-[K⁺]_o fue desarrollada en presencia de L-NAME en rodajas incubadas previamente con este inhibidor (L-NAME + alto-[K⁺]_o), tal como se observa en la Figura 26 (gráficos A y B respectivamente). En ambas condiciones la producción de NO no fue suficiente para alcanzar a, o ser detectada en, las motoneuronas. Por el contrario la perfusión de las rodajas con el dador de NO DETA/NO desencadenó el incremento de la fluorescencia (Figura 26C). Tales resultados indicarían la vinculación existente entre incremento de la fluorescencia para DAF-2T y la presencia de NO (Figura 26, A y C) y entre la activación de la NOS y la producción de NO endógeno durante la depolarización (Figura 26, A y B).

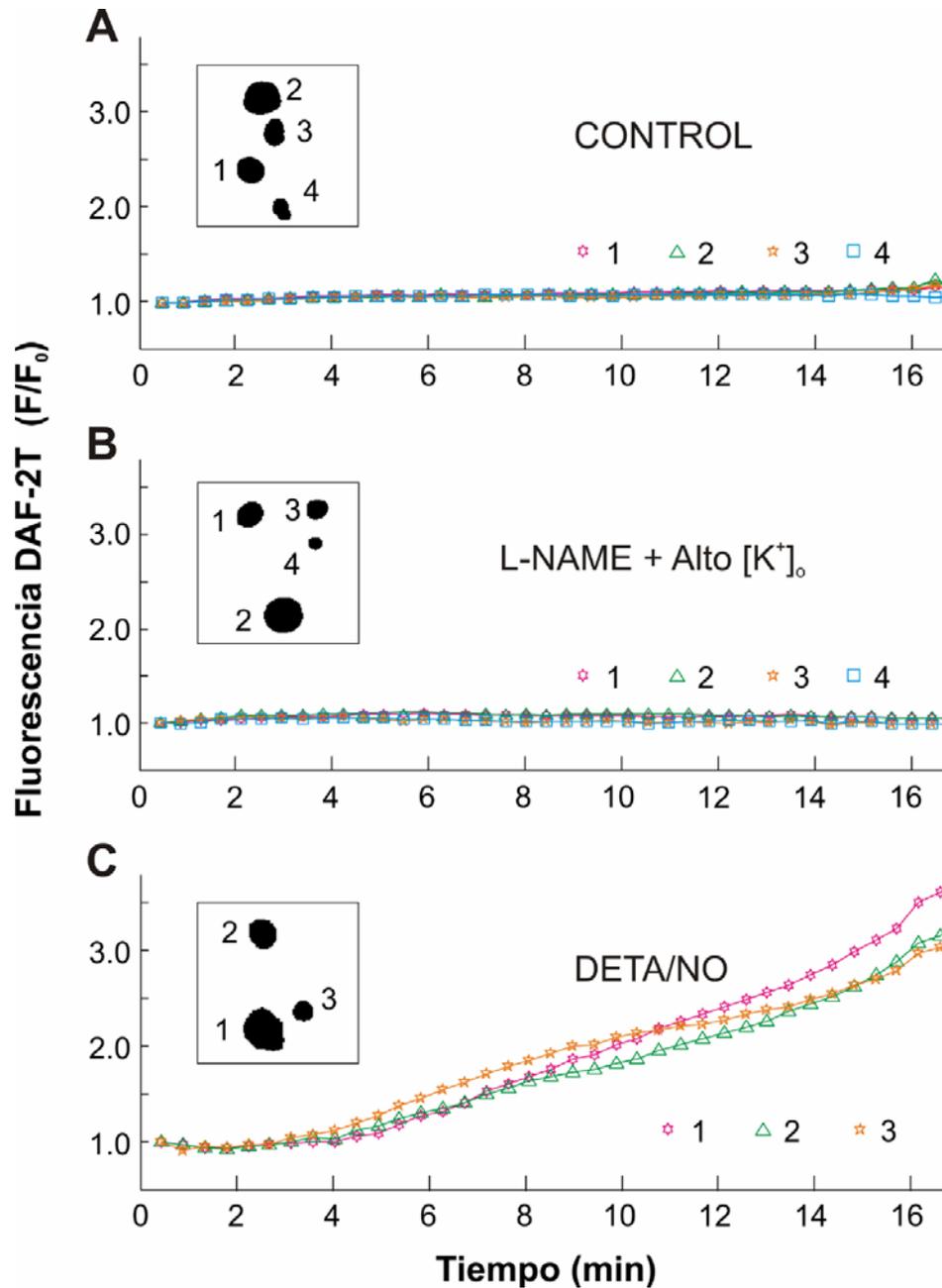


Figura 26: La señal fluorescente para DAF-2T es originada tanto por el NO endógeno generado por activación de la nNOS ante la depolarización como por el NO exógeno liberado por dadores de NO. Los gráficos muestran ejemplos típicos del curso temporal de las variaciones de la intensidad de fluorescencia para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales durante la perfusión de las rodajas vivas de tronco encefálico con: **(A)** solución fisiológica (control), **(B)** inhibidor competitivo de la NOS aplicado previamente y durante la administración de solución depolarizante (L-NAME + high- $[K^+]_o$) y **(C)** dador de NO (DETA/NO). Obsérvese que no se registran aumentos de la intensidad de fluorescencia en situación control, ni ante el bloqueo por el L-NAME del efecto del estímulo depolarizante sobre la activación de la NOS, pero sí se detectan incrementos cuando la rodaja recibe el aporte exógeno de NO por medio de un dador. En el inset de cada gráfico se representan como manchas negras numeradas las zonas automáticamente seleccionadas para medir señal DAF-2T que corresponden a las estructuras motoneuronales identificadas con CM-DiI en el campo seleccionado. La señal fluorescente para DAF-2T se expresa y grafica de igual forma que en la Figura 25B.

Para hacer el análisis de la respuesta obtenida en las rodajas ante los diferentes tratamientos experimentales, todos los máximos de la intensidad de fluorescencia de la señal DAF-2T, expresados como la relación entre F/F_0 (ver material y métodos y leyenda de la Figura 25B), fueron agrupados en categorías para la construcción de histogramas de frecuencias (tamaño del intervalo, 0,5; rango 1 – 6, Figura 27A). En los histogramas correspondientes a la situación control y a los experimentos con L-NAME + alto-[K⁺]_o, los máximos de señal para DAF-2T se ubicaron en las categorías 1 y 1,5, pudiendo corresponder estos picos a variaciones randómicas (Figura 27A, histogramas superiores). Por el contrario, ante la perfusión con alto-[K⁺]_o, se registraron en las motoneuronas máximos de la señal DAF-2T incluidos en la categoría 2 y mayores que 2 (Figura 27A, histograma inferior izquierdo). No se detectaron picos en estas categorías ni en situación control ni durante el tratamiento con L-NAME + alto-[K⁺]_o, lo que sugiere que la detección de estos máximos de intensidad de fluorescencia para DAF-2T requiere específicamente de la presencia de NO intracelular de origen endógeno. En este sentido, por un lado durante los experimentos control la ausencia de depolarización previno el incremento de Ca²⁺ intracelular necesario para la activación de la NOS_n, y por otro, durante el bloqueo con L-NAME aunque la rodaja se despolarizó con alto-[K⁺]_o, la activación de la NOS_n fue inhibida en forma competitiva (Figure 27A, histogramas superiores).

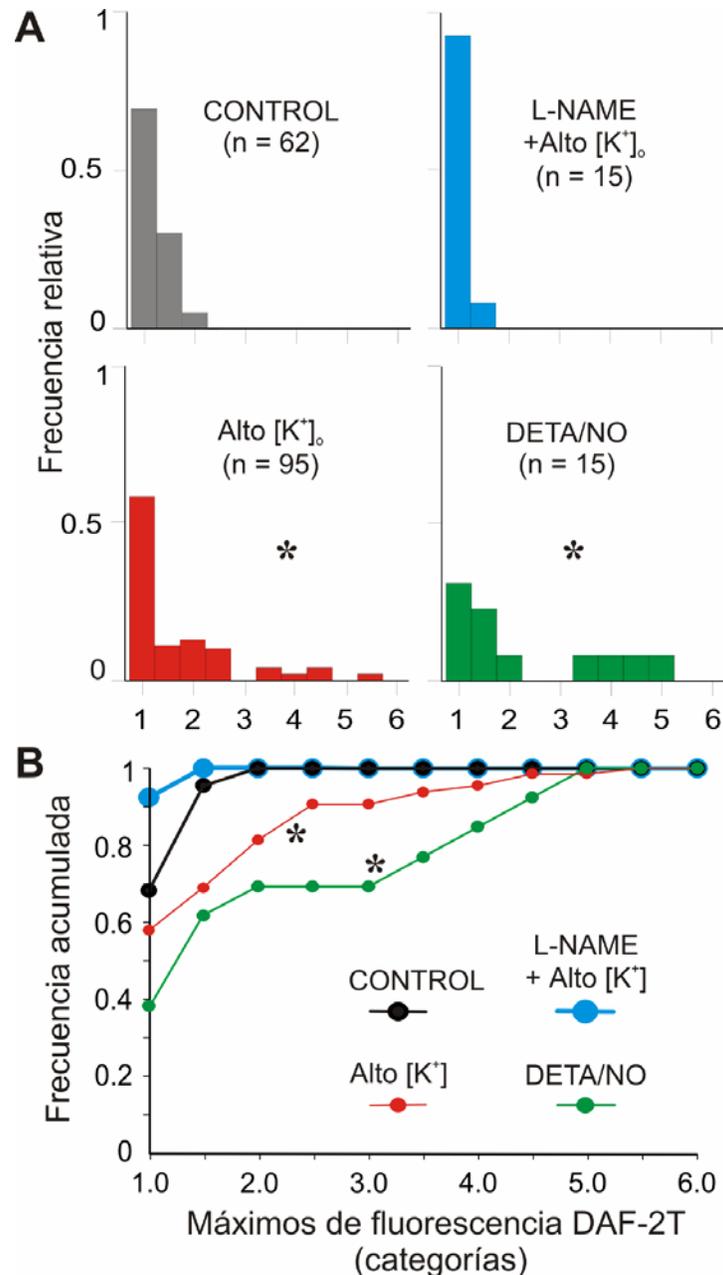


Figura 27: Distribución de frecuencia de valores máximos de señal fluorescente DAF-2T en las motoneuronas trigeminales ante distintos tratamientos recibidos por las rodajas de tejido vivo. (A) Histogramas de frecuencia de los máximos valores de intensidad de fluorescencia para DAF-2T agrupados en categorías (intervalo 0,5; rango de 0,5 a 6) para rodajas sometidas a diferentes tratamientos: control, alto-[K⁺]_o, L-NAME + alto-[K⁺]_o y DETA/NO. Los valores de intensidad de fluorescencia incluidos en las categorías mayores de 2 se detectan únicamente en los histogramas de los experimentos con alto-[K⁺]_o o DETA/NO. n = número de células (motoneuronas trigeminales identificadas). **(B)** Curvas de frecuencia acumulada de los máximos valores de intensidad de fluorescencia para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales para iguales tratamientos que en (A). Las rodajas tratadas con alto-[K⁺]_o y DETA/NO presentan incremento del contenido de NO en las motoneuronas con respecto a las rodajas control ($p < 0,05$). El efecto del tratamiento con alto-[K⁺]_o fue bloqueado por L-NAME tal como lo muestra la curva del tratamiento con L-NAME + alto-[K⁺]_o que no fue diferente a la curva control ($p > 0,05$). * = $p < 0,05$ en comparación con el control.

La curva de frecuencia acumulada para los máximos de señal DAF-2T muestra mayor presencia de motoneuronas DAF-2T positivas ante el tratamiento con alto-[K⁺]_o si se la compara con las curvas de frecuencia acumulada de los experimentos control y con L-NAME + alto-[K⁺]_o ($p < 0,05$, Figura 27B). Debido a que las motoneuronas son NOSn negativas el NO endógeno responsable de estos picos debe originarse en otras estructuras del NMT y difundir hasta ellas para desencadenar la detección de fluorescencia para DAF-2T.

Con el fin de realizar la validación del DAF-2 DA como un sensor sensible y específico para el NO en este modelo, rodajas cargadas previamente con DAF-2 DA fueron perfundidas con solución conteniendo el dador DETA/NO (2 mM). El curso temporal de la respuesta al DETA/NO mostró típicamente en todas las motoneuronas trigeminales registradas un incremento simultáneo, intenso y de niveles similares en la fluorescencia para DAF-2T (Figura 27C). Dado que los perfiles de variación de la señal DAF-2T fueron similares en todas las motoneuronas se descartó que (1) la heterogeneidad en la carga basal del marcador en diferentes sectores del NMT (Rodríguez *et al.*, 2005) o (2) un acceso diferencial del O₂ (Ledo *et al.*, 2005) en el tejido, pudieran generar distorsión de los registros de fluorescencia obtenidos. Al igual que en los experimentos con alto-[K⁺]_o, las motoneuronas trigeminales de las rodajas tratadas con DETA/NO mostraron valores máximos de señal intracelular para DAF-2T iguales y mayores que 2 (Figura 27A, histograma inferior derecho); de hecho las curvas de frecuencia acumulada para los picos de fluorescencia

detectados en los experimentos con alto-[K⁺]_o y en los experimentos con DETA/NO no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$, Figura 27B).

A modo de resumen cabe destacar que, a pesar de la dificultad para asegurar que la señal fluorescente para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales es linealmente proporcional exclusivamente a la concentración intracelular de NO "libre" (Hall y Garthwaite, 2009; Hill *et al.*, 2010), es válido afirmar que en el NMT los incrementos en dicha señal requieren de la presencia y aumento del contenido intracelular de NO. Esta afirmación se sustenta (a) en que la fluorescencia en las motoneuronas se incrementa como resultado de la administración exógena de dador (DETA/NO) con consecuente liberación de NO y (b) en que el incremento de la fluorescencia generada por alto-[K⁺]_o es impedido por la administración del inhibidor competitivo de la NOS (L-NAME). El bloqueo por el L-NAME del aumento de la señal DAF-2T ante la depolarización permite vincular la depolarización con la producción de NO endógeno. Como las motoneuronas no tienen la capacidad de sintetizar NO y la depolarización incrementa el contenido de NO endógeno en ellas, el NO debe difundir desde otras estructuras fuente hasta las motoneuronas trigeminales postsinápticas incluyéndolas en su campo de difusión.

Estos resultados por tanto permiten afirmar el cumplimiento del segundo objetivo planteado en esta tesis que proponía verificar si el NO endógeno liberado desde fuentes nitrérgicas ante estímulos depolarizantes incluía a las motoneuronas trigeminales en su dominio de influencia.

A continuación se profundizará en aspectos vinculados a la dinámica del incremento de la concentración de NO frente a diferentes maniobras experimentales.

7.2.3.- La dinámica de incremento en la concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es diferente si el NO es generado endógenamente o es aplicado exógenamente.

Aunque los picos detectados ante el tratamiento con DETA/NO y ante la despolarización con alto-[K⁺]_o presentan máximos de fluorescencia similares, son generados por fenómenos claramente diferentes: en el primer caso la fuente de NO es exógena y en el segundo es endógena. En tal sentido sería esperable que la dinámica de aumento de la concentración de NO intracelular en las motoneuronas no fuera la misma en ambas situaciones, y consecuentemente tampoco la dinámica de generación de la señal para DAF-2T. De hecho tal como lo muestra el gráfico de barras de la Figura 28 la latencia para alcanzar el máximo de fluorescencia para DAF-2T es mayor en el caso del tratamiento con DETA/NO que para la despolarización con alto-[K⁺]_o ($p < 0,05$).

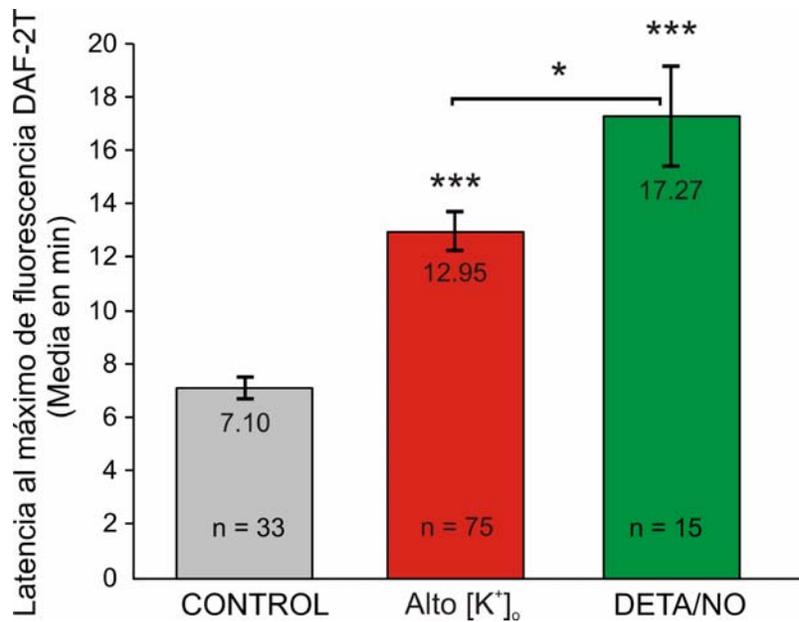


Figura 28: La latencia a la máxima concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es diferente en las rodajas tratadas con alto- $[K^+]_o$ y con DETA/NO. Gráfica que representa la media del tiempo transcurrido en minutos desde el inicio del experimento hasta el momento en que se alcanza la máxima fluorescencia en las motoneuronas trigeminales para los grupos experimentales control y tratados con alto- $[K^+]_o$ o DETA/NO (latencia a la respuesta máxima detectada por DAF-2T). Nótese que el grupo con menor latencia a la respuesta máxima corresponde al que recibió estímulo depolarizante con alto- $[K^+]_o$. El número en el sector superior de cada barra corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de p al comparar con la situación control y el ubicado sobre la llave recta representa p al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Para comparar la dinámica de incremento de la concentración intracelular de NO en las motoneuronas ante un tratamiento y otro se graficó el curso temporal de la fluorescencia, representado por la pendiente de ascenso al máximo, en función de la máxima intensidad de fluorescencia alcanzada en las motoneuronas de las rodajas tratadas con alto- $[K^+]_o$ y DETA/NO (Figura 29, inset). Los parámetros graficados varían proporcionalmente ajustando con líneas rectas siendo mayor la pendiente para los experimentos de despolarización con alto- $[K^+]_o$ que para los de administración exógena de NO con DETA/NO ($p < 0,001$, Figura 29). Esta diferencia puede reflejar efectivamente la existencia de mecanismos

subyacentes distintos y de diferente velocidad en el origen de la presencia de NO en las motoneuronas trigeminales en estos experimentos, por ejemplo la síntesis de NO por la NOSn podría ser más rápida que la liberación de NO desde el dador. Por otra parte la eventual generación de radicales oxidativos podría producir la oxidación del DAF-2 a un compuesto radicalar intermedio aumentando la señal fluorescente en las motoneuronas trigeminales frente a la despolarización (Espey *et al.*, 2002; Jourd'heuil, 2002); sin embargo el incremento en la generación neuronal de superóxido (O_2^-) ha sido reportado ante el aumento de la actividad metabólica celular (Bredt, 1999) pero no frente al tratamiento con alto- $[K^+]_o$ (Bindokas *et al.*, 1996).

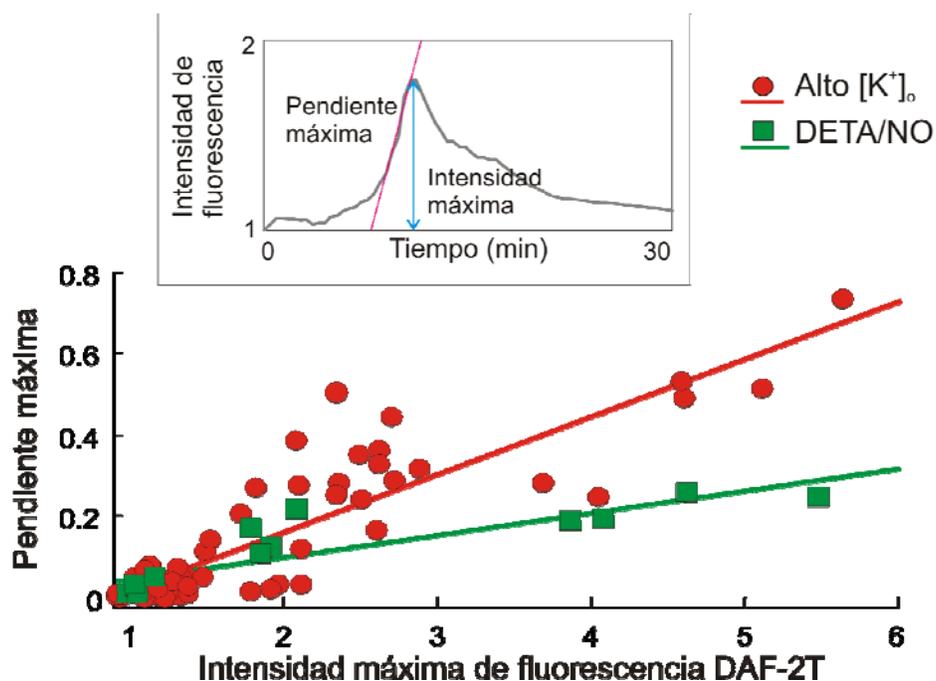


Figura 29: La dinámica de incremento de la concentración de NO dentro de las motoneuronas trigeminales es diferente si el NO es generado endógenamente o si el NO es aplicado exógenamente. El inset en la parte superior muestra como se obtuvieron a partir de cada curva de curso temporal de la intensidad de fluorescencia para DAF-2T los valores de la máxima pendiente de ascenso y de la máxima fluorescencia alcanzada por cada motoneurona. Estos datos fueron graficados para cada una de las motoneuronas identificadas tratadas con alto- $[K^+]_o$ o con DETA/NO. En la gráfica obtenida con los datos se superpone la curva de regresión lineal de mejor ajuste a cada uno de los grupos experimentales. $r^2 = 0,78$ para alto- $[K^+]_o$ ($n = 75$) y $r^2 = 0,77$ para DETA/NO ($n = 15$). El incremento de la concentración de NO en las motoneuronas es mayor y acontece más rápidamente al ser inducido por la depolarización con alto- $[K^+]_o$ que ante la administración de NO exógeno. Se aplicó el test de covariancia entre las curvas: $p < 0,001$.

Un aspecto a considerar con respecto al estímulo depolarizante masivo intencionalmente escogido es que la aplicación de alto-[K⁺]_o por más de 15 min puede ser muy artificial con respecto a lo que realmente sucedería en condiciones fisiológicas en el NMT para activar múltiples fibras. En tal sentido pareció importante determinar si efectos similares podían ser observados frente al uso de un estímulo más "fisiológico" como al disminuir el tiempo de aplicación de alto-[K⁺]_o o la administración de un neurotransmisor. Dado que la latencia al máximo efecto sobre la fluorescencia para DAF-2T ante la perfusión con alto-[K⁺]_o tuvo una media de aproximadamente 13 minutos en los experimentos dinámicos realizados, se desarrollaron experimentos "estáticos" en rodajas cargadas con DAF-2 DA incubándolas con alto-[K⁺]_o durante 13 minutos. En otros experimentos también "estáticos" las rodajas fueron expuestas a NMDA 10 μM, agonista glutamatérgico que típicamente media el influjo celular de Ca²⁺ en el SNC y por tanto podría generar la activación de la NOSn en las fibras presinápticas (ver discusión). En ambos casos, al finalizar cada experimento el tejido fue fijado y luego montado para la observación por microscopía confocal.

La respuesta obtenida con estos tratamientos fue consistente con la del tratamiento con alto-[K⁺]_o en los experimentos dinámicos. En los experimentos estáticos ambos estímulos aumentaron la fluorescencia para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales con respecto al tratamiento control, si bien la respuesta observada con el NMDA fue de menor intensidad que la del alto-[K⁺]_o (Figura30). Por tanto, el incremento de la concentración intracelular de NO endógeno en las motoneuronas trigeminales durante la despolarización con

alto- $[K^+]_o$ es observable también frente a otros estímulos depolarizantes y/o generadores de aumento del influjo de Ca^{2+} y puede ser reproducido en experimentos estáticos. De aquí en más este fue el tipo de experimento que se utilizó para el cumplimiento los restantes objetivos planteados.

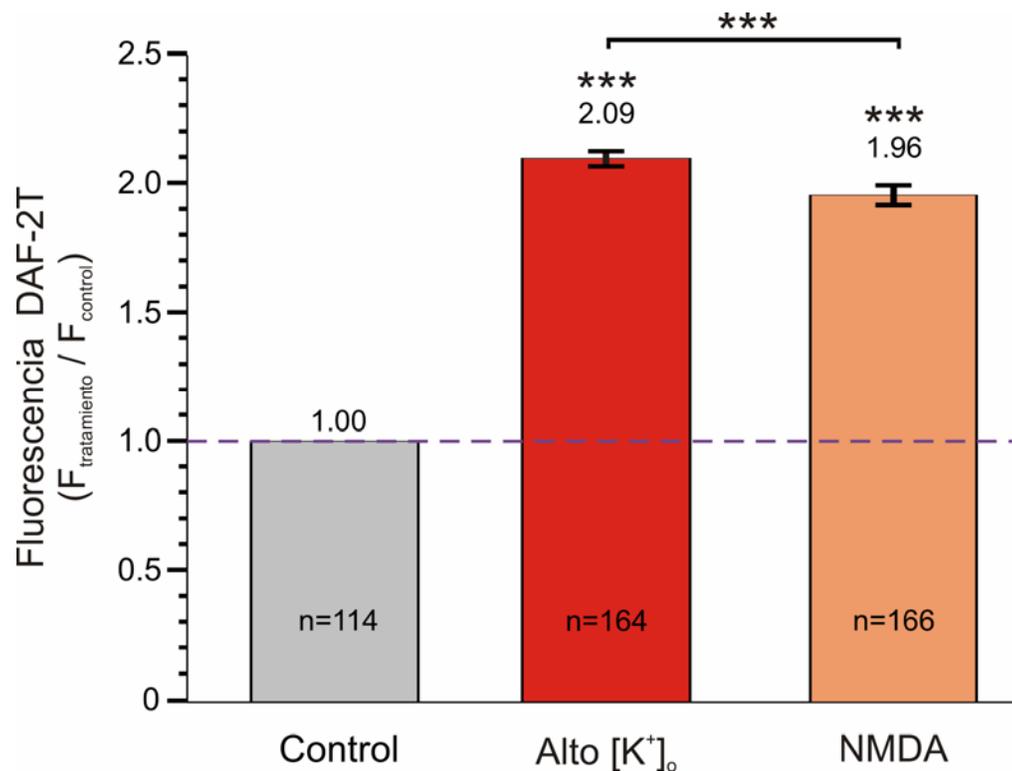


Figura 30: El incremento de la concentración de NO en las motoneuronas trigeminales es inducido también en experimentos estáticos al depolarizar y al administrar un agonista glutamatérgico. Gráfica que representa la intensidad de la señal fluorescente para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales de un grupo de rodajas control, otro tratado con alto- $[K^+]_o$ durante 13 minutos y un grupo de rodajas tratadas con NMDA (10 μ M). Ante ambos tratamientos se detectó un incremento en la señal para DAF-2T en comparación a la situación control, siendo el incremento observado con el NMDA menor que el inducido por la depolarización. La línea punteada horizontal representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de p en comparación a la situación control y los ubicados sobre la llave recta señalan los valores de p al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células, *** = $p < 0,001$

7.3.- Evidenciar que el NO endógeno al difundir ingresa a las motoneuronas trigeminales en concentraciones biológicamente efectivas que permitan activar a la GCs presente en ellas (Objetivo específico 3)

7.3.1.- La administración de NO exógeno incrementa la inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas trigeminales

De acuerdo a los datos obtenidos por las técnicas imagenológicas con DAF-2 DA, el NO sintetizado por las fibras nitrérgicas delgadas ante la depolarización masiva con alto- $[K^+]_o$ es suficiente para difundir y alcanzar a las motoneuronas trigeminales. Sin embargo no está demostrado si la concentración de NO endógeno que arriba a dichas células es suficiente para modular su función. La GCs es la molécula blanco del NO más estudiada. La misma ha sido inmunolocalizada en las motoneuronas trigeminales donde la enzima media el efecto de los dadores de NO sobre la excitabilidad neuronal (Abudara *et al.*, 2002). Se consideraron como concentraciones de NO biológicamente efectivas aquellas capaces de activar la GCs motoneuronal y por tanto de aumentar la formación de GMPc intracelular en las motoneuronas trigeminales. El aumento del GMPc intracelular podría ser responsable

entonces de la modulación de la actividad neuronal tal como ha sido propuesto (Abudara *et al.*, 2002).

Mediante el empleo de inmunohistoquímica de fluorescencia para detección de GMPc (De Vente *et al.*, 1998) se buscó evaluar y localizar sitios donde existiera actividad de la GCs y evidenciar así la presencia de una concentración biológicamente efectiva de NO endógeno (Hall y Garthwaite, 2009). A manera de control metodológico se administró a las rodajas el dador de NO DETA/NO (2 mM) a fin de verificar si la activación de la GCs motoneuronal por el NO liberado era detectable en las rodajas como incrementos en la señal fluorescente para GMPc.

Efectivamente el NO administrado exógenamente incrementó la concentración de GMPc intracelular en la motoneuronas trigeminales con respecto a la situación basal (Figura 31A y B). Cabe destacar que en el experimento que se presenta en las fotografías de dicha figura en situación control ya era detectable la inmunofluorescencia para GMPc, lo cual podría indicar actividad basal de la GCs inducida quizás por la producción basal de NO.

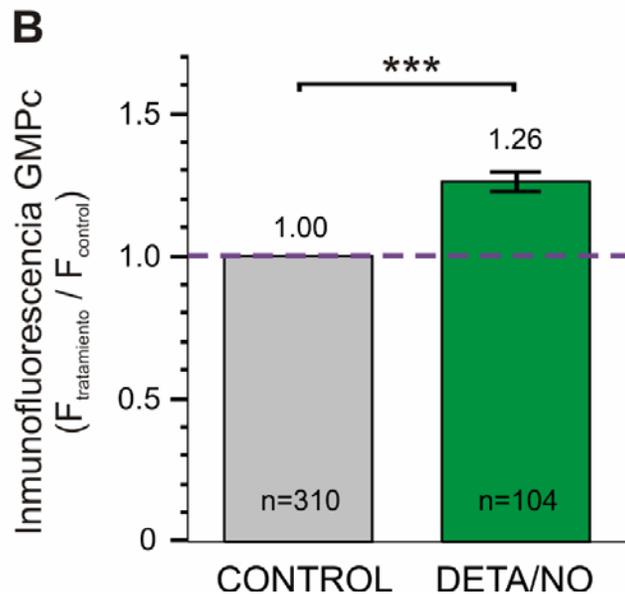
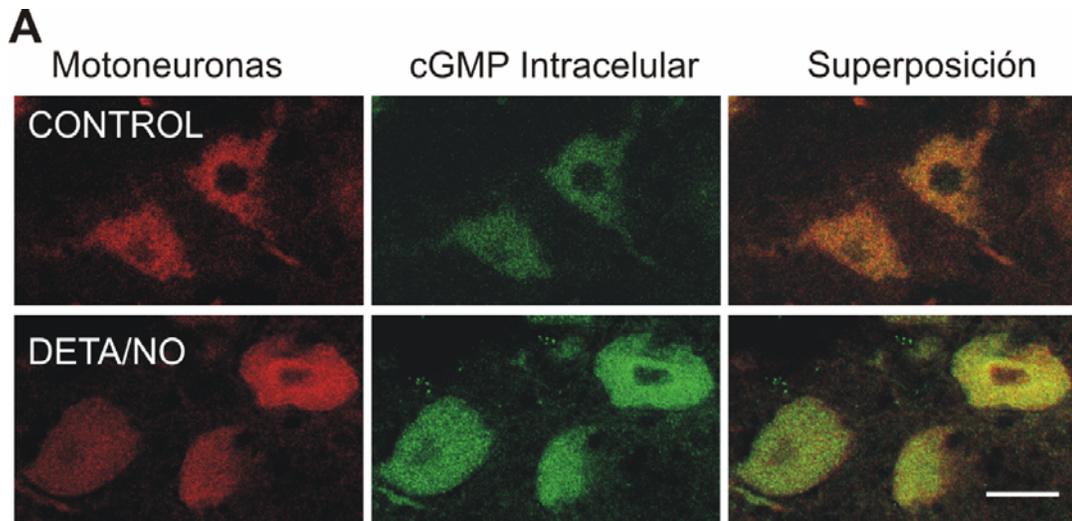


Figura 31: La administración exógena de NO incrementa la señal de inmunofluorescencia para GMPc en motoneuronas trigeminales con respecto a la situación control. (A) Las microfotografías muestran la detección de GMPc en motoneuronas trigeminales en condición basal y ante la administración de DETA/NO. Cada trío de microfotografías presentado en cada fila corresponde a un mismo campo del NMT. Las rodajas fueron observadas con dos sets de filtros ópticos diferentes: uno para las motoneuronas marcadas con CM-DiI (rodamina, primera columna, observadas en rojo) y otro para la detección de GMPc intracelular por inmunofluorescencia (fluoresceína, segunda columna, observada en verde). Las microfotografías de un mismo campo obtenidas con cada uno de los filtros fueron superpuestas con la finalidad de detectar la colocalización de ambos marcadores y por lo tanto evidenciar la presencia de GMPc dentro de las motoneuronas (superposición, tercera columna, colocalización observada en amarillo). La fila superior corresponde a un ejemplo típico de experimento en situación control y la inferior a un experimento de administración exógena de NO (DETA/NO 2 mM). Nótese que se detectó GMPc en ambas condiciones experimentales observándose diferente intensidad de la señal en una y otra. Barra de calibración: 50 μ m **(B)** Gráfica que representa la intensidad de la señal inmunofluorescente para GMPc en las motoneuronas trigeminales de un grupo de rodajas en situación control y un grupo de rodajas tratadas con DETA/NO. La línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. La presencia de GMPc es mayor en las motoneuronas que recibieron NO exógeno, lo que está en concordancia con el papel que tiene el mismo en la activación de la GCs. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. n = número de células, *** = $p < 0,001$

7.3.2.- La depolarización con alto-[K⁺]_o aumenta la señal de inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas que expresan la GCs

Una vez testada la técnica se determinó si el NO generado endógenamente ante el estímulo depolarizante al ingresar en las motoneuronas postsinápticas podría activar a la GCs. El alto-[K⁺]_o incrementó la señal de inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas identificadas con CM-DiI al compararla con el control (Figura 32). El aumento de la señal causado por la depolarización con alto-[K⁺]_o fue atribuido a un aumento de la actividad de la GCs ya que el ODQ (5-10 μM), potente y específico inhibidor de esta enzima previno en forma completa dicho efecto (Figura 32B).

El hecho de que el ODQ reduzca la señal fluorescente de GMPc en las motoneuronas trigeminales por debajo de la señal de la situación control (Figura 32B) sugiere que probablemente dicha síntesis se desarrolla fisiológicamente en las motoneuronas en situación basal. Esto estaría en concordancia con la producción basal de NO endógeno planteada en numerales anteriores.

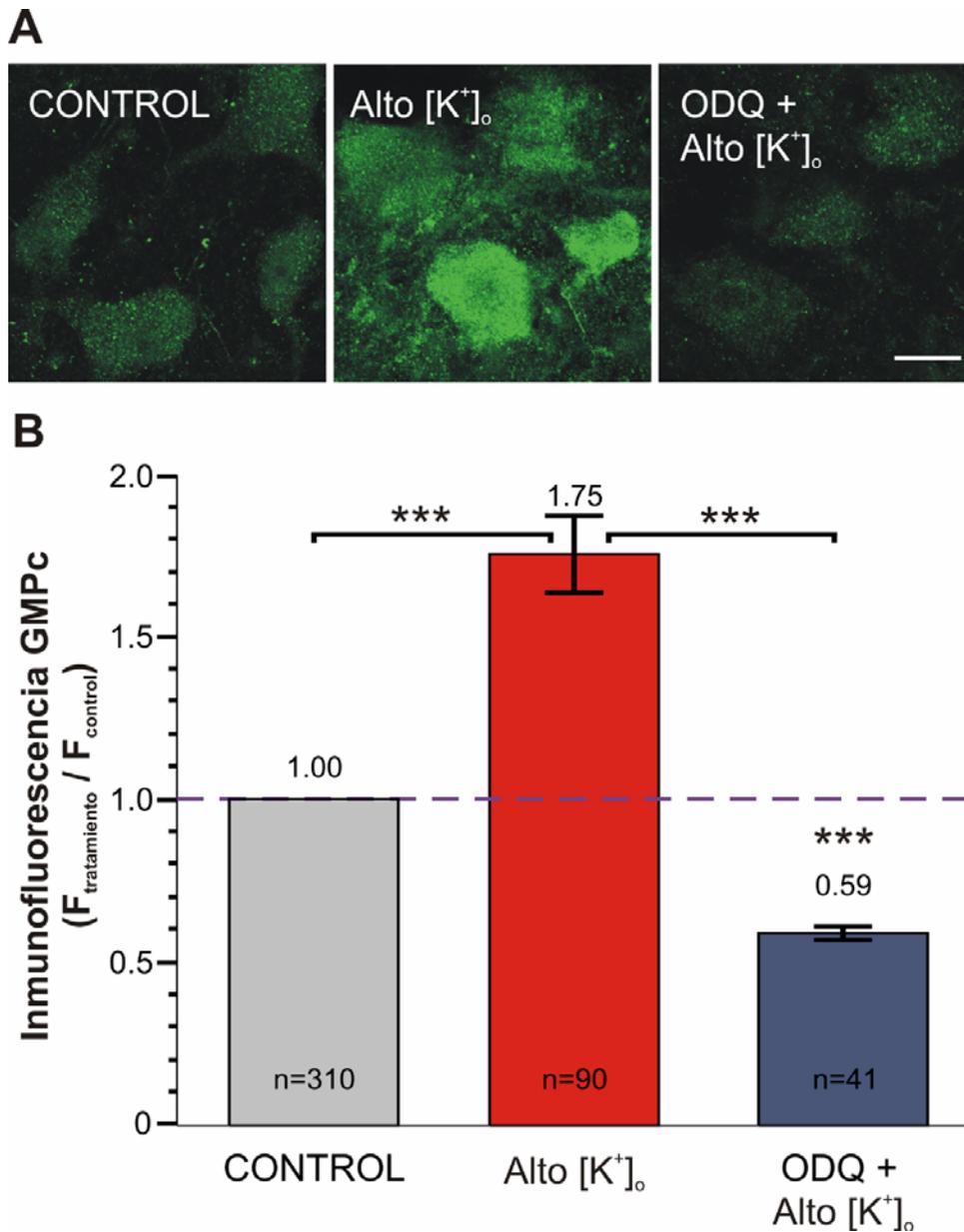


Figura 32: El NO endógeno alcanza a las motoneuronas trigeminales postsinápticas en concentraciones biológicamente efectivas para activar a la GCs. (A) Microfotografías que ejemplifican un experimento en el NMT donde la administración de alto- $[K^+]_o$ determina un incremento en la señal de inmunofluorescencia para GMPC en las motoneuronas el cual es totalmente prevenido al tratar la rodaja con el inhibidor específico de la GCs: ODQ (5-10 μ M), antes y durante la perfusión con alto- $[K^+]_o$. Barra de calibración: 50 μ m. **(B)** El gráfico de barras ilustra que el NO endógeno producido ante la depolarización con alto- $[K^+]_o$ incrementa la síntesis de GMPC en las motoneuronas a través de la activación de la GCs. El tratamiento con alto- $[K^+]_o$ incrementa la inmunofluorescencia para GMPC con respecto a la situación control. El efecto de la depolarización es totalmente prevenido por el ODQ (5 - 10 μ M). Nótese que la señal ODQ + alto- $[K^+]_o$ es menor que la detectada en situación control (asteriscos sobre la barra para ODQ). La línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. n = número de células, *** = $p < 0,001$

Estos resultados soportan el concepto de que durante la depolarización (de las terminales nerviosas) el NO liberado que ingresa a las motoneuronas trigeminales es suficiente para activar la GCs promoviendo la síntesis de GMPc. Se puede concluir entonces que el NO endógeno ingresa a las motoneuronas en concentraciones biológicamente efectivas, tal como se planteaba evidenciar en el objetivo 3, lo cual le permitiría modular las motoneuronas postsinápticas.

7.4.- Identificar los mecanismos que subyacen y modulan a la transmisión nitrérgica en el NMT (Objetivo específico 4)

7.4.1.- Desde la estimulación de las fuentes nitrérgicas premotoras a la producción post-sináptica de GMPc en las motoneuronas: una secuencia que subyace a la transmisión anterógrada mediada por el NO en el NMT

Desde la perspectiva de la neurotransmisión anterógrada clásica, los mecanismos que acoplarían la depolarización con alto-[K⁺]_o con la síntesis postsináptica de GMPc en las motoneuronas incluirían: la activación de canales de Na⁺ - voltaje dependientes responsables del potencial de acción en las fibras nitrérgicas presinápticas durante la depolarización, apertura de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes localizados en la terminal presináptica, entrada de Ca²⁺ a través de dichos canales, la activación de la NOSn por el influjo de Ca²⁺ y la producción de NO en las fibras premotoras, la difusión de NO desde las fibras y el ingreso de NO al interior de las motoneuronas trigeminales

NOSn-negativas y la activación de la GCs soluble presente en dichas células con la consecuente formación de GMPc mediador de la neurotransmisión o neuromodulación. Con la finalidad de evidenciar los distintos pasos de esta secuencia se determinó como distintas sustancias de acción farmacológica inhibidora específica en cada una de las fases mencionadas influían en la señal de inmunofluorescencia para GMPc y/o en la de fluorescencia de DAF-2T generadas durante la administración de alto-[K⁺]_o. Es importante recordar que ya se ha explicitado el papel del ODQ como inhibidor del último paso de esta secuencia; los resultados obtenidos con los otros fármacos se exponen a continuación.

7.4.2.- La transmisión anterógrada entre las fibras nitrérgicas premotoras y las motoneuronas trigeminales requiere de activación neural

La administración de alto-[K⁺]_o en presencia de TTX (1 μM), un bloqueante específico de canales de Na⁺ responsables del potencial de acción, inhibió por completo tanto la señal de fluorescencia para DAF-2T como la de inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas trigeminales (Figuras 33A y B respectivamente). Esto indica que la activación de los canales de Na⁺ voltaje dependientes es un componente fundamental en las transmisión mediada por NO durante la actividad neural. La TTX provocó la reducción de ambas señales fluorescentes por debajo de la señal correspondiente a la situación control. Esto sugiere la existencia de liberación endógena de NO en

forma dependiente de la actividad neural en concentraciones biológicamente efectivas y la consecuente producción de GMPc en condiciones basales en las motoneuronas, en concordancia con lo observado en la Figura 22, y probablemente debida a actividad neural espontánea en las rodajas.

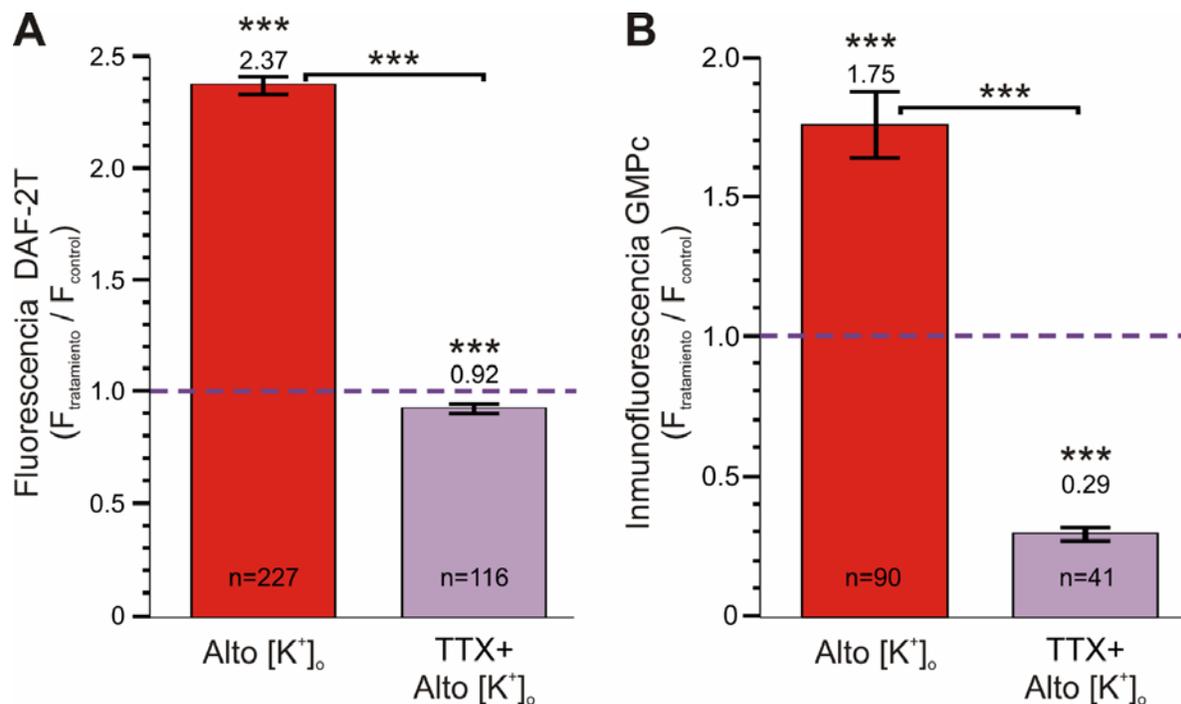


Figura 33: La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural. (A) Gráfica que compara la intensidad de la señal fluorescente para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales entre rodajas tratadas con alto-[K⁺]_o y tratadas con TTX + alto-[K⁺]_o. La TTX (1 μM) bloqueó el incremento en el contenido neuronal de NO inducido por la depolarización. **(B)** Gráfica que representa la intensidad de la señal inmunofluorescente para GMPc en las motoneuronas trigeminales entre tratadas con alto-[K⁺]_o y tratadas con TTX + alto-[K⁺]_o. La TTX (1 μM) bloqueó el incremento en el contenido neuronal de GMPc inducido por la depolarización. Tanto en (A) como en (B) la línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de *p* en comparación a la situación control y los ubicados sobre llaves rectas señalan los valores de *p* al comparar las otras situaciones experimentales. *n* = número de células, *** = *p* < 0,001

7.4.3.- La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere de la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes presinápticos y del ingreso de Ca^{2+} extracelular a las terminales

Como la actividad enzimática de la NOSn es Ca^{2+} -calmodulina dependiente su activación se vincula al incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Este incremento en el NMT ocurriría ante el influjo del ión a través de CCVDs ubicados en la terminales nitrérgicas. Se testó el efecto del bloqueo de los CCVDs y de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sobre la señal fluorescente inducida por alto- $[\text{K}^+]_o$ en las motoneuronas.

El tratamiento de las rodajas con un bloqueante de los CCVDs presinápticos de tipo N, P y Q (Llinás y Moreno, 2004), la conotoxina ω -ctx-MVIIC (1 μM) administrado previamente y durante la administración alto- $[\text{K}^+]_o$, evitó el incremento de fluorescencia para DAF-2T generado por la depolarización (Figura 34A).

Por otra parte la señal de inmunofluorescencia para GMPc inducida por alto- $[\text{K}^+]_o$ fue inhibida en las motoneuronas cuando las rodajas fueron incubadas en solución fisiológica extracelular conteniendo baja $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0,2 mM), alta $[\text{Mg}^{2+}]_o$ (4 mM) y el quelante de Ca^{2+} EGTA (2 mM) (Figura 34B). Ambos hechos permiten afirmar que la transmisión nitrérgica en el NMT requiere del influjo de Ca^{2+} al interior de las fuentes y que este se desarrolla a través de canales Ca^{2+} voltaje-dependientes presinápticos.

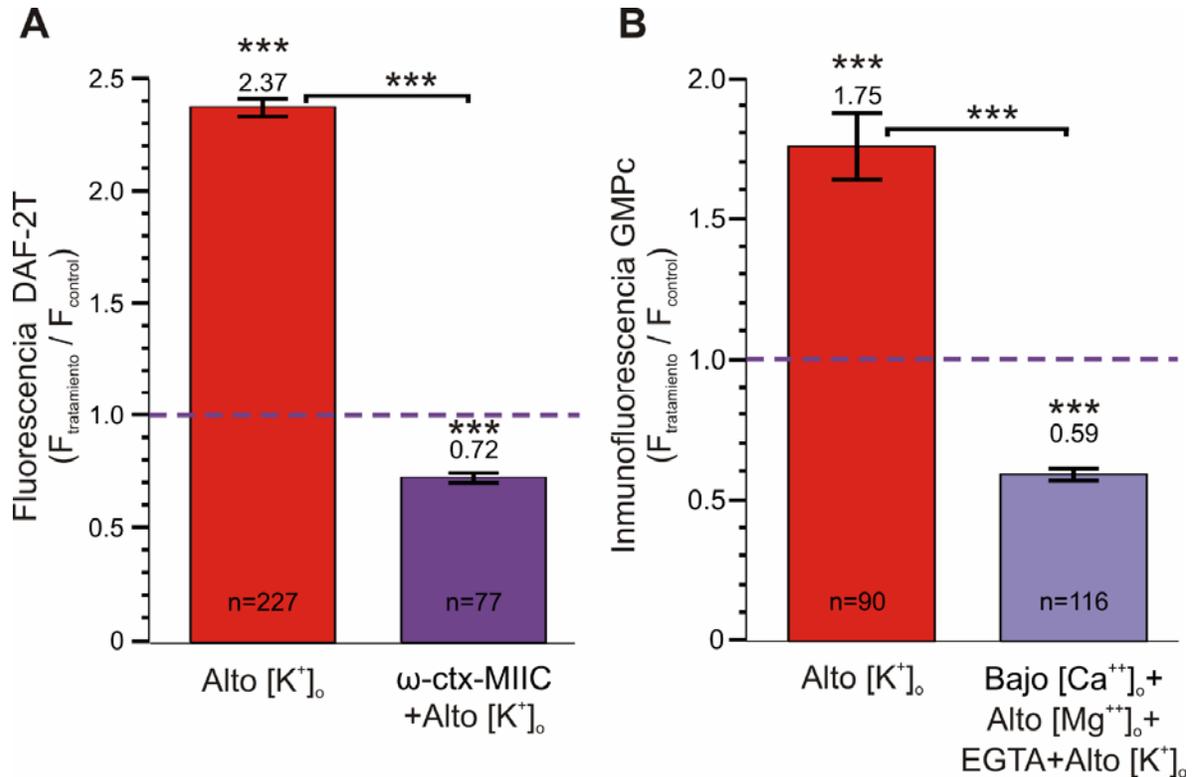


Figura 34: La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere del influjo de Ca²⁺ extracelular a la fuente nitrérgica a través de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes presinápticos. (A) Gráfica que representa la intensidad de la señal fluorescente para DAF-2T en las motoneuronas trigeminales de un grupo de rodajas tratadas con alto-[K⁺]_o y un grupo de rodajas tratadas ω-ctx-MVIIC + alto-[K⁺]_o. La conotoxina ω-ctx-MVIIC (1 μM) bloqueó el incremento del contenido neuronal de NO inducido por la depolarización. **(B)** Gráfica que representa la intensidad de la señal inmunofluorescente para GMPC en las motoneuronas trigeminales de rodajas tratadas con alto-[K⁺]_o y rodajas expuestas a solución depolarizante conteniendo bajo-[Ca²⁺]_o + alto-[Mg²⁺]_o + EGTA + alto-[K⁺]_o. La solución extracelular con bajo-[Ca²⁺]_o + alto-[Mg²⁺]_o + EGTA (2 mM) bloqueó el incremento en el contenido de GMPC en las motoneuronas trigeminales inducido por la depolarización. Tanto en (A) como en (B) la línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de *p* en comparación a la situación control y los ubicados sobre llaves rectas señalan los valores de *p* al comparar las otras situaciones experimentales. *n* = número de células, *** = *p* < 0,001

7.4.4.- La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere la activación de la NOSn y la producción de NO en las fibras nitrérgicas premotoras

Si bien en el desarrollo de los objetivos 1 y 2 se había demostrado que la detección de NO de origen endógeno en el NMT tanto en condiciones basales como ante la depolarización con alto-[K⁺]_o era prevenida por el tratamiento con L-NAME, este inhibidor de la NOS no permite discernir cual de las isoenzimas de la NOS ha sido activada. Por lo tanto las rodajas fueron tratadas previamente y durante la depolarización con un inhibidor selectivo de la NOSn, el L-VNIO (1 μM) (Alderton *et al.*, 2001). El L-VNIO abolió el aumento de la inmunofluorescencia para GMPc inducido por el alto-[K⁺]_o por lo que se demuestra que ese aumento depende de la activación de la NOSn (Figura 35). La NOSn en el NMT del cobayo solamente ha sido detectada en la fibras delgadas nitrérgicas presinápticas descritas previamente (Abudara *et al.*, 2002); esto, junto con los resultados aquí indicados, señala a dichas fibras como fuentes del NO endógeno producido ante la depolarización que son capaces de sostener una transmisión anterógrada efectiva en el NMT.

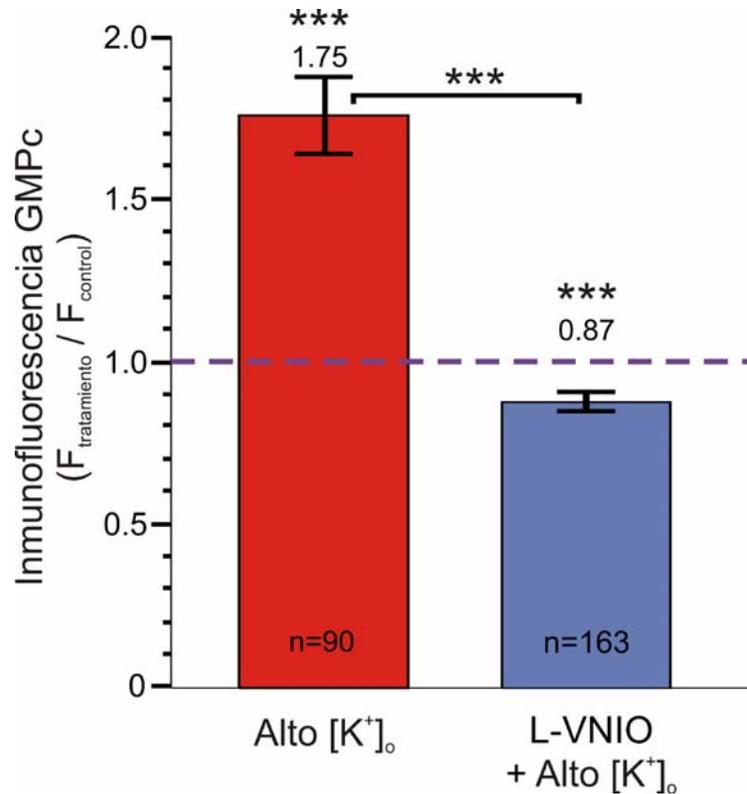


Figura 35: La transmisión anterograda mediada por NO en el NMT requiere la activación de la NOSn presináptica. Gráfica que representa la intensidad de la señal inmunofluorescente para GMPCr en las motoneuronas trigeminales de un grupo de rodajas tratadas con alto-[K⁺]_o y un grupo de rodajas tratadas con L-VNIO + alto-[K⁺]_o. El L-VNIO (1 μM), bloqueó el incremento en el contenido neuronal de GMPCr inducido por la depolarización. La línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de *p* en comparación a la situación control y los ubicados sobre la llave recta señala los valores de *p* al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células, *** = *p* < 0,001

7.4.5.- La transmisión anterograda mediada por NO en el NMT requiere la difusión de NO desde las fibras y su ingreso al interior de las motoneuronas trigeminales NOSn-negativas

Para determinar si el NO liberado desde las terminales nitrérgicas presinápticas difunde a través del medio extracelular como neurotransmisor en volumen hasta alcanzar la motoneuronas trigeminales, las rodajas fueron incubadas antes y durante la depolarización con c-PTIO, un "secuestrador" de

NO extracelular. El c-PTIO que es un radical libre estable y soluble en agua, es capaz de reaccionar estequiométricamente con el NO de forma tal que este queda atrapado en el medio extracelular sin poder atravesar las membranas e ingresar a las células. El tratamiento de las rodajas con c-PTIO (30 μM) inhibió potentemente el incremento de la inmunofluorescencia para GMPC inducida por el alto- $[\text{K}^+]_o$ (Figura 36), lo cual demuestra que el NO endógeno responsable de la activación de la GCs en las motoneuronas es suministrado por fuentes nitrérgicas externas a las motoneuronas.

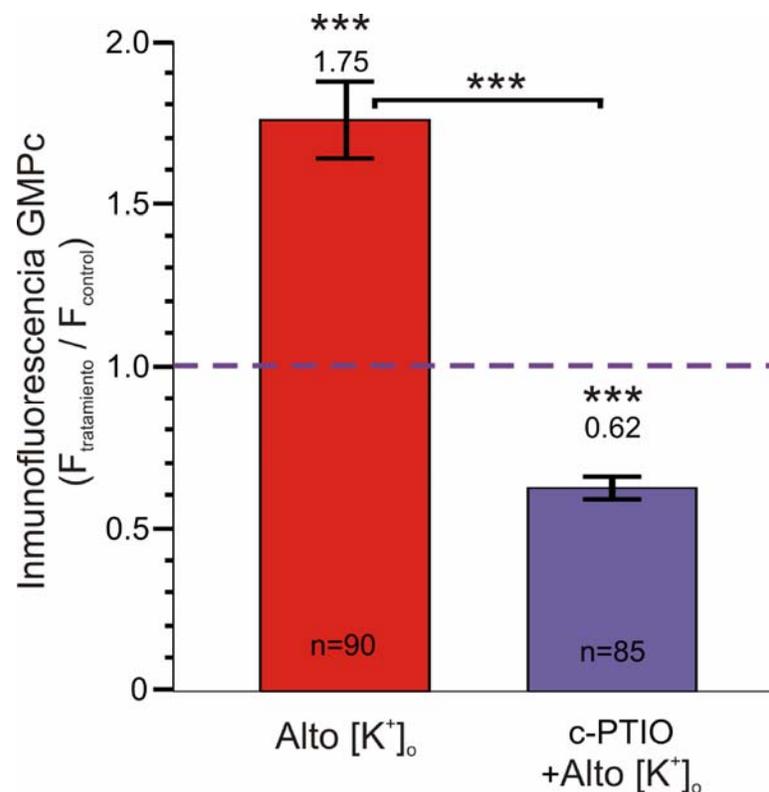


Figura 36: La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT requiere de la difusión extracelular de NO desde fuentes extramotoneuronales. Gráfica que representa la intensidad de la señal inmunofluorescente para GMPC en las motoneuronas trigeminales de un grupo de rodajas tratadas con alto- $[\text{K}^+]_o$ y un grupo de rodajas tratadas con c-PTIO + alto- $[\text{K}^+]_o$. El c-PTIO (30 μM), bloqueó el incremento en el contenido neuronal de GMPC inducido por la depolarización. La línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de p en comparación a la situación control y los ubicados sobre la llave recta señala los valores de p al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células, *** = $p < 0,001$

7.4.6.- Resumen de los resultados obtenidos correspondientes al cuarto bloque

En suma, a la luz de todos los resultados aquí expuestos, resumidos en los gráficos de las Figuras 37 y 38, se puede afirmar que el incremento de los niveles de NO y de GMPc detectados en las motoneuronas ante la

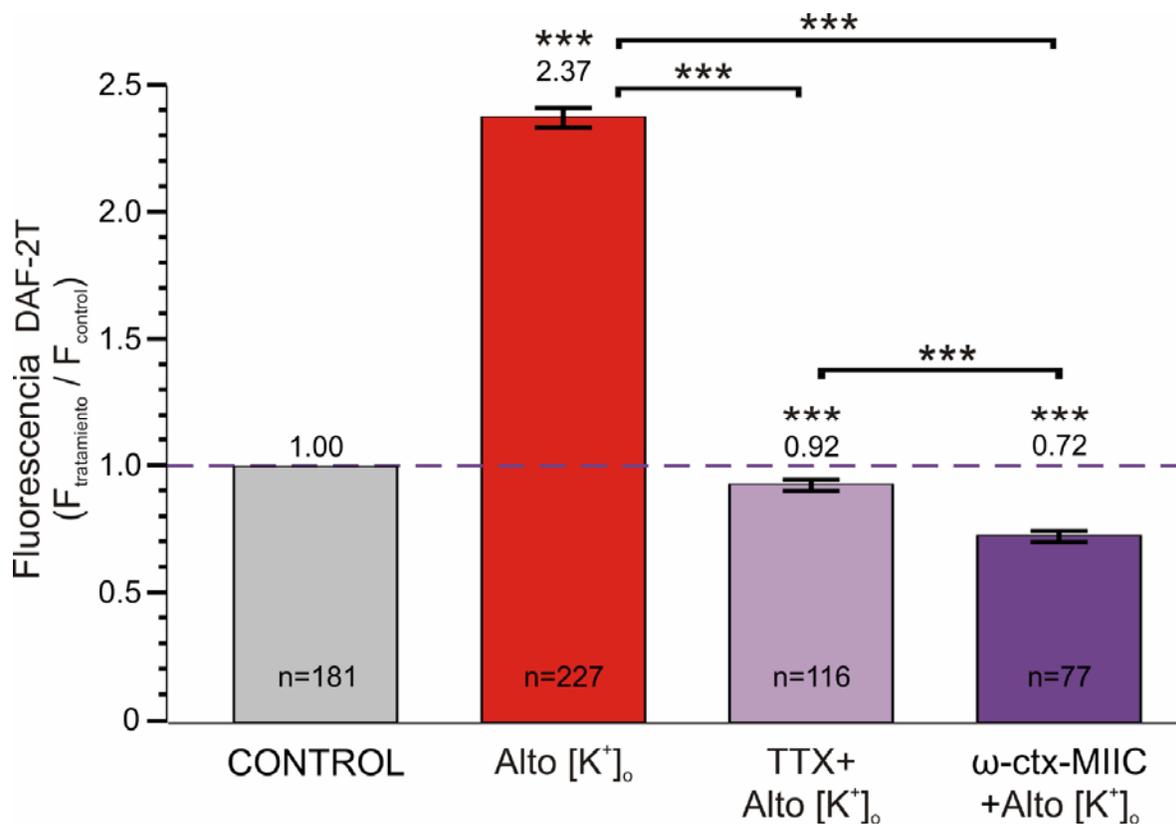


Figura 37: La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural y requiere del influjo de Ca²⁺ y apertura de CCVDs presinápticos. Gráfica que resume los resultados de la variación de la fluorescencia de DAF-2T en experimentos estáticos que permiten analizar la secuencia de eventos que vinculan la depolarización con alto-[K⁺]_o con el aumento de la concentración de NO en las motoneuronas trigeminales. Tanto la TTX (1 μM) como la conotoxina ω-ctx-MVIIC (1 μM) al ser administradas previamente y durante la perfusión con alto-[K⁺]_o bloquean el aumento de la señal DAF-2T inducido por la depolarización. La línea punteada horizontal representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de *p* en comparación a la situación control y los ubicados sobre las llaves rectas señalan los valores de *p* al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células, *** = *p* < 0,001

depolarización con alto-[K⁺]_o se producen siguiendo una secuencia de eventos que permiten vincular las fibras presinápticas premotoras como fuentes y las motoneuronas trigeminales como blanco de la neurotransmisión anterógrada nitrérgica en el NMT.

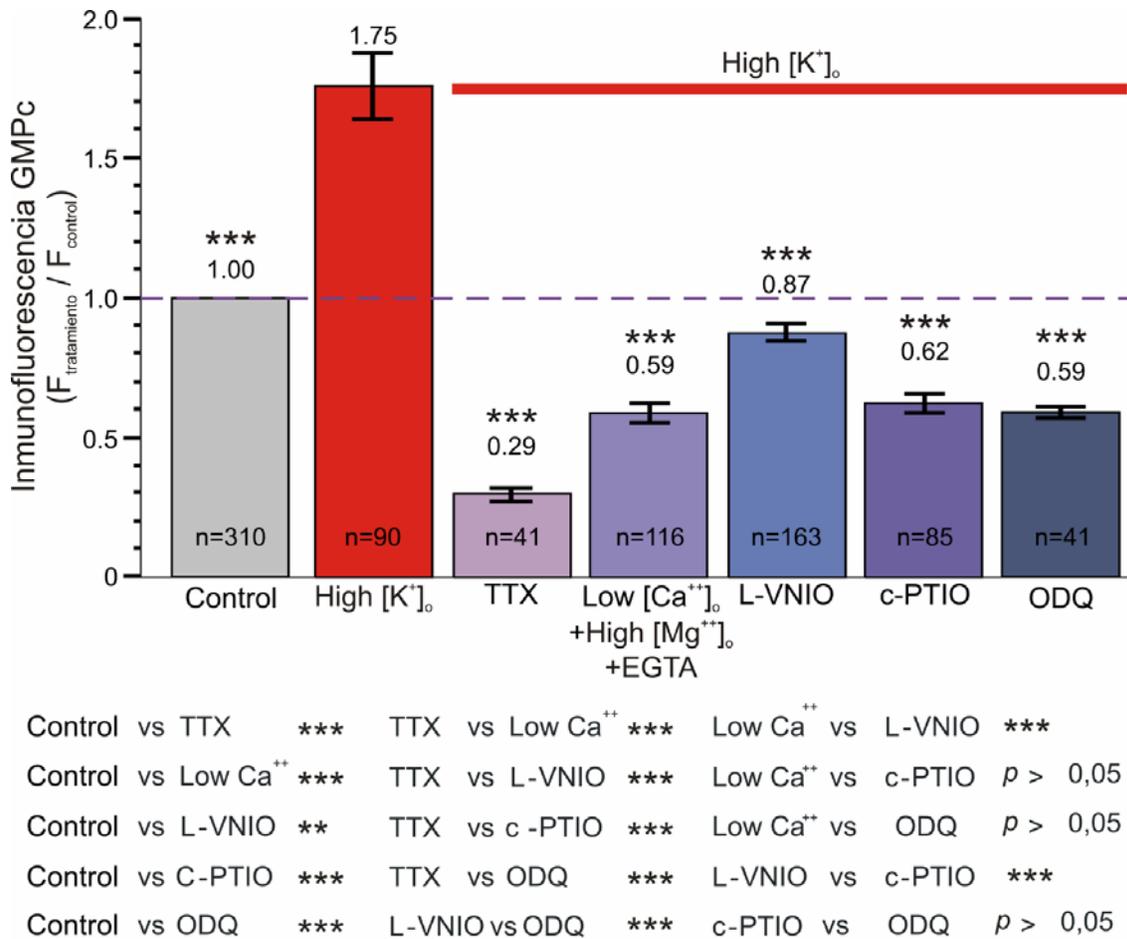


Figura 38: La transmisión anterógrada mediada por NO en el NMT depende de la actividad neural y requiere de Ca²⁺ extracelular, de la activación de la NOSn presináptica, de la difusión de NO y de la activación de la GCs. Gráfica que resume los resultados de la variación de la inmunofluorescencia para GMPC en experimentos estáticos y que permiten analizar la secuencia de eventos que vinculan la depolarización con alto-[K⁺]_o con el aumento de concentración de GMPC en las motoneuronas trigeminales. La TTX, la baja [Ca²⁺]_o, el L-VNIO, el c-PTIO y el ODQ al ser administradas previamente y durante la perfusión con alto-[K⁺]_o bloquean el aumento de la señal inmunofluorescente para GMPC inducida por la depolarización. Nótese que en todos los casos los bloqueantes llevan los valores de inmunofluorescencia por debajo del valor de la situación control lo que aporta evidencias a favor de la producción basal de NO por las fibras nitrérgicas en el NMT. La línea punteada representa el valor de la media correspondiente a la situación control. El número sobre las barras corresponde al valor de la media para cada situación experimental. Los asteriscos sobre las barras representan el valor de p en comparación a la depolarización con alto-[K⁺]_o. Debajo de la gráfica se presentan los valores de p al comparar las otras situaciones experimentales. n = número de células, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001

8.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aquí se ha demostrado que en rodajas de tronco encefálico la administración de solución depolarizante alto-[K⁺]_o incrementa la concentración de NO y de GMPc en las motoneuronas trigeminales NOSn- negativas que contienen GCs (Figuras 24, 25 y 32). Estos resultados pueden ser atribuidos a (1) la liberación de NO desde las fibras delgadas NOSn- positivas como consecuencia del ingreso de Ca²⁺ a través de CCVDs presinápticos durante la actividad neuronal lo cual a su vez (2) activa la NOSn Ca²⁺-calmodulina regulada en las terminales nerviosas llevando a la producción de NO que (3) difunde desde las fibras premotoras e ingresa a las motoneuronas trigeminales en concentraciones adecuadas para (4) activar la GCs e incrementar el GMPc intracelular. Además en el NMT también se detecta producción de NO endógeno y GMPc en condiciones basales. Estos resultados evidencian que en el NMT el NO generado endógenamente por activación de la NOSn puede sostener la señalización anterógrada a pesar de la gran diferencia entre el tamaño de la fuente y el tamaño del blanco. Debido a que la difusión de NO es multidireccional, es necesario explicitar que el término anterógrado hace referencia aquí a la direccionalidad del efecto nitrérgico: el NO liberado desde las fibras premotoras modula la actividad de las motoneuronas postsinápticas. Es importante destacar que aunque en este trabajo se haga hincapié en la transmisión anterógrada, el NO será capaz de actuar en el NMT en forma retrógrada y/o anterógrada en cualquier blanco, celular o subcelular,

existente dentro de su volumen difusión si es que lo alcanza en concentraciones biológicamente efectivas.

8.1.- Las fuentes nitrérgicas que responden al estímulo con alto-[K]^o en el NMT

Debido a que en el NMT del cobayo (1) la NOSn fue detectada exclusivamente en las fibras premotoras y terminales botón-símiles íntimamente asociadas a las motoneuronas trigeminales, y (2) el aumento de GMPc inducido por la depolarización con alto-[K]^o fue inhibido por el inhibidor de la NOSn L-VNIO (Figura 35), es posible concluir que la liberación de NO y consecuente producción de GMPc debe tener origen en dichas fibras. Ni la actividad para la NADPH-d asociada con NOSn (Hope *et al.*, 1991) ni la inmunoreactividad para NOSn fueron detectadas en las motoneuronas trigeminales del cobayo (Abudara *et al.*, 2002). Análogamente en la rata, las motoneuronas trigeminales (Pose *et al.*, 2011b) y del hipogloso (Montero *et al.*, 2008) tampoco presentan maquinaria para la síntesis de NO.

Dado que el "secuestro" extracelular de NO ante la administración de c-PTIO inhibió el incremento de inmunofluorescencia para GMPc inducido por depolarización en las motoneuronas (Figura 36) el NO producido durante la depolarización debe provenir de fuentes extramotoneuronales. La disminución de la señal para DAF-2T y para GMPc provocada por (1) la inhibición de la

actividad neuronal con TTX (Figura 33) y (2) el bloqueo del influjo de Ca^{2+} (Figura 34) apoyan la idea de que la depolarización invade las fibras y terminales NOSn- positivas, y produce la apertura de CCVDs presinápticos permitiendo el influjo de Ca^{2+} lo que activa la NOSn luego de lo cual el NO difunde e invade la motoneuronas donde activa a la GCs.

En preparados de rodajas de corteza y cerebelo de rata se ha reportado la existencia de fibras nerviosas perivasculares correspondientes a interneuronas que expresan NOSn junto con otros neurotransmisores (Cauli *et al.*, 2004; Rancillac *et al.*, 2006; Garthwaite, 2008). En el NMT del cobayo no se ha detectado este tipo de fibras (Abudara *et al.*, 2002). En el caso de que existieran en el NMT de cobayo fibras perivasculares que expresan NOSn aún no descritas, los experimentos aquí desarrollados no permitirían descartar su contribución de NO; pero este aporte en caso de existir debiera ser cuantitativamente menor ya que las fibras perivasculares (1) estarían menos próximas a las motoneuronas que las fibras premotoras y (2) su ubicación tan cercana a los vasos sanguíneos determinaría que el NO liberado sea "secuestrado" por la hemoglobina durante su difusión antes de arribar a las motoneuronas (Lancaster, 1994; 1997). Los astrocitos podrían considerarse como posibles fuentes de NO ya que son capaces de expresar NOSn (Murphy *et al.*, 1993) y por tanto su producción de NO podría ser también inhibida por el L-VNIO, pero como ningún soma fue detectado como NOSn positivo en el NMT (Abudara *et al.*, 2002) serían una fuente nitrérgica improbable en este preparado.

8.2.- Eventuales fuentes productoras de NO en condiciones basales

La señal fluorescente para DAF-2T fue detectada en situación basal en el NMT (Figura 22, patrones II y III). Esto concuerda con que la inhibición por ODQ del aumento de la inmunofluorescencia para GMPc ante alto-[K]_o alcance valores por debajo de los valores de la situación control (Figura 38), lo que señala la existencia de producción basal de GMPc al menos en parte evocada por NO. Dicha producción basal de GMPc dependiente de NO podría estar involucrada en la regulación de la actividad de las motoneuronas.

Al igual que el ODQ también la aplicación del "secuestrador" de NO, el c-PTIO y de la solución extracelular bajo [Ca²⁺]_o+alto [Mg²⁺]_o+EGTA provocaron una inhibición de la señal para GMPc a valores por debajo del control (Figura 38). Los tres bloqueos mencionados fueron de igual intensidad lo que reflejaría que toda la producción basal de GMPc dependiente de la activación de la GCs deriva de fuentes nitrérgicas extraneuronales que necesitan del influjo de Ca²⁺ para producir el mensajero. Esta necesidad de influjo de Ca²⁺ para la inducción de la síntesis de NO también es sustentada por el bloqueo del aumento de la señal DAF-2T post-depolarización observado ante la aplicación de ω-Conotoxin MVIIC y el hecho que las fuentes sean extramotoneuronales es consistente con la no expresión de NOSn en dichas células (Abudara *et al.*, 2002).

Una inhibición de la inmunofluorescencia para GMPc de menor magnitud fue inducida por el bloqueante de la NOSn L-VNIO (Figura 38) lo que reflejaría que parte del GMPc producido basalmente en fuentes extramotoneuronales y

con necesidad de influjo de Ca^{2+} es generado por mecanismos que no involucran a la NOSn y sí probablemente a la actividad basal de otras isoformas NOS. La contribución de la NOSi parece improbable ya que la señal de GMPc basal que se bloquea con el ODQ pero no con el L-VNIO requiere del influjo de Ca^{2+} y la síntesis de NO por la NOSi no requiere de él²¹ (Weaver *et al.*, 2005). Por lo tanto el componente de la señal basal de GMPc que es sensible al ODQ y al PTIO pero no al L-VNIO debería ser resultado de la actividad tónica de la NOSe. Estos resultados que indican que la producción basal de GMPc dependiente de la activación de la GCs requiere de la biosíntesis de NO son congruentes con la potente inhibición de la presencia de señal DAF-2T en el NMT en situación basal inducida por la administración de L-NAME a las rodajas (Figura 22B, incremento del patrón I en casi un 100%). Alderton *et al.*, (2001) definen a los inhibidores de NOS con una selectividad de 10 a 50 veces mayor para una isoforma de NOS que para otra como “parcialmente selectivos”; en este sentido el L-NAME es un inhibidor de NOS 50 veces más selectivo para NOSn que para NOSi y 20 veces más selectivo para NOSe que para NOSi (Boer *et al.*, 2000) y por tanto parcialmente selectivo. Esto determina que si bien no es posible descartar totalmente el papel de la NOSi en la contribución de NO en situación basal, sí se torne muy fuerte la hipótesis de que el principal aporte corresponde al de las isoformas constitutivas de la isoenzima: NOSn y NOSe. La NOSe en el SNC se encuentra principalmente expresada en las células endoteliales capilares. La contribución al

²¹ En NOSi clonada y caracterizada de pulmón de cobayo se ha determinado que su calcio-dependencia es intermedia entre la de NOSn de rata y la de NOSi de humano (Alderton *et al.*, 2001).

procesamiento neural de NO derivado de activación de NOSe ha sido reportado en rodajas de hipocampo (Hopper y Garthwaite, 2006) y en nervio óptico aislado de rata (Garthwaite *et al.*, 2006).

Tanto el componente de la señal de GMPc generado por GCs que es sensible a L-VNIO como el que no es sensible a éste fueron prevenidos por la aplicación de TTX, lo que indica que para ambos componentes la actividad neural está involucrada en la biosíntesis basal de NO a través de la NOSn y de otra isoforma de NOS respectivamente. Esta necesidad de actividad neural para la inducción de la síntesis de NO también es sostenida por el bloqueo del aumento de la señal DAF-2T post-depolarización observado ante la aplicación de TTX. En cuanto a la vinculación de la actividad neural con la activación de la NOSe se ha descrito que fibras nerviosas colinérgicas inervan las células endoteliales de los capilares cerebrales (Benagiano *et al.*, 2000) por lo que la liberación de acetilcolina durante la actividad espontánea podría activar la NOSe. Por último como ya se ha mencionado no se han identificado en el NMT somas que expresen NOSn por lo que tampoco los astrocitos parecen ser fuentes de NO en situación basal.

Existe un componente de la señal de GMPc que no es bloqueado por el ODQ detectado con valores por debajo de los valores del control (Figura 38); dicha presencia de GMPc basal no sería generada a través de la activación de la GCs y podría corresponder a la actividad basal de la guanilatociclasa de membrana que se encuentra expresada en el SNC y es activada por otros mensajeros como por ejemplo el péptido natriurético (Kuhn, 2009). Esta inmunofluorescencia para el GMPc ODQ-independiente posee dos

componentes: a) un componente sensible a la TTX lo que refleja que la actividad neural estaría involucrada en su generación y en concordancia que algún/nos neurotransmisor/es estarían involucrados en su producción y b) otro componente insensible a la TTX que no requiere de actividad neural para el desencadenamiento de su síntesis y podría estar ligado *in vivo* a la acción de algún tipo de hormona que utilizara al GMPc como segundo mensajero intracelular (Rekling *et al.* 2000; Kuhn, 2003; Kleppisch y Robert Feil, 2009).

8.3.- En el NMT la extensión de la señal de NO permite el reclutamiento de grupos de motoneuronas

La concentración de NO es máxima en la superficie de la fuente y decrece a medida que el NO difunde desde ella (Lancaster, 1994; 1997; Philippides *et al.*, 2005). El tamaño de la fuente es un determinante crítico de las dinámicas de producción y difusión del NO: cuanto más fina es la fuente menor es la concentración de NO en su superficie y más rápidamente declina la concentración con la distancia (Philippides *et al.*, 2005). Como corolario de esto se espera que: 1) la activación diferencial de fibras de distintos tamaños resulte en una liberación diferencial de NO y 2) que la distancia entre fuentes y blancos se relacione inversamente con la potencia de la señal del NO (Park *et al.*, 1998). Debido a que la mayoría de las fibras que expresaron NOSn en el NMT son finas (0,6 – 1,6 μm de diámetro) y están en proximidad a las dendritas de las motoneuronas (Abudara *et al.*, 2002) es posible hipotetizar que una única fibra puede producir una cantidad suficiente de NO como para

afectar sólo a las dendritas adyacentes. El umbral de detección de NO del DAF-2 DA para formar DAF-2T es de 5 nM (Kojima *et al.*, 1998a). De acuerdo con el modelo de Philippides *et al.* (2005) para fibras de 1 μm de diámetro dicha concentración es detectada hasta 30 - 35 μm de distancia desde su superficie, por lo tanto para distancias mayores el marcador no detectaría NO; para fibras de menor diámetro la concentración umbral para la detección se alcanzaría sólo a distancias aún menores de la superficie de la fuente. Si extrapolamos a nuestro preparado biológico el modelo propuesto por Philippides *et al.*, (2005), la predicción sería que una única fibra de entre 0,6 y 1,6 μm de diámetro podría alcanzar una producción máxima de 10 nM y 50 nM respectivamente y la concentración de NO podría declinar en un 50% de su máximo (5 nM y 25 nM respectivamente) a 4 μm y 6 μm desde la superficie de la fibra, lo cual si bien podría incluir en su dominio a estructuras subcelulares, no llegaría a cubrir el diámetro de las motoneuronas trigeminales (de 20 a 60 μm aproximadamente). Como se ha expuesto en resultados numerosos somas de motoneuronas se tornan DAF-2T positivas cuando múltiples y dispersas fibras delgadas nitrérgicas son estimuladas simultáneamente. Por lo tanto es posible concluir que el NO producido por dichas fibras en forma cooperativa (Philippides *et al.*, 2005) fue suficiente para llenar los somas grandes de las motoneuronas (Figuras 24 y 25) lo cual puede tener implicancias *in vivo* dado que el desplazamiento de un potencial de acción a través de los axones nitrérgicos premotores puede evocar la difusión de NO desde múltiples terminales hacia las motoneuronas postsinápticas. Por otra parte las fibras delgadas nitrérgicas del NMT se disponen dispersas en forma similar a un plexo

laxo (Abudara *et al.*; 2002) lo que ofrecería ciertas ventajas al momento de generar una señal en volumen que complemente la neurotransmisión sináptica clásica ya que, plexos de fibras finas y dispersas generan un volumen de señal mayor, con una concentración más homogénea y más persistente y con una selectividad regional mayor que fuentes de mayor tamaño (Philippides *et al.*, 2005). La uniformidad espacial de la señal en los plexos haría que, más que cada fuente individual afectara a un blanco individual, las fuentes afectarían los blancos ubicados en el volumen en el cual el plexo y los blancos coexisten.

La concentración de NO requerida para la activación de la GCs (concentración de NO biológicamente efectiva) (Griffiths *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004) es más baja que el umbral de detección de NO por el DAF-2T (Kojima *et al.*, 1998a), por lo tanto la síntesis de GMPc debiera tener lugar en las estructuras celulares que presenten fluorescencia DAF-2T y además contengan la GCs. En concordancia con esto las motoneuronas también presentaron aumento de la inmunofluorescencia para GMPc luego de la depolarización (Figura 32) lo que indica que en ellas el NO podría ejercer un papel modulador de su actividad (aspecto que se analizará más adelante).

8.4.- Posibles efectos de la activación de la vía NO/GMPc sobre la actividad neuronal

Como hemos demostrado en esta tesis, el NO endógeno aumenta la síntesis de GMPc en las motoneuronas trigeminales a través de la activación de la GCs. ¿Qué consecuencias tendrá la producción aumentada de este

nucleótido sobre la actividad de las motoneuronas trigeminales? La liberación de NO puede ejercer un efecto excitatorio en las motoneuronas trigeminales (ver Figura 2B en Fernández-Alvarez *et al.*, 2011) al igual que otros modelos por acción directa sobre corrientes iónicas postsinápticas (Montero *et al.*, 2008) o indirecta sobre la liberación presináptica de neurotransmisores (Garthwaite, 2008) lo cual podría a su vez modular la excitabilidad neuronal. En las motoneuronas trigeminales podrían tener lugar ambos mecanismos ya que la aplicación de dadores de NO incrementa la corriente catiónica I_h así como también la actividad sináptica (Abudara *et al.*, 2002). Efectivamente en rodajas de tronco encefálico que contienen al NMT, al administrar exógenamente dadores de NO por perfusión se produce depolarización y disminución de la rebase de las motoneuronas trigeminales, junto con un aumento de la amplitud y la frecuencia del ruido sináptico excitatorio e inhibitorio registrado en ellas en ausencia de estimulación a entradas sinápticas (Abudara *et al.*, 2002). Estos efectos fueron imitados mediante la administración de análogos del GMPc e inhibidos por ODQ. También se observa con este tratamiento un aparente incremento en la corriente la corriente catiónica I_h .

La evidencia de que el DETA/NO, administrado en igual concentración (2 mM) y en el mismo preparado biológico que en los experimentos electrofisiológicos mencionados determina el ingreso de NO a las motoneuronas trigeminales (Figuras 26C y 27) y la producción de GMPc en ellas (Figura 31) sugiere que al menos parte de los efectos mediados por el GMPc podrían ejercerse directamente sobre dichas células. El flujo de NO

exógeno que libera el DETA/NO 2 mM en las rodajas y con el cual se han detectado efectos electrofisiológicos sobre la actividad neuronal es de 1,54 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Abudara *et al.*, 2002). La concentración en que el NO endógeno es producido ante la depolarización o en condiciones basales en el NMT no es conocida. Dado que el umbral de detección del DAF-2T es de 5 nM (Kojima *et al.*, 1998a) es probable que la liberación de NO endógeno alcance en la motoneuronas por lo menos en ese valor, el cual está incluido en el rango de concentración de NO requerido para activar a la GCs (Artz *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2003). Coincidentemente la detección dentro de las motoneuronas de GMPc producido por activación de la GCs en condiciones basales y que la depolarización induzca su incremento sugieren que la concentración de NO endógeno producido en ambos casos es efectiva para desencadenar efectos biológicos en las motoneuronas como por ejemplo la modulación de corrientes iónicas.

En las motoneuronas de los núcleos facial, hipogloso y trigémino una corriente persistente de Na^+ (INap) está activada por debajo del umbral de disparo; esa corriente es capaz de acelerar la depolarización subumbral de la membrana hacia el umbral de la espiga (Rekling *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 1989). Particularmente en las motoneuronas del NMT del cobayo una rectificación de entrada previa al umbral de disparo en respuesta a pulsos de corriente depolarizante fue asociada con la INap como corriente subyacente (Chandler *et al.*, 1994). Además la INap influencia la dinámica de los trenes de descarga en las motoneuronas trigeminales por contribuir a su finalización (Del Negro *et al.*, 1999). Esta INap ha sido propuesta como blanco de efectos

regulatorios del NO en las motoneuronas (Montero *et al.*, 2008). En concordancia con esto la INap podría ser modulada por el NO endógeno en las motoneuronas trigeminales ya que la aplicación de azul de metileno (inhibidor de la GCs y de la NOSn, (Hobbs, 1997) a rodajas de tronco encefálico de cobayo provoca una disminución del retardo en el inicio del potencial de acción en dichas células frente a estímulos depolarizantes (Fernández-Alvarez *et al.*, 2011); esto sugiere la influencia inhibidora del NO sobre la INap de las motoneuronas del NMT. La perfusión con azul de metileno también generó hiperpolarización e incremento de la rebase de las motoneuronas robusteciendo la idea de que al menos *in vitro* la liberación endógena basal de NO modula las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas (Fernández-Alvarez *et al.*, 2011); estos datos conciben con la depolarización y disminución de la rebase generada por dadores de NO en el mismo preparado (Abudara *et al.*, 2002).

8.5.- La segregación espacial entre las terminales axónicas premotoras y las fuentes somatodendríticas le confiere propiedades funcionales particulares a la señalización por NO en el NMT

Los somas de origen de las fibras nitrérgicas del NMT se han identificado por marcado retrógrado en la formación reticular bulbar (Fabbiani *et al.*, 2005; Pose *et al.*, 2005) y en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (McGregor *et al.*,

2005). Por lo tanto las motoneuronas son afectadas por el NO aportado desde el dominio axo-terminal localizado en el NMT y no por el compartimiento somato-dendrítico que no está incluido en las rodajas de tronco encefálico que contienen el NMT. Esto puede otorgarle a la señalización por NO en el NMT propiedades particulares.

Dado que las fuentes axo-terminales producen mucho menos NO que las somatodendríticas son más apropiadas para realizar un ajuste fino de la transmisión (Philippides *et al.*, 2005), es así que por activación discriminada de terminales individuales delgadas la señal de NO podría ser dirigida selectivamente a un grupo determinado de blancos moleculares. Por otra parte el incremento en el Ca^{2+} citosólico que lleva a la formación de NO puede ser mediado diferencialmente por la activación de receptores NMDA glutamatérgicos en el dominio somatodendrítico (Bredt, 2003) y por CCVDs presinápticos en las terminales nitrérgicas (Okada *et al.*, 2004). Entonces, *in vivo*, el campo de difusión del NO que abarca a un grupo de motoneuronas puede ser delimitado por el ajuste de los niveles de Ca^{2+} en la terminal a través de variaciones en el patrón de descarga de las neuronas productoras de NO (Park *et al.*, 1998) o a través de la activación selectiva de receptores presinápticos por neurotransmisores (Okada *et al.*, 2004). Lo último puede llevarse a cabo a través de la acción de neurotransmisores clásicos liberados sinápticamente desde entradas contiguas o desde las propias terminales nitrérgicas donde estos neurotransmisores podrían colocalizarse con la NOSn (Maqbool *et al.*, 1995) como por ejemplo el glutamato (Fabbiani *et al.*, 2005; Pose *et al.*, 2011a). En acuerdo con esto en el capítulo de resultados se ha

presentado evidencia de que el NMDA incrementa el contenido de NO en las motoneuronas trigeminales (Figura 30).

Los sitios de acción del NMDA que inducen el aumento de NO en el NMT (Figura 30) merecen una especial discusión. El receptor NMDA, como ya se ha mencionado, está ligado a la NOSn (Brenman *et al.*, 1996; Brenman y Bredt, 1997; Ishii *et al.*, 2006). El aumento de NO provocado por la acción NMDA sobre receptores ubicados en somas neuronales nitrérgicos debe descartarse porque aunque generalmente la ubicación de los receptores NMDA en neuronas motoras es postináptica (Rekling *et al.*, 2000) no se han detectado somas nitrérgicos en el NMT. Un ejemplo de la vinculación de receptores NMDA presinápticos en la activación de NOSn en el SNC se ha descrito en las fibras paralelas del cerebelo donde el influjo de Ca^{2+} a través de receptores NMDA presinápticos induce la formación de NO que media la LDT (Lev-Ram *et al.*, 1995). Neuronas premotoras que colocalizan NOSn y glutamato y que proyectan al NMT se han descrito en el bulbo del cobayo (Fabbiani *et al.*, 2005) y en la formación reticular bulbar ventromedial del gato (Pose *et al.*, 2011a), pero la presencia de receptores NMDA en sus terminales no ha sido demostrada. Aunque la bibliografía que reporta sobre el papel de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos presinápticos en la modulación de la transmisión sináptica de motoneuronas es escasa (Rekling *et al.*, 2000), en el cuerno dorsal de la médula espinal de la rata los receptores NMDA se localizan en terminales presinápticas inmediatamente adyacentes a los sitios de liberación vesicular en la zona activa (Liu *et al.*, 1994). Se requeriría profundizar en la búsqueda de la colocalización de NOSn y receptores NMDA en

las terminales premotoras del NMT para corroborar si ello podría dar cuenta del incremento de la señal DAF-2T ante la aplicación de NMDA en las rodajas (Figura 30). En este caso la estimulación del receptor NMDA incrementaría la concentración intracelular de Ca^{2+} libre en las terminales nitrérgicas presinápticas con la consiguiente activación de la NOSn y producción y difusión de NO tal como ya se ha reportado en las fibras paralelas de cerebelo (Lev-Ram *et al.*, 1995). Finalmente la eventual activación de receptores NMDA de neuronas premotoras ubicadas en la rodaja (Kim y Chandler, 1995; Trueblood *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 2009) estableciendo sinapsis axo-axónicas con las fibras premotoras nitrérgicas puede además dar cuenta de la activación de la NOSn.

Es así que son múltiples las modalidades por las cuales podría ser modificado selectivamente el contenido de Ca^{2+} en la terminales presinápticas nitrérgicas para ajustar la señal de NO. El reclutamiento diferencial de neuronas adyacentes ante la depolarización con alto- $[\text{K}]_o$ (Figura 25) sugiere que la señalización por NO presenta mecanismos de direccionamiento hacia ciertos blancos específicos. Esto contribuiría al establecimiento de redes químicas dinámicas de comunicación (Agnati *et al.*, 2006a; 2006b) que determinarían el significado de la información transferida por el mensajero.

La segregación espacial existente entre la ubicación de los somas de origen de las fibras nitrérgicas y dichas fibras es indispensable para que el ajuste de la señal de NO sea posible dado que la "nube" de NO originada desde varios somas individuales puede derivar en una señal ambigua y relativamente inespecífica que enmascarare la liberación selectiva de NO desde fibras

delgadas en el NMT. Este tipo de segregación anatómica puede ser imprescindible cuando se intenta aumentar la precisión y fidelidad de la señal nitrérgica (Ott *et al.*, 2007) que como ya se ha mencionado estará delineada por el tamaño de la fuente, la proximidad entre fuentes y blancos y las características del blanco (Lancaster, 1997).

8.6.- Conclusiones generales

En conclusión, se ha demostrado aquí la capacidad de fuentes nitrérgicas pequeñas presinápticas de generar en forma cooperativa suficiente NO endógeno como para alcanzar grandes somas postsinápticos y sustentar una transmisión anterógrada a pesar de lo dispar de la relación tamaño de la fuente/tamaño del blanco y de la dispersa distribución de las fuentes. En el NMT, la señal nitrérgica podría modular y coordinar la actividad de un conjunto de motoneuronas trigeminales durante la masticación, el acarreo o la mordida. El ajuste del Ca^{2+} intracelular por la activación diferencial de fibras nitrérgicas o de receptores presinápticos en las terminales nitrérgicas podría ser una estrategia para afinar y delimitar el campo de difusión del NO y diseñar patrones de conectividad (redes de redes) en el NMT.

9.- RESUMEN DE LA TESIS

La capacidad de señalización del óxido nítrico (NO) está decisivamente determinada por la extensión de su volumen de difusión. A su vez dicho volumen depende directa y categóricamente del tamaño, forma y distribución de las fuentes nitrérgicas.

En el sistema nervioso central, el NO es típicamente liberado desde somas postsinápticos ante el influjo de Ca^{++} extracelular a través de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA lo que conlleva a la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) Ca^{++} / calmodulina dependiente. El NO generado y liberado desde estos somas "fuente" afecta en forma retrógrada a "blancos" presinápticos de menor tamaño. En contraste con este escenario, en el núcleo motor del trigémino del cobayo (NMT) el NO se produce en terminales premotoras "fuente" delgadas y dispersas que expresan la NOSn e inervan motoneuronas postsinápticas "blanco" de gran tamaño. Dichas motoneuronas no expresan la NOSn y contienen la enzima guanilato-ciclasa soluble (GCs) que se activa por acción del NO. En este contexto el pequeño cociente entre el tamaño de las fuentes y el tamaño de los blancos y la dispersa distribución de las fuentes nitrérgicas, hacen poner en duda si en el NMT el NO endógeno es suficiente para sostener una señalización anterógrada entre las terminales premotoras y las motoneuronas post-sinápticas.

En rodajas de tronco encefálico que contienen el NMT se identificaron por marcado retrógrado con CM-DiI motoneuronas trigeminales visualizadas por microscopia de epifluorescencia y/o confocal. En dichas células, NOSn-negativas, se evaluó la presencia de NO mediante el marcador DAF-2 DA y la actividad de la GCs mediante cuantificación de la inmunofluorescencia para GMPc.

La depolarización de múltiples fibras nitrérgicas premotoras mediante la administración de solución con alta concentración de K^+ aumentó la señal fluorescente para DAF-2T y la inmunofluorescencia para GMPc en las motoneuronas con respecto a la situación control. Dichos efectos: a) requirieron de la presencia de Ca^{++} extracelular (activador fisiológico de la NOSn) y de la apertura de canales de Ca^{++} voltaje dependientes presinápticos; b) fueron imitados por dadores de NO; y c) fueron bloqueados por inhibidores de la NOSn, inhibidores de la GCs, y por maniobras que silencian la actividad neuronal o impiden la difusión de NO.

Estos resultados indican que el NO liberado presinápticamente durante la activación neuronal en el NMT alcanza a las motoneuronas en concentraciones suficientes para activar a la GCs. Se concluye, que en este modelo, el NO generado por fibras delgadas y dispersas es efectivo como neuromodulador anterógrado en el SNC a pesar del bajo cociente entre el tamaño de las fuentes y el tamaño de los blancos y de la dispersa distribución de las fuentes. Se propone que, en forma similar a lo que ocurre en la neurotransmisión clásica, los niveles intraterminales de Ca^{++} modularían la liberación de NO y por lo tanto su señalización espacial dentro del NMT.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abudara V, Fernández-Alvarez A, Chase MH, Morales FR. (2002) Nitric oxide as an anterograde neurotransmitter in the trigeminal motor pool. *J Neurophysiol* 88: 497-506.

Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Ozini I, Toffano G, Ferraguti F. (1986) A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol Scand* 128: 201-207.

Agnati LF, Fuxe K. (2000) Volume transmission as a key feature of information handling in the central nervous system possible new interpretative value of the Turing's B-type machine. *Prog Brain Res* 125: 3-19.

Agnati, L.F., Santarossa, L., Genedani, S., Canela, E.I., Leo, G., Franco, R., Woods, A., Lluís, C., Ferrè, S., Fuxe, K. (2004). On the nested hierarchical organization of CNS: basic characteristics of neuronal molecular networks. In: Erdi, P., Esposito, A., Marinaro, M., Scarpetta, S. (Eds.), *Computational Neuroscience: Cortical Dynamics*, Lecture Notes in Computer Sciences. Springer, Berlin, pp. 24–54.

Agnati LF, Leo G, Zanardi A, Genedani S, Rivera A, Fuxe K, Guidolin D. (2006a) Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. *Acta Physiol (Oxf)* 187: 329-344.

Agnati LF, Zunarelli E, Genedani S, Fuxe K. (2006b) On the existence of a global molecular network enmeshing the whole central nervous system: physiological and pathological implications. *Curr Protein Pept Sci* 7: 3-15.

Agnati LF, Genedani S, Leo G, Rivera A, Guidolin D, Fuxe K. (2007) One century of progress in neuroscience founded on Golgi and Cajal's outstanding experimental and theoretical contributions. *Brain Res Rev* 55: 167-189.

Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, Fuxe K. (2010) Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 64: 137-159.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.

Alger BE, Nicoll RA. (1982) Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptor on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol* 328: 125-141.

Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD. (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87: 1025-1035.

Ariano MA, Lewicki JA, Brandwein HJ, Murad F. (1982) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1316-1320.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, 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.

Artz JD, Toader V, Zavorin SI, Bennett BM, Thatcher GR. (2001) In vitro activation of soluble guanylyl cyclase and nitric oxide release: a comparison of NO donors and NO mimetics. *Biochemistry* 40: 9256-9264.

Balcerzyk A, Soszynski M, Bartosz G. (2005) On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 39: 327-335.

Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH. (2001) Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24: 99-106.

Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: 1424-1437.

Bellamy TC, Garthwaite J (2001) Sub-second kinetics of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in intact cerebellar cells. *J Biol Chem* 276: 4287-4292.

Bellamy TC, Garthwaite J. (2002) The receptor-like properties of nitric oxide-activated soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Mol Cell Biochem* 230: 165-176.

Bellamy TC, Griffiths C, Garthwaite J. (2002) Differential Sensitivity of Guanylyl Cyclase and Mitochondrial Respiration to Nitric Oxide Measured Using Clamped Concentrations *J Biol Chem* 277: 31801-31807.

Benagiano V, Virgintino D, Rizzi A, Errede M, Bertossi M, Troccoli V, Roncali L, Ambrosi G. (2000) Cholinergic nerve fibres associated with the microvessels of the human cerebral cortex: a study based on monoclonal immunocytochemistry for choline acetyltransferase. *Eur J Histochem* 44: 165-169.

Bennett MV, Goodenough DA. (1978) Gap junctions, electrotonic coupling, and intercellular communication. *Neurosci Res Program Bull* 16: 1-486.

Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-1336.

Bjelke B, England R, Nicholson C, Rice ME, Lindberg J, Zoli M, Agnati LF, Fuxe K. (1995) Long distance pathways of diffusion for dextran along fibre bundles in brain. Relevance for volume transmission. *Neuroreport* 6: 1005-1009.

Boehning D, Snyder SH. (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26: 105-131.

Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. (2000) The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* 58: 1026-1034.

Bon CL, Garthwaite J. (2001) Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Neurosci* 14: 585-594.

Bredt DS, Snyder SH. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.

Bredt DS, Snyder SH. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11.

Bredt DS. (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31: 577-596.

Bredt DS. (2003) Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. *J Cell Sci* 116: 9-15.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767.

Brenman JE, Bredt DS. (1997) Synaptic signalling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol* 7: 374-378.

Broillet M, Randin O, Chatton J. (2001) Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett* 491: 227-232.

Brown LA, Key BJ, Lovick TA. (1999). Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. *J Neurosci Methods* 92: 101-110

Brown LA, Key BJ, Lovick TA. (2000) Fluorescent imaging of nitric oxide production in neuronal varicosities associated with intraparenchymal arterioles in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 294: 9-12.

Buerk DG. (2001) Can we model nitric oxide biotransport? A survey of mathematical models for a simple diatomic molecule with surprisingly complex biological activities. *Annu Rev Biomed Eng* 3: 109-143.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. (1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346-7.

Cao L, Eldred WD. (2001) Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in turtle retina: electron immunocytochemistry. *Vis. Neurosci* 18: 949-960.

Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA. (2006) Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci* 31: 231-239.

Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. (2004) Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24: 8940-8949.

Chandler SH, Hsiao CF, Inoue T, Goldberg LJ (1994) Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. *J Neurophysiol* 71:129-145.

Cheramy A, Leviel V, Glowinski J. (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289: 537-542.

Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS. (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274: 27467-27473.

Cuello AC. (1983) Nonclassical neuronal communications. *Fed Proc* 42: 2912-2922.

Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. (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.

Dawson TM, Snyder SH. (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14: 5147-5159.

Dawson VL, Dawson TM. (1995) Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 34: 323-342

De Carlos JA, Borrell J. (2007) A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Res Rev* 55: 8-16.

De Vente J, Hopkins DA, Markerink-Van Ittersum M, Emson PC, Schmidt HH, Steinbusch HW. (1998) Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience* 87: 207-241.

De Wied D, Jolles J. (1982) Neuropeptides derived from pro-opiocortin: behavioral, physiological, and neurochemical effects. *Physiol Rev* 62: 976-1059.

Del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH. (1999) Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 81: 1478-1485.

Denicola A, Souza JM, Radi R, Lissi E. (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys* 328: 208-212.

Denicola A, Batthyany C, Lissi E, Freeman BA, Rubbo H, Radi R. (2002) Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *J Biol Chem* 277: 932-936.

Derbyshire ER, Marletta MA. (2009) Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol* 191: 17-31.

Descarries L, Beaudet A, Watkins KC. (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100: 563-588.

Dingledine R, Korn SJ. (1985) Gamma-aminobutyric acid uptake and the termination of inhibitory synaptic potentials in the rat hippocampal slice. *J Physiol* 366: 387-409.

Dobrev D, Andreas K. (1997) Modulation of potassium-evoked [3H]dopamine release from rat striatal slices by voltage-activated calcium channel ligands: effects of omega-conotoxin-MVIIIC. *Neurochem Res* 22: 1085-1093.

Dunn KW, Mayor S, Myers JN, Maxfield FR. (1994) Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology. *FASEB J* 8: 573-582.

Edelman GM, Gally JA. (1992) Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11651-11652.

Espey MG, Thomas DD, Miranda KM, Wink DA. (2002) Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11127-11132.

Fabbiani G, McGregor R, Pose I, Chase M, Morales F. (2005) Different neurotransmitter phenotypes of premotor trigeminal and hypoglossal neurons in the medulla of the guinea pig. Program No.749.7 Abstract viewer/Itinerary planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.

Fernández Alvarez A, Abudara V, Morales FR. (1999) El Oxido Nítrico como Neurotransmisor y Neuromodulador. *Actas de Fisiología* 5: 39-77. <http://www.rau.edu.uy/universidad/medicina/actas5/morales/nitrico.htm>

Fernández Alvarez A, Gómez-Sena L, Fabbiani MG, Budelli R, Abudara V. (2011) Endogenous presynaptic nitric oxide supports an anterograde signaling in the central nervous system. *J Neurochem* 118: 546-557.

Fields RD, Stevens-Graham B. (2002) New views of neuron–glia communication. *Science* 298: 483–690.

Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. (1993) Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* 326: 1-3.

Frade J.G., Barbosa R.M., Laranjinha J. (2009) Stimulation of NMDA and AMPA Glutamate Receptors Elicits Distinct Concentration Dynamics of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices *Hippocampus* 19: 603–611.

Furchgott RF, Jothianandan D. (1991) Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cyclicGMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28: 52-61.

Furuyama T, Inagaki S, Takagi H. (1993) Localizations of alpha 1 and beta 1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 20: 335-344.

Fuxe K, Grobecker H, Hökfelt T, Jonsson G. (1967) Identification of dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine varicosities in a fraction containing nerve ending particles. *Brain Res* 6: 475-80.

Fuxe K, Jonsson G. (1973) The histochemical fluorescence method for the demonstration of catecholamines. Theory, practice and application. *J Histochem Cytochem* 21: 293-311.

Fuxe K, Hökfelt T, Eneroth P, Gustafsson JA, Skett P. (1977) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 196: 899-900.

Fuxe K, Andersson K, Locatelli V, Agnati LF, Hökfelt T, Skirboll L, Mutt V. (1980) Cholecystokinin peptides produce marked reduction of dopamine turnover in discrete areas in the rat brain following intraventricular injection. *Eur J Pharmacol* 67: 329-31.

Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Härfstrand A, Goldstein M. (1988) Studies on the relationship of tyrosine hydroxylase, dopamine and cyclic amp-regulated phosphoprotein-32 immunoreactive neuronal structures and d1 receptor antagonist binding sites in various brain regions of the male rat-mismatches indicate a role of d1 receptors in volume transmission. *Neurochem Int* 13: 179-197.

Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcellino D, Jansson A, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Jacobsen K, Tinner-Staines B, Hagman B, Leo G, Staines W, Guidolin D, Kehr J, Genedani S, Belluardo N, Agnati LF. (2007) From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 55: 17-54.

Fuxe K, Dahlström AB, Jonsson G, Marcellino D, Guescini M, Dam M, Manger P, Agnati L. (2010) The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. *Prog Neurobiol* 90: 82-100.

Gally JA, Montague PR, Reeke GN Jr, Edelman GM. (1990) The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3547-3551.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-8.

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

Garthwaite G, Bartus K, Malcolm D, Goodwin D, Kollb-Sielecka M, Dooldeniya C, Garthwaite J. (2006) Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. *J Neurosci* 26:7730-7740. Erratum in: *J Neurosci* 2006, 26:1 p preceding 8217. Kollb-Sielecka, Martha [corrected to Kollb-Sielecka, Marta].

Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. (2008) *Eur J. Neurosci* 27: 2783-2802.

Golgi C. (1891a) La rete nervosa diffusa degli organi centrali del sistema nervoso. Suo significato fisiologico. *Rend. R. 1st. Lomb. Sci. Lett* 24: 594-603.

Golgi C. (1891b) La rete nervosa diffusa degli organi centrali del sistema nervoso. Suo significato fisiologico. Rend. R. 1st. Lomb. Sci. Lett 24: 656-657.

Griffiths C, Garthwaite J (2001) The shaping of nitric oxide signals by a cellular sink J Physiol 536: 855-862.

Griffiths C, Wykes V, Bellamy TC, Garthwaite J. (2003) A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. Mol Pharmacol 64: 1349-1356.

Gross SS, Wolin MS. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. Annu Rev Physiol 57: 737-769.

Hall CN, Garthwaite J. (2006) Inactivation of nitric oxide by rat cerebellar slices. J Physiol 577:549-567.

Hall CN, Garthwaite J. (2009) What is the real physiological NO concentration in vivo? Nitric Oxide 21: 92-103.

Haugland RP (2002) Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes, Inc. Ninth edition. Ed. Gregory J, Spence MTZ, Johnson I.

Herkenham M. (1987) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. Neuroscience 23: 1-38.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 150-166.

Hill BG, Dranka B, Bailey SM, Lancaster JR Jr., Darley-Usmar VM. (2010) What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology J Biol Chem 285: 19699-19704.

Hobbs AJ. (1997) Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. Trends Pharmacol Sci 18: 484-451.

Hofmann M, Spano PF, Trabucchi M, Kumakura K. (1977) Guanylate cyclase activity in various rat brain areas. J Neurochem 29:395-396.

Hofmann MH, Bleckmann H. (1999) Effect of temperature and calcium on transneuronal diffusion of DiI in fixed brain preparations. J Neurosci Methods 88: 27-31.

Honig MG, Hume RI. (1986) Fluorescent Carbocyanine Dyes Allow Living Neurons of Identified Origin to Be Studied in Long-Term Cultures. The Journal of Cell Biology 103: 171-187.

Honig MG, Hume RI. (1989a) Carbocyanine dyes. Novel markers for labelling neurons. Trends Neurosci 12, 336-338.

Honig MG, Hume RI. (1989b) DiI and DiO: Versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. Trends Neurosci 12: 333-335, 340-341.

Hope BT, Michael GJ, Knifge KM, Vincent SR. (1991) Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88: 2811-2814.

Hopper RA, Garthwaite J (2006) Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 26: 11513-11521.

Hrabetová S, Hrabe J, Nicholson C. (2003) Dead-space microdomains hinder extracellular diffusion in rat neocortex during ischemia. *J Neurosci* 23: 8351-8359.

Huston E, Cullen GP, Burley JR, Dolphin AC. (1995) The involvement of multiple calcium channel sub-types in glutamate release from cerebellar granule cells and its modulation by GABAB receptor activation. *Neuroscience* 68: 465-478.

Ishii H, Shibuya K, Ohta Y, Mukai H, Uchino S, Takata N, Rose JA, Kawato S. (2006) Enhancement of nitric oxide production by association of nitric oxide synthase with N-methyl-D-aspartate receptors via postsynaptic density 95 in genetically engineered Chinese hamster ovary cells: real-time fluorescence imaging using nitric oxide sensitive dye. *J Neurochem* 96:1531-1539.

Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA, Snyder SH. (1998) CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20: 115-124.

Jaffrey SR, Benfenati F, Snowman AM, Czernik AJ, Snyder SH. (2002) Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3199-3204.

James LR, Griffiths CH, Garthwaite J, Bellamy TC. (2009) Inhibition of nitric oxide-activated guanylyl cyclase by calmodulin antagonists bph_416 *British Journal of Pharmacology*, 158: 1454-1464.

Jansson A, Lippoldt A, Mazel T, Bartfai T, Ogren SO, Syková E, Agnati LF, Fuxe K. (2000) Long distance signalling in volume transmission. Focus on clearance mechanisms. *Prog Brain Res* 125: 399-413.

Joshi MS, Ferguson TB Jr, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR Jr. (2002) Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10341-10346.

Jourd'heuil D. (2002) Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 33: 676-684.

Kalia M, Fuxe K, Goldstein M, Harfstrand A, Agnati LF, Coyle JT. (1984) Evidence for the existence of putative dopamine-, adrenaline- and noradrenaline-containing vagal motor neurons in the brainstem of the rat. *Neurosci Lett* 50: 57-62.

Kalia M, Richter D. (1985) Morphology of physiologically identified slowly adapting lung stretch receptor afferents stained with intra-axonal horseradish peroxidase in the nucleus of the tractus solitarius of the cat. II. An ultrastructural analysis. *J Comp Neurol* 241: 521-535.

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

Kim YI, Chandler SH. (1995) NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 74: 334-346.

Kimura M, Yamanishi Y, Hanada T, Kagaya T, Kuwada M, Watanabe T, Katayama K, Nishizawa Y. (1995) Involvement of P-type calcium channels in high potassium-elicited release of neurotransmitters from rat brain slices. *Neuroscience* 66: 609-615.

Kiss PJ, Vizzi ES. (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24: 211-215.

Kleppisch T, Robert Feil (2009) cGMP Signalling in the Mammalian Brain: Role in Synaptic Plasticity and Behaviour In *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications, Handbook of Experimental Pharmacology* 191: 549-579, DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_24

Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Progress in Neurobiology* 62: 327-351.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. (1998a) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: 2446-2453.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Tanaka J, Kudo Y, Nagano T. (1998b) Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport* 15: 3345-3348.

Kojima H, Hirata M, Kudo Y, Kikuchi K, Nagano T. (2001) Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. *J Neurochem* 76: 1404-1410.

Kraus-Friedmann N. (2000) Cyclic nucleotide-gated channels in non-sensory organs *Cell Calcium* 27: 127-138.

Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 62: 505-515.

Kuhn M, Völker K, Schwarz K, Carbajo-Lozoya J, Flögel U, Jacoby C, Stypmann J, van Eickels M, Gambaryan S, Hartmann M, Werner M, Wieland T, Schrader J, Baba HA. (2009) The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 119: 2019-2030.

Kuhn M. (2003) Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 93: 700-709.

Lancaster JR Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8137-8141.

Lancaster JR Jr. (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1: 18-30.

Larry R Squire, Floyd E Bloom, Susan K McConnell, James L Roberts, Nicholas C Spitzer & Michael J Zigmond (2003) *Fundamental Neuroscience*, Reprint of Second Edition 1999 Academic Press

Ledo A, Barbosa RM, Gerhardt GA, Cadenas E, Laranjinha J. (2005) Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17483-17488.

Leikert JF, Rathel TR, Muller C, Vollmar AM, Dirsch VM. (2001) Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett* 506: 131-134.

Leinders-Zufall T, Rosenboom H, Barnstable CJ, Shepherd GM, Zufall F. (1995) A calcium-permeable cGMP-activated cation conductance in hippocampal neurons. *Neuroreport*; 6: 1761-1765.

Lev-Ram V, Makings LR, Keitz PF, Kao JP, Tsien RY. (1995) Long-term depression in cerebellar Purkinje neurons results from coincidence of nitric oxide and depolarization-induced Ca^{2+} transients. *Neuron* 15: 407-415.

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. (1994) Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8383-8387.

Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR Jr. (1998) Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273: 18709-18713.

Llinas RR, Moreno H (2004). Calcium channels in presynaptic terminals. *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley and Sons Ltd. (www.els.net)

Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tombouliant P. (1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 193: 1076-1082.

Maqbool A, Batten TF, McWilliam PN. (1995) Co-localization of neurotransmitter immunoreactivities in putative nitric oxide synthesizing neurones of the cat brain stem. *J Chem Neuroanat* 8: 191-206.

Mariño J, Cudeiro J. (2003) Nitric oxide-mediated cortical activation: a diffuse wake-up system. *J Neurosci* 23: 4299-4307.

Matsubayashi Y, Iwai L, Kawasaki H. (2008) Fluorescent double-labeling with carbocyanine neuronal tracing and immunohistochemistry using a cholesterol-specific detergent digitonin. *J Neurosci Methods* 174: 71-81.

Mayer B. (1995) Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. In: Nitric Oxide in the Nervous System. Academic Press Limited. (Ed.) S. R. Vincent. pp 21 - 42.

McGregor R, Damian A, Fabbiani G, Torterolo P, Pose I, Chase M, Morales FR. (2005) Direct hypothalamic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde tracer study. *Neuroscience* 136: 1073-1081.

McLean S, Rothman RB, Jacobson AE, Rice KC, Herkenham M. (1987) Distribution of opiate receptor subtypes and enkephalin and dynorphin immunoreactivity in the hippocampus of squirrel, guinea pig, rat, and hamster. *J Comp Neurol* 255: 497-510.

Meulemans, A. (1994). Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosci Lett* 171: 89-93.

Miki N, Kawabe Y, Kuryama K. (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 851-856.

Mo E, Amin H, Bianco IH, Garthwaite J. (2004) Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J Biol Chem* 279: 26149-26158.

Molecular Probes, Inc. (2005) DiI Derivatives for Long-Term Cellular Labeling Product Information MP 06999.

Moller M, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A. (2005) Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 280: 8850-8854.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38: 1709-1715.

Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. (1994) Role of NO producción in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263: 973-977.

Montero, F, Portillo, F, González-Forero, D and Moreno-López, B (2008) The nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates the inspiratory-related activity of hypoglossal motoneurons in the adult rat. *Eur J Neurosci* 28: 107-116.

Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP. (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 16: 323-328.

Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. (2009) Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal* 2: re2. doi: 10.1126/scisignal.268re2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744355/pdf/nihms-126255.pdf>

Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T. (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett* 427: 263-266.

Napper RM, Harvey RJ. (1988) Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *J Comp Neurol* 274: 168-177.

Nicholson C. (1999) Signals that go with the flow. *Trends Neurosci* 22: 143-145.

Nishimura Y, Schwindt PC, Crill WE. (1989) Electrical properties of facial motoneurons in brainstem slices from guinea pig. *Brain Res* 502: 127-142.

Okada D, Yap CC, Kojima H, Kikuchi K, Nagano T. (2004) Distinct glutamate receptors govern differential levels of nitric oxide production in a layer-specific manner in the rat cerebellar cortex. *Neuroscience* 125: 461-472.

Olgart C, Gustafsson LE, Wiklund NP. (2000) Evidence for nonvesicular nitric oxide release evoked by nerve activation. *Eur J Neurosci* 12: 1303-1309.

Ott SR., Philippides A, Elphick MR., O'Shea M. (2007) Enhanced fidelity of diffusive nitric oxide signalling by the spatial segregation of source and target neurones in the memory centre of an insect brain. *Eur J Neurosci* 25: 181-190.

Pang YW, Ge SN, Nakamura KC, Li JL, Xiong KH, Kaneko T, Mizuno N. (2009) Axon terminals expressing vesicular glutamate transporter VGLUT1 or VGLUT2 within the trigeminal motor nucleus of the rat: origins and distribution patterns. *J Comp Neurol* 512: 595-612.

Park JH, Straub VA, O'Shea M. (1998) Anterograde signaling by nitric oxide: characterization and in vitro reconstitution of an identified nitrergic synapse. *J Neurosci* 18: 5463-5476.

Pfaus JG. (1999) Neurobiology of sexual behavior. *Curr Opin Neurobiol* 9: 751-758.

Philippides A, Husbands P, O'Shea M. (2000) Four-dimensional neuronal signaling by nitric oxide: a computational analysis. *J Neurosci* 20: 1199-1207.

Philippides A, Ott SR, Husbands P, Lovick TA, O'Shea M. (2005) Modeling cooperative volume signaling in a plexus of nitric oxide synthase-expressing neurons. *J Neurosci* 25: 6520-6532.

Photowala H, Freed R, Alford S. (2005) Location and function of vesicle clusters, active zones and Ca²⁺ channels in the lamprey presynaptic terminal. *J Physiol* 569: 119-135.

Pose I, Fung S, Sampogna S, Chase MH, Morales FR. (2005) Nitrergic innervation of trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat. *Brain Res* 1041: 29-37.

Pose I, Sampogna S, Chase MH, Morales FR. (2011a) Nitrergic ventro-medial medullary neurons activated during cholinergically induced active (rapid eye movement) sleep in the cat. *Neuroscience* 172: 246-255.

Pose I, Silveira V, Morales FR. (2011b) Inhibition of excitatory synaptic transmission in the trigeminal motor nucleus by the nitric oxide-cyclicGMP signaling pathway. *Brain Res* 1393: 1-16.

Radi R. (1996) Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol* 9: 828-835.

Ragnarson B, Bengtsson L, Haegerstrand A. (1992) Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry* 97: 329-333.

Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS. (1986) Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science* 232: 232-235.

Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong XK, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B. (2006) Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J Neurosci* 26: 6997-7006.

Rand MJ, Li CG. (1995) Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* 57: 659-682.

Rapisarda C, Bacchelli B. (1977) The brain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *Arch Sci Biol* 61: 1-37.

Räthel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM. (2003) Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. *Biol Proced Online* 5: 136-142.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746-752.

Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80: 767-852.

Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA. (1985) Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res* 326: 47-63.

Rice ME, Cragg SJ. (2008) Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev* 58: 303-313.

Richmond FJ, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB. (1994) Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J Neurosci Methods* 53: 35-46. Erratum in: *J Neurosci Methods* 1995, 58: 221.

Rodríguez J, Specian V, Maloney R, Jourd'heuil D, Feelisch M. (2005) Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 38: 356-368.

Roy B, Garthwaite J. (2006) Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12185-12190.

Sanchez R, Leonard CS. (1994) NMDA receptor-mediated synaptic input to nitric oxide synthase-containing neurons of the guinea pig mesopontine tegmentum in vitro. *Neurosci Lett* 179: 141-144.

Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. (1992) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 40: 1439-1456.

Schmitt FO. (1984) Molecular regulators of brain function: a new view. *Neuroscience* 13: 991-1001.

Schuman EM, Madison DV. (1994) Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* 263: 532-536.

Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ. (1988) Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons - intracellular injection of HRP. *Brain Res* 461: 238-256.

Snyder SH, Bredt DS. (1991) Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12: 125-128.

Snyder SH. (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science* 257: 494-496.

Snyder SH. (2009) Neurotransmitters, receptors, and second messengers galore in 40 years. *J Neurosci* 29: 12717-12721.

Southam E, Garthwaite J. (1993) The nitric oxide-cyclicGMP signaling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 11: 1267-1277.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.

Stone J, Marletta M. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Biochemistry* 35: 1093-1099.

Suzuki N, Kojima H, Urano Y. (2002) Calcium concentration and ability of 4,5 - Diaminofluorescein to detect NO. *J Biol Chem* 277: 47-49.

Sykova E. (2004) Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience* 129: 861-76.

Tao HW, Poo M. (2001) Retrograde signaling at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11009-11015.

Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 355-360.

Trueblood PR, Levine MS, Chandler SH. (1996) Dual-component excitatory amino acid-mediated responses in trigeminal motoneurons and their modulation by serotonin in vitro. *J Neurophysiol* 76: 2461-2473.

Uemura-Sumi M, Takahashi O, Matsushima R, Takata M, Yasui Y, Mizuno N. (1982) Localization of masticatory motoneurons in the trigeminal motor nucleus of the guinea pig. *Neurosci Lett* 29: 219-224.

Vargová L, Syková E. (2008) Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission. *Physiol Res* 57 Suppl 3: S89-99.

Ventura R, Harris KM. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19: 6897-6906.

Vincent SR, Hope BT. (1992) Neurons that say NO. *Trends Neurosci* 5:108-113.
Vincent SR. (1994) Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress Neurobiol* 42: 129-160.

Vincent SR. (1995) Nitric oxide in the nervous system. Vincent, S.R.(Ed) Academic Press.

Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-784.

Vizi ES, Kiss JP, Lendvai B. (2004) Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem Int* 45: 443-451.

Vizi ES. (1984) Physiological role of cytoplasmic and non-synaptic release of transmitter. *Neurochem Int* 6: 435-440.

von Bohlen und Halbach O. (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide* 9: 217-228.

Wardman P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43: 995-1022.

Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, Pou S, Roman LJ., Rosen GM. (2005) A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: Generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide *Biochimica et Biophysica Acta* 1726: 302 - 308.

Wei JY, Roy DS, Laconte L, Barnstable CJ. (1998) Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 56: 37–64.

West AR, Grace AA. (2004) The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci* 24: 1924-1935.

Wiklund NP, Celtek S, Leone AM, Iversen HH, Gustafsson LE, Brundin L, Furst VW, Flock A, Moncada S. (1997) Visualization of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res* 47: 224-232.

Wood J, Garthwaite J. (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signaling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33: 1235 -1244.

Zhang X, Kim WS, Hatcher N, Potgieter K, Moroz LL, Gillette R, Sweedler JV. (2002) Interfering with nitric oxide measurements; 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem* 277: 48472-48478.

Zoli M, Torri C, Ferrari R, Jansson A, Zini I, Fuxe K, Agnati LF. (1998) The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 136-147.

Zoli M, Jansson A, Syková E, Agnati LF, Fuxe K. (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 20: 142-150.

11.- ENDOGENOUS PRESYNAPTIC NITRIC OXIDE SUPPORTS AN ANTEROGRADE SIGNALING IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM
(Fernández Alvarez et al., 2011, J. Neurochem. 118: 546-557)