

## **- RESULTADOS -**

### **1. Formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios de cerebelo de rata a lo largo del desarrollo del cultivo.**

La capacidad de formar cGMP en respuesta a NO se estudió en cultivos primarios de cerebelo de rata a lo largo del desarrollo del cultivo, etapa en la que se observan grandes cambios en la composición del cultivo y en la morfología de las células. Para ello se eligieron tres momentos diferentes del desarrollo del cultivo: un estadio temprano del cultivo en el que el porcentaje de neuronas es elevado y se localizan mayoritariamente asociadas a astrocitos fusiformes formando agregados (3 días), estadios en los que la astrogliosis está en fase de proliferación y es el tipo celular predominante (7 días) y cultivos en los que la astrogliosis ya es confluyente y las neuronas prácticamente han desaparecido (14 días). Según estudios previos del grupo (Agulló y col., 1995), en este estadio las células microgliales constituyen la principal contaminación celular del cultivo debido a que una vez los astrocitos han alcanzado la confluencia, se produce una rápida proliferación de la microglía que se dispone formando una monocapa de morfología ramificada debajo de la monocapa de astrocitos, pudiendo llegar a constituir el 20-30 % del cultivo. Nuestro estudio se centró en las células capaces de formar cGMP: astrocitos y neuronas. Hasta la fecha no se ha descrito la expresión de sGC en células microgliales *in vivo*, y datos previos del laboratorio indican que estas células en cultivo no presentan actividad sGC (Agulló y col., 1995). Otras posibles células formadoras de cGMP (oligodendrocitos, fibroblastos,...) aparecen en un porcentaje muy bajo (Agulló y col., 1995).

#### **1.1. Características del cultivo.**

El primer paso para investigar la relación entre la edad del cultivo y la capacidad de formación de cGMP fue el estudio de los cambios en la composición de los cultivos y la morfología de los astrocitos, a lo largo del desarrollo del cultivo. La proporción de neuronas y astrocitos, células presentes en el cultivo capaces de formar cGMP, se calculó a cada edad del cultivo

realizando dobles tinciones mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos frente a Neu-N (marcador específico de neuronas) o frente a GFAP (marcador específico de astrocitos), en combinación con un marcador de DNA (DAPI) que permite cuantificar las células. El número de células y el contenido de proteínas calculados fueron similares en cultivos de 3 y 7 días, y aumentaron desde el 7° al 14° día de cultivo (Tabla 1).

Características del cultivo			
Días de cultivo	3 días	7 días	14 días
N° células x 10 <sup>-3</sup> /placa	147,2 ± 15,6	203,1 ± 16,0	618,3 ± 55,7
Proteína total (µg/placa)	163,2 ± 12,8	177,1 ± 6,7	308,8 ± 43,8
% GFAP+	17,7 ± 2,6	60,4 ± 13,5	74,8 ± 1,7
% Neu-N+	51,6 ± 4,3	< 1	---
%LDH intracelular	62,4 ± 6,3	88,1 ± 1,5	91,7 ± 1,1

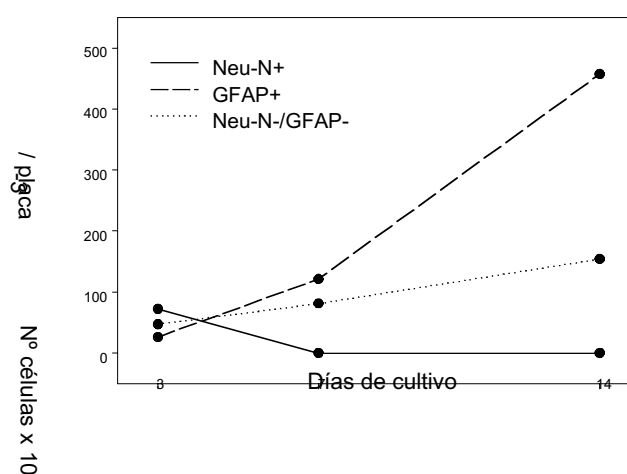
**Tabla 1. Características de los cultivos primarios cerebelares a lo largo de su desarrollo.** En cultivos de 3, 7 y 14 días se determinaron la cantidad de proteína total, la viabilidad celular, el número total de células y el porcentaje de células GFAP+ y Neu-N+, siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo Materiales y Métodos. La cuantificación del % de células GFAP+ y Neu-N+ se realizó examinando un mínimo de 7 campos (200x). La viabilidad celular se expresa como porcentaje de actividad LDH intracelular. Los resultados son medias ± SEM de tres experimentos realizados en triplicados en distintos cultivos.

En cultivos de tres días (Fig. 5), la distribución de las células en la superficie de la placa es irregular: la mayoría de las células aparecen en grupos compactos y también se observan algunas células aisladas, sin apenas contacto entre ellas. La mitad de las células se marcan con anti-Neu-N, marcador específico de neuronas, y son pequeñas y sin prolongaciones. Sólo una quinta parte de las células son GFAP+ (Tabla 1). Estas células se distinguen por su forma alargada, con pocas prolongaciones (2-3), y su intensa expresión de GFAP. Los astrocitos se localizan tanto en las agrupaciones celulares como aislados. Por el contrario, las neuronas solo aparecen en las zonas más

densamente pobladas, formando grupos compactos de varias células (Fig. 5; Fig. 7).

A los siete días de cultivo la distribución de las células sigue siendo irregular, aunque las agrupaciones de células no son tan compactas o grandes como en cultivos de tres días. Las células se extienden por la superficie de la placa sin alcanzar la confluencia. Del 3º al 7º día, la proporción de células GFAP+ se triplica (Tabla 1), y el marcaje es también intenso en todas ellas. Su morfología es variada (fusiforme, poligonal y formas intermedias). La presencia de células Neu-N+ disminuye de forma drástica. Las neuronas sólo aparecen esporádicamente, en algunas de las áreas más densamente pobladas, representando menos del 1 % del total de células. En la Fig. 5 se muestra uno de los pocos campos en los que se visualizaron células Neu-N+, en el que se observa que estas células siguen apareciendo agregadas.

En los cultivos de 14 días las células Neu-N+ desaparecen completamente y las células GFAP+ ( $74,8 \pm 1,7$  % del total) abarcan toda la superficie de la placa. La gran mayoría de las células son planas y poligonales, y la intensidad de marcaje para la GFAP es menor que la detectada en cultivos de 3 y 7 días. Tanto a los 7 como a los 14 días, la mayoría de las células GFAP- poseen un núcleo redondo y más pequeño que el de los astrocitos, tal como se ha descrito para la microglía en estudios previos del grupo sobre la composición de los cultivos confluentes (Agulló y col., 1995).



**Figura 6. Composición de los cultivos a lo largo de su desarrollo.** El número de células GFAP+/placa, células Neu-N+/placa y células Neu-N-/GFAP-/placa se calculó a partir de los datos mostrados en la Tabla 1.

Estudios de actividad LDH en los mismos cultivos indican una mayor muerte celular (mayor actividad LDH extracelular) en cultivos de 3 días, con respecto a cultivos de 7 y 14 días (Tabla 1). La relación entre el porcentaje de viabilidad celular y la desaparición de las neuronas sugiere que las células que mueren entre los 3 y 7 días son esencialmente neuronas. Por otro lado, la relación entre el número de células y el porcentaje de células GFAP+ muestran una importante proliferación de los astrocitos entre los 3 y 14 días. La Fig. 6 resume la evolución de la composición del cultivo a lo largo de las primeras dos semanas.

## **1.2. Formación de cGMP en respuesta a NO.**

### **1.2.1. Localización celular de la formación de cGMP a lo largo del desarrollo del cultivo.**

La capacidad de las células de formar cGMP en respuesta a NO y la localización intracelular de dicho cGMP se estudiaron mediante técnicas inmunocitoquímicas a lo largo del desarrollo del cultivo, usando el donador de NO SNP como fuente exógena de NO. Cultivos de 3, 7 y 14 días se trataron con vehículo o SNP 100  $\mu$ M durante 3 min, en presencia del inhibidor de PDEs IBMX (1 mM) para evitar la degradación del cGMP formado. Inmediatamente después se fijaron con p-formaldehído 4% y se visualizó el cGMP utilizando un anticuerpo frente al complejo cGMP-folmaldehído-tiroglobulina, específico para el cGMP fijado con formaldehído, siguiendo el protocolo descrito previamente por De Vente y Steinbusch (1992). Para determinar en qué células (neuronas o astrocitos) se estaba formando el cGMP, se realizaron dobles tinciones cGMP/GFAP y cGMP/Neu-N. Esta última se realizó sólo en cultivos de 3 días, ya que a los 7 y 14 días el número de neuronas presentes era inferior al 1 %. Los resultados indican que en ninguno de los estadios del estudio se detecta formación basal de cGMP, ni en ausencia (datos no mostrados) ni en presencia de IBMX, apareciendo el marcaje difuso y débil (Fig. 7). La estimulación con SNP durante 3 minutos provoca un aumento significativo del marcaje con anti-cGMP en todos ellos. Sin embargo, la intensidad del marcaje es distinta a cada edad de cultivo estudiada. En cultivos de 3 días el marcaje con anti-cGMP aparece en pocas células, exclusivamente en aquellas con morfología de astrocito. Las

imágenes de los triples marcajes cGMP/GFAP/DAPI confirman que todas las células marcadas con anti-cGMP son GFAP+ y viceversa (Fig. 7). Las dobles tinciones cGMP/Neu-N indican, tal como se muestra en el campo desprovisto de astrocitos que se muestra en la Fig. 8, que las neuronas de los cultivos de tres días no forman cGMP en respuesta a NO. En astrocitos, el marcaje del cGMP aparece intenso en toda la célula, y especialmente intenso en la región perinuclear (Fig. 7 y 9). En cultivos de 7 días el número de células cGMP+ aumenta, y de nuevo se corresponden con las GFAP+. También en estas células el marcaje es intenso en toda la célula y en especial en la región perinuclear (Fig. 7 y 9). En los cultivos de 14 días el marcaje con anti-cGMP aparece en la mayoría de las células, aunque la intensidad del marcaje es menor que en los cultivos anteriores y su distribución más difusa y homogénea dentro de la célula (Fig. 7 y 9).

### **1.2.2. Cuantificación del cGMP formado en astrocitos.**

Los niveles de cGMP intracelular formados en respuesta a NO se cuantificaron por RIA en cultivos de 3, 7 y 14 días tratados con IBMX 1 mM en presencia o ausencia de SNP 100  $\mu$ M. También se midió la cantidad de cGMP en el medio de incubación (cGMP extracelular) para averiguar si la variación en el cGMP intracelular se debía a cambios en la salida del cGMP fuera de las células. En la tabla 2 se muestran los valores totales de cGMP intracelular y extracelular (pmol / placa), formados en condiciones basales o tras la estimulación con SNP.

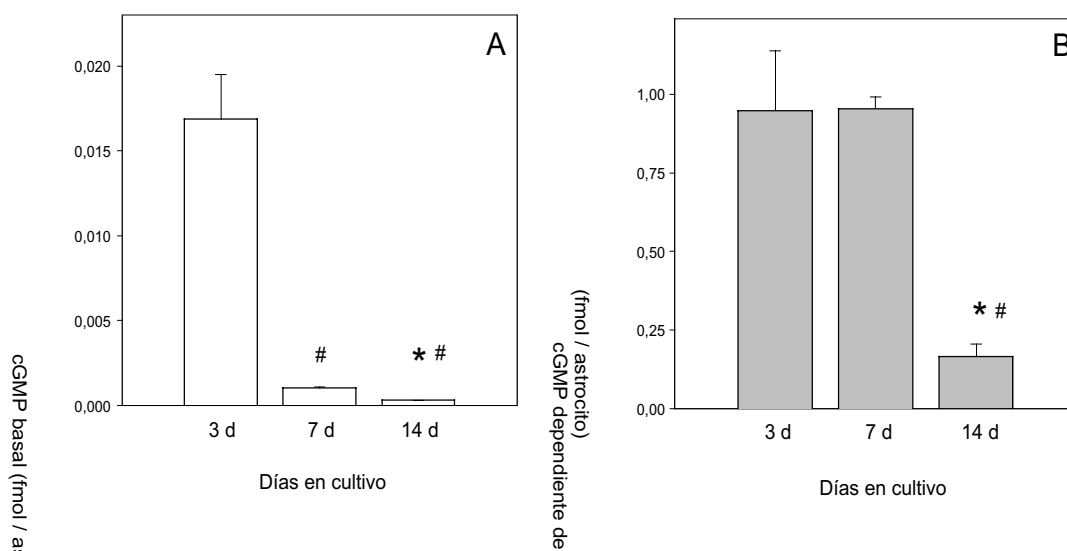
Según estos resultados, en condiciones basales se forma muy poco cGMP en todos los cultivos, aunque a los 3 días los niveles de cGMP basal son significativamente mayores que en los otros cultivos. También la salida de cGMP fuera de las células es mayor a los 3 días. Tras la estimulación con SNP, los niveles de cGMP intracelulares expresados como pmol/placa aumentaron 50, 1000 y 300 veces (a los 3, 7 y 14 días respectivamente). También aumentaron los niveles extracelulares, pero en muchísimo menor grado que el cGMP intracelular, representando menos del 2,5 % del total de cGMP formado en todos los casos. Si además se tiene en cuenta que el volumen del medio extracelular (1 ml) es mucho mayor al volumen intracelular, la relación entre la concentración de cGMP extracelular e intracelular es despreciable.

		Formación de cGMP (fmol / placa)		
		3 días	7 días	14 días
Basal	Intracelular	220 ± 61	57 ± 14 *	123 ± 13 *
	Extracelular	361 ± 60	67 ± 5 *	88 ± 13 *
Estimulada	Intracelular	31940 ± 7009	114425 ± 4332	64926 ± 1195
	Extracelular	866 ± 162	625 ± 81	792 ± 190

**Tabla 2. Formación de cGMP basal y estimulada por NO en cultivos primarios cerebelares a lo largo del desarrollo.** Cultivos de 3, 7 y 14 días se lavaron y se incubaron con IBMX 1mM en ausencia (basal) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (estimulada). Tras 3 minutos se recogió el medio de incubación y se añadió etanol sobre las monocapas. La cantidad de cGMP en el medio de incubación (cGMP extracelular) y en el extracto etanólico (cGMP intracelular) se determinó mediante RIA. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en triplicado en distintos cultivos. \*P < 0,05 respecto a 3 días.

Según los resultados mostrados en la Fig. 7, el cGMP en estos cultivos se forma únicamente en las células GFAP+, y la proporción de estas células varía a lo largo del cultivo. Para poder comparar el cGMP formado por astrocito en las distintas edades del cultivo, el cGMP determinado por RIA (Tabla 2) se dividió entre el número de astrocitos presentes a cada tiempo del cultivo (Tabla 1).

Como muestra la Fig. 10A, el cGMP formado por astrocito en condiciones basales disminuye drásticamente entre los 3 y los 7 días. Esto no parece deberse a una menor producción de NO endógeno ya que los niveles de nitritos acumulados en el medio son semejantes a las tres edades estudiadas (Tabla 3). Sin embargo, el promedio de cGMP formado / astrocito tras la estimulación con SNP es similar en cultivos de 3 y 7 días (Fig. 10B). De acuerdo con los resultados inmunocitoquímico, la formación de cGMP es significativamente menor en astrocitos de cultivos confluentes, y supone un 20 % del cGMP formado en las otras edades.



**Figura 10. Formación de cGMP basal (A) y estimulada (B) expresada por astrocito, a lo largo del desarrollo de cultivos primarios cerebelares.** La cantidad total de cGMP formado por placa (datos presentados en la Tabla 2) se dividió entre el número de astrocitos presentes en cada placa (Datos presentados en la Tabla 1). #P < 0,05 respecto a 3 días. \*P < 0,05 respecto a 7 días.

#### Acumulación de nitritos

Días de cultivo	3 días	7 días	14 días
Nitritos ( $\mu\text{M}$ )	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1

**Tabla 3. Acumulación de nitritos en el medio de incubación de cultivos primarios cerebelares a lo largo de su desarrollo.** Cultivos primarios sembrados en placas de 35 mm de diámetro se incubaron con 2 ml de DMEM-10 % SFB en las condiciones habituales. El medio de incubación se cambió los días 4, 7 y 11. En el 3<sup>er</sup>, 7<sup>o</sup> y 14<sup>o</sup> día de cultivo, se determinó la concentración de nitritos en el medio de incubación. Los resultados son medias  $\pm$  rango de dos experimentos realizados en triplicado en distintos cultivos.

### 1.3. Relación entre la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO y la reactividad, diferenciación y proliferación astrogliar.

#### 1.3.1. Relación con la reactividad astrogliar.

La reactividad astrogliar ocurre en el SNC *in vivo* en respuesta a casi todas las formas de daño físico o químico, y lleva consigo aumento del tamaño del soma y de las prolongaciones de la célula, acompañado de aumento en la expresión de GFAP (Wu y Schwartz, 1998). Puede estar acompañada de proliferación glial cuando el daño crea un espacio físico que puede ser rellenado

por los astrocitos en división (Wu y Schwartz, 1998). Ciertos autores consideran que los astrocitos cultivados presentan fenotipo reactivo, ya que expresan mayor cantidad de GFAP que los astrocitos in vivo. Durante los primeros días del desarrollo de nuestros cultivos, el marcaje inmunocitquímico de la GFAP en los astrocitos es visiblemente más intenso que en la mayoría de los astrocitos de cultivos confluentes. En vista de esta diferencia y de la posibilidad de que la propia preparación del cultivo (disgregación mecánica, centrifugación,...) sea capaz de causar reactividad glial, decidimos estudiar si existía una relación entre la capacidad de formación de cGMP y la reactividad glial.

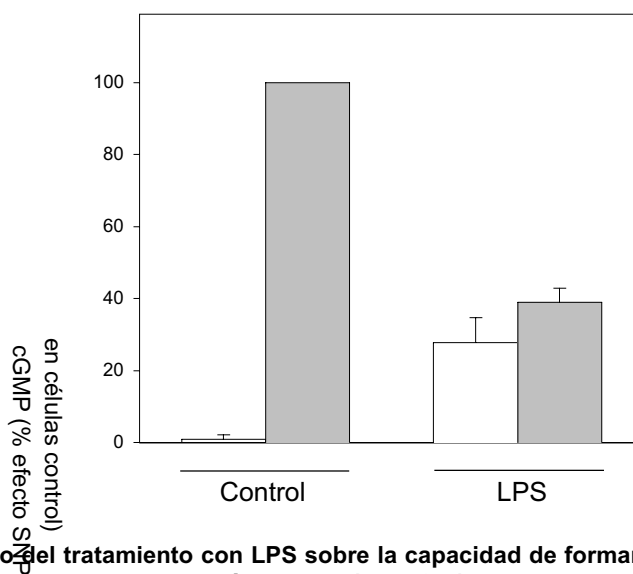
Ya que no se ha definido un marcador de reactividad astroglial inequívoco, decidimos estudiar la relación entre reactividad y capacidad de formación de cGMP de una manera indirecta, estudiando la formación de cGMP en respuesta a NO en cultivos jóvenes (7 días) tratados con LPS, toxina de la pared de las bacterias gram negativas cuya capacidad de inducir reactividad astroglial está bien establecida (ver revisión: Eddleston y Mucke, 1993). Con este propósito, los cultivos de 7 días se trataron con LPS 10 ng/ml (o vehículo) durante 24 horas, y tras un lavado se incubaron 3 min con SNP 100  $\mu$ M en presencia de IBMX 1 mM, o sólo con IBMX (basales). El cGMP formado se visualizó mediante inmunotinción (Fig. 11) o se cuantificó mediante RIA (Fig. 12).

Al igual que ocurre en cultivos astrogliales confluentes (Baltrons y col., 1999), el tratamiento de los cultivos de 7 días con LPS produce un cambio morfológico en los astrocitos: sus prolongaciones se vuelven más finas y el soma se condensa (Fig. 11). El marcaje del cGMP acumulado en condiciones basales aumenta notablemente tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, tras estimular con SNP la intensidad del marcaje es similar en células tratadas y no tratadas, si bien la superficie marcada es menor en células tratadas con LPS ya que tanto los somas, como las prolongaciones se encuentran más condensados.

La cuantificación de los niveles de cGMP mediante RIA (Fig. 12) confirma el aumento de la formación de cGMP producida por el tratamiento con LPS. Este aumento se debe a la producción endógena de NO debido a la inducción de la NOS-2 en astrocitos y en la microglía contaminante (ver revisión: Murphy y col., 1993). De hecho, las concentraciones de nitritos detectados en el medio de incubación aumentan tras el tratamiento con LPS de  $0,6 \pm 0,1 \mu$ M a  $11,9 \pm 2,8 \mu$ M (n=3). Los datos representados en la Fig. 12 también muestran una



importante disminución de la respuesta a SNP ( $59,1 \pm 2,7 \%$ ) en las células tratadas con LPS, tal como ha sido previamente descrito en cultivos de 14-15 días (Baltrons y García, 1999). Estas observaciones indican que la mayor formación de cGMP en cultivos jóvenes no está relacionada con un mayor grado de reactividad sino más bien lo contrario.



**Figura 12. Efecto del tratamiento con LPS sobre la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO en cultivos astrogliales de 7 días.** Después de 6 días *in vitro*, las células se trataron con vehículo o LPS 10 ng/ml durante 24 horas. A continuación las monocapas se lavaron y se incubaron durante 3 min con IBMX 1 mM en ausencia (columnas blancas) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (columnas grises). La cantidad de cGMP formado se determinó mediante RIA. Los resultados, representados como porcentajes del cGMP formado en respuesta a SNP en células control, son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en triplicado en distintos cultivos.

### 1.3.2. Relación con la diferenciación astrogliar.

La diferente morfología de los astrocitos en cultivos jóvenes y en cultivos confluentes puede ser indicativa de diferente grado de diferenciación celular. Varios grupos han descrito previamente que los astrocitos poligonales cocultivados con neuronas adquieren características de astrocitos diferenciados (Nagata y col., 1986; Gasser y Hatten, 1990; Hatten, 1985): su morfología pasa a ser estrellada, más parecida a la que presentan los astrocitos maduros *in vivo* (Butt, 1991). Para estudiar si la diferente capacidad de formación de cGMP en respuesta a NO estaba relacionada con el grado de diferenciación de las células se prepararon en paralelo cultivos primarios de cerebelo enriquecidos en astrogliar y cultivos primarios de cerebelo enriquecidos en neuronas granulares,

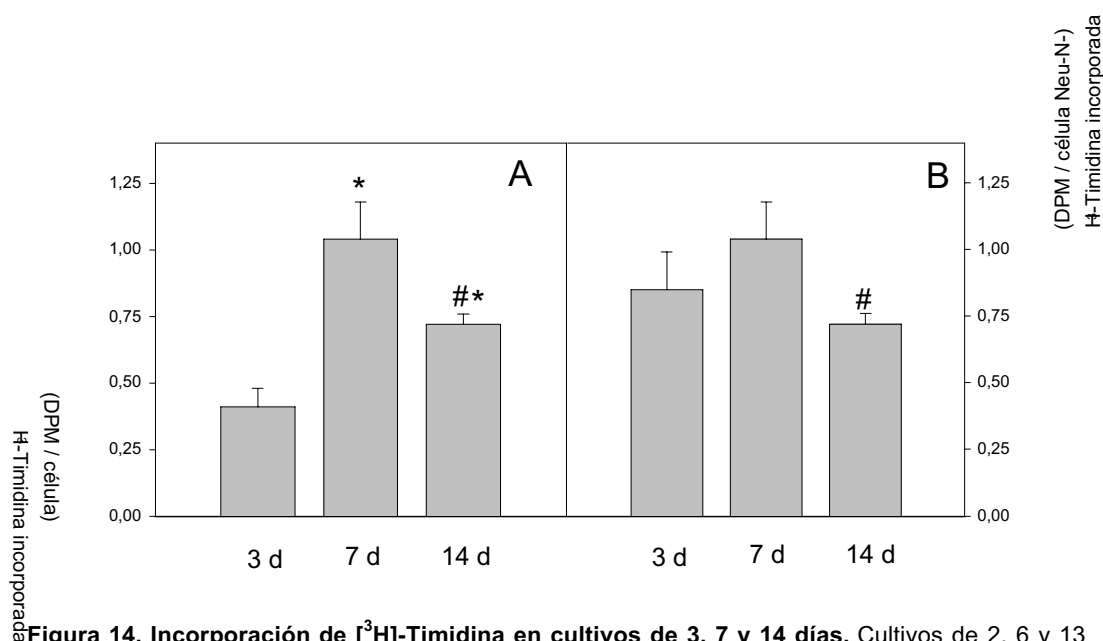
donde los astrocitos contaminantes presentan morfología estrellada. Después de 14 días de cultivo, la formación de cGMP tras el tratamiento con SNP en astrocitos se visualizó mediante doble inmunotinción GFAP / cGMP. Como se muestra en la Fig. 13, en cultivos de 14 días enriquecidos en neuronas granulares, el cGMP se forma principalmente en neuronas (células GFAP- con soma pequeño y redondo, y con ramificaciones finas y largas). Los astrocitos de estos cultivos (células de mayor tamaño, estrelladas e intensamente marcadas con anti-GFAP) también se marcan con anti-cGMP en respuesta a NO, pero la intensidad del marcaje es en general menor que en neuronas, y también menor que el detectado en astrocitos aparentemente no diferenciados de cultivos enriquecidos en astrogliá procesados en paralelo. Dos diferencias importante en cuanto a las condiciones de preparación de cultivos enriquecidos en neuronas o en astrogliá son la densidad de siembra ( $1,2 \times 10^5$  cel./cm<sup>2</sup> y  $0,6 \times 10^5$  cel./cm<sup>2</sup>, respectivamente) y la presencia de 25 mM KCl en el medio de incubación del cultivo (ver apartado Materiales y Métodos). Para descartar que la presencia de KCl en el medio o la densidad de siembra fuesen el motivo de la diferencia de marcaje con anti-cGMP entre astrocitos crecidos en presencia o ausencia de neuronas, se utilizaron como controles del experimento cultivos enriquecidos en astrocitos incubados en el medio suplementado con KCl y cultivos enriquecidos en astrocitos sembrados a doble densidad. Los resultados (datos no mostrados) fueron semejantes a los presentados en la Fig. 13, descartando el efecto de estas dos condiciones de cultivo en la intensidad de marcaje con anti-cGMP en astrocitos. Estos resultados sugieren una relación inversa entre la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO y la diferenciación de los astrocitos inducida por la presencia de neuronas.

### **1.3.3. Relación con la proliferación astrogliá.**

En la literatura se han descrito efectos opuestos de la vía NO/cGMP sobre la proliferación celular. En algunos casos esta vía ha sido implicada en fenómenos mitogénicos (Tantini y col., 2001; Pignatti y col., 1999), mientras que en otras ocasiones se ha relacionado con la inhibición de la proliferación (Garg y col., 1992; Garg y Hassid, 1989). Teniendo en cuenta que los astrocitos de cultivos jóvenes proliferan hasta alcanzar la confluencia se decidió estudiar si la diferente capacidad de formación de cGMP en respuesta a NO entre cultivos

jóvenes y cultivos confluentes estaba relacionada con el grado de proliferación de las células.

Para cuantificar el grado de proliferación de los distintos cultivos, se determinó la radiactividad presente en cultivos de 3, 7 ó 14 días incubados con [<sup>3</sup>H]-timidina durante las 24 horas anteriores. Los resultados (Fig. 14A) muestran que, de las tres edades estudiadas, es a los 7 días cuando la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina por célula es más alta, mientras que los cultivos de 3 días son los que incorporan menor cantidad.

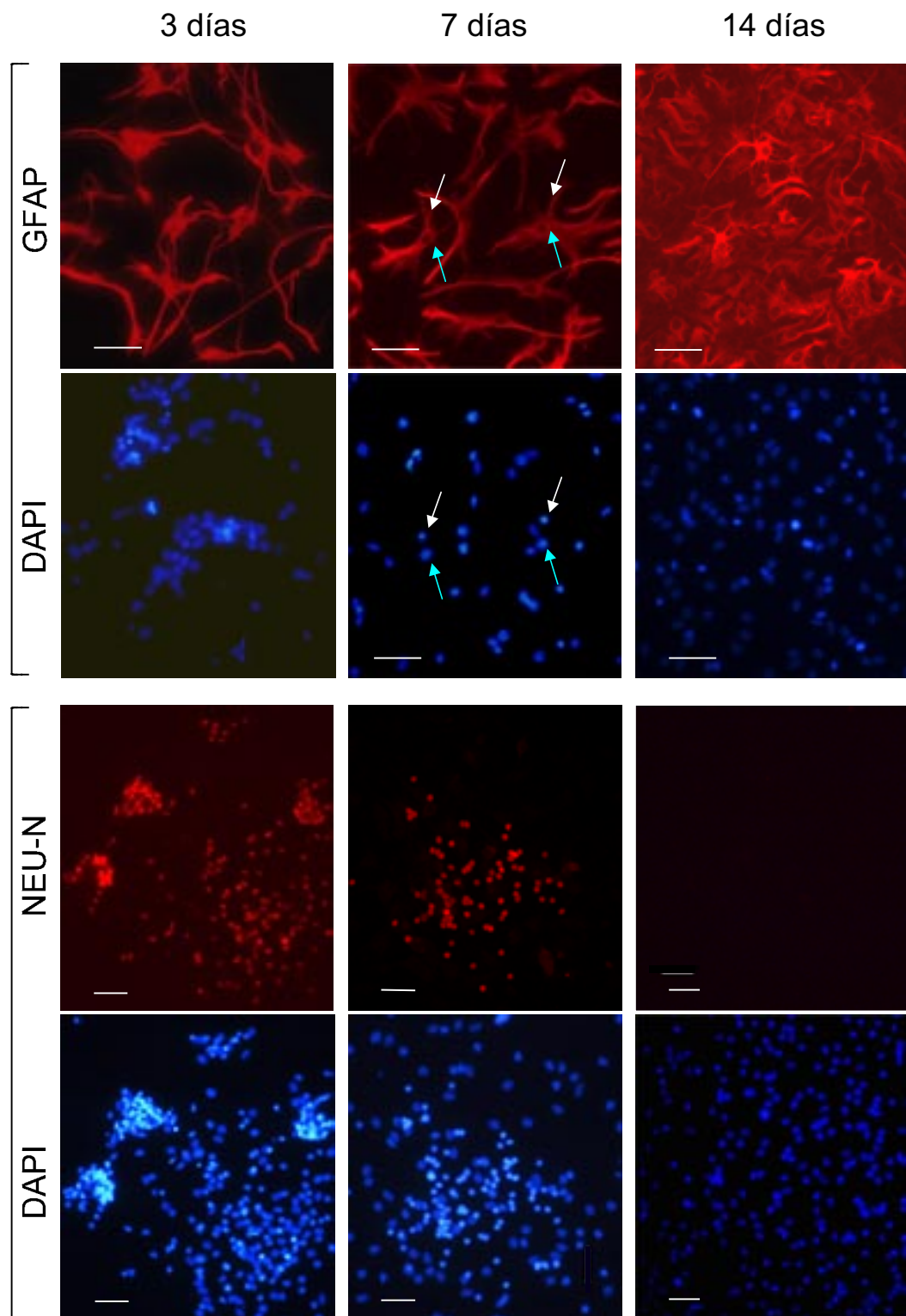


**Figura 14. Incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina en cultivos de 3, 7 y 14 días.** Cultivos de 2, 6 y 13 días fueron incubados en placas de 24 pocillos durante 24 horas con [<sup>3</sup>H]-Timidina (1  $\mu$ Ci/ml). A continuación las monocapas se lavaron y se resuspendieron con tripsina. La suspensión celular se filtró, y se midió la reactividad retenida en los filtros. A: Relación entre DPM y número de células totales. B: Estimación de la radiactividad incorporada por célula Neu-N- (Tabla 1). Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en cuadruplicados en distintos cultivos. \*P < 0,05 respecto a 3 días. #P < 0,05 respecto a 7 días.

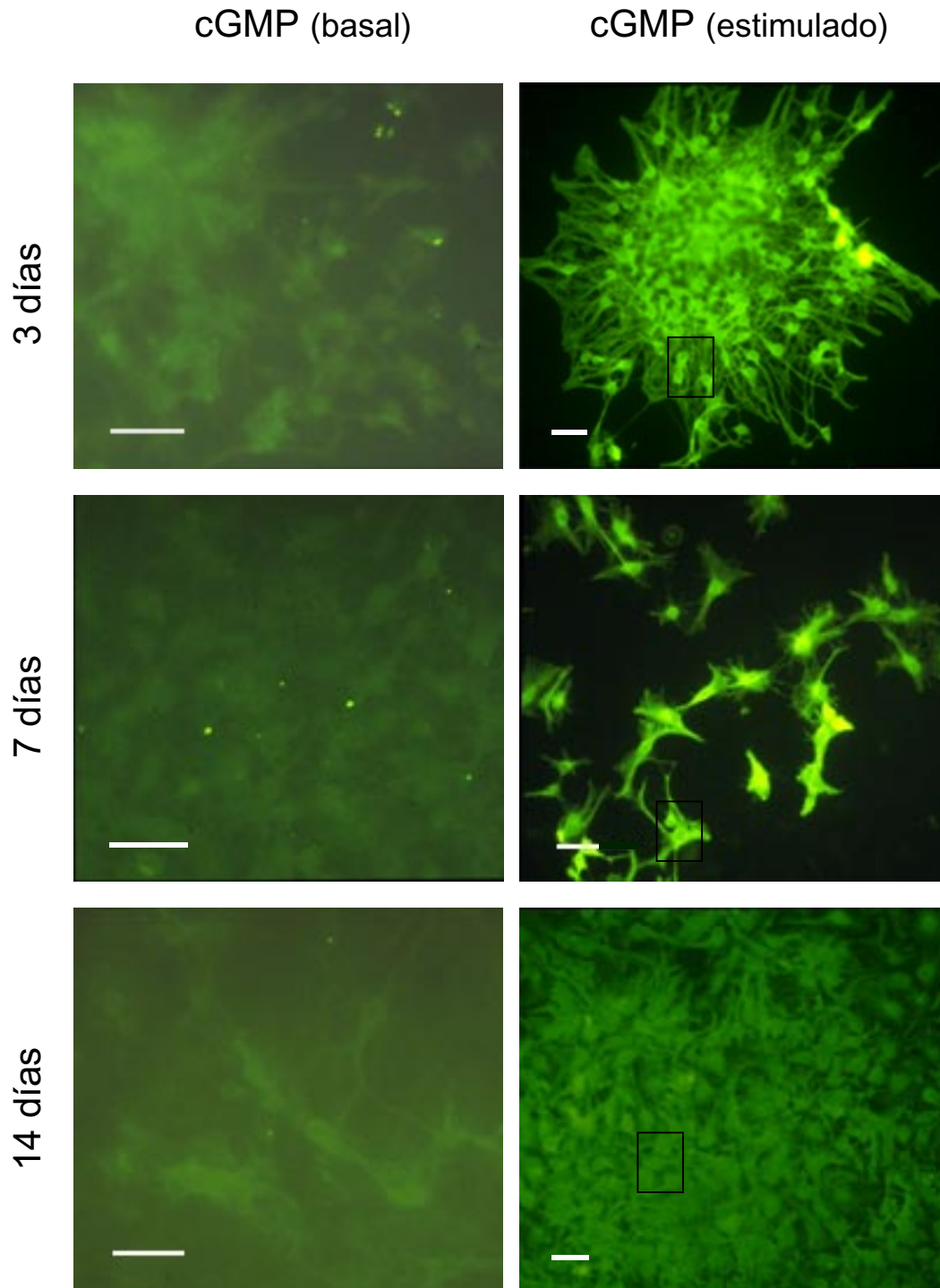
Para determinar qué tipo de células estaban en fase de proliferación, las células se incubaron con el análogo de timidina BrdU que una vez incorporado puede detectarse inmunocitoquímicamente con anti-BrdU (ver apartado Materiales y Métodos). En las mismas células se realizó la doble tinción BrdU / GFAP. Las imágenes presentadas en la Fig. 15 muestran que los cultivos de 3 días presentan pocos núcleos marcados con anti-BrdU, y la mayoría de ellos corresponden a células GFAP+. En cultivos de 7 días, el número de núcleos marcados con BrdU aumenta visiblemente, y también corresponden mayoritariamente a células GFAP+. Sin embargo, en cultivos de 14 días el número de células que incorporan BrdU es mucho menor que en cultivos de 7

días y a mayor parte de los núcleos marcados corresponden a células GFAP-, presumiblemente células microgliales que proliferan en mayor medida una vez la monocapa de astrocitos ha alcanzado la confluencia (Agulló y col., 1995).

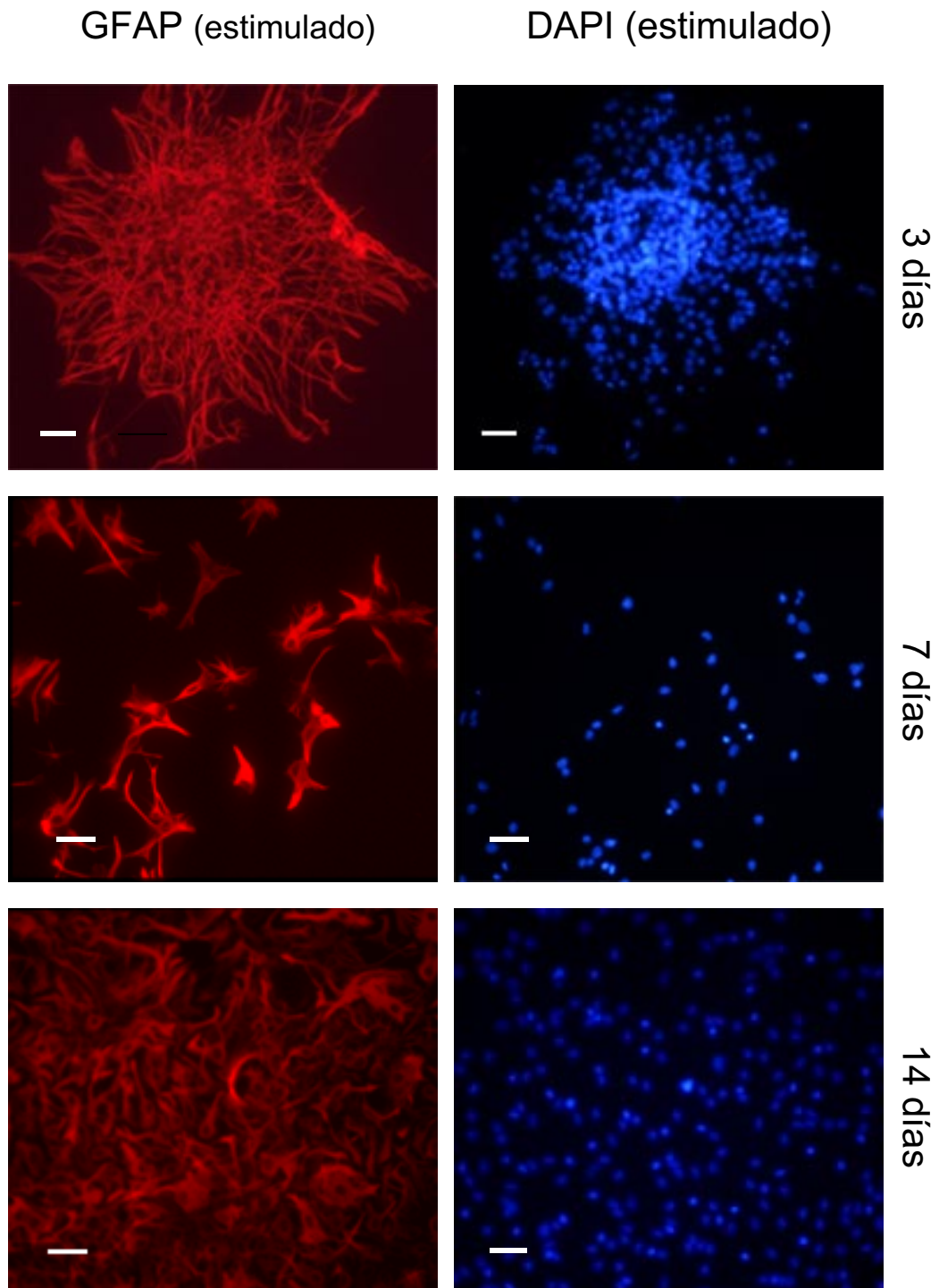
El hecho de que no todas las células que proliferan a los distintos días de cultivo sean GFAP+ impide realizar un cálculo correcto del grado de proliferación de astrocitos. Sin embargo, si se tiene en cuenta que las neuronas no sólo no proliferan sino que se mueren, y que la proliferación de las células microgliales es baja antes de los 9-10 días de cultivo (Agulló y col., 1995), se puede tomar el grado de proliferación celular del cultivo excluyendo las neuronas (DPM / célula NeuN-; Fig. 14B), como una estimación aproximada del grado de proliferación de los astrocitos en los cultivos de 3 y 7 días. Según este cálculo, el grado de proliferación astrogliar en cultivos de 3 días sería semejante al de los 7 días y muy superior al de los 14 días, ya que a esa edad del cultivo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina ocurriría mayoritariamente en células microgliales. Estos resultados sugieren una relación directa entre el grado de proliferación astrogliar y la capacidad de formación de cGMP en respuesta a NO. Ésta sería alta mientras los astrocitos presentan una tasa elevada de replicación celular, disminuyendo notablemente al perder la capacidad de dividirse cuando alcanzan la confluencia o cuando se induce su diferenciación en contacto con las neuronas.



**Figura 5. Inmunofluorescencia indirecta frente a GFAP y Neu-N a lo largo del desarrollo de cultivos primarios cerebelares.** En cultivos de 3, 7 y 14 días se realizaron dobles marcajes GFAP/DAPI o Neu-N/DAPI según se describe en el capítulo Materiales y Métodos. Las flechas azules señalan algunos núcleos de células GFAP+, y las flechas blancas señalan núcleos de células GFAP-. Barras, 100  $\mu$ m.

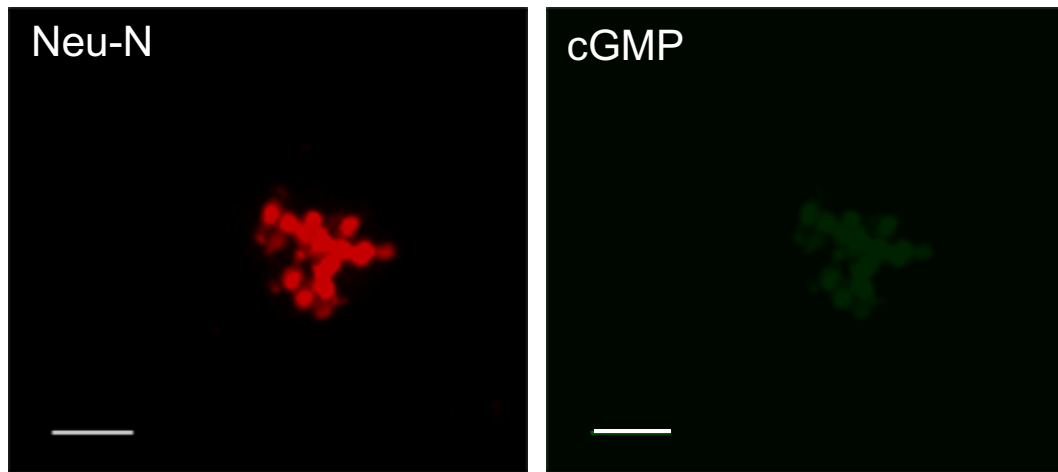


**Figura 7. Inmunofluorescencia indirecta frente al cGMP formado en condiciones basales o tras estimulación con SNP en cultivos primarios cerebelares durante el desarrollo.** 3, 7 y 14 días después de la siembra, los cultivos se lavaron y se trataron durante 3 minutos con IBMX 1 mM en ausencia (basales) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (estimulados). Inmediatamente después, se aspiró el medio de incubación, y las monocapas se fijaron con p-formaldehído 4%. Sobre las monocapas fijadas se realizó una triple tinción cGMP/GFAP/DAPI tal como se describe en el

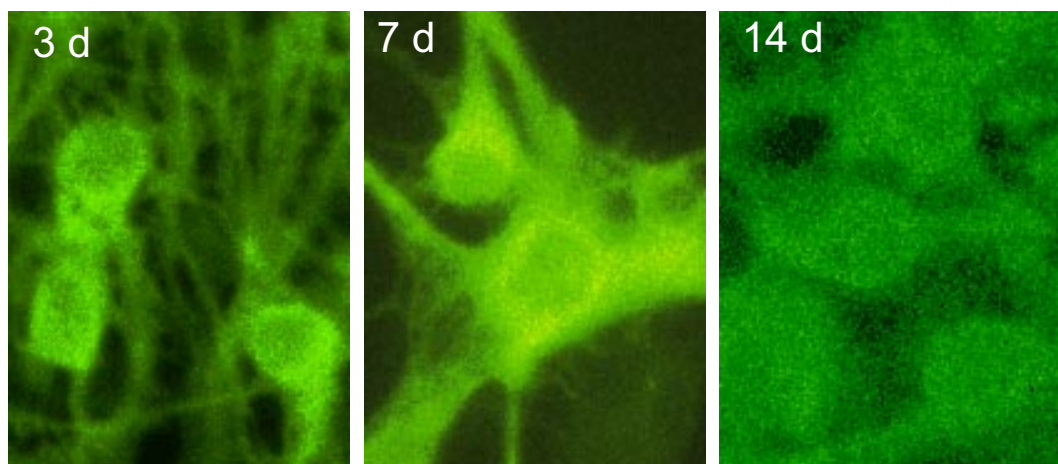


apartado Materiales y Métodos. Las imágenes muestran la inmunotinción del cGMP basal y las inmunotinciones de GFAP, DAPI y cGMP de un mismo campo estimulado con SNP, en cada edad estudiada. El contenido de los recuadros se muestra ampliado en la Fig. 4. Todas las micrografías del marcaje de cGMP se tomaron con el mismo tiempo de exposición. Barras, 100  $\mu\text{m}$ .



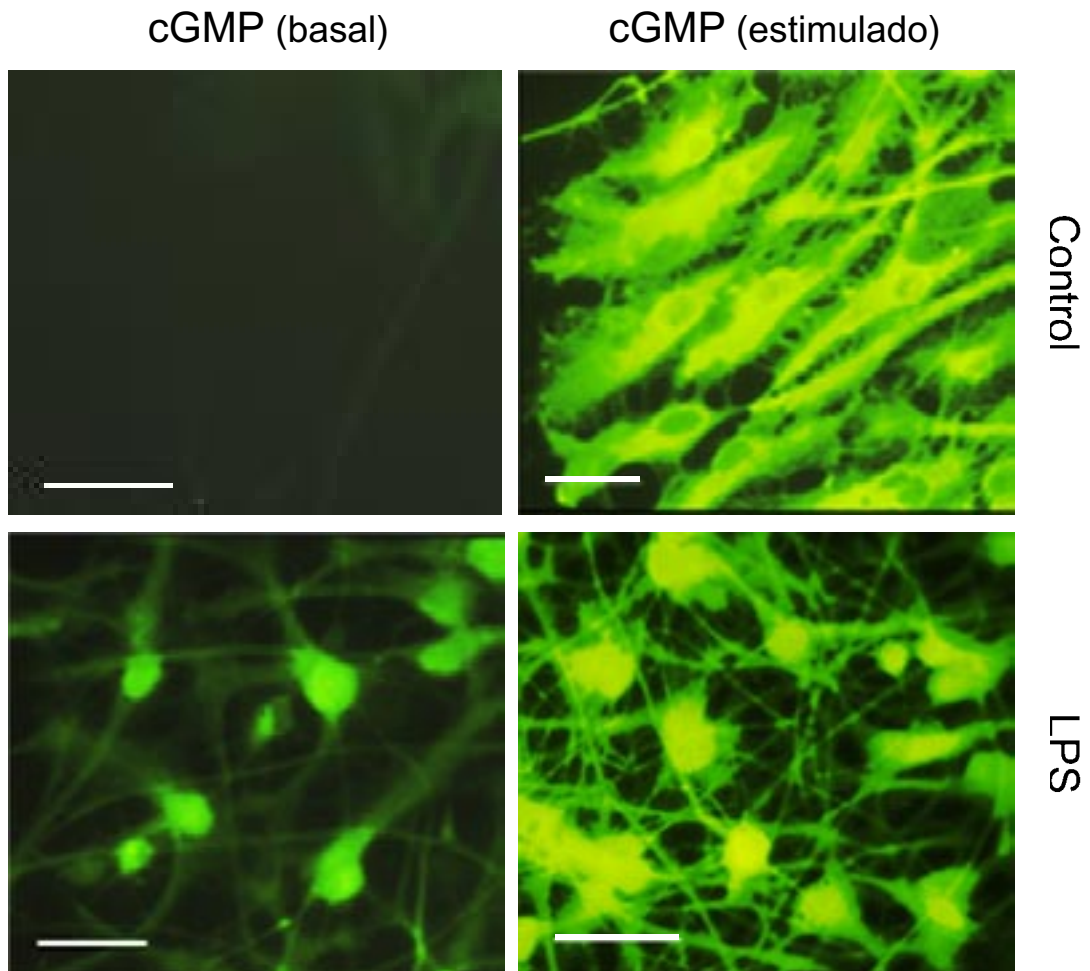


**Figura 8. Formación de cGMP en neuronas tras la estimulación con SNP en cultivos primarios cerebelares de 3 días.** Tres días después de la siembra, los cultivos se lavaron y se trataron durante 3 minutos con SNP 100  $\mu$ M en presencia de IBMX 1 mM. Inmediatamente después las monocapas se fijaron y sobre ellas se realizó una doble tinción cGMP/Neu-N. Las imágenes muestran el marcaje con cGMP y Neu-N en un mismo campo. Las micrografías del marcaje de cGMP se tomaron con el mismo tiempo de exposición empleado en la Fig. 2. Barras, 100  $\mu$ m.

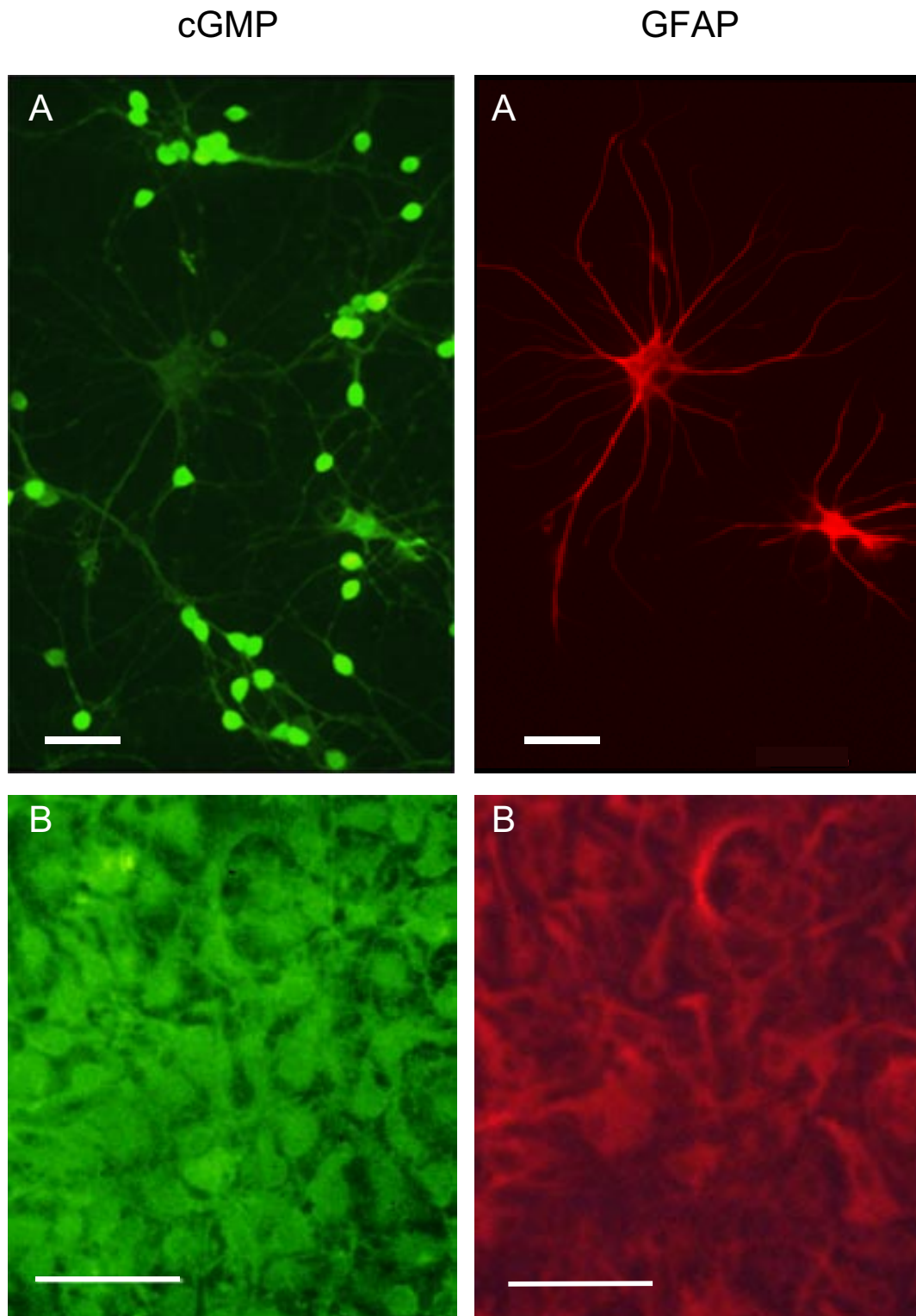


**Figura 9. Distribución intracelular del cGMP formado en respuesta a NO en astrocitos durante el desarrollo de los cultivos primarios cerebelares.** Inmunodetección del cGMP formado tras la estimulación con SNP (100  $\mu$ M, 3 min), en cultivos de 3, 7 y 14 días. Imágenes ampliadas de los campos enmarcados en la Fig. 2.

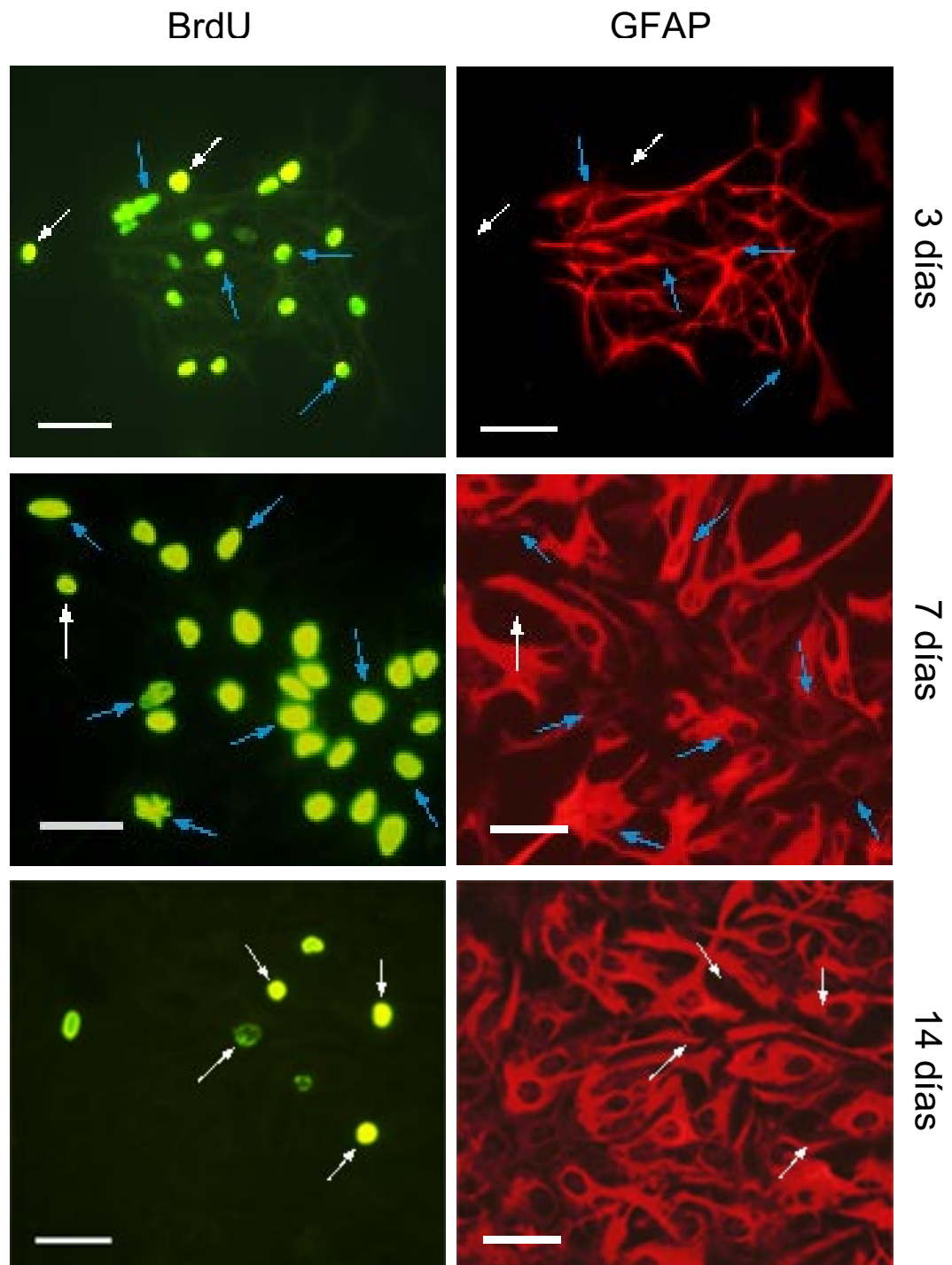




**Figura 11. Efecto del tratamiento con LPS sobre la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO en cultivos astrogliales de 7 días.** Después de 6 días in vitro, las células se trataron con vehículo (control) o LPS 10 ng/ml durante 24 horas. A continuación las monocapas se lavaron y se trataron durante 3 minutos con IBMX 1mM en ausencia (basal) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (estimulado). Inmediatamente después las monocapas se fijaron con p-formaldehído 4% y se realizó una inmunotinción del cGMP. Todas las micrografías se tomaron con el mismo tiempo de exposición. Barras, 100  $\mu$ m.



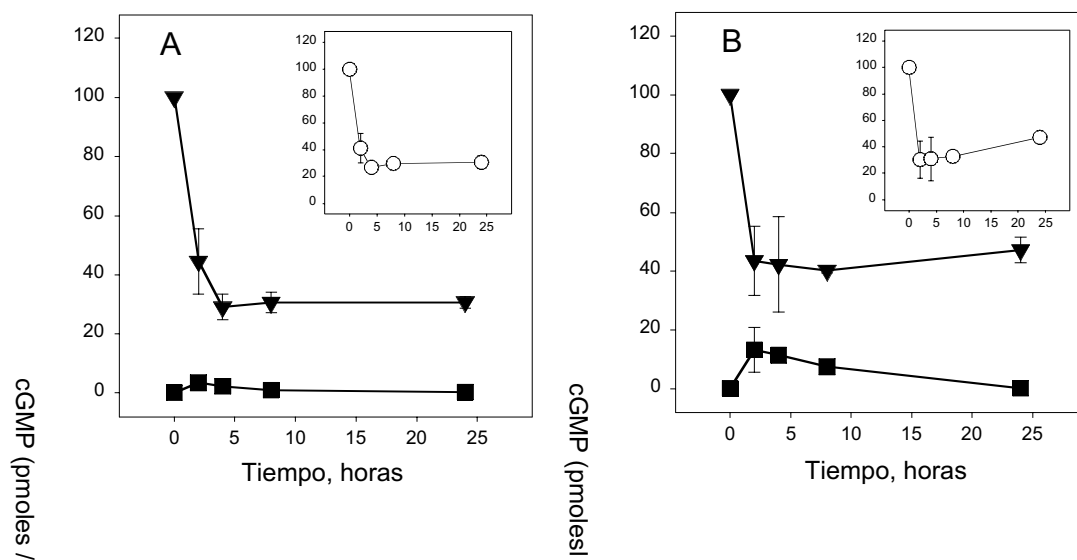
**Figura 13. Doble marcaje de GFAP y cGMP en cultivos primarios cerebelares enriquecidos en neuronas o en astrogía estimulados con SNP.** Cultivos primarios de cerebelo enriquecidos en neuronas granulares (A) y cultivos enriquecidos en astrogía (B) se prepararon en paralelo, tal como se describe en el capítulo Materiales y Métodos. Tras 14 días *in vitro*, ambos cultivos se lavaron y se trataron durante 3 minutos con SNP 100  $\mu$ M en presencia de IBMX 1 mM. Inmediatamente después las monocapas se fijaron con p-formaldehído 4%. GFAP y cGMP se marcaron simultáneamente mediante inmunofluorescencia indirecta. Las micrografías muestran los marcajes para cGMP y GFAP de los mismos campos. Barras, 100  $\mu$ m.



**Figura 15. Inmunofluorescencia indirecta frente al BrdU incorporado en cultivos primarios cerebelares de distintas edades.** Cultivos de 2, 6 y 13 días fueron incubados durante 24 horas con BrdU. A continuación las células se fijaron y se realizó una doble tinción BrdU/GFAP según se describe en el capítulo Materiales y Métodos. Las micrografías de GFAP y BrdU muestran los mismos campos. Las flechas azules señalan algunos núcleos marcados con BrdU de células GFAP+. Las flechas blancas señalan células GFAP-. Barras, 100  $\mu$ m.



valores basales. El incremento es superior en el caso del SNAP. Por otro lado, en las células tratadas se observa una reducción de la acumulación de cGMP producida por la estimulación aguda (3 min) con SNP. La máxima reducción es semejante para ambos donadores y ya se observa a las dos horas de tratamiento. Dicha reducción se mantiene hasta al menos 24 horas en el caso del SNP. Sin embargo, tras 24 horas de tratamiento con SNAP se observa una ligera reversión de la reducción máxima detectada con tratamientos más cortos.



**Figura 17. Efecto del tratamiento con SNP (A) y SNAP (B) durante distintos tiempos sobre la formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios enriquecidos en astrocitos cerebelares.** Después del tratamiento con SNP o SNAP (100  $\mu$ M) durante los distintos tiempos indicados, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1 mM en ausencia (■) o presencia (▼) de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular. La resta de los niveles de cGMP obtenidos en presencia de SNP, menos los obtenidos en su ausencia (O) representan la estimulación aguda de la formación de cGMP inducida por NO (insertos). Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres (A) o dos (B) experimentos.

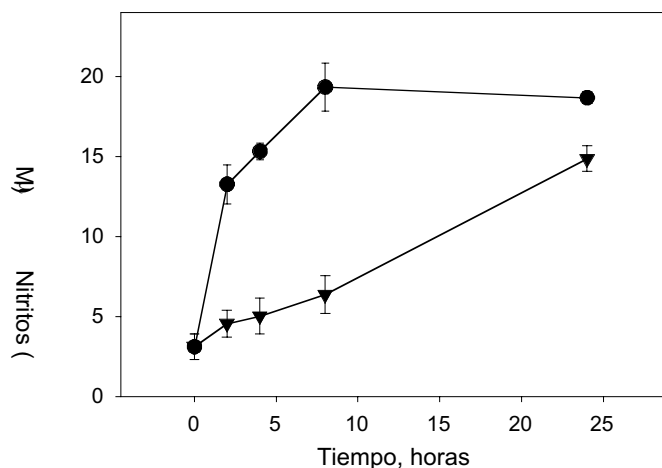
La disminución en la capacidad de formación de cGMP dependiente de NO no es debida a efectos citotóxicos del tratamiento con los donadores. Como puede verse en la Tabla 4, la liberación de LDH al medio extracelular no es significativamente diferente en células tratadas y no tratadas y en ningún caso supera un 6 % de la actividad total.

El hecho de que ambos donadores, con estructura química diferente, sean capaces de producir el mismo efecto sugiere que es el NO liberado por dichos compuestos el agente responsable del efecto. Sin embargo, el que los niveles basales de cGMP aumenten más tras el tratamiento con SNAP que tras

% LDH extracelular					
Tiempo de exposición al donador	0 h	2 h	4 h	8 h	24 h
SNP	5,3±0,1	4,2±0,4	3,6±0,3	4,6±3,2	5,3±1,2
SNAP	5,3±0,1	4,1±0,6	3,3±0,2	2,7±1,4	2,1±0,1

**Tabla 4. Efecto del tratamiento con SNP y SNAP sobre la viabilidad de las células astrogliales en cultivo.** La actividad LDH se midió en la monocapa y en el medio de cultivos tratados con SNP o SNAP 100  $\mu$ M durante distintos tiempos, según se describe en el apartado 2.7.3. de Materiales y Métodos. Los resultados, expresados como % de LDH en el medio respecto al total, son medias  $\pm$  rango de dos experimentos.

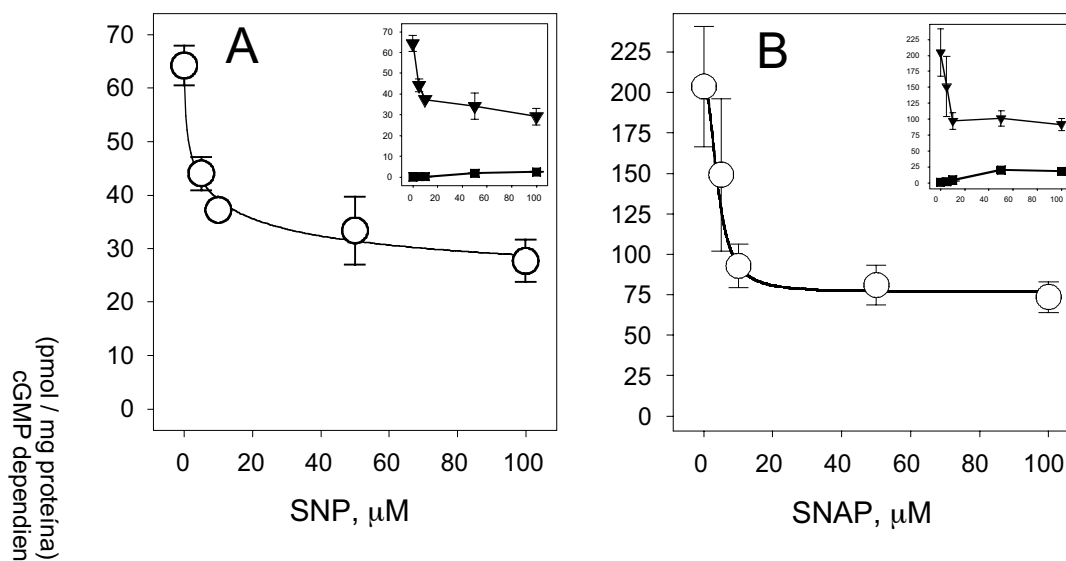
el tratamiento con SNP, y el que la inhibición producida por SNP sea más duradera que la del SNAP podría relacionarse con la diferente cantidad de NO liberado por ambos donadores. Para comprobar esta hipótesis se determinó la concentración de nitritos acumulados en el medio de incubación. Como se muestra en la Fig. 18, la concentración de nitritos en el medio de incubación de células tratadas con SNAP aumenta durante las primeras horas de tratamiento alcanzando un máximo a las 8 horas, manteniéndose estable posteriormente al menos hasta 24 horas. Sin embargo, la acumulación de nitritos tras el tratamiento con SNP es mucho más lenta y aumenta linealmente durante las 24 horas. La concentración de nitritos producida por el SNAP es en todos los casos mayor que la debida al tratamiento con SNP. Estos datos indican que la liberación de NO por parte del SNAP se produce en las primeras horas, mientras el SNP libera cantidades menores de NO, pero de forma más constante. De acuerdo con nuestros resultados, estudios anteriores describen que el SNP libera cantidades pequeñas de NO durante periodos prolongados (Bates y col., 1991; Murphy y Noack, 1994). Sin embargo, los datos sobre liberación de NO por parte del SNAP descritos por otros grupos son muy variables (Matthews y col., 1996; Singh y col., 1996; Lärffars y Gyllenhammar, 1995), probablemente debido a que la liberación de NO por parte de los nitrosotioles es altamente dependiente de los componentes del sistema de estudio, particularmente de las concentraciones de tioles reducidos y metales de transición presentes (Dicks y Williams, 1996; Gordge y col., 1996; Singh y col., 1996).



**Figura 18. Concentración de nitritos acumulados en el medio de incubación de los astrocitos tras el tratamiento con SNP o SNAP durante distintos tiempos.** Los cultivos de astrocitos se trataron con SNP (▼) ó SNAP (●) 100  $\mu$ M, y tras los tiempos indicados se determinó la concentración de nitritos en el medio de incubación siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.7.4. de Materiales y Métodos. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos.

Las distintas cinéticas de liberación de NO del SNAP y del SNP concuerdan con la diferente acumulación de cGMP basal tras el tratamiento con ambos donadores. Este hecho sugiere que los aumentos del cGMP basal se deberían al cGMP que se forma en la fase de tratamiento y no llega a ser degradado, o bien a la presencia de NO en la célula una vez retirado el donador. El hecho de que el NO pueda unirse reversiblemente a muchas proteínas y prolongar así su vida media hace posible esta segunda hipótesis. Por otro lado, se observa que pequeñas cantidades de NO liberadas por el SNP tras 2 horas de tratamiento son suficientes para producir la misma reducción de la formación de cGMP que producen mayores cantidades liberadas por el SNAP. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inactivación del NO en presencia de células es más rápida cuanto mayor es la concentración de NO (Kharitonov y col., 1994; Goldstein y Czapski, 1995), y en consecuencia, la vida media de las altas cantidades de NO liberado por el SNAP podría ser menor a la vida media del NO liberado por el SNP. La reversión observada entre las 8 y 24 horas de tratamiento con SNAP podría deberse a que, según indican los niveles de nitritos, el SNAP no libera NO a partir de las 8 horas.

Para estudiar la relación entre la concentración del donador y su efecto inhibitorio, la formación de cGMP estimulada por SNP (3 min) se estudió en células previamente tratadas con concentraciones crecientes de SNP o SNAP



**Figura 19. Efecto del tratamiento con SNP (A) o SNAP (B) sobre la estimulación aguda de la formación de cGMP por SNP, en cultivos enriquecidos en astrogía cerebelar.** Después del tratamiento con concentraciones crecientes de los donadores durante 2 horas, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1 mM en ausencia o presencia de SNP 100  $\mu\text{M}$ , y se determinó el cGMP intracelular. La estimulación aguda de la formación de cGMP inducida por NO (○) se calculó restando los valores en ausencia de SNP (■) a los valores en presencia de SNP (▼). Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido tres (A) o dos veces (B) con resultados semejantes.

durante 2 horas, tiempo en el que, según los resultados anteriores, se ha alcanzado la inhibición máxima. Los resultados obtenidos indican que el efecto inhibitorio de los donadores es dependiente de su concentración (Fig. 19). El ajuste no lineal de los datos permitió estimar su potencia y efecto máximo (Tabla 5), que resultaron semejantes para ambos donadores, a pesar de la distinta cinética de liberación de NO descrita previamente.

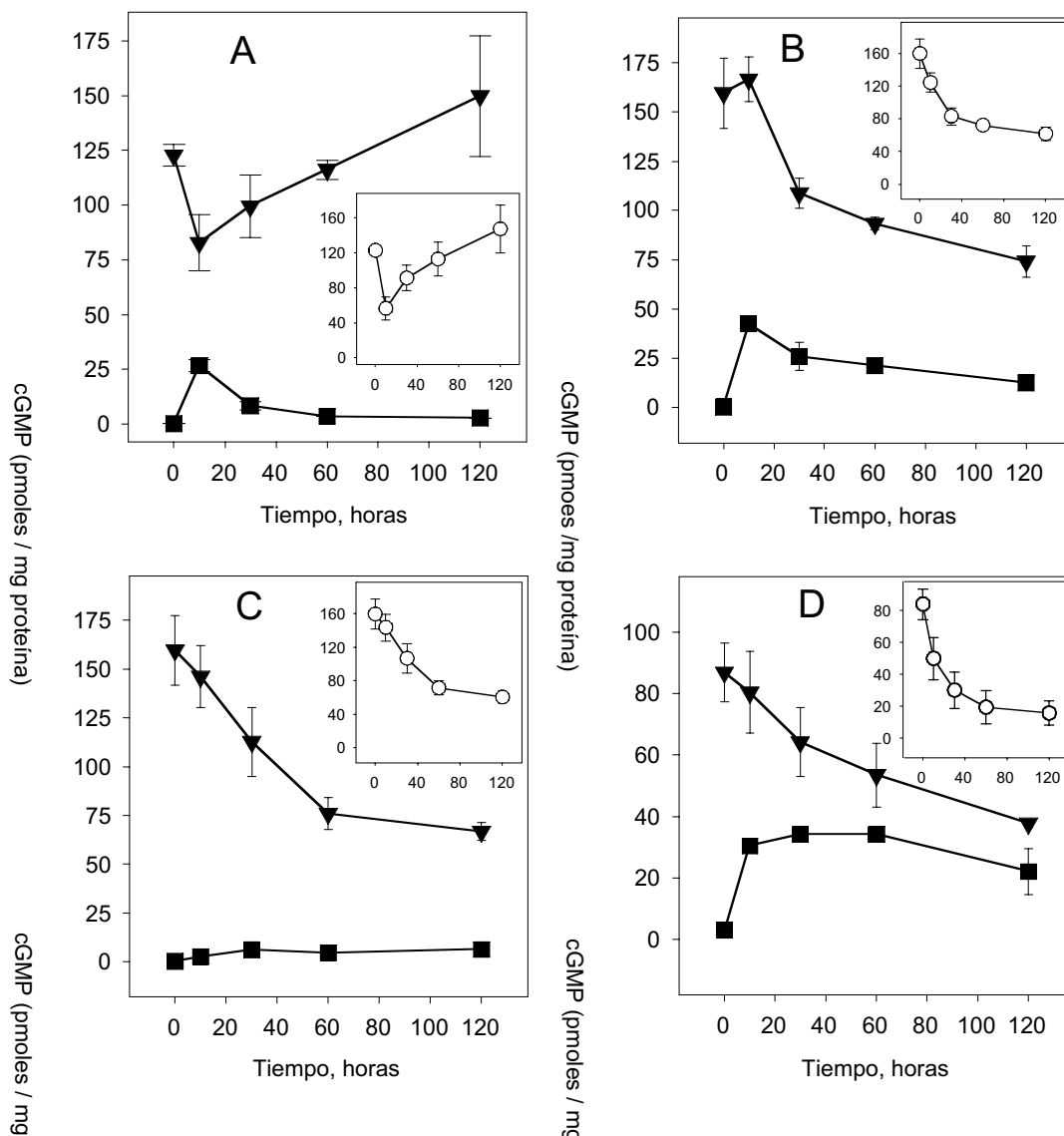
	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_{\text{max}}$ (%)
<b>SNP</b>	$5.8 \pm 0.6$	$55.5 \pm 6.8$
<b>SNAP</b>	$7.9 \pm 2.5$	$62.1 \pm 0.2$

**Tabla 5. Potencia ( $EC_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{\text{max}}$ ) de SNP y SNAP para inhibir la acumulación de cGMP dependiente de NO tras 2 horas de tratamiento.** Para determinar la  $EC_{50}$  y el  $E_{\text{max}}$  se realizó un ajuste no lineal de los datos de experimentos como los representados en la Fig. 4 (ver apartado 2.8.1. de Materiales y Métodos). Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres o dos experimentos.

Ya que la máxima inhibición de la formación de cGMP se observaba ya al primer tiempo estudiado (2 horas), con dos donadores de cinéticas de liberación



de NO tan diferentes, se procedió a estudiar el efecto de exposiciones más cortas a SNAP o distintos NONOatos, donadores de NO con una velocidad de liberación de NO bien establecida y que no es afectada por los componentes del medio (Feelisch y Stamler, 1996). Como se observa en la Fig. 20, la exposición a estos donadores a una concentración fija (100  $\mu$ M) durante 10-120 min produce una rápida disminución de la acumulación de cGMP inducida por SNP, cuya



**Figura 20. Efecto del tratamiento con DEA/NO (A), SPER/NO (B), DETA/NO (C) y SNAP (D) durante distintos tiempos sobre la formación de cGMP dependiente de NO.** Después del tratamiento con los donadores (100  $\mu$ M) durante los tiempos indicados, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1 mM en ausencia (■) o presencia (▼) de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular. Insertos: niveles de cGMP obtenidos en presencia de SNP menos los obtenidos en su ausencia (○). Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido una (DEA/NO) o dos veces (SPER/NO, DETA/NO y SNAP) con resultados semejantes.

evolución en el tiempo varia en función del donador y de su velocidad de liberación de NO. El tratamiento con DEA/NO, donador con una vida media de 2,1 min, disminuye en un  $47,0 \pm 1,2$  % la formación de cGMP sólo a los 10 min de exposición (tiempo más corto estudiado). Tratamientos durante tiempos muy superiores a la vida media del DEA/NO, no tienen efecto, indicando que la rápida inhibición producida por el DEA/NO en los primeros 10 min es espontáneamente reversible. La SPER/NO y el DETA/NO, donadores con vidas medias de 39 min y 20 horas, respectivamente, producen a los 120 min de tratamiento una inhibición máxima similar:  $55,6 \pm 6,6$  % y  $53,5 \pm 8,7$  %, respectivamente. No obstante, la velocidad de inhibición es mayor en el caso de la SPER/NO. A partir de los datos experimentales se calculó la velocidad de inhibición para cada uno de los donadores al tiempo más corto estudiado (10 min) (Tabla 6). Ordenando los NONOatos en función de su velocidad de inhibición se obtiene la relación DEA/NO > SPER/NO > DETA/NO. Según estos resultados, la velocidad de inhibición está inversamente relacionada con la vida media para los distintos NONOatos (DETA/NO > SPER/NO > DEA/NO), y por lo tanto directamente relacionada con la velocidad de NO liberado. Por otro lado, el SNAP inhibe la formación de cGMP con una velocidad similar a la del SPER/NO, aunque la inhibición máxima producida es mayor ( $74,0 \pm 7,4$  % del no control).

	DEA/NO	SPER/NO	DETA/NO	SNAP
% Inhibición/min	$7,0 \pm 1,6$	$3,0 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$

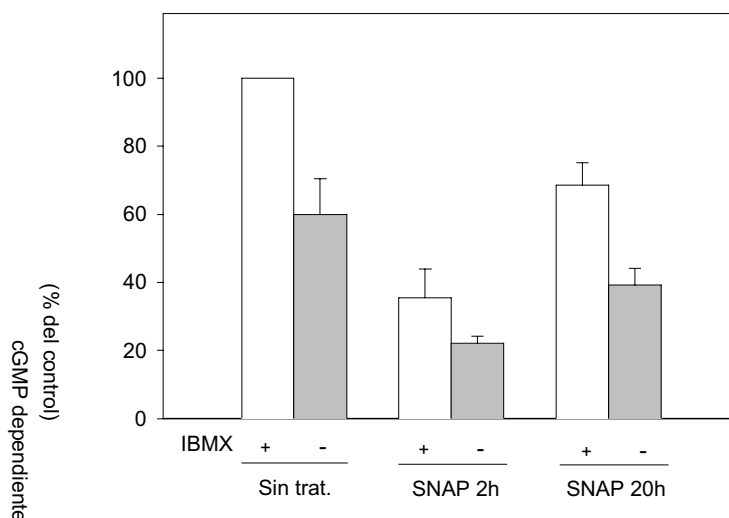
**Tabla 6. Velocidad de inhibición de la formación de cGMP dependiente de NO causada por el tratamiento con diferentes donadores en cultivos astrogliales.** A partir de experimentos como los representados en la Fig. 20 se calculó para cada donador de NO la variación en el tiempo de los niveles de cGMP formados en respuesta a SNP tras los primeros 10 min de tratamiento, es decir, la pendiente entre los puntos 0 y 10 min. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos (SPER/NO, DETA/NO y SNAP) o media  $\pm$  rango de dos experimentos (DEA/NO).

También se observa una relación entre los niveles basales de cGMP tras el tratamiento con los donadores y la vida media de los NONOatos. DEA/NO produce un máximo de acumulación de cGMP basal a los 10 min de exposición que desaparece rápidamente. El aumento de cGMP basal producido por SPER/NO es máximo en los primeros minutos y disminuye progresivamente, aunque se mantiene durante al menos 2 horas. El tratamiento con DETA/NO, el donador de NO más lento, aumenta los niveles basales de forma más lenta y en menor cantidad que en los casos anteriores. En comparación con los NONOatos,

la exposición a SNAP produce un rápido aumento del cGMP basal alcanzando a los 10 min de tratamiento niveles comparables a los obtenidos con DEA/NO y SPER/NO que además se mantienen significativamente elevados durante las 2 horas siguientes. Estos datos indican que el SNAP es el donador más eficaz a tiempos cortos, ya que a la misma concentración que los otros donadores, este agente produce una mayor estimulación y una mayor inhibición de los niveles de cGMP.

### **2.1.2. Efecto del tratamiento con donadores de NO sobre la actividad y expresión de la sGC.**

La concentración intracelular de cGMP depende de la velocidad de su síntesis y degradación y de la velocidad de su liberación al medio extracelular. Como se ha visto en el apartado anterior (Tabla 2) los niveles de cGMP en el medio extracelular de cultivos de astrocitos estimulados con SNP son muy bajos (< 2 % del total), y el tratamiento previo con SNAP no los modifica (datos no mostrados). Esto implica que los efectos observados tras la exposición continuada a NO deben ser el resultado de la activación de fosfodiesterasas o de la inhibición de la enzima sGC, o bien por ambos. El protocolo utilizado en los experimentos anteriores (Fig. 16) apoya la idea de que es la actividad sGC, y no la degradación del cGMP la que está siendo modificada, ya que el IBMX, un inhibidor inespecífico de PDEs, está presente durante la estimulación aguda con SNAP, para evitar los posibles efectos debidos a los cambios de la actividad PDE. Sin embargo, se ha descrito que en cerebro puede haber PDEs del cGMP que no son totalmente inhibidas por 1 mM IBMX (Mayer y col., 1992; Fisher y col., 1998; Soderling y col., 1999). Por lo tanto, y con el fin de averiguar si un aumento en la actividad de PDEs estaba implicada en la disminución de la acumulación de cGMP inducida por tratamientos con donadores, se comparó la acumulación de cGMP en respuesta a NO (3 min) en presencia o ausencia de IBMX, en cultivos tratados con SNAP. En células de músculo liso vascular se ha descrito que el efecto inhibitorio de los donadores sobre la acumulación de cGMP está mediada por diferentes mecanismos en función de la duración del tratamiento (Papapetropoulos y col., 1996). En consecuencia, en este estudio se eligieron dos tiempos diferentes de exposición al SNAP, 2 y 20 horas, para determinar el efecto de exposiciones cortas y largas a NO.

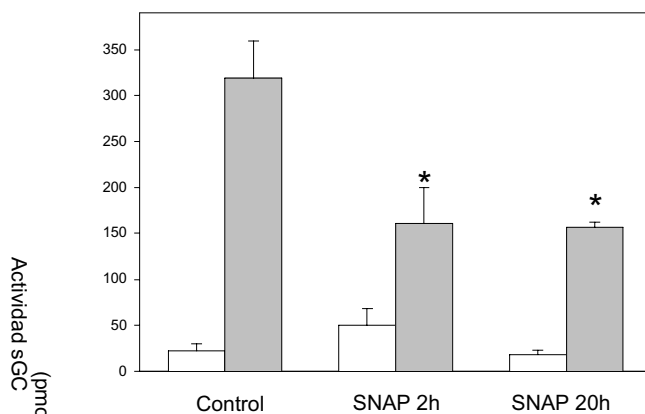


**Figura 21. Efecto del tratamiento con SNAP sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO en presencia o ausencia de IBMX.** Después del tratamiento con SNAP 100  $\mu$ M durante 2 ó 20 horas, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con SNP 100  $\mu$ M, en presencia (columnas grises) o ausencia (columnas blancas) de IBMX 1mM y se determinó el cGMP formado. Los resultados, expresados como porcentaje del efecto del SNP en presencia de IBMX en células no tratadas, son medias  $\pm$  rango de dos experimentos.

Como puede verse en la Fig. 21, en ausencia de IBMX se reduce la acumulación de cGMP dependiente de NO en un  $40,1 \pm 10,6$  %, lo cual indica que en los astrocitos las PDEs del cGMP si son sensibles a IBMX, de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Baltrons y col., 1997). Por otro lado el porcentaje de inhibición que produce el tratamiento previo con SNAP es similar en presencia y ausencia de IBMX ( $62,6 \pm 3,1$  % y  $64,6 \pm 8,5$  % a las 2 horas, y  $33,8 \pm 3,7$  % y  $31,3 \pm 6,6$  % a las 20 horas, respectivamente). Esto indica que el efecto del SNAP no es debido a una estimulación de las PDEs.

Con el fin de comprobar que la disminución de la formación de cGMP era debida a una reducción de la actividad sGC, se determinó esta actividad en fracciones citosólicas preparadas a partir de cultivos astrogiales expuestos a SNAP 100  $\mu$ M durante 2 y 20 horas. Como se muestra en la Fig. 22 tanto 2 horas como 20 horas de exposición a SNAP disminuyen significativamente la actividad de la sGC estimulada con NO ( $53,7 \pm 14,7$  % y  $51,0 \pm 5,4$  %, respectivamente). Al igual que en la acumulación de cGMP basal, el pretratamiento con SNAP 2 horas también tiene efecto en la actividad basal del enzima ( $238,0 \pm 58,5$  %), mientras que el tratamiento durante 20 horas no la modifica ( $96,0 \pm 13,0$  %). La transnitrosilación es una reacción importante entre los nitrosotioles, familia de donadores de NO a la que pertenece el SNAP. Por

ejemplo, la transnitrosilación que se produce entre el SNAP y el glutatión posee una constante de equilibrio que favorece la formación de S-nitrosoglutatión (Singh y col., 1996). Por lo tanto, es posible que en las fracciones citosólicas preparadas a partir de monocapas tratadas con SNAP haya proteínas o péptidos solubles nitrosiladas, que liberen NO dando lugar a la activación de la sGC. El hecho de que 20 horas de tratamiento no modifiquen la actividad basal puede deberse a la ausencia de NO remanente en la fracción citosólica (debido a que la mayor parte del NO se libera en las primeras horas de tratamiento), o a que la actividad basal es menor que la presente en muestras control, y el NO remanente la activa hasta alcanzar niveles semejantes.



**Figura 22. Actividad de la sGC en fracciones citosólicas de cultivos astroglicales.** Las fracciones citosólicas se obtuvieron a partir de cultivos no tratados (control) o tratados con SNAP 100  $\mu$ M durante 2 ó 20 horas. La actividad sGC se determinó incubando las fracciones citosólicas (30 – 50  $\mu$ g de proteína) en medio de reacción durante 10 min en ausencia (columna blanca, basal) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (columna gris, estimulado), y se determinó la cantidad de cGMP formado (ver apartado 2.4.2. de Materiales y Métodos). Los resultados son medias  $\pm$  SEM de cuatro experimentos. \*P < 0,05 respecto al control.

Con el objetivo de averiguar si la disminución de la actividad sGC era debida a una disminución de la concentración de la proteína enzimática, se examinaron los niveles de la subunidad  $\beta_1$ , para la cual se dispone de anticuerpo, por *western blot*. La Fig. 23 muestra que el tratamiento con SNAP durante 2 horas no afecta a la concentración de la subunidad  $\beta_1$  de la sGC en los astrocitos mientras que el tratamiento durante 20 horas la disminuye en un 35  $\pm$  8 % (n=5).

Para averiguar si la disminución de los niveles de la subunidad  $\beta_1$  de la sGC podían deberse a una disminución de los niveles del mRNA correspondiente se analizaron por RT-PCR los mRNAs de la subunidad  $\beta_1$ , y

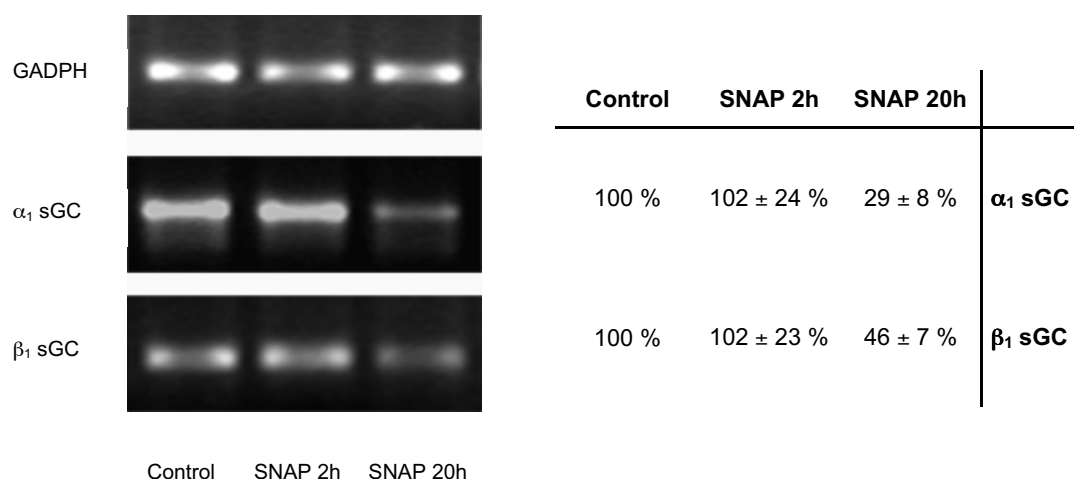
también de la  $\alpha_1$ , que según datos recientes de hibridación in situ colocaliza con la  $\beta_1$  en células astrogliales cerebelares (Gibb y Garthwaite, 2001). En concordancia con los resultados obtenidos al analizar los niveles de subunidad  $\beta_1$ , exposiciones a SNAP de 2 horas no alteraron los niveles de mRNA de dicha subunidad, ni los de  $\alpha_1$  (Fig. 24), mientras que exposiciones de 20 horas disminuyeron los niveles un  $71 \pm 8 \%$  y  $54 \pm 7 \%$  ( $n=3$ ) para los mRNAs de la  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , respectivamente.



	Control	SNAP 2h	SNAP 20h
<b>Proteína (% del control)</b>	100 %	$103 \pm 5 \%$	$65 \pm 8 \%$

**Figura 23. Efecto del tratamiento con SNAP sobre la concentración de la subunidad  $\beta_1$  de sGC.** Las fracciones solubles se obtuvieron a partir de cultivos no tratados (control) o tratados con SNAP  $100 \mu\text{M}$  durante 2 ó 20 horas. Las proteínas de los homogenados ( $40 - 50 \mu\text{g}$  de proteína) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que fueron incubadas con un anticuerpo que reconoce principalmente a la subunidad  $\beta_1$  de la sGC ( $70 \text{ kDa}$ ). Como control positivo se utilizó una fracción soluble de cortex de rata. En la tabla se representan los niveles de proteína respecto al control calculados tras el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de cinco experimentos como el que se representa.

Según estos resultados, la disminución de la actividad sGC tras 20 horas de tratamiento con SNAP está causada por la disminución de la concentración de al menos una de sus subunidades ( $\beta_1$ ). Ya que la sGC es un heterodímero  $\alpha/\beta$  obligado y la subunidad  $\beta_1$  parece formar parte de los heterodímeros funcionales (Koesling, 1999), la reducción de la concentración de  $\beta_1$  sería suficiente para producir disminución de la actividad. Además, el tratamiento con NO disminuye los niveles de mRNA de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , lo cual indica que el NO también podría afectar a la expresión de la subunidad  $\alpha_1$ . En contraste, el tratamiento con SNAP durante 2 horas no modifica los niveles de mRNA de  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , ni reduce la concentración de  $\beta_1$ . En este caso, la disminución de la actividad sGC parece deberse a un efecto directo sobre el enzima.

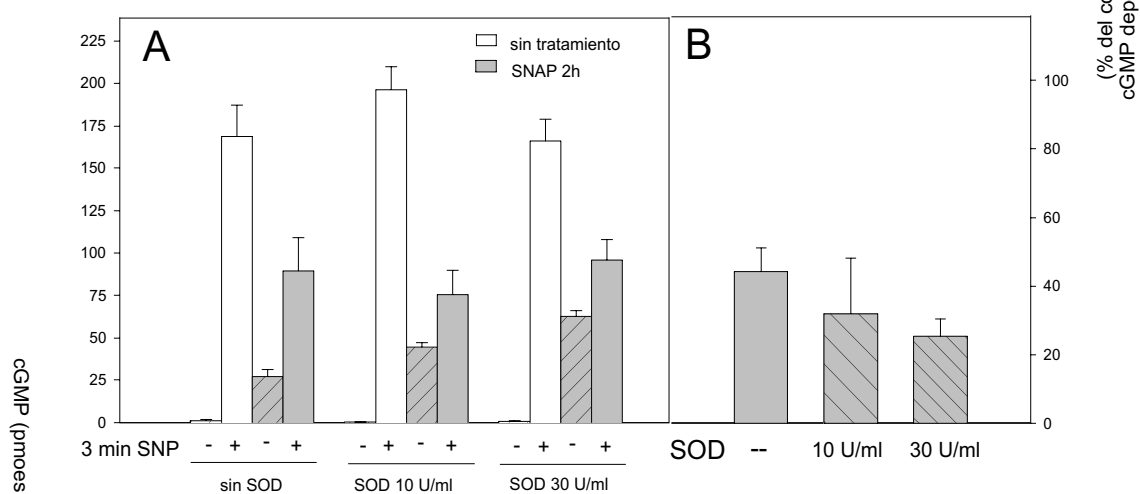


**Figura 24. Efecto del tratamiento con SNAP sobre los niveles de mRNA de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de sGC en astrocitos.** El RNA extraído de cultivos celulares tratados con vehículo (control) o con SNAP 100  $\mu$ M durante 2 ó 20 horas, se analizó mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para amplificar la GADPH y las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la sGC. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el programa Molecular Analyst (BioRad). En la tabla se presenta el resultado del análisis de 3 experimentos como el representado. El mRNA de la GADPH ha sido utilizado como control de la eficiencia de la retrotranscripción. Los resultados han sido calculados como porcentaje de la respectiva GADPH y posteriormente como porcentaje del control, y están expresados como medias  $\pm$  SEM.

### 2.1.3. Mecanismos implicados en la desensibilización de la sGC

El NO es una molécula muy inestable cuya vida media puede variar en función del estado de oxido-reducción del entorno. Por ejemplo, al interactuar con el radical superóxido ( $O_2^-$ ) se transforma en peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), una molécula altamente oxidante. NO y peroxinitrito poseen diferentes características reactivas y actúan sobre distintas dianas. Beltrán y col. (2000) han descrito como el NO y el peroxinitrito inhiben distintos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, y a través de diferentes mecanismos de inhibición. Además, el efecto del NO es inmediatamente reversible, mientras que el efecto del peroxinitrito es irreversible y citotóxico (Beltran y col., 2000). Muchas de las acciones del NO sobre proteínas se corresponden con nitrosaciones reversibles de tioles (Becker y col., 1998), mientras que el peroxinitrito tiene especial afinidad por la nitración de tirosinas (Gow y Ischiropoulos, 2001). Como se ha demostrado en el apartado anterior, el tratamiento de las células con SNAP durante 2 horas no altera el nivel de proteína, sugiriendo que la inhibición es mediada por una modificación de la proteína. Para determinar si el efecto inhibitorio de los donadores de NO se debía al propio NO, o al producto de su

oxidación por superóxido, el peroxinitrito, las células se trataron con SNAP 100  $\mu\text{M}$  en ausencia o presencia de superóxido dismutasa (SOD), enzima que inactiva el anión superóxido. Los resultados (Fig. 25) muestran que la presencia de SOD durante el tratamiento con SNAP aumenta la acumulación de cGMP basal, probablemente porque aumenta la vida media del NO. Por otro lado, la presencia de SOD durante el tratamiento no reduce la inhibición de la formación de cGMP estimulada por SNP, sino que tiende a aumentarla, lo cual está de acuerdo con que es el propio NO, y no el peroxinitrito, el que inhibe a la sGC.

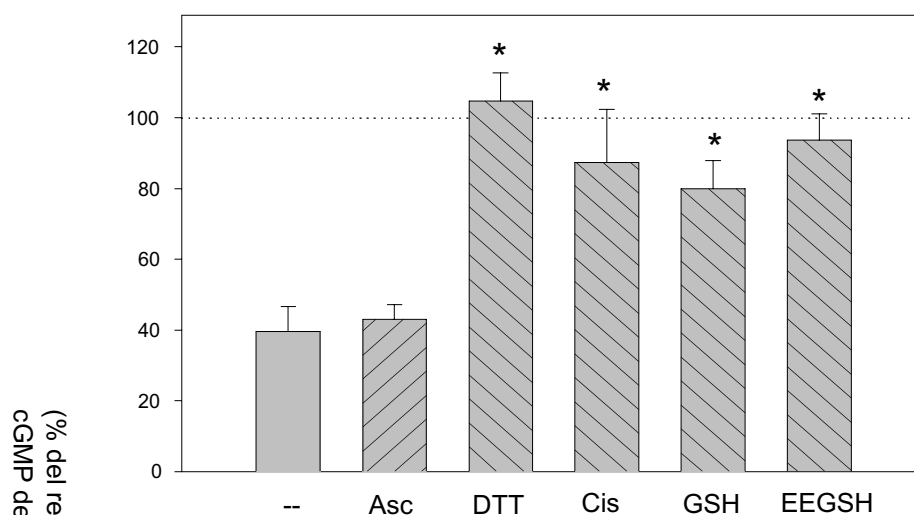


**Fig. 25. Efecto de la presencia de SOD durante el tratamiento con SNAP sobre la estimulación de la formación de cGMP en astroglía.** Las células se trataron 2 horas con vehículo o SNAP 100  $\mu\text{M}$ , en ausencia o presencia de SOD 10 ó 30 U/ml. A continuación las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1mM en ausencia o presencia de SNP 100  $\mu\text{M}$ , y se determinó el cGMP intracelular. A: los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido con resultados semejantes. B: los datos de dos experimentos como el representado en A se expresan como porcentaje del cGMP formado en respuesta a SNP en células tratadas con SNAP respecto a células sin tratar, en cada caso. Los resultados son medias  $\pm$  rango.

El estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo y de residuos de cisteína de la proteína juegan un papel importante en el grado de actividad de la sGC (ver revisión: Mittal y Murad, 1977). Con el fin de averiguar si la inhibición de la sGC astroglial por exposición a NO se debe a oxidación de residuos clave del enzima se estudió el efecto de los agentes antioxidantes durante el tratamiento con SNAP. Los cultivos se trataron durante 2 horas con SNAP 100  $\mu\text{M}$  en presencia de ascorbato 0,5 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, cisteína 1 mM, glutatión reducido 1 mM (GSH), o su derivado permeable etil-éster-glutatión reducido 1 mM (EEGSH). Los resultados (Fig. 26) muestran que la presencia de agentes reductores con grupos tiol (DTT, cisteína, GSH y EEGSH), previene el efecto inhibitorio del tratamiento de las células con SNAP. Sin embargo la



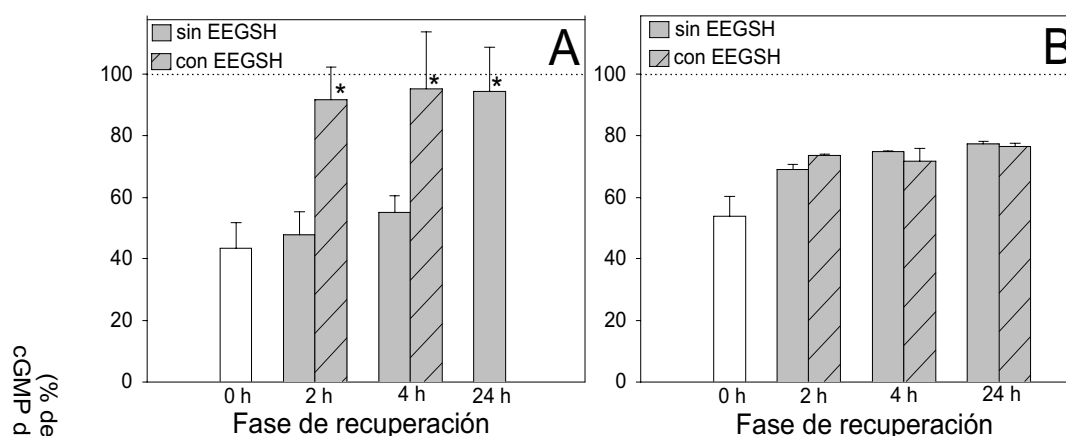
presencia de ascorbato no impide dicha inhibición. El hecho de que el efecto del SNAP se vea impedido por agentes reductores con grupos tiol permeables a la célula (DTT, EEGSH, cisteína) y no permeables (GSH), pero no por antioxidantes sin grupos tiol, sugiere que el efecto bloqueante de la presencia de los reductores durante el tratamiento se debe al secuestro del NO liberado por el SNAP, impidiendo así su posterior efecto sobre la sGC. De acuerdo con nuestros resultados, el efecto de 2 horas de tratamiento con NO sobre la formación de cGMP en células de músculo liso vascular también se ve impedido en presencia de agentes antioxidantes (Papapetroloulos y col., 1996).



**Figura 26. Efecto de la presencia de agentes reductores durante el tratamiento con SNAP sobre la estimulación de la formación de cGMP en cultivos primarios enriquecidos en astroglias cerebrales.** Las células se trataron 2 horas con vehículo o SNAP 100  $\mu$ M, solos o junto con ácido ascórbico (Asc) 500  $\mu$ M, DTT 2 mM, cisteína (Cis) 10 mM, glutatión reducido (GSH) 1 mM o etilglutatión reducido (EEGSH) 1 mM. A continuación las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1mM en ausencia (basal) o presencia de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular por RIA. Los resultados se representan como porcentaje del cGMP formado tras la estimulación con SNP (cGMP estimulado por SNP menos basal) en células tratadas con SNAP respecto a células sin tratar, en cada caso. Los resultados son medias  $\pm$  rango de dos experimentos. \*P < 0,05 respecto al efecto del SNAP.

Para comprobar si los agentes reductores con grupos tiol son además capaces de revertir la inhibición de la sGC producida por la exposición continuada con SNAP, se estudió el efecto de la incubación con EEGSH después del tratamiento. Para ello cultivos de astroglias fueron tratados 2 horas con SNAP 100  $\mu$ M y, tras un lavado, fueron incubados durante distintos tiempos en medio sin donador. Durante esta fase de recuperación se añadió EEGH 1 mM (o vehículo) a las muestras. Como se observa en la Fig. 27A, la inhibición en la formación de cGMP producida por SNAP revierte espontáneamente en las

siguientes 24 horas, y esta reversión se acelera si EEGSH está presente en la fase de recuperación, observándose una recuperación total a las 2 horas. La presencia de EEGSH durante la fase de recuperación no modificó la acumulación de cGMP en respuesta a SNP en cultivos no tratados con SNAP (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el NO podría estar induciendo la desensibilización del enzima mediante la nitrosación de tioles importantes para la actividad.



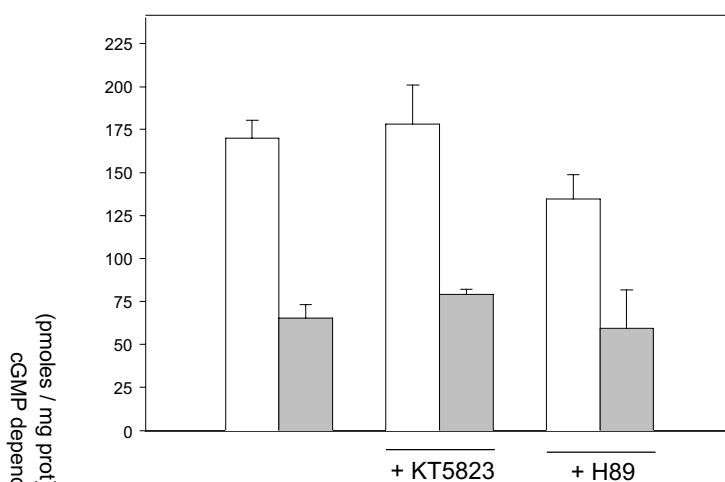
**Figura 27. Reversión espontánea e inducida por EEGSH de la inhibición de la formación de cGMP producida por el tratamiento con NO.** Después de la exposición a SNAP 100  $\mu$ M durante 20 horas (A) o 20 horas (B), las monocapas fueron lavadas e incubadas distintos tiempos con IBMX en ausencia (columnas lisas) o presencia (columnas rayadas) de etilesterglutation (EEGSH) 1 mM. A continuación las células se incubaron durante 3 min con IBMX 1 mM en presencia o ausencia de SNAP 100  $\mu$ M, y se calculó el cGMP estimulado por el SNP. Los resultados (porcentajes de cGMP estimulado por SNP sobre los correspondientes controles) son medias  $\pm$  rango de dos experimentos. \*P < 0,05 respecto a las 0 horas de recuperación.

En contraste, la inhibición de la sGC tras exposiciones al donador durante 20 horas no revierte en las 24 horas posteriores a la retirada del donador ni en ausencia o presencia de EEGSH (Fig. 27B). Al igual que se observaba en la Fig. 17, la comparación de las inhibiciones producidas tras 2 y 20 horas de tratamiento (0 horas de recuperación en Fig. 27A y B), muestra un menor efecto en tratamientos largos, lo que está de acuerdo con una cierta reversión debido a la ausencia de liberación de NO durante las últimas horas de tratamiento y con la reversibilidad del efecto directo del NO sobre el enzima. Por lo tanto, la inhibición de la sGC detectada a los dos tiempos estudiados está mediada por mecanismos distintos, con diferente capacidad de reversión.

Se ha demostrado que el NO regula la expresión de múltiples genes

(Marshall y col., 2000). En algunos casos dicha regulación se lleva a cabo a través de la síntesis de cGMP y posterior activación de proteínas kinasas (PKG e indirectamente PKA) (Idriss y col., 1999). Para estudiar si la inhibición de la sGC producida por tratamientos largos con SNAP estaba mediada por la activación de alguna de las dos o ambas proteína quinasas, las monocapas se expusieron a SNAP 100  $\mu$ M durante 2 ó 20 horas, en ausencia o presencia de un inhibidor de PKG (KT-5823), o un inhibidor de PKA (H-89).

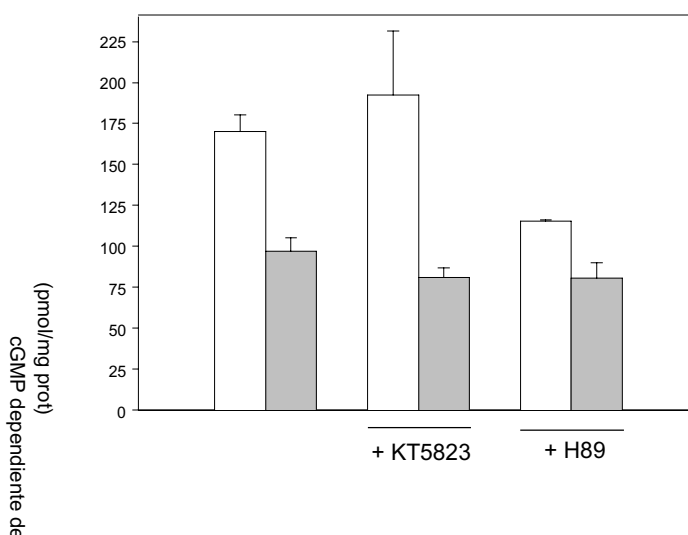
Según muestran los resultados (Fig. 28) la inhibición de la PKG con KT-5823 durante las 2 horas de tratamiento con SNAP no modifica el porcentaje de inhibición producido por este donador ( $54,3 \pm 7,3$  y  $51,0 \pm 4,5$  %, en ausencia o presencia de KT-5823 respectivamente). El tratamiento con H-89 es capaz de disminuir la respuesta a SNP ( $21,2 \pm 2,7$  %, pero su presencia durante el tratamiento con SNAP tampoco altera la inhibición ( $59,7 \pm 9,7$  % y  $58,0 \pm 4,6$  %, en ausencia o presencia de H-89 respectivamente).



**Figura 28. Efecto de la presencia de los compuestos KT-5823 y H-89 durante el tratamiento con SNAP (2 horas) sobre la formación de cGMP dependiente de NO.** Las células se trataron 2 horas con vehículo o SNAP 100  $\mu$ M, en ausencia o presencia de KT-5823 2  $\mu$ M ó H-89 1  $\mu$ M (añadidos 30 min antes). A continuación las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1mM en ausencia o presencia de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular estimulado por el SNP. Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido tres (H-89) y una vez (KT-5823) con resultados semejantes.

Cuando el tratamiento con SNAP se prolonga a 20 horas (Fig. 29), la presencia del inhibidor de PKG tampoco previene el efecto del donador ( $51,0 \pm 4,5$  % y  $43,7 \pm 10,7$  %, en ausencia o presencia de KT-5823 respectivamente), lo que descarta la implicación de la PKG en la inhibición producida por tratamientos largos con SNAP. Al igual que a las 2 horas, el tratamiento con H-89 tiene por si

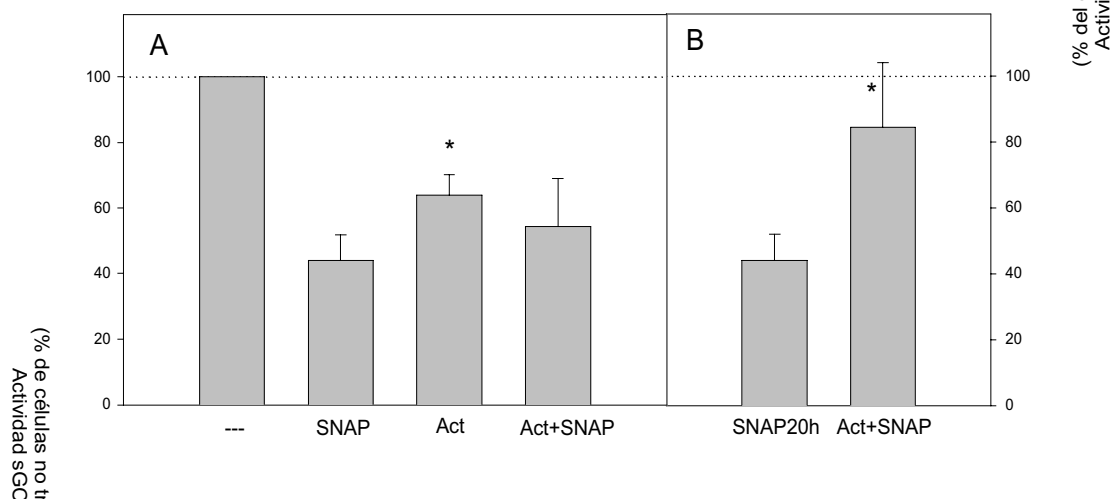
mismo un efecto inhibitorio sobre la formación de cGMP en respuesta a NO ( $36,6 \pm 8,5 \%$ ), y la combinación de H-89 y SNAP no modifica la cantidad de cGMP formado en respuesta a NO en comparación con las células tratadas con SNAP sólo. Sin embargo, la determinación del porcentaje de inhibición relativo al correspondiente control (células tratadas con H-89 20 horas) indica que la presencia de H89 sí revierte, aunque parcialmente, la inhibición producida por el SNAP ( $42,5 \pm 4,2 \%$  y  $19,2 \pm 10,4 \%$ , en ausencia o presencia de H-89 respectivamente;  $P < 0,05$ ). Este resultado indicaría que la actividad PKA podría estar implicada en la inhibición de la sGC causada por exposiciones prolongadas a NO.



**Figura 29. Efecto de la presencia de los compuestos KT-5823 y H-89 durante el tratamiento con SNAP (20 horas) sobre la formación de cGMP dependiente de NO.** Las células se trataron 20 horas con vehículo o SNAP  $100 \mu\text{M}$ , en ausencia o presencia de KT-5823  $2 \mu\text{M}$  ó H-89  $1 \mu\text{M}$  (añadidos 30 min antes). A continuación las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX  $1\text{mM}$  en ausencia o presencia de SNP  $100 \mu\text{M}$ , y se determinó el cGMP intracelular estimulado por el SNP mediante RIA. Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido dos veces con resultados semejantes.

En células de músculo liso se ha demostrado que la transcripción y traducción están implicadas en la disminución de la concentración de la sGC causadas por tratamientos largos con donadores de NO (Scott y Nakayama, 1997; Filippov y col., 1997). Para determinar si estos mecanismos están también implicados en la inhibición de la sGC producida por exposiciones largas a NO en nuestros cultivos, se estudió el efecto de la presencia de actinomicina D (inhibidor de la transcripción) y de cicloheximida (CHX; inhibidor de la síntesis de proteínas) durante el tratamiento. Según muestran los resultados (Fig. 30) el tratamiento con actinomicina D disminuye la actividad sGC, aunque esta

disminución es menor que la producida por el SNAP. Por otro lado, la presencia de actinomicina D durante el tratamiento con SNAP previene el efecto inhibitorio del SNAP.

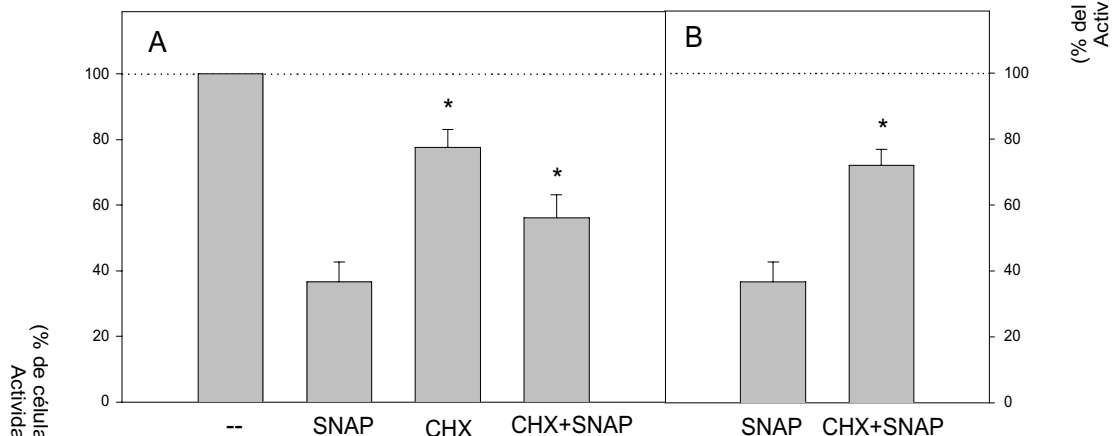


**Figura 30. Efecto de la presencia de actinomicina D durante el tratamiento con SNAP sobre la actividad sGC en fracciones citosólicas de cultivos astrogliales.** Las fracciones citosólicas se obtuvieron a partir de cultivos tratados durante 20 h con SNAP 100  $\mu$ M o vehículo, en presencia o ausencia de actinomicina D 4  $\mu$ g/ml (Act) (añadida 30 min antes). Alícuotas de 30 – 50  $\mu$ g de proteína fueron incubadas en el medio de reacción durante 10 min, en ausencia o presencia de SNAP 100  $\mu$ M. Los resultados se representan como porcentajes de cGMP formado en respuesta a NO respecto a las células no tratadas (A), y como el porcentaje de cGMP formado por las células tratadas con SNAP en cada caso (B). Los datos son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos. \*P < 0,05 respecto al tratamiento con SNAP.

Al igual que con la actinomicina D, el tratamiento con CHX durante 20 horas disminuye la actividad sGC (Fig. 31). La inhibición de la traducción con CHX durante el tratamiento con SNAP también previene la inhibición producida por este donador sobre la actividad sGC, aunque no completamente. Según estos resultados, tanto la transcripción como la traducción son pasos necesarios para que el tratamiento con SNAP durante 20 horas inhiba la actividad sGC

#### 2.1.4. Efecto del tratamiento con donadores de NO sobre la concentración intracelular de glutation en astrocitos.

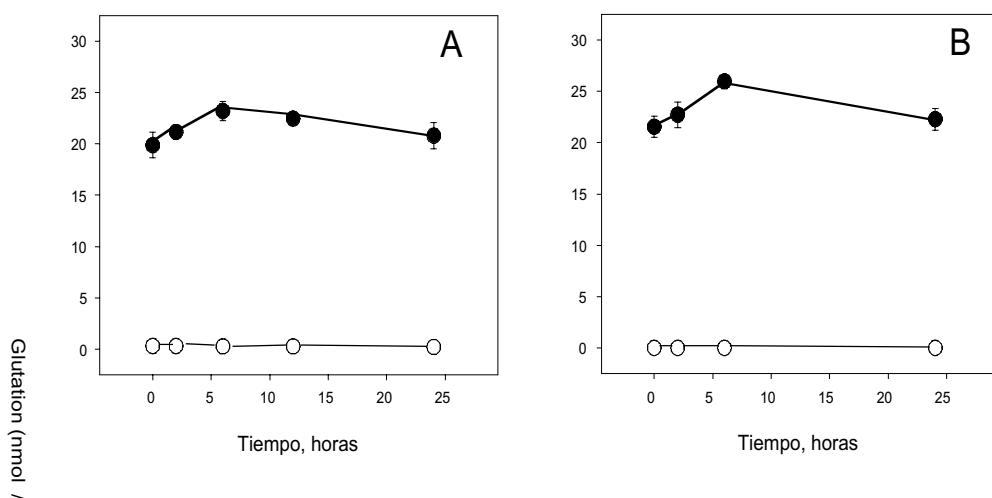
Resultados previos del grupo demuestran que en astrocitos, el tratamiento con LPS (10 ng/ml) durante 20 horas disminuye la actividad sGC (Baltrons y García, 1999). Al igual que con tratamientos largos con NO, esta inhibición enzimática se debe a la disminución de concentración de la proteína



**Figura 31. Efecto de la presencia de cicloheximida durante el tratamiento con SNAP sobre la actividad sGC en fracciones citosólicas de cultivos astrogiales.** Las fracciones citosólicas se obtuvieron a partir de cultivos tratados durante 20 horas con SNAP 100  $\mu$ M o vehículo, en presencia o ausencia de cicloheximida 20  $\mu$ M (CHX) (añadida 30 min antes). Alícuotas de 30 – 50  $\mu$ g de proteína fueron incubadas en el medio de reacción durante 10 min, en ausencia o presencia de SNP 100  $\mu$ M. Los resultados se representan como porcentajes de cGMP formado en respuesta a SNAP respecto a las células control (sin tratamiento con SNAP ni CHX) (A), y como el porcentaje de cGMP formado en las células tratadas con SNAP en cada caso (B). Los datos son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos. \*P < 0,05 respecto al tratamiento con SNAP.

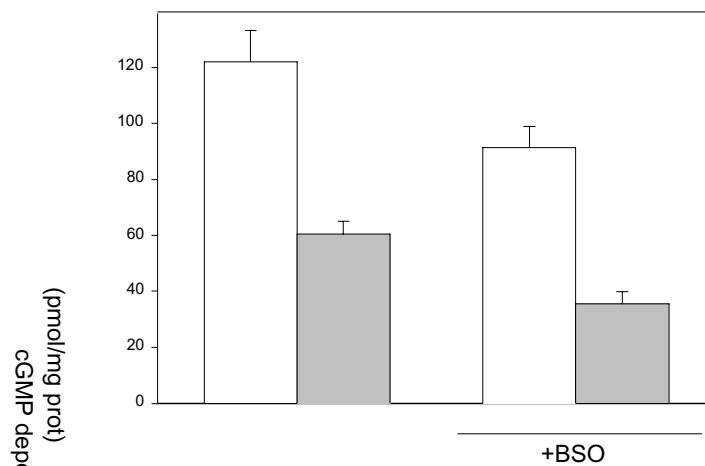
enzimática, y requiere transcripción y traducción. El LPS, además, induce la expresión de iNOS y la formación de cantidades de NO comparables a las que se generan por los donadores durante el tratamiento con SNAP (Baltrons y García, 1999). Sin embargo, la inhibición de la actividad sGC producida por el LPS no es dependiente del NO en nuestros cultivos (Baltrons y García, 1999), mientras que si lo es en otros tipos de células (Papapetropoulos y col., 1996). Por otro lado, se ha descrito que en cultivos de astrocitos el LPS previene la deplección del GSH causada por NO, mediante la inducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que genera NADPH, necesario para mantener la actividad de GSH reductasa (García-Nogales y col., 1999). Teniendo en cuenta que el GSH es capaz de revertir la inhibición de la sGC por el NO, para determinar si la diferente capacidad inhibitoria de la sGC por parte del NO exógeno y el NO formado durante el tratamiento con LPS, se debía a diferencias en los niveles de glutatión reducido y oxidado, se cuantificó la concentración de glutatión intracelular en células tratadas durante distintos tiempos con SNAP 100  $\mu$ M y LPS 10 ng/ml. En cultivos de astrocitos cerebelares no tratados, prácticamente todo el glutatión está en su forma reducida. La concentración de GSH intracelular es  $18,7 \pm 2,6$  nmol/mg proteína (n=5), mientras que la concentración de glutatión oxidado (GSSG) es mucho menor ( $0,3 \pm 0,2$  nmol/mg

proteína). Estos niveles de GSSG están muy cerca del límite de sensibilidad del método, y en algunos experimentos no pudieron ser detectados. Como muestra la Fig. 32, el tratamiento de los cultivos con SNAP o con LPS durante 0 – 24 horas no modifica significativamente los niveles de GSH, ni altera la relación GSSG/GSH. Por lo tanto, la diferente capacidad inhibitoria del NO procedente de donador y del NO formado tras la estimulación con LPS no puede explicarse por diferentes niveles de glutatión durante ambos tratamientos.



**Figura 32. Efecto del tratamiento con LPS (A) y SNAP (B) sobre la concentración intracelular de glutatión en cultivos enriquecidos en astrogliá cerebelar.** Se determinó la concentración intracelular de glutatión reducido (●) y glutatión oxidado (○) en cultivos tratados con LPS 10 ng/ml (A) ó SNAP 100  $\mu$ M (B) durante distintos tiempos. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de tres (A) o dos experimentos (B).

La relación entre el efecto del NO y los niveles intracelulares de glutatión se estudió también determinando el efecto de la deplección del glutatión en la inhibición producida por el NO exógeno. Para depletar las células de glutatión las monocapas se pretrataron durante 24 horas con L-butionina-(S,R)-sulfoximina (L-BSO), un inhibidor específico de la  $\gamma$ -glutamil cisteina sintetasa, enzima que interviene en la síntesis de glutatión. Este pretratamiento redujo la concentración intracelular de glutatión en un  $91,7 \pm 2,6$  % (n=3). Ya que la concentración de tioles puede afectar a la liberación de NO a partir del SNAP, se utilizó DETA/NO como fuente exógena de NO. Los resultados (Fig. 33) indican que en células pretratadas con BSO el efecto inhibitorio del DETA/NO es semejante al producido en células control ( $60,0 \pm 14,9$  % y  $52,0 \pm 10,2$  %, respectivamente), sugiriendo que los niveles intracelulares de glutatión no están relacionados con el efecto inhibitorio del NO.



**Figura 33. Efecto de la ausencia de glutatión intracelular durante el tratamiento con DETA/NO (20 horas) sobre la formación de cGMP dependiente de NO.** Cultivos astrogliales pretratados durante 24 h con o sin BSO 250  $\mu$ M, se trataron 20 h con DETA/NO 100  $\mu$ M (columnas grises) o vehículo (columnas blancas). A continuación, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 minutos con IBMX 1mM en ausencia o presencia de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular estimulado por el SNP mediante RIA. Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento repetido dos veces con resultados semejantes.



## 2.2. Desensibilización de la sGC de neuronas granulares de cerebelo.

El efecto de la exposición prolongada a NO sobre la acumulación de cGMP en neuronas se estudió utilizando cultivos enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo de 7 días, momento en el que las neuronas ya se han diferenciado, formando una red de prolongaciones neuronales. En estos cultivos, los niveles de cGMP acumulados tras la estimulación durante 3 min con el donador de NO SNP (100  $\mu$ M) son mayores que los alcanzados en astrocitos, sin embargo, en presencia del inhibidor de PDEs IBMX (1 mM) la acumulación es comparable en ambos tipos celulares (Baltrons y col., 1997). Para realizar este estudio se siguió el mismo protocolo de tratamiento con donadores utilizado en cultivos enriquecidos en astrocitos (Fig. 16).

Ya que las neuronas son células más sensibles a la toxicidad causada por NO que los astrocitos (Bolaños y col., 1995), inicialmente se realizó un estudio de citotoxicidad con varios tiempos de exposición a SNAP o SNP con el fin de determinar un tiempo de tratamiento adecuado para el estudio de la desensibilización. Paralelamente, y para conocer la cantidad de NO liberada por los donadores en los distintos tratamientos, se midió la concentración de nitritos acumulados en el medio de incubación de las neuronas.

% LDH extracelular				
Tiempo de exposición al donador	0 h	2 h	4 h	24 h
SNP	9,7 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 0,2	28,0 $\pm$ 2,4 *	72,9 $\pm$ 8,3 *
SNAP	9,7 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,2	16,5 $\pm$ 0,1 *

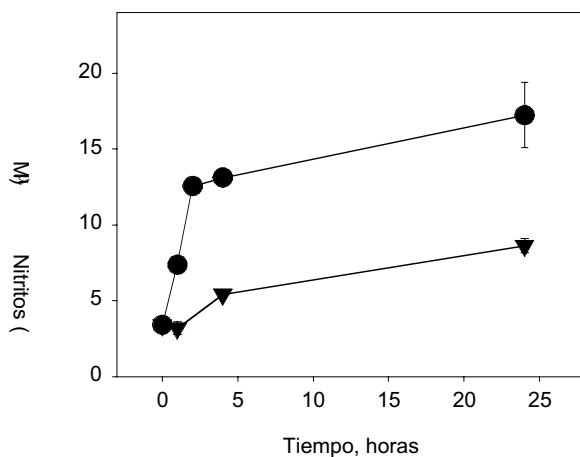
**Tabla 7. Efecto del tratamiento con SNP y SNAP sobre la viabilidad de las neuronas granulares en cultivo.** La actividad LDH intra- y extracelular se midió en cultivos tratados con SNP o SNAP 100  $\mu$ M durante distintos tiempos. Los resultados son medias  $\pm$  rango de dos experimentos.

Según los resultados recopilados en la Tabla 7, los tratamientos largos con ambos donadores, SNP y SNAP, tienen efectos tóxicos en las neuronas granulares en cultivo, resultando el SNP más tóxico que el SNAP. El tratamiento

con SNAP no altera el porcentaje de actividad LDH extracelular dentro de las primeras 4 horas de tratamiento, pero casi la duplica a las 24 horas. Sin embargo, el tratamiento con SNP produce un aumento significativo de la actividad LDH extracelular ya a las 4 horas (3 veces la del control), que aumenta notablemente a las 24 horas constituyendo un 73 % de la actividad total.

La gráfica de acumulación de nitritos (Fig. 34) sugiere que, al igual que en cultivos de astrocitos, en presencia de neuronas la velocidad de acumulación de NO por parte del SNAP sigue un comportamiento no lineal, siendo mayor en las primeras horas de tratamiento. Las cantidades de nitritos acumulados en el medio de neuronas son también comparables a las de cultivos de astrocitos. Sin embargo, a diferencia de lo observado en cultivos de astrocitos, la acumulación de nitritos generada por el SNP no es lineal, y tras 24 horas de tratamiento es menor a la hallada en cultivos de astrocitos. Si se toma la velocidad de acumulación de nitritos como medida indirecta de la velocidad de liberación de NO por parte del donador, estos resultados sugieren que, así como la velocidad de liberación de NO por parte del SNAP es semejante en los dos tipos de cultivos (astrocito o neurona), la velocidad de liberación de NO por parte del SNP depende del tipo de cultivo. Aunque el mecanismo de liberación de NO por parte del SNP es poco conocido, se admite que su descomposición no es espontánea, sino que ocurre tras fotólisis, adición de agentes reductores y transformaciones metabólicas (Bates y col., 1991; Murphy y Noack, 1994). Diferencias en estas últimas podrían explicar la distinta liberación de NO en cultivos de astrocitos y de neuronas.

La comparación de los datos de citotoxicidad y de acumulación de nitritos corrobora que las neuronas son células más sensibles al NO que los astrocitos, ya que la exposición a las mismas cantidades de NO no tiene efecto en astrocitos, pero resulta tóxica en cultivos de neuronas. El hecho de que el SNP produzca mayor toxicidad que el SNAP en neuronas, a pesar de que la cantidad de NO que libera es menor, podría sugerir que el efecto tóxico de este compuesto no está mediado por NO, o al menos no completamente. Además de NO, la descomposición del SNP produce ión ferricianuro, un compuesto con efectos tóxicos, ya que inhibe el transporte electrónico (Feelish y Stamler, 1996). La toxicidad del SNP en nuestras neuronas podría deberse, al menos en parte, al componente ferricianuro.

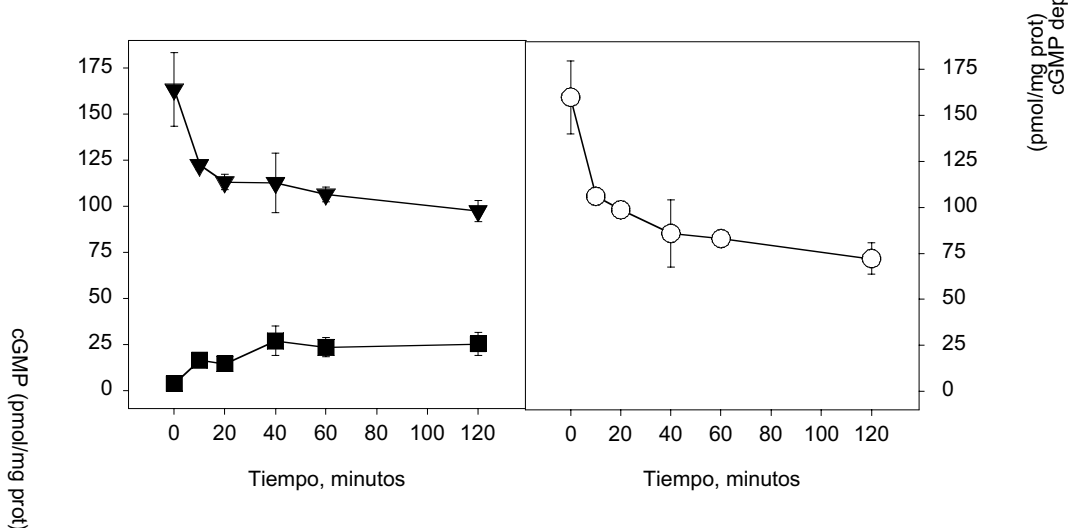


**Figura 34. Concentración de nitritos acumulados en el medio de incubación de las neuronas tras el tratamiento con SNP o SNAP durante distintos tiempos.** Los cultivos de neuronas se trataron con SNP (▼) ó SNAP (●) 100  $\mu$ M, y tras los tiempos indicados se determinó la concentración de nitritos en el medio de incubación. Los resultados son medias  $\pm$  rango de dos experimentos.

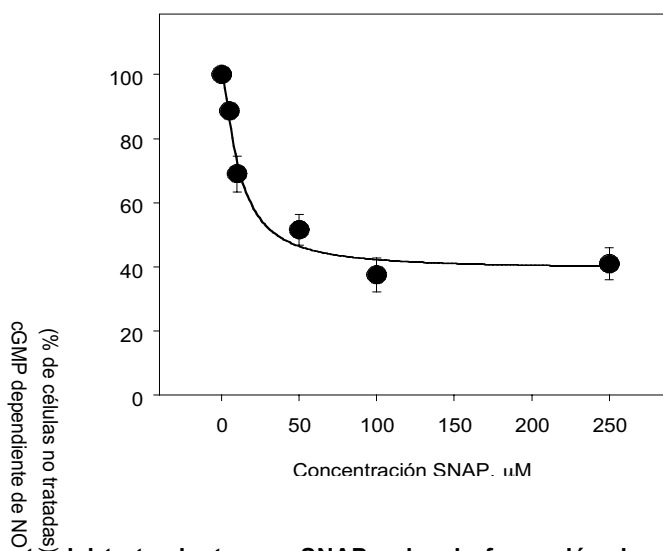
Para estudiar la desensibilización de la sGC por exposiciones prolongadas a NO, las neuronas se trataron con SNAP 100  $\mu$ M durante distintos tiempos dentro del intervalo de 0 a 2 horas, tiempos que, según los resultados anteriores no alteraban el porcentaje de actividad LDH extracelular. Los resultados (Fig. 35) muestran que, al igual que en cultivos enriquecidos en astrocitos, el tratamiento de las células con SNAP 100  $\mu$ M produce una rápida reducción de los niveles de cGMP producidos por la estimulación aguda (3 min) con SNP. La inhibición máxima producida ( $53,1 \pm 7,3$  % del no tratado) es alcanzada a los 30-40 min de tratamiento y se mantiene al menos hasta las 2 horas. La velocidad de inhibición inicial (velocidad de inhibición en los primeros 10 min) calculada a partir de los datos experimentales ( $3,09$  % inhibición / min), no resultó significativamente diferente a la calculada en cultivos de astrocitos ( $3,6 \pm 0,2$  % inhibición / min). Además, tal y como ocurre en cultivos astrogliales, en las neuronas tratadas con SNAP y no estimuladas con SNP (basales) se observan aumentos en los niveles intracelulares de cGMP.

La relación entre la concentración del donador y su efecto inhibitorio se estudió tratando las células con concentraciones crecientes de SNAP. Ya que los resultados anteriores indicaban que la inhibición máxima se alcanzaba a los 60 min de tratamiento, y con el fin de disminuir en lo posible los efectos tóxicos en las células, el tiempo de exposición elegido para estudiar la respuesta a las distintas concentraciones de SNAP fue de 1 hora. Los resultados obtenidos

indican que el efecto del SNAP es dependiente de su concentración (Fig. 36). El ajuste no lineal de los datos (ver el capítulo Materiales y Métodos) permitió estimar la  $EC_{50}$  ( $10,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ) y el efecto máximo ( $62,1 \pm 0,2 \%$ ). Los valores obtenidos fueron similares a los calculados en cultivos enriquecidos en astrocitos.



**Figura 35. Efecto del tratamiento con SNAP durante distintos tiempos sobre la formación de cGMP dependiente de NO en neuronas granulares de cerebelo.** Después del tratamiento con SNAP  $100 \mu\text{M}$  durante los tiempos indicados, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX  $1 \text{ mM}$  en ausencia (■) o presencia (▼) de SNP  $100 \mu\text{M}$ , y se determinó el cGMP intracelular. La resta de los niveles obtenidos en presencia de SNP, menos los obtenidos en su ausencia (○) representan la estimulación aguda de la formación de cGMP inducida por NO. Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido dos veces con resultados semejantes.



**Figura 36. Efecto del tratamiento con SNAP sobre la formación de cGMP estimulada por SNP, en cultivos enriquecidos en neuronas granulares.** Después del tratamiento con concentraciones crecientes de SNAP durante 1 hora, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX  $1 \text{ mM}$  en ausencia o presencia de SNP  $100 \mu\text{M}$ , y se determinó el cGMP intracelular. Los resultados (valores en presencia de SNP menos valores en ausencia de SNP) son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos.

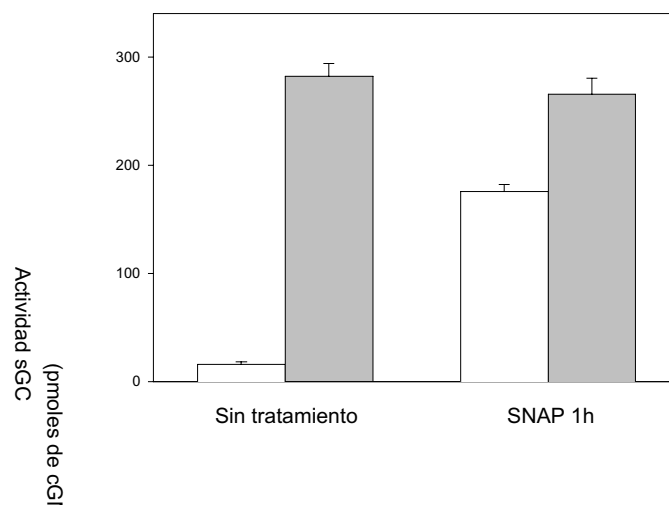
El estudio de la actividad LDH tras los tratamientos con las distintas concentraciones de SNAP, confirmó que durante estos tratamientos no se alteraba el porcentaje de LDH extracelular (Tabla 8).

% LDH extracelular				
SNAP, $\mu\text{M}$	0	50	100	250
% LDH extracelular	9,7 $\pm$ 1,4	11,1 $\pm$ 2,0	13,0 $\pm$ 1,0	9,9 $\pm$ 1,4

**Tabla 8. Efecto del tratamiento con distintas concentraciones de SNAP sobre la viabilidad de las neuronas granulares en cultivo.** La actividad LDH intra- y extracelular se midió en cultivos tratados con concentraciones crecientes de SNAP durante 1 hora. Los resultados son medias  $\pm$  rango de dos experimentos.

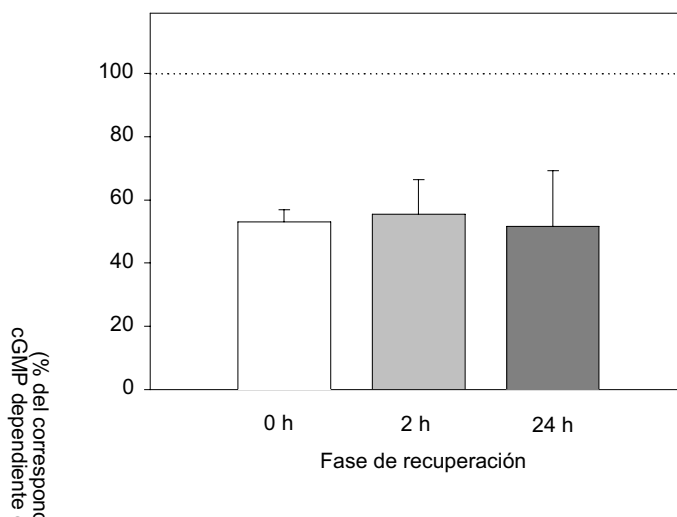
Para determinar si la disminución de la acumulación de cGMP se debía a una disminución de la actividad sGC se midió su actividad en fracciones citosólicas obtenidas a partir de cultivos de neuronas tratados previamente con SNAP 100  $\mu\text{M}$  (ó vehículo). Como muestra la Fig. 37, la actividad sGC estimulada por el SNP en fracciones citosólicas de neuronas es 20 veces superior a la actividad basal. El tratamiento previo de las neuronas con SNAP durante 1 hora provoca importantes aumentos en su actividad basal. Como en astrocitos, la mayor actividad basal tras el tratamiento con el donador podría deberse al NO liberado durante el tratamiento, almacenado en la fracción soluble mediante uniones reversibles a grupos tiol, o a cGMP remanente tras el tratamiento debido a una menor actividad PDE. Por otro lado, la actividad sGC dependiente de SNP (actividad estimulada menos basal) en cultivos tratados con SNAP significa sólo un tercio de la determinada en los controles.

Para estudiar la reversibilidad del efecto inhibitorio producido por la exposición continuada a SNAP, la acumulación de cGMP en respuesta a NO se determinó en cultivos de neuronas tratados con SNAP 100  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, y tras un lavado, incubados en medio fresco sin donador durante distintos tiempos. Los resultados obtenidos (Fig. 38) indican que la disminución de la acumulación del cGMP producida tras 1 hora de tratamiento con SNAP 100  $\mu\text{M}$  no revierte espontáneamente dentro de las 24 horas siguientes al tratamiento. Comparando estos resultados con los obtenidos en astrocitos, se aprecia que tiempos de exposición a SNAP que en cultivos de astrocitos causan una inhibición reversible



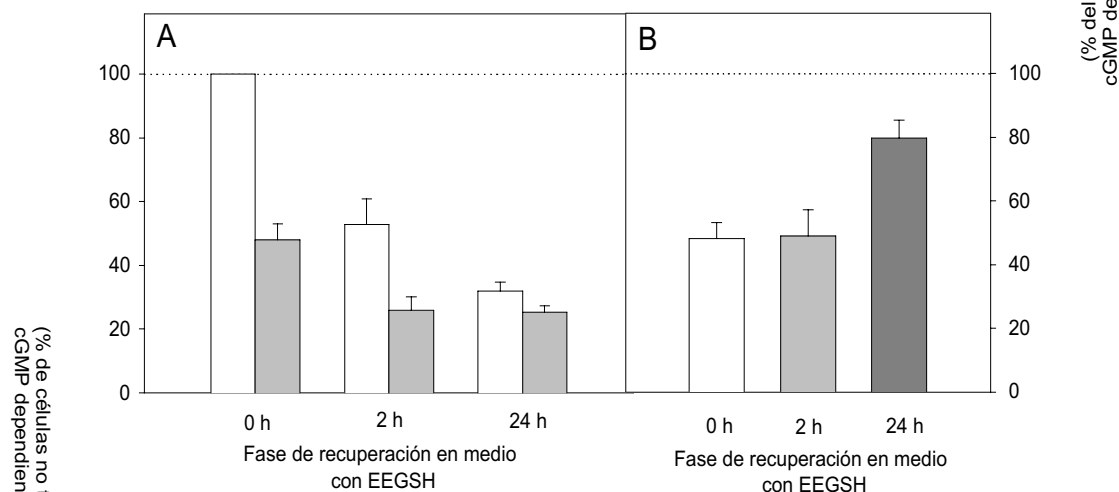
**Figura 37. Actividad de la sGC en fracciones citosólicas de neuronas en cultivo.** Las fracciones citosólicas se obtuvieron a partir de cultivos tratados con SNAP 100  $\mu$ M durante 1 hora, o cultivos controles. Las actividades sGC basales y estimuladas por NO se determinaron incubando alícuotas de las fracciones citosólicas (30 – 50  $\mu$ g de proteína) en medio de reacción durante 10 min en ausencia (columna blanca, basal) o presencia de SNP 100  $\mu$ M (columna gris, estimulado), y se determinó la cantidad de cGMP formado. Los resultados son medias  $\pm$  SD de un experimento representativo repetido con resultados semejantes.

de la acumulación de cGMP, en cultivos de neuronas producen una inhibición más duradera.



**Figura 38. Recuperación de la formación de cGMP dependiente de NO en neuronas pretratadas con donadores de NO.** Después de la exposición a SNAP 100  $\mu$ M durante 1 hora, las monocapas fueron lavadas e incubadas distintos tiempos con DMEM. A continuación las células se incubaron durante 3 min con IBMX 1mM en presencia o ausencia de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP estimulado por el SNP. Los resultados (porcentajes de la formación de cGMP estimulada por SNP sobre los correspondientes controles) son medias  $\pm$  SEM de tres experimentos.

Al igual que en cultivos de astrocitos, se estudió también en neuronas si agentes reductores con grupos tiol eran capaces de revertir la disminución de la acumulación de cGMP causada por la exposición continuada a NO. Para ello, cultivos de neuronas tratados durante 1 hora con SNAP 100  $\mu$ M, se lavaron y se incubaron durante distintos tiempos con EEGH 1 mM en medio fresco sin donador. Los datos representados en la Fig. 39A muestran que la incubación de las neuronas con EEGSH 1 mM produce por si misma una gran disminución de la acumulación de cGMP estimulada por NO, dependiente del tiempo de incubación. Si el efecto inhibitorio del EEGSH y del tratamiento con SNAP se consideran independientes, y se calcula el efecto relativo del tratamiento con SNAP a lo largo de la fase de recuperación (Fig. 39B), en presencia de EEGSH durante 2 horas se observa el mismo % de inhibición, pero a las 24 horas revierte casi totalmente la inhibición causada por el tratamiento con SNAP. La disminución de la producción de cGMP inducida por NO que produce el tratamiento con GSH ha sido previamente descrita en células cromafines bovinas, aunque en mucha menor medida y tras tratamientos más largos (Ferrero y col., datos no publicados). Hasta el momento no hemos encontrado datos que permitan explicar satisfactoriamente este efecto.



**Figura 39. Efecto de la presencia de EEGSH en la reversión de la inhibición de la formación de cGMP producida por el tratamiento con NO.** Después de la exposición a SNAP 100  $\mu$ M (columnas grises) o vehículo (columnas blancas) durante 1 hora, las monocapas fueron lavadas e incubadas distintos tiempos con DMEM en presencia de EEGSH 1 mM. A continuación las células se incubaron durante 3 min con IBMX 1mM en presencia o ausencia de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP formado. A: Los resultados, expresados como % del cGMP en células no tratadas, son medias  $\pm$  sd de triplicados de un experimento representativo repetido con resultados semejantes. B: Los resultados presentados en A expresados como % de sus correspondientes controles.

Los resultados de los estudios de reversibilidad del efecto inhibitorio del SNAP muestran importantes diferencias entre la respuesta de astrocitos y neuronas a la exposición continuada a NO. Por un lado, y como ya se ha comentado anteriormente, la inhibición por exposición a NO parece más persistente en neuronas que en astrocitos. Por otro lado, la presencia de EEGSH durante la fase de recuperación revierte en menos de 2 horas la inhibición producida por el tratamiento con SNAP en cultivos de astrocitos, pero requiere 24 horas en neuronas.

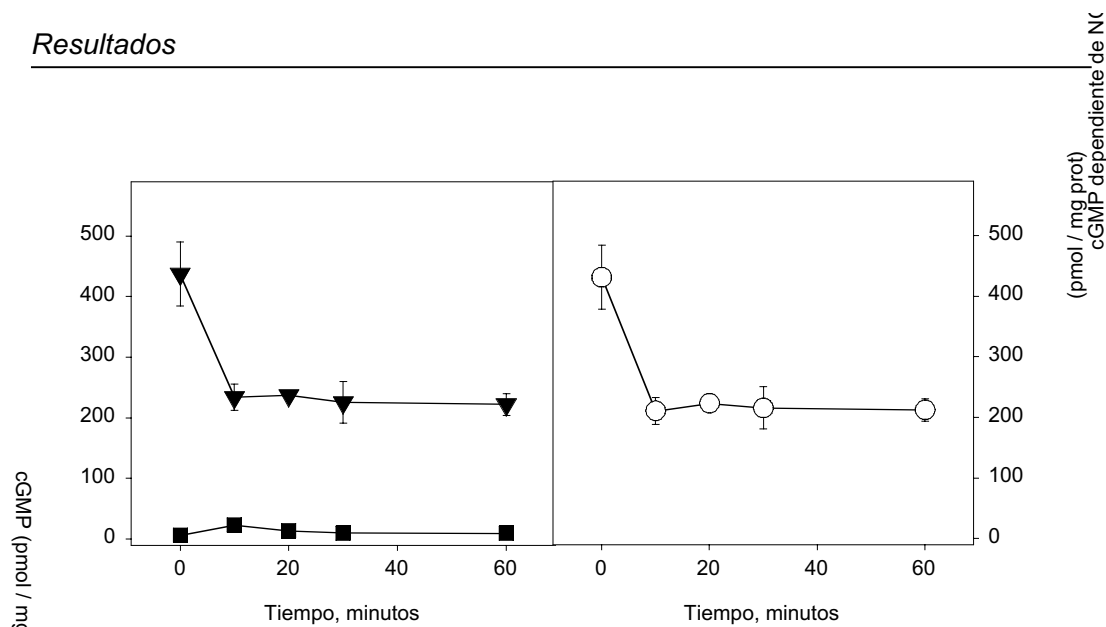
### **2.2.1 Efecto del NO endógeno sobre la formación de cGMP dependiente de NO.**

Como ya se ha mencionado, en astrocitos el NO formado endógenamente tras el tratamiento con LPS no está involucrado en la disminución de la actividad sGC. Para estudiar el efecto del NO endógeno en la desensibilización de la sGC en neuronas se estimularon las células con NMDA, el agonista más eficaz en la estimulación de la NOS-1 (Kiedrowski y col., 1992; Novelli y col., 1987; Garthwaite y col., 1988). La estimulación de receptores de aminoácidos excitadores de tipo NMDA induce la entrada localizada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que a su vez activa la NOS-1. Debido al efecto inhibitorio del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la activación del receptor NMDA, los tratamientos se realizaron en solución PBS-HEPES sin  $\text{Mg}^{2+}$ .

Según los resultados (Fig. 40), el tratamiento previo con NMDA (100  $\mu\text{M}$ ) disminuye la acumulación de cGMP en respuesta a SNP. La inhibición por el tratamiento con NMDA es más rápida que la producida por SNAP. La inhibición máxima se alcanza al primer tiempo estudiado ( $52,8 \pm 2,3 \%$ ), y se mantiene durante los 60 min de tratamiento ( $58,8 \pm 8,9 \%$ ). La medida paralela de actividad LDH intra- y extracelular indicó que la viabilidad de los cultivos no se modificó a lo largo del tratamiento (datos no mostrados).

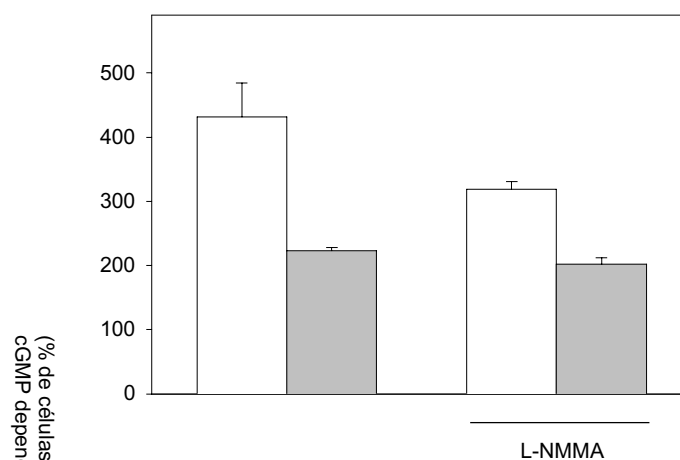
Para determinar si el efecto del NMDA sobre la acumulación de cGMP estaba mediado por el NO, se bloqueó la formación de NO mediante la incubación con un inhibidor de la NOS (N-monometil-L-arginina, L-NMMA) añadido 30 min antes del tratamiento con NMDA.





**Figura 40. Efecto del tratamiento con NMDA sobre la formación de cGMP dependiente de NO en cultivos de neuronas granulares.** Después del tratamiento con NMDA 100  $\mu$ M durante los tiempos indicados, las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1 mM en ausencia (■) o presencia (▼) de SNP 100  $\mu$ M, y se determinó el cGMP intracelular. La resta de los niveles obtenidos en presencia de SNP, menos los obtenidos en su ausencia (O) representan la estimulación aguda de la formación de cGMP inducida por NO. Los resultados son medias  $\pm$  SD de triplicados de un experimento representativo repetido con resultados semejantes.

Los resultados (Fig. 41) mostraron que la inhibición de la NOS durante el tratamiento con NMDA produce una reversión parcial de la disminución de la formación de cGMP ( $47,0 \pm 1,3$  % y  $32,7 \pm 3,9$  %, sin o con L-NMMA respectivamente). Estos resultados sugieren que el NO no es el único agente implicado en la reducción de la acumulación de cGMP producida por el NMDA,. Un factor que podría contribuir al menos en parte en el efecto es el  $Ca^{2+}$ . Estudios anteriores del grupo han demostrado que el tratamiento con agentes que aumentan la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  disminuye la generación de cGMP dependiente de NO, tanto en neuronas granulares como en astrocitos en cultivo, mediante la activación de PDEs dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (Baltrons y col., 1997). También en sinaptosomas de cerebro de rata se ha descrito una activación de PDEs de cGMP por  $Ca^{2+}$ , que no es completamente bloqueada por IBMX (Mayer y col., 1992). Además, recientemente se ha demostrado la inhibición de la sGC por  $Ca^{2+}$  mediante un mecanismo de interacción directa no competitivo (Parkinson y col., 1999). Estos datos sugieren que parte del efecto sobre la acumulación de cGMP producido por el NMDA podría estar mediado directamente por el  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, el aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , requisito indispensable para que el NO se forme, podría estar dificultando el estudio de la desensibilización de la sGC neuronal por el NO generado endógenamente.



**Figura 41. Efecto de la presencia de L-NMMA durante el tratamiento con NMDA sobre la formación de cGMP dependiente de NO.** Las células se trataron 1 hora con vehículo (columnas blancas) o NMDA 100 μM (columnas grises), en ausencia o presencia de L-NMMA 10 μM (añadido 30 min antes). A continuación las monocapas fueron lavadas e incubadas durante 3 min con IBMX 1mM en ausencia o presencia de SNP 100 μM, y se determinó el cGMP intracelular. Los resultados son medias ± SD de un experimento realizado en triplicados y repetido con resultados semejantes.

