

**Regulación de la formación de GMP  
cíclico dependiente de NO en cultivos  
primarios de células cerebrales durante  
el desarrollo del cultivo y tras la  
exposición a NO**

Trabajo de Tesis Doctoral elaborado por  
Teresa Sardón Urtiaga, bajo la supervisión de la  
Dra. Agustina García Sánchez

Institut de Biotecnologia i Biomedicina  
"Vicent Villar i Palasi"

Abril, 2002

## RESUMEN

El guanosin- 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) es un segundo mensajero intracelular esencial para el correcto funcionamiento del organismo. Este agente se sintetiza mediante la acción del grupo de enzimas guanilato ciclasas (GC), al que pertenecen las GC solubles (sGC), enzimas activadas por óxido nítrico (NO). La vía metabólica NO-sGC-cGMP ha sido identificada en procesos muy importantes en el SNC, como el desarrollo cerebral y la plasticidad sináptica. Debido a la transcendencia de las funciones de esta vía, es de gran interés el estudio de su regulación. En el presente trabajo hemos estudiado la regulación de la formación de cGMP en células cerebelares asociada a dos aspectos: a) el desarrollo de cultivos primarios; b) la exposición continuada al NO.

El estudio de la regulación de la formación de cGMP dependiente de NO durante el desarrollo de cultivos primarios cerebelares muestra que en nuestros cultivos, los astrocitos son las únicas células capaces de formar cGMP, y que esta capacidad disminuye a lo largo del desarrollo del cultivo. Además, la mayor capacidad de formar cGMP en edades tempranas del cultivo no parece estar relacionada con la mayor diferenciación morfológica de las células o con un mayor grado de reactividad glial. Sin embargo, sí parece existir un paralelismo entre la capacidad de los astrocitos de formar cGMP dependiente de NO y su grado de proliferación.

La exposición continuada a donadores de NO en cultivos de astrocitos o de neuronas cerebelares produce una disminución de la capacidad de estas células de formar cGMP en respuesta a un nuevo estímulo de NO. La disminución observada en astrocitos tras exposiciones a NO durante periodos menores a 2 horas, es espontáneamente reversible y se debe a la inhibición directa de la sGC, probablemente por nitrosación de algún tiol crítico para su actividad, ya que agentes reductores con grupos tiol son capaces de prevenir y revertir el efecto. Sin embargo, exposiciones mayores a NO (20 horas) producen una disminución de la vida media de la sGC, que requiere transcripción y síntesis de proteínas. En las neuronas granulares, la exposición a NO durante periodos superiores a 2 horas induce muerte celular, de acuerdo con la mayor sensibilidad de estas células a los efectos citotóxicos del NO. Además, la inhibición de la formación de cGMP dependiente de NO inducida tras 1 hora de exposición al donador no revierte espontáneamente después de 24 horas y sólo parcialmente en presencia de grupos tiol.

## **ABSTRACT**

The cyclic guanosin-3',5'-monophosphate (cGMP) is an intracellular second messenger implicated in many important physiological events. It is synthesised by the family of enzymes guanylyl cyclases (GC), that includes two subfamilies, the particulate and the soluble enzymes. The formation of cGMP by the soluble GCs (sGCs) is activated by nitric oxide (NO). In the CNS, the NO-sGC-cGMP metabolic pathway participates in many processes like the brain development, the synaptic plasticity and the neuroendocrine regulation. In the present work, we have studied the regulation of the NO dependent cGMP formation in neural cells in primary cultures, during the development of the cultures and after the prolonged exposition to NO.

In rat cerebellar primary cultures, the capacity of the cells to form cGMP in response to NO was determined during the development (days 3, 7 and 14) of the cultures. The results showed that only the astrocytes are able to form NO dependent cGMP in these cultures, and this cGMP formation ability diminishes with the age of the culture. This variation in the astroglial capacity of forming cGMP is not related with the morphologic differentiation or the reactivity rate of these cells, but it exists a parallelism between the capacity of forming NO dependent cGMP and the proliferation rate of the astrocytes.

In cultured astrocytes and neurons, the continuous exposure to NO donors diminishes the ability of the cells to form NO dependent cGMP. In astrocytes, the effect produced by short (minutes) expositions to NO is spontaneously reversible, and it is due to the direct inhibition of the sGC, probably through a critical thiol group nitrosation. Longer treatments with NO donors (hours) reduce the amount of enzyme sGC in a transcription and transduction dependent way. In granular neurons, short expositions to NO are more persistent (not reversible in the next 24 hours) and treatments longer than 2 hours produce cellular death.

**- ÍNDICE -**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	V
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Metabolismo del NO</b> .....	2
1.1. Biosíntesis del NO. Óxido nítrico sintasas (NOSs).....	2
1.2. Localización y activación de las NOSs en el SNC.....	4
1.3. Reactividad del NO.....	6
1.4. Donadores de NO.....	8
<b>2. Metabolismo del cGMP</b> .....	11
2.1. Síntesis del cGMP. Guanilil ciclasas.....	11
2.1.1. Guanilil ciclasas particuladas.....	12
2.1.2. Guanilil ciclasa soluble.....	12
2.2.2.a. Isoformas de la sGC.....	12
2.2.2.b. Dominios estructurales de la sGC.....	14
2.2.2.c. Mecanismos de activación de la sGC.....	16
2.2.2.d. Expresión de la sGC en SNC.....	18
2.2.2.e. Regulación de la actividad y expresión de la sGC.....	21
2.2. Degradación de cGMP. Fosfodiesterasas.....	23
<b>3. Sistemas efectores del cGMP</b> .....	24
3.1. Proteína quinasas.....	24
3.2. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos.....	25
3.3. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.....	25

<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>1. Materiales</b> .....	29
1.1. Animales.....	29
1.2. Reactivos.....	29
<b>2. Métodos</b> .....	31
2.1. Cultivos primarios de cerebelo de rata.....	31
2.1.1. Cultivos primarios enriquecidos en astrocitos .....	31
2.1.2. Cultivos enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo.....	31
2.2. Técnica inmunocitoquímicas.....	32
2.2.1. Determinación del porcentaje de astrocitos y neuronas .....	32
2.2.2. Localización celular de la formación de cGMP.....	33
2.2.3. Determinación de la incorporación de BrdU.....	34
2.3. Medida de la formación de cGMP.....	35
2.3.1. Material utilizado.....	35
2.3.2. Estimulación de las células.....	36
2.3.3. Radioinmunoensayo.....	36
2.3.4. Análisis de los resultados.....	37
2.4. Medida de la actividad sGC.....	37
2.4.1. Preparación de fracciones citosólicas de astrocitos y neuronas de cerebelo destinados a la medida de la actividad sGC.....	37
2.4.2. Medida de la actividad.....	38
2.5. Determinación de los niveles de la subunidad $\beta_1$ de la sGC por <i>Western Blot</i> .....	38
2.5.1. Preparación de extractos celulares de astrocitos de cerebelo destinados a la medida de la cantidad de proteína SgC ( <i>Western Blot</i> ).....	38
2.5.2. <i>Western Blot</i> .....	39
2.6. Determinación de la variación de niveles de mRNAs de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la sGC por RT-PCR.....	40

2.6.1. Extracción de RNA.....	40
2.6.2. RT-PCR.....	41
2.7. Otros métodos.....	42
2.7.1. Cuantificación de la proliferación mediante incorporación de [ <sup>3</sup> H]-Timidina.....	42
2.7.2. Medida de la concentración de glutatión.....	43
2.7.3. Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	44
2.7.4. Determinación de la concentración de nitritos.....	44
2.7.5. Determinación de la concentración de proteínas.....	45
2.8. Tratamiento de los resultados.....	45
2.8.1. Determinación de EC <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> .....	45
2.8.2. Análisis estadístico.....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	47
<b>1. Formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios de cerebelo de rata a lo largo del desarrollo del cultivo</b> .....	47
1.1. Características del cultivo.....	47
1.2. Formación de cGMP en respuesta a NO.....	50
1.2.1. Localización celular de la formación de cGMP a lo largo del desarrollo del cultivo.....	50
1.2.2. Cuantificación del cGMP formado en astrocitos.....	51
1.3. Relación entre la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO y la reactividad, diferenciación y proliferación astrogliar.....	53
1.3.1. Relación con la reactividad astrogliar.....	53
1.3.2. Relación con la diferenciación astrogliar.....	55
1.3.3. Relación con la proliferación astrogliar.....	56
<b>2. Desensibilización de la sGC por exposición continuada a NO en astrocitos y neuronas en cultivo</b> .....	59
2.1. Desensibilización de la sGC en astrocitos.....	59
2.1.1. Efecto del tratamiento con distintos donadores de NO sobre la acumulación de cGMP en cultivos primarios enriquecidos en astrogliar de cerebelo.....	59

2.1.2. Efecto del tratamiento con donadores de NO sobre la actividad y expresión de la sGC.....	66
2.1.3. Mecanismos implicados en la desensibilización de la sGC. ....	70
2.1.4. Efecto del tratamiento con donadores de NO sobre la concentración intracelular de glutation en astrocitos.....	77
2.2. Desensibilización de la sGC en neuronas granulares de cerebelo.....	80
2.2.1. Efecto del NO endógeno sobre la formación de cGMP dependiente de NO.....	87
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
<b>1. Formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios de cerebelo de rata a lo largo del desarrollo del cultivo.....</b>	<b>91</b>
<b>2. Desensibilización de la sGC por exposición continuada a NO en astrocitos y neuronas en cultivo.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>

## - ABREVIATURAS -

**AC**, adenilil ciclasa

**ANP**, péptido natriurético atrial

**BSA**, albúmina bovina

**Cam-PDE**, fosfodiesterasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina

**cAMP**, adenosin- 3',5'-monofosfato cíclico

**cGMP**, guanosin- 3',5'-monofosfato cíclico

**CHX**, cicloheximida

**DAPI**, 4',6'-diamidino-2-fenilindol

**DEA/NO**, dietilamina/NO

**DETA/NO**, dietilenediamina/NO

**DMEM**, medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DTNB**, ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

**DTT**, ditioneitol

**E<sub>max</sub>**, efecto máximo

**EC<sub>50</sub>**, concentración de las sustancias que producen la mitad del efecto máximo

**EDRF**, factor relajante derivado del endotelio

**EDTA**, ácido etilendiamino tetracético

**EEGSH**, etilesterglutation reducido

**EGTA**, ácido etilenbis(oxietileno nitrilo)tetracético

**FITC**, isotiocianato de fluoresceína

**GC**, guanilil ciclasa

**GFAP**, proteína glial fibrilar ácida

**GSH**, glutation reducido

**GSSG**, glutation oxidado

**GTP**, guanosin-5'-trifosfato

**h**, índice de Hill

**HEPES**, ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico

**IBMX**, 3-isobutil-1-metilxantina

**IL-1 $\beta$** , interleuquina-1 $\beta$

**INF $\gamma$** , interferon- $\gamma$

**INT**, cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil-5-feniltetrazolio)

**LDH**, lactato deshidrogenasa

**L-NMMA**, N-monometil-L-arginina



**L-BSO**, L-butionina-(S,R)-sulfoximina  
**LPS**, lipopolisacárido bacteriano  
**LTD**, depresión a largo plazo  
**LTP**, potenciación a largo plazo  
**NADPH**, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**Neu-N**, proteína nuclear de neuronas  
**NMDA**, N-metil-D-aspartato  
**NO**, óxido nítrico  
**NO<sup>+</sup>**, catión nitrosonio  
**NO<sup>-</sup>**, anión nitroxilo  
**NOS**, óxido nítrico sintasa  
**PBS**, medio salino tamponado con fosfato  
**PDE**, fosfodiesterasa  
**pGC**, guanilil ciclasa particulada  
**PK**, proteína quinasa  
**PKA**, proteína quinasa dependiente de cAMP  
**PKG**, proteína quinasa dependiente de cGMP  
**PMSF**, fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**RIA**, radioinmunoensayo  
**SDS**, dodecilsulfato sódico  
**SFB**, suero fetal bovino  
**sGC**, guanilil ciclasa soluble  
**SNC**, sistema nervioso central  
**SNP**, nitroprusiato sódico  
**SNAP**, S-nitroso-N-acetilpenicilamina  
**SOD**, superóxido dismutasa  
**SPER/NO**, espermina/NO  
**TBS**, tampón salino tamponado con Tris  
**TGFβ<sub>1</sub>**, factor de crecimiento tumoral β<sub>1</sub>  
**TNFα**, factor de necrosis tumoral - α

## - INTRODUCCIÓN -

El guanosin-3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) es un segundo mensajero implicado en importantes procesos fisiológicos. Este nucleótido cíclico y los enzimas responsables de su síntesis, las guanilil ciclasas (GC), han sido detectados en todos los tejidos de mamíferos examinados, además de en otros organismos (pájaros, peces, plantas, bacterias,...). Existen dos tipos de GC (solubles y particuladas) que son activadas por diferentes estímulos: las GC particuladas (pGC) se activan por una familia de péptidos, mientras que el principal activador de las GC solubles (sGC) es el NO (ver revisiones: Mittal y Murad, 1982; Hobbs, 1997; Lucas y col., 2000). La activación de las GCs permite la transmisión de señales a proteína quinasas (PK) dependientes de cGMP, canales catiónicos regulados por cGMP y fosfodiesterasas reguladas por cGMP (ver revisiones: Chinkers y Garbers, 1991; Schultz y col., 1991; Schmidt y col., 1993; Wnag y Robinson, 1997).

No fue hasta finales de los 70 cuando se demostró que el radical NO era un potente activador de la sGC, sugiriendo que un amplio grupo de compuestos que contenían NO inducían la formación de cGMP vía un mecanismo común que comprendía la liberación de NO (Gruetter y col., 1979). En aquel momento se pensaba que la biosíntesis de NO se restringía a bacterias nitrificantes y desnitrificantes, y el significado de estas observaciones en relación a la fisiología de mamíferos no se apreció durante muchos años. Sin embargo, la identificación del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) como NO, no solo mostró que las células de mamífero eran capaces de sintetizar esta molécula inorgánica, sino que condujo al descubrimiento del sistema de transducción NO-sGC-cGMP (ver revisión: Hobbs, 1997). Desde entonces se ha producido un gran progreso en el conocimiento de las funciones del NO, y se ha demostrado que la vía de señalización NO-sGC-cGMP es importante en la mediación de numerosos procesos fisiológicos, incluyendo relajación del músculo liso vascular y no vascular, la reactividad de las plaquetas y la neurotransmisión periférica y central.

En el sistema nervioso central (SNC), el NO puede formarse en todos los

tipos de células parenquimales y en células de los vasos cerebrales. Sin embargo el cGMP parece formarse mayoritariamente en neuronas, astrocitos y células cerebrovasculares (Garthwaite y Boulton, 1995; Iadecola y col., 1994). En comparación con la gran cantidad de información existente sobre la regulación de la formación de NO en células cerebrales, se conoce muy poco sobre el control de la formación de cGMP o de su relevancia funcional en diferentes células del SNC (ver revisión: Baltrons y García, 2001).

## **1. Metabolismo del NO.**

### **1.1. Biosíntesis del NO. Oxido nítrico sintasas (NOS).**

El NO es generado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina catalizada por enzimas de la familia de NO sintasas (NOS) (EC 1.14.13.39), que utilizan oxígeno y NADPH como cosubstratos y generan L-citrulina como coproducto (Moncada y col., 1991). La reacción oxidativa implica 5 electrones y esta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre (Schmidt y col., 1993; Forstermann y col., 1994).

Hasta al fecha se han identificado tres isoformas de la NOS (tipos 1-3) que son producto de, al menos, tres genes distintos. Inicialmente, estas isoformas se clonaron a partir de cerebelo de rata (NOS-1), de macrófagos (NOS-2) y de células endoteliales bovinas y humanas (NOS-3). Trabajos posteriores han demostrado su expresión en otras células y tejidos: La NOS-1, además de en células nerviosas, se localiza en epitelio pulmonar, útero, estómago, músculo esquelético, islotes pancreáticos y en la mácula densa del riñón (Schmidt y col., 1992; Nakane y col., 1993; Kobzik y col., 1994); la NOS-3 se expresa también en determinadas poblaciones neuronales (Dinerman y col., 1994a); y, la NOS-2 puede expresarse en distintos tipos de células como los hepatocitos (Geller y col., 1993), las células endoteliales (Buttery y col., 1993), los condrocitos (Charles y col., 1993), las células gliales (Murphy y col., 1993; 1995) y las neuronas (Minc-Golomb y col., 1994; Sato y col., 1995; 1996). Las tres son homodímeros en su forma activa, con monómeros de peso molecular alrededor de 160 kDa para NOS-1 y 130 kDa para NOS-2 y NOS-3. Todas contienen FAD, FMN y hemo como grupos prostéticos y requieren tetrahidrobiopterina (ver revisiones: Knowles y Moncada, 1994; Forstermann y

Kleinert, 1995; Stuehr, 1997; Nathan, 1997).

Las isoformas de la NOS se pueden distinguir por la dependencia de calcio-calmodulina y por la inducibilidad. NOS-1 y NOS-3 se expresan constitutivamente y son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. A las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en células en reposo ( $\approx 100$  nM), estas isoformas no unen calmodulina y por lo tanto, están inactivas, mientras que concentraciones mayores que 500 nM provocan la unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y la consecuente activación del enzima. Normalmente, generan niveles moderados de NO (del orden de picomoles) que modulan procesos rápidos como la neurotransmisión y la dilatación de vasos sanguíneos. Por el contrario, la isoforma NOS-2 prácticamente no se expresa en células no estimuladas, y es inducida a nivel transcripcional por endotoxinas bacterianas o por citoquinas proinflamatorias. Su activación es independiente del calcio, aparentemente porque tiene calmodulina fuertemente unida (Schmidt y col., 1993). Esta isoenzima puede generar cantidades importantes de NO (del orden de nanomoles) durante largos periodos de tiempo, que pueden causar efectos citotóxicos (Sparrow, 1994-95).

Las isoformas de NOS también difieren en su localización subcelular. Aunque la NOS-1 es un enzima soluble, puede aparecer parcialmente asociado a membrana. La identificación de un dominio PDZ en el extremo N-terminal sugiere su capacidad de interactuar con otras proteínas como la PSD-95 en células neurales, o el complejo de la distrofina en células musculares. Estas interacciones permitirían una localización de la NOS-1 próxima a los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), principales activadores de esta isoforma en neuronas, y a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo, favoreciendo así una rápida activación (Brenman y col., 1996). A diferencia de la NOS-1, la isoforma NOS-3 es una proteína particulada, asociada a la membrana por residuos de mirístico (Forstermann y col., 1991) y la NOS-2 es una proteína citosólica.

Aunque las isoformas NOS-1 y NOS-3 se expresan constitutivamente, su grado de expresión está regulado por distintos tratamientos. Por ejemplo, la sección del nervio ciático en ratas provoca un notable aumento de la proteína y del mRNA de la NOS-1 en ganglios lumbares (Verge y col., 1992; Fiallos-Estrada y col., 1993; Steel y col., 1994) y diferentes lesiones producen los mismos

efectos en la médula espinal (Solodkin y col., 1992; Vizzard y co., 1993) y otras regiones del cerebro (Herdegen y col., 1993; Regidor y col., 1993; Saxon y Beitz, 1994). También se ha detectado aumento del mRNA de la NOS-1 en el núcleo paraventricular del hipotálamo en respuesta al estrés y a la lactancia (Calza y col., 1993; Ceccatelli y Eriksson, 1993). La expresión de la NOS-3 aumenta tras tratamientos con estrógenos o TGF  $\beta_1$  (Hisikawa y col., 1995; Inoue y col., 1995). Además, el TNF $\alpha$  reduce la expresión de NOS-3 mediante un mecanismo post-transcripcional que desestabiliza su mRNA (Yoshizumi y col., 1993).

Todas las isoformas presentan secuencias consenso de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), y estudios *in vitro* indican que la actividad de la isoforma NOS-1 puede ser regulada mediante fosforilación también por otras proteína quinasas (Nakane y col., 1991; Dinerman y col., 1994b). Además, la NOS-1 también parece regularse por interacción con una proteína aun no identificada que desestabiliza el dímero, inhibiendo su actividad (Jaffrey y Snyder, 1996). Otro mecanismo de regulación de la actividad es la inhibición directa de la actividad enzimática por el propio NO (Rengasamy y Johns, 1993; Vickroy y Malphurs, 1995; Schwartz y col., 1997), probablemente por unión al grupo hemo (Griscavage y col., 1994). Además, el propio NO posee un efecto inhibitorio sobre la transcripción de la NOS-2 inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y citoquinas (Park y col., 1994; Colasanti y col., 1995). Estos dos mecanismos de retroinhibición pueden suponer un importante control de la producción de NO.

## **1.2. Localización y activación de las NOSs en el SNC.**

La NOS-1 se ha detectado en numerosas regiones del SNC como el cerebelo, el bulbo olfatorio accesorio, el núcleo tegmental pedunculopontino y, en menor medida, en el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio principal, los colículos superiores e inferiores, el núcleo supraóptico, la corteza cerebral y el caudado putamen (Bredt y col., 1990; 1991). Esta amplia distribución indica que el NO es un importante mensajero biológico en multitud de procesos dentro del sistema nervioso. En cuanto a su localización celular, en cortes de cerebro la NOS-1 ha sido localizada tanto en astrocitos (Kugler y Drenckhahn, 1996) como en poblaciones neuronales (Bredt y col., 1991). La localización en neuronas aparece en general restringida a poblaciones neuronales muy concretas, y en

algunas regiones en un porcentaje de neuronas muy bajo. La NOS-3 se expresa en determinadas poblaciones neuronales de diferentes regiones cerebrales (células piramidales del hipocampo, neuronas de la capa granular interna del bulbo olfatorio,...) (Dinerman y col., 1994a) y en astrocitos corticales (Gabbott y Bacon, 1996; Wiencken y Casagrande, 1999). Sin embargo, la microglía y los oligodendrocitos no parecen expresar actividad NOS constitutiva ni *in vitro* ni *in vivo* (Agullo y col., 1995; Murphy y col., 1995; Murphy, 2000).

La NOS-2 puede expresarse en muchos tipos celulares del sistema nervioso, sin embargo, la regulación de su expresión depende mucho de la especie y del tipo celular. Así, el LPS y la combinación de citoquinas proinflamatorias ( $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$ ) inducen la expresión de la NOS-2 en astrocitos y microglía de roedores en cultivo (Simmons y Murphy, 1993; Hewett y col., 1993; Murphy y col., 1993). Sin embargo, la inducción de la NOS-2 en astrocitos humanos en cultivo se produce en respuesta a la  $\text{IL-1}\beta$  en combinación con  $\text{INF}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$ , pero no en respuesta a LPS solo o combinado con citoquinas (Lee y col., 1993; Hu y col., 1995; Zhao y col., 1998). Los datos publicados sobre la expresión de la NOS-2 en microglía humana son contradictorios: mientras unos autores describen la expresión de NOS-2 en respuesta a LPS en combinación con  $\text{TNF}\alpha$  (Colasanti y col., 1995) o en respuesta a varias citoquinas combinadas (Ding y col., 1997), otros autores niegan la expresión de NOS-2 en estas células (Zhao y col., 1998). También, se ha descrito la inducción de la NOS-2 por LPS e  $\text{INF}\gamma$  en neuronas granulares de cerebelo de rata tanto *in vitro* (Minc-Golomb y col., 1994; Sato y col., 1995) como *in vivo* (Minc-Golomb y col., 1996). Los datos existentes sobre la expresión de NOS-2 en oligodendrocitos son controvertidos (Merrill y col., 1997; Hewett y col., 1999).

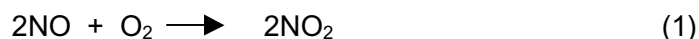
Cada vez existen más evidencias de la implicación del NO en neuropatologías como la hipoxia-isquemia y diversas enfermedades neurodegenerativas (Zhang y Snyder, 1995; Szabó, 1996). En estas situaciones, el NO se puede producir en grandes cantidades como resultado de la inducción de la NOS-2. La expresión de la NOS-2 en astroglia y microglía se ha demostrado *in vivo*, tras la producción en animales experimentales de lesiones cerebrales, infecciones víricas, isquemia cerebral y tras la inducción de encefalitis alérgica experimental (Endoh y col., 1994; Wallace y Bisland, 1994;

Grzybicki y col., 1998; Okuda y col., 1997). En humanos, la expresión de NOS-2 en glia se ha detectado en tejido *post-mortem* de pacientes con Esclerosis Múltiple (Bö y col., 1994), las enfermedades de Alzheimer (Wallace y col., 1997) y Parkinson (Hunot y col., 1996) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Almer y col., 1999). También se ha detectado NOS-2 en cerebro de pacientes con SIDA, aunque no se ha determinado su localización celular (Bukrinsky y col., 1995).

### 1.3. Reactividad del NO.

El NO es una molécula pequeña, no cargada y con un electrón desapareado, que posee un carácter fuertemente hidrofóbico. Debido a su condición de radical libre, el NO reacciona rápidamente con otras moléculas que contienen electrones no apareados, como son otros radicales libres y metales de transición (ej.:  $\text{Fe}^{2+}$  del grupo hemo). El NO puede oxidarse parcialmente y perder el electrón desapareado, dando lugar al catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ) que es más estable que el NO. También puede reducirse ganando un electrón y formar el anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ). El  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$  y otros productos de la oxidación del NO pueden actuar sobre otras moléculas a través de reacciones de nitrosación (reacción de  $\text{NO}^+$  ó de un portador de  $\text{NO}^+$  con un centro nucleofílico) o nitrosilación (adición de un grupo NO a un grupo hemo, formando un aducto nitrosil-hemo). Teniendo en cuenta que cada una de estas especies químicas presenta una reactividad característica, se deduce que la reactividad y el metabolismo del NO están influenciados por las características del medio y las especies químicas formadas (ver revisión: Bonner y Stedman, 1996).

Una de las reacciones más conocidas del NO es su oxidación con una molécula de oxígeno (1). Ésta es una reacción trimolecular, que implica dos moléculas de NO y una de  $\text{O}_2$ , y es lenta a concentraciones fisiológicas de NO. Sin embargo, la velocidad de reacción no es lineal respecto a la concentración de NO y se acelera con concentraciones altas de NO. Por lo tanto, esta oxidación puede adquirir importancia en aquellas condiciones fisiopatológicas en las que la producción de NO aumente (Wink y col., 1996). La reacción se produce a través de varios intermediarios como el  $\text{N}_2\text{O}_3$ , y el producto último principal, en ausencia de dianas biológicas, es el nitrito (Bonner y Stedman, 1996).



La reacción del NO con el anión superóxido da lugar a la formación de peroxinitrito (2). La velocidad de esta reacción es muy alta, y está prácticamente limitada por la difusión. El peroxinitrito y su forma protonada, el ácido peroxinitroso, son a su vez moléculas muy reactivas y capaces de oxidar irreversiblemente prácticamente a todas las biomoléculas. Otras reacciones que pueden llevar a cabo son la formación de aductos S-nitrosilados y la nitración de anillos aromáticos (ver revisión: Gow y Ischiropoulos, 2001).



La interacción fisiológica más importante del NO es su unión al  $\text{Fe}^{2+}$  del grupo hemo de la sGC, explicada en los apartados siguientes. Además, el NO puede unirse al grupo hemo de otras proteínas como la hemoglobina, la mioglobina, o el citocromo P450. Su unión a la hemoglobina y la mioglobina provoca la transformación del NO en nitrato, por lo que ambas proteínas se consideran “secuestradoras” de NO. La interacción del citocromo P450 con NO produce la inhibición del enzima (Khatsenko y col., 1993; Takemura y col., 1999). Otro ejemplo de nitrosilación es la unión del NO a la citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial). Al igual que la sGC, este enzima es muy sensible al NO a bajas concentraciones. Esta unión al NO se produce en competición con el  $\text{O}_2$  y da como resultado una inhibición reversible del enzima. Se ha postulado que mediante este mecanismo el NO regula el consumo de oxígeno por parte de las células y permite su adaptación a los cambios en el entorno (Clementi y col., 1999).

Una reacción del NO de gran importancia fisiológica es su unión a grupos tioles, y se produce principalmente a través de la especie  $\text{NO}^+$ . La reacción es reversible y los nitrosotioles resultantes son capaces de transferir  $\text{NO}^+$  a otros grupos sulfhidrilo para formar enlaces covalentes más estables. La unión del NO a los grupos tiol también puede producirse a partir del anión nitrosilo ( $\text{NO}^-$ ) y productos intermedios de la oxidación del NO con el  $\text{O}_2$ . Sin embargo, es posible que las dianas que reaccionan con las distintas especies químicas sean diferentes. Por ejemplo, se ha descrito que a concentraciones fisiológicas de NO, el  $\text{N}_2\text{O}_3$  se forma en los núcleos hidrofóbicos de las proteínas, y posteriormente nitrosila la proteína en esta misma región (Nedospasov y col., 2000). El enlace



entre una proteína y el NO a través de un grupo tiol (RS-NO) puede derivar en la formación de un enlace disulfuro (RS-SR), o la formación de un ácido sulfénico (RS-OH). Los tres tipos de enlace son reversibles mediante una reacción de oxido-reducción (Stamler y Hausladen, 1998).

La interacción del NO con grupos tiol puede tener varias funciones fisiológicas en las células. Por un lado, varios autores consideran que la nitrosación/desnitrosación puede significar un mecanismo fisiológico de regulación de la función proteica. De hecho, varios autores sustituyen el término S-nitrosación por S-nitrosilación por analogía a otros términos de modificaciones postranslacionales de proteínas (ej.: fosforilación, miristilación) (Simon y col., 1996). Este tipo de alteraciones se han postulado como las responsables de la inhibición por NO de los receptores de NMDA, la inhibición de adenilato ciclasas, y la activación de PKC. Otras dianas susceptibles de nitrosación son las proteínas p21 ras y caspasa-3, el receptor de rianodina y la proteína G (ver revisión: Gow y Ischiropoulos, 2001). Otra función atribuida a las reacciones de S-nitrosación es la eliminación del exceso del NO del medio. Por ejemplo, la unión del NO a la metalotioneína, proteína con un alto contenido en cisteínas, se considera un posible mecanismo de “secuestro” de NO, que podría evitar sus efectos neurotóxicos (Montoliu y col., 2000). Otro ejemplo de agente antioxidante capaz de S-nitrosarse es el glutatión: se ha demostrado que la elevación del contenido intracelular de glutatión en neuronas previene la toxicidad producida por el NO (Hu y col., 1999). Un tercer papel de la formación de compuestos S-nitrosilados es el aumento de la vida media del NO, ya que evita que se oxide con el O<sub>2</sub>. Los nitrosotioles podrían, por tanto, actuar como almacén y sistema de transporte del NO (Gaston y col., 1993; Kluge y col., 1997).

#### **1.4. Donadores de NO.**

La mayor apreciación del papel del NO en numerosos procesos fisiológicos ha potenciado el uso terapéutico de los donadores de NO y su utilización en estudios farmacológicos. Cuando se aplican a sistemas biológicos, los donadores de NO mimetizan la respuesta al NO endógeno o sustituyen el NO endógeno deficiente. Sin embargo, en función de la especie química de NO que se libera (NO<sup>+</sup>, NO ó NO<sup>-</sup>) se producen importantes diferencias en la reactividad del donador de NO y en el tipo de productos secundarios formados. Existen

diferentes clases de donadores de NO, y sus acciones sobre sistemas biológicos varían mucho en función de las características de cada compuesto: la vía de liberación del NO (enzimática o no enzimática), la velocidad de liberación del NO, la especie química de NO liberado, la susceptibilidad a las condiciones del tratamiento (pH, aerobiosis, estado de oxido-reducción, luz, ...). Además, ya que la reacción de NO con el O<sub>2</sub> depende de su concentración, las mismas cantidades absolutas de NO liberado en un periodo de tiempo concreto pueden generar especies oxidadas de NO en distinto grado y, consecuentemente, el número de reacciones paralelas como nitración o nitrosación de biomoléculas puede variar (Feelisch, 1998).

El nitroprusiato sódico (SNP) (Fig. 1) es un complejo inorgánico en el que el NO se une en la forma NO<sup>+</sup> y que se usa en clínica para reducir la presión sanguínea. Sin embargo, su uso está limitado por el hecho de que, tras su descomposición para liberar la molécula de NO se produce como metabolito cianuro, que es citotóxico. El mecanismo de liberación del NO a partir de este donador es todavía desconocido. Su descomposición no es espontánea y requiere irradiación con luz o la pérdida de un electrón. En sistemas biológicos, la liberación de NO es dependiente de su contacto con tejidos y parece estar mediada por proteínas ligadas a la membrana (Kowaluk y col., 1992). La presencia de nucleófilos y agentes reductores (tioles, aminas, ascorbato,...) puede afectar considerablemente a la cinética de liberación de NO a partir del SNP. Por lo general, su descomposición aumenta en presencia de tioles, pero este efecto no es lineal y en presencia de concentraciones altas de tioles la liberación de NO disminuye (ver revisión: Feelisch y Stamler, 1996). A pesar de los potenciales problemas derivados de su descomposición, el SNP es uno de los donadores de NO más ampliamente utilizados tanto en estudios clínicos como en el laboratorio.

El donador de NO S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) pertenece a la familia de los S-nitrosotioles (Fig. 1). Compuestos de esta familia han sido detectados *in vivo* (ej.: S-nitrosoglutatión) y pueden estar implicados en los mecanismos de procesos biológicos que se han atribuido al NO. Esto ha hecho que se preste más atención a la química y farmacología de estos compuestos. En soluciones fisiológicas, la liberación de NO a partir de estos compuestos es relativamente rápida. Su estabilidad en solución varía en función de la temperatura, el pH, la presión de oxígeno, la presencia de nucleófilos, de

especies oxido-reductoras y metales. Se ha demostrado que su descomposición es catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , por lo que diferencias en la concentración de estos cationes podrían ser las responsables de las grandes variaciones en la estabilidad de estos compuestos descritas por distintos autores. También la exposición a la luz, especialmente a la luz ultravioleta, activa la descomposición de este compuesto. Dependiendo de las condiciones de oxido-reducción del medio, los nitrosotioles liberan  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$  o  $\text{NO}^-$  (ver revisión: Feelisch y Stamler, 1996). Una reacción importante entre los nitrosotioles es la transnitrosilación, es decir, la transferencia del grupo nitro desde el nitrosotiol hacia otra molécula con grupo tiol. El intercambio del grupo  $\text{NO}$  entre varias biomoléculas (cisteína, albumina, glutatión,...) ha sido demostrado por diferentes autores (Meyer y col., 1994). La reacción de transnitrosilación se produce entre el SNAP y el glutatión, con una constante de equilibrio que favorece la formación de S-nitrosoglutatión (Singh y col., 1996).

Los NONOatos son compuestos formados por la unión de un dímero de  $\text{NO}$  a un nucleófilo a través de un átomo de nitrógeno del nucleófilo (Fig. 1). Esta familia de donadores comprende varios compuestos, entre los que se encuentran dietilaminaNONOato (DEA/ $\text{NO}$ ), esperminaNONOato (SPER/ $\text{NO}$ ) y dietilenetriaminaNONOato (DETA/ $\text{NO}$ ). Al descomponerse, estos compuestos liberan hasta 2 radicales de  $\text{NO}$  por molécula y el nucleófilo original. La generación de  $\text{NO}$  a partir de estos compuestos es espontánea y se ve influida por el tipo de nucleófilo que forma el NONOato, el pH y la temperatura. Sin embargo, la descomposición de estos compuestos no es catalizada por las biomoléculas presentes en el medio (ej.: tioles, albumina,...). Estas características hacen que, a diferencia de otros donadores de  $\text{NO}$ , la eficacia biológica de los NONOatos sea predecible a partir de su tasa de descomposición *in vitro*. Ya que en condiciones fisiológicas la estabilidad de estos compuestos no depende más que de su estructura, se pueden diseñar NONOatos de acuerdo con el perfil de liberación deseado y con vidas medias de descomposición variables entre 1 min y varios días. Así, las vidas medias a pH y temperatura fisiológicos de DEA/ $\text{NO}$ , SPER/ $\text{NO}$  y DETA/ $\text{NO}$  son 2 min, 39 min y 20 horas respectivamente (ver revisión: Feelisch y Stamler, 1996).

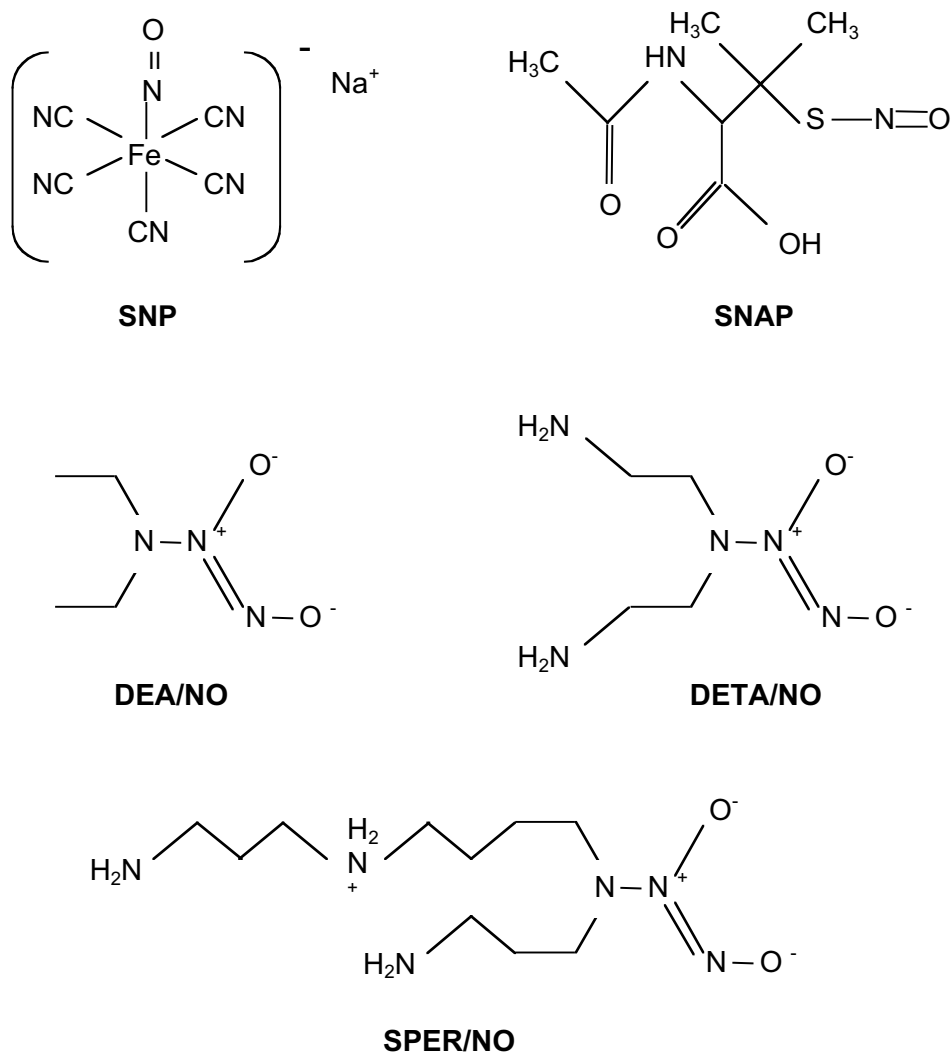


Figura 1. Estructura química de SNP, SNAP, DEA/NO, SPER/NO y DETA/NO.

## 2. Metabolismo del cGMP.

### 2.1. Síntesis del cGMP. Guanilil ciclasas.

Las guanilil ciclasas (EC 4.6.1.2) son una familia de enzimas responsables de la síntesis de cGMP a partir de guanosin-5'-trifosfato (GTP). Es sabido desde 1969 que las guanilil ciclasas existen tanto en la fracción soluble como en la fracción particulada de la mayoría de los tejidos (Hardman y Sutherland, 1969; White y Aurbach, 1969; Schultz y col., 1969). Trabajos iniciales ya demostraron que la actividad presente en las fracciones particuladas era debida a una proteína diferente de la presente en las fracciones solubles (Kimura y Murad, 1974; Chrisman y col., 1975; Garbers y Gray, 1974).

Posteriormente, y gracias al desarrollo de técnicas de clonación y expresión de proteínas, se pudieron estudiar con más detalle los diferentes componentes de esta familia.

### **2.1.1. Guanilil ciclasas particuladas (pGC).**

Hasta la fecha, se han identificado en mamífero siete isoformas de pGC (de GC-A, hasta GC-G), que presentan una estructura altamente conservada entre si. Estructuralmente, estas enzimas se componen de varios dominios o regiones: un dominio extracelular de unión al ligando (en el extremo N-terminal), un dominio transmembrana, un dominio regulador intracelular bastante homólogo a dominios tirosina quinasa, una región bisagra y un dominio catalítico en el extremo C-terminal. Las isoformas GC-C, -D, -E, y -F poseen una cola C-terminal adicional (ver revisiones: Wedel y Garbers, 1997; Wedel y Garbers, 2001).

En base a la especificidad de unión a ligandos, las pGCs se han clasificado en tres grupos: receptores de péptidos natriuréticos (GC-A y -B), receptores de péptidos intestinales (GC-C) y receptores huérfanos (sin ningún ligando específico identificado). Las isoformas GC-A y -B son activadas por la unión de péptidos natriuréticos de tipo A, B y C (ANP, BNP y CNP respectivamente). La isoforma GC-C se activa por enterotoxinas bacterianas y por algunos péptidos endógenos como la guanilina, la uroguanilina y la linfoguanilina (Currie y col., 1992; Forte y col., 1999).

En mamífero, las isoformas GC-A, -B y -G se expresan en numerosos tejidos incluyendo cerebro, pulmón, hígado, intestino, tejido adiposo y músculo esquelético. La distribución de los otros subtipos queda restringida a tejidos específicos (ver revisión: Lucas y col., 2000). En el SNC, estudios inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos frente al cGMP han demostrado que la acumulación de este nucleótido en respuesta al péptido natriurético atrial (ANP) se localiza en astrocitos de áreas restringidas del cerebro adulto y en pocas estructuras neuronales (De Vente y col., 1989, 1990), pero no en oligodendrocitos o células microgliales (Tanaka y col., 1997). De acuerdo con estos datos, el ANP también aumenta el cGMP intracelular en astrocitos en cultivo, pero no en neuronas (Friedl y col., 1989; Yeung y col., 1991).

## 2.1.2. Guanilil ciclasa soluble (sGC).

### 2.1.2.a. Isoformas de la sGC.

La sGC es un heterodímero, formado por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), cada una con un dominio catalítico, que contienen ferroprotoporfirina IX como grupo prostético (Genzer y col., 1981). Hasta la fecha, dos isoformas diferentes de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  han sido clonadas y caracterizadas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$   $\beta_2$ ), cada una de ellas codificadas por un gen diferente (Koesling y col., 1991a; b; Koesling y Friebe, 1999). Las isoformas  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se purificaron como heterodímero a partir de pulmón bovino y de rata, obteniéndose unas proteínas de 82kD (rata) o 73kD (bovina) y 70 kD ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$  respectivamente) (Koesling y col., 1988; 1990; Nakane y col., 1988; 1990). Estas isoformas son las más abundantes y más extendidas en cuanto a su distribución en los distintos tejidos. Las isoforma  $\alpha_2$  (82 kDa) y  $\beta_2$  (76kDa) se clonaron a partir de cerebro fetal humano y de riñón de rata respectivamente (Harteneck y col., 1991; Yuen y col., 1990), y han sido localizadas también en otros tejidos de la misma especie (ver revisiones: Hobbs, 1997; Koesling, 1999). La subunidad  $\beta_2$  posee en su región C-terminal 86 aminoácidos adicionales en comparación a la  $\beta_1$  (Yuen y col., 1990). En ellos se encuentra una secuencia de aminoácidos (-Cys-Val-Val-Leu-) que permite las modificaciones postraduccionales de isoprenilación o carboximetilación y de anclaje a la membrana. Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias de que la subunidad  $\beta_2$  se asocie a la membrana mediante estas modificaciones. En cerebro humano adulto se aislaron dos isoformas ( $\alpha_3$  y  $\beta_3$ ) consideradas inicialmente distintas a las descritas anteriormente (Giulli y col., 1992). Sin embargo, estudios posteriores de comparación de secuencias sugirieron que estas subunidades se corresponden con las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  descritas en otros organismos (Zabel y col., 1998). Hasta la fecha, no ha sido posible obtener un mutante homocigótico con el gen de la subunidad  $\beta_1$  delecionado (*knockouts*), indicando que la pérdida de la actividad sGC es letal, y sugiriendo que no sólo la sGC es fundamental en el crecimiento y desarrollo, sino que parece no haber una subunidad  $\beta$  alternativa que sustituya a la isoforma  $\beta_1$  (ver revisión: Hobbs, 1997).

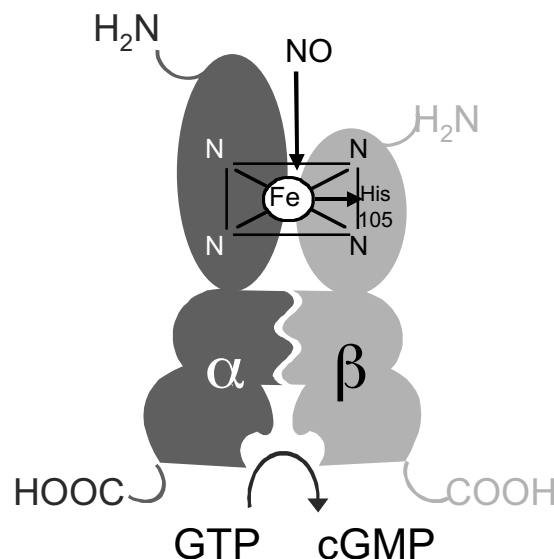
La expresión de los dos tipos de subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) es necesaria para que la sGC exprese actividad catalítica (Harteneck y col., 1990; Buechler y col., 1991). El heterodímero funcional  $\alpha_1/\beta_1$  ha sido identificado en pulmón bovino y de rata, y el dímero  $\alpha_2/\beta_1$  en placenta humana (Russwurm y col., 1998). Sin embargo, experimentos en sistemas de expresión ha demostrado que el heterodímero  $\alpha_1/\beta_1$  muestra mayor actividad sGC que el  $\alpha_2/\beta_1$  (Harteneck y col., 1991). También la subunidad  $\beta_2$  puede formar heterodímeros con  $\alpha_1$  en células donde ambas subunidades se coexpresan, pero el enzima resultante es menos sensible al NO que la combinación  $\alpha_1/\beta_1$  (Gupta y col., 1997). Por otro lado, la expresión simultánea de  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  origina una disminución en la formación del heterodímero  $\alpha_1/\beta_1$ , probablemente debido a la competición de  $\beta_2$  y  $\beta_1$  por la unión con  $\alpha_1$  (Gupta y col., 1997). Esta competición podría representar un mecanismo de regulación negativa de la sensibilidad al NO de la forma  $\alpha_1/\beta_1$  *in vivo*, ya que se ha descrito que la menor sensibilidad renal al NO en ratas está acompañada de una mayor expresión de mRNA de la subunidad  $\beta_2$  (Gupta y col., 1997). Por otro lado, resultados obtenidos en sistemas de expresión muestran que la formación de homodímeros  $\alpha_1/\alpha_1$  ó  $\beta_1/\beta_1$  es posible, aunque da como resultado enzimas inactivos (Zabel y col., 1999).

Recientemente se ha aislado una nueva isoforma de la subunidad  $\beta$  ( $\beta_3$ ) a partir del sistema nervioso de invertebrados (*Manduca sexta*). Dicha subunidad está muy relacionada con  $\beta_1$ , aunque no precisa heterodimerización para presentar actividad catalítica (Nighorn y col., 1999). Datos más recientes han descrito la existencia de una variante de la subunidad  $\beta_2$  en mamíferos que también posee actividad como homodímero (Koglin y col., 2001).

### **2.1.2.b. Dominios estructurales de la sGC.**

Todas las subunidades de las sGC están formadas por tres dominios: un dominio catalítico ciclasa en el extremo C-terminal, un dominio central relacionado con la dimerización de las subunidades, y un dominio N-terminal (Fig. 2). Las regiones C-terminales y centrales están bastante conservadas entre subunidades, mientras que la regiones N-terminales son diversas, y definen las propiedades específicas de  $\alpha$  ó  $\beta$ .

Los segmentos N-terminal de la sGC constituyen el dominio de unión al grupo hemo, el cual confiere al enzima su sensibilidad al NO (Gerzer y col., 1982; Ignarro y col., 1982). Cada heterodímero contiene un grupo hemo (Zhao y col., 1997), aunque su presencia no es necesaria para mantener la integridad estructural del enzima (Foerster y col., 1996). Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que el grupo hemo se une al enzima mediante un enlace de coordinación entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y un nitrógeno imidazólico de la His 105 de la subunidad  $\beta_1$ : La mutación de este residuo resulta en la formación de una sGC carente del grupo hemo (Foerster y col., 1996; Zhao y col., 1998). También la mutación de la Cys 78 y la Cys 124 de la subunidad  $\beta_1$  da lugar a un enzima con menor afinidad por el grupo hemo e insensible a NO (Friebe y col., 1997). Por otro lado, la delección de varios residuos de la región N-terminal de la subunidad  $\alpha_1$  no modifica la respuesta del enzima al NO (Foerster y col., 1996), sugiriendo que el grupo hemo se une fundamentalmente a la región N-terminal de la subunidad  $\beta$ . Sin embargo, la subunidad  $\alpha$  está también implicada en la coordinación del grupo hemo, ya que se requiere su presencia para que el hemo se una a la sGC (Stone y Marletta, 1994). A diferencia de la subunidad  $\beta_1$ , la isoforma  $\beta_2$  no presenta ninguna His entre los residuos 86 y 129, indicando que la interacción con el grupo hemo es diferente en los heterodímeros que contienen esta isoforma.



**Figura 2. Representación esquemática de la sGC.** La región N-terminal constituye el dominio de unión al grupo hemo. La región central de cada subunidad contiene las secuencias que median la dimerización de los monómeros. La región C-terminal forma el dominio catalítico, responsable de la unión del sustrato (GTP) y su conversión a cGMP.



Los extremos C-terminal de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contienen los dominios catalíticos que presentan elevada homología con los dominios catalíticos  $C_1$  y  $C_2$  de las adenilato ciclasas (AC) y aquellos de las formas particuladas de GC (Chinkers y col., 1989; Thorpe y Garbers, 1989). Al igual que para las ACs, la actividad ciclasa de la sGC requiere la expresión de ambos dominios que contribuirían con residuos específicos para dar lugar a un único sitio de unión al sustrato y a un único sitio catalítico (Liu y col., 1997).

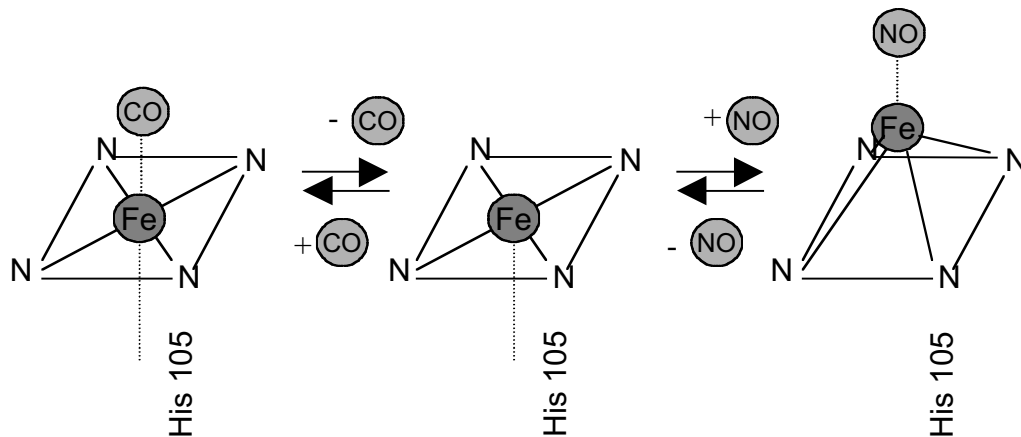
### **2.1.2.c. Mecanismos de activación de la sGC.**

La activación de la sGC se produce mediante la unión del NO al ion ferroso del grupo hemo. Se han postulado dos hipótesis sobre los mecanismos de activación. La primera propone que el NO se une a la sexta posición de coordinación del  $Fe^{2+}$  del grupo hemo, y la formación de este sexto enlace provocaría la ruptura del enlace entre el  $Fe^{2+}$  y la His 105, obteniéndose un complejo hemo-nitrosilo pentacoordinado. Aunque no está del todo claro, parece que la activación se debe a que el cambio conformacional en la histidina axial expone la región catalítica al GTP del citosol (ver revisiones: Schmidt 1992; Murad 1994; Koesling 1998; 1999; Denninger y Marletta, 1999). La segunda hipótesis, propuesta recientemente por Lawson y col. (2000), sugiere que el NO se uniría al grupo hemo por el lado proximal, rompiendo el enlace del  $Fe^{2+}$ -histidina, y ocupando el NO la quinta posición de coordinación. También en este caso, el cambio conformacional inducido en el enzima sería responsable del incremento de su actividad.

La asociación del NO al  $Fe^{2+}$  pentacoordinado está controlada por la difusión del NO (Zhao y col., 1999). La velocidad de disociación en el enzima purificado es alta, en comparación a la que presentan otras hemoproteínas (Kharitonov y col., 1997b). Además la disociación se acelera unas 40 veces en presencia del sustrato MgGTP, alcanzando tiempos medios de disociación de unos 5 s a 37°C (Kharitonov y col., 1997a). Estudios recientes han demostrado que la desactivación de la sGC en células intactas es aun más rápida (190 ms) (Bellamy y Garthwaite, 2001), y probablemente esta vida media de disociación es suficientemente corta para permitir la desactivación rápida del enzima en sistemas biológicos. Los mismos autores han calculado para el NO una  $EC_{50}$  de

45 nM en células intactas.

Aunque el NO es el principal activador de la sGC, otro monóxido de bajo peso molecular, el CO, es también capaz de unirse al grupo hemo del enzima y activarlo (Fig. 3). Sin embargo, la unión del CO al grupo hemo da lugar a un complejo hexacoordinado, y la activación del enzima es mucho menor a la producida por el NO (Stone and Marletta, 1995). También se ha descrito que el CO incrementa de forma significativa la formación de cGMP inducida por NO, mediante la unión de ambos ligandos gaseosos a los lados opuestos del grupo hemo y la formación de aductos estables (Reynolds y col., 2000). Este mecanismo sugeriría un papel modulador del CO sobre la activación de la sGC.



**Figura 3. Representación esquemática de la activación de la sGC por NO y CO.** La unión del NO al grupo hemo forma un complejo hemo-nitrosilo pentacoordinado, que rompe la unión a la histidina axial (His 105) y activa el enzima. La unión del CO al grupo hemo forma un complejo hexacoordinado donde el ligando axial permanece unido, y en consecuencia se produce poca activación.

La oxidación del grupo hemo al estado férrico resulta en una pérdida de actividad enzimática. Agentes reductores como tioles o ascorbato, aumentan la actividad enzimática, presumiblemente manteniendo el metal de la protoporfirina en un estado reducido, y facilitando la reacción entre el NO y el grupo hemo. En el lado opuesto, agentes oxidantes como el azul de metileno, inhiben la actividad enzimática (ver revisión: Hobbs, 1997).

Tanto las sGC como las pGCs precisan de cationes divalentes como cofactores para alcanzar la máxima activación (ver revisión: Waldman y Murad,

1987). Al igual que todas las ciclasas de nucleótidos, la sGC requiere que un catión divalente se una a su sustrato para que posteriormente éste se una al dominio catalítico del enzima. En el caso de la sGC, las especies que probablemente actúan como cofactores fisiológicos son el  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  (más este último, ya que su concentración intracelular es mayor). Por el contrario, el  $Ca^{2+}$  inhibe la actividad sGC mediante la disminución de su afinidad por el sustrato tanto *in vitro* como en células HEK 293 intactas en las que se ha expresado la sGC (Parkinson y col., 1999; Serfass y col., 2001).

Recientemente se ha descrito la existencia de una región reguladora en la sGC, localizada entre la Cys 238 y Cys 243 de la subunidad  $\alpha$ . A través de la unión a esta región, compuestos sintéticos como YC-1 y BAY 41-2272 modulan alostéricamente la actividad sGC, potenciando la formación de cGMP en respuesta a NO y CO (Stasch y col., 2001; Koesling, 1999). La presencia de esta región moduladora en la sGC sugiere la existencia de moduladores endógenos que en condiciones fisiológicas sensibilicen al enzima frente al NO. De forma opuesta, en pulmón bovino se ha identificado un inhibidor endógeno de la sGC de naturaleza proteica, cuya capacidad de interactuar con el enzima es independiente de su estado de activación y cuyo sitio de interacción con el enzima se encuentra alejado del sitio hemo (Kim y col., 1994)

#### **2.1.2.d. Expresión de la sGC en SNC.**

Los niveles de actividad, expresión de mRNA y expresión de proteína sGC en las distintas regiones del SNC han sido estudiados utilizando diferentes técnicas experimentales. Estudios de hibridación *in situ* en el cerebro de rata postnatal y adulta, han demostrado que el mRNA que codifica las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se expresa en distintas regiones, predominantemente en los sistemas olfatorio y estriado, y en las capas II y III del córtex cerebral (Matsuoka y col., 1992; Furuyama y col., 1993; Burgunder y Cheung, 1994). El mRNA que codifica la isoforma  $\beta_1$  presenta una localización ubicua, mientras que la distribución del mRNA correspondiente a la subunidad  $\alpha_1$  es más limitada. Estudios posteriores llevados a cabo por Gibb y Garthwaite (2001) han confirmado la diferente distribución entre el mRNA de las subunidades. Además han mostrado que los puntos donde la expresión del mRNA de la  $\beta_1$  no se acompaña de la expresión

de  $\alpha_1$  coinciden con el patrón de localización de la subunidad  $\alpha_2$ , sugiriendo que las diferentes regiones cerebrales expresan diferentes heterodímeros de sGC (Gibb y Garthwaite, 2001). Mediante hibridación *in situ* no ha sido posible detectar la presencia de la subunidad  $\beta_2$ . Sin embargo, utilizando una técnica más sensible, RT-PCR, se ha demostrado la expresión de los cuatro tipos de subunidades sGC a nivel de mRNA, al menos en cerebelo (Gibb y Garthwaite, 2001). En humano se ha demostrado la expresión de mRNA de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  en distintas regiones cerebrales mediante *northern blot*. Al igual que en la rata, en cerebro adulto la expresión de  $\beta_1$  es mayor que la de  $\alpha_1$  en todas las regiones estudiadas, y la isoforma  $\alpha_2$  está presente con diferente distribución que  $\alpha_1$  (Budworth y col., 1999). Además, se ha demostrado mediante *western blot* la expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  en varias regiones del cerebro humano y de rata (Zabel y col., 1998; Gibb y Garthwaite, 2001)

Los estudios sobre actividad sGC en rata muestran que el estriado es la región con actividad basal más elevada (Hoffman y col., 1977), y que el efecto del donador de NO SNP es mayor en estriado, córtex e hipocampo que en cerebelo y bulbo olfatorio (Matsuoka y col., 1992). Sin embargo, los estudios de medida del cGMP muestran que el grado de actividad sGC de las distintas regiones no se corresponde con los niveles de cGMP determinados. Por ejemplo, en el cerebelo, los niveles de cGMP alcanzan una concentración 10 veces superior a la de otras regiones (Greenberg y col., 1978), en contraste a lo esperado ya que es una de las regiones con actividad sGC más baja (Hoffman y col., 1977; Greenberg y col., 1978). Teniendo en cuenta que la acumulación de cGMP depende de la velocidad de su síntesis y de su degradación, la diferencia entre el grado de actividad sGC y los niveles de cGMP se debería a la distinta actividad fosfodiesterasa (PDE) en las distintas regiones.

En cuanto a la distribución celular de la sGC, estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos monoclonales frente a la sGC y de hibridación *in situ* con sondas para el mRNA, han demostrado una localización restringida del enzima a ciertas poblaciones celulares en las diferentes regiones estudiadas. En cerebelo, algunos estudios de hibridación *in situ* muestran expresión moderada de sGC en células de Purkinje, estrelladas, en cesta y de Golgi y expresión débil en células granulares, pero no muestran señal en células gliales (Furuyama y col., 1993; Matsuoka y col., 1992). Sin embargo, trabajos

más recientes han detectado mRNA de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  también en estas células (Gibb y Garthwaite, 2001). Estudios inmunocitoquímicos frente a la sGC realizados en esta región confirman la distribución neuronal de la sGC, y también detectan inmunoreactividad en astrocitos de la capa granular y de la molecular, en este caso probablemente glía de Bergman (Nakane y col., 1983; Ariano y col., 1982). En concordancia con estos estudios, en cortes de cerebelo estimulados con SNP se ha detectado inmunoreactividad intensa frente al cGMP en glía de Bergman, células granulares y glomérulos (de Vente y col., 1989; 1990; de Vente y Steinbusch, 1992; Southam y col., 1992) y de forma más moderada en células de Purkinje (Southam y Garthwaite, 1993). Igualmente, cortes de hipocampo estimulados con SNP presentan inmunoreactividad frente al cGMP en subpoblaciones de astrocitos (de Vente y Steinbusch, 1992). También se ha demostrado la formación de cGMP en respuesta a donadores de NO en astrocitos y neuronas de distintas regiones cerebrales en cultivo, pero no en microglía (Agulló y col., 1995). Hasta la fecha no hay datos de la localización celular de sGC en cerebro humano, pero trabajos no publicados de nuestro laboratorio muestran que astrogía fetal humana en cultivo forma cGMP en respuesta a donadores de NO. También se ha demostrado la formación de cGMP en estas células tras la inducción de la NOS-2 (Ding y col., 1997).

Diversos autores han demostrado que el contenido de cGMP y el grado de estimulación de síntesis de cGMP en el cerebro disminuyen durante la maduración y el envejecimiento (De Vente y Steinbusch, 1992; Markerink-Van Ittersum y col., 1997). Estudios de hibridación *in situ* han mostrado que, aunque la localización de  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  en las distintas regiones cerebrales es la misma en ratas de 8 días y adultas, las señales en adulto son más débiles (Matsuoka y col., 1992; Furuyama y col., 1993; Burgunder y Cheung, 1994; Gibb y Garthwaite, 2001). El estudio ontogénico de un tipo celular concreto también muestra importantes cambios en la expresión de sGC. En cortes de cerebelo de rata adulta, las células granulares acumulan cGMP en respuesta a NO (Southam y col., 1992) y expresan selectivamente mRNA de la subunidad  $\alpha_1$ , que se asociaría con la subunidad  $\beta_1$  (Furuyama y col., 1993). Por el contrario, en el tejido inmaduro, los precursores de células granulares de la capa granular externa y las células granulares en diferenciación de la capa interna expresan subunidad  $\alpha_2$  de la sGC, pero parecen deficientes en otras subunidades estudiadas (Gibb y Garthwaite, 2001). En consistencia con resultados previos

(Rubin y Ferrendelli, 1977; Garthwaite y Garthwaite, 1987; De Vente y col., 1990), estos datos sugieren que las células granulares a nivel de neuroblasto y durante la diferenciación no poseen actividad sGC, aunque la adquieren con posterior maduración. En otras células, los oligodendrocitos, se ha descrito una expresión de sGC transitoria durante el desarrollo (Tanaka y col., 1997).

En cuanto a la localización de las NOSs constitutivas respecto a la sGC, varios estudios inmunohistoquímicos en cortes de tejidos han confirmado que el marcaje con anti-NOS-1 y el marcaje con anti-cGMP tras la estimulación de la sGC con donadores de NO, se localizan generalmente próximos y se complementan (Southam y Garthwaite, 1993; De Vente y Steinbusch, 2000), lo que está de acuerdo con la corta distancia de difusión del NO. Mediante esta difusión el NO formado presinápticamente puede actuar como neurotransmisor sobre estructuras postsinápticas y el NO formado en regiones postsinápticas puede actuar como mensajero retrógrado sobre las estructuras presinápticas (Garthwaite, 1991). Esta actuación del NO como mensajero retrogrado parece implicada en los procesos de plasticidad sináptica relacionados con la memoria y el aprendizaje, como la potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo o la depresión a largo plazo (LTD) en cerebelo (Grassi y Pettorossi, 2001; Daniel y col., 1998). Por otro lado, también existen evidencias de que la NOS-1 y la formación de cGMP pueden colocalizarse en un mismo compartimento celular (De Vente y Steinbusch, 2000). Teniendo en cuenta la extensa ramificación de las células que contienen NOS, y las propiedades fisico-químicas del NO, Bicker y col. (1997) han propuesto que el NO sintetizado por la NOS en una parte de una fibra nerviosa podría difundir y activar la sGC en la misma fibra, pero en una zona distante.

#### **2.1.2.e. Regulación de la actividad y expresión de la sGC.**

Si se tiene en cuenta la importancia de las acciones del cGMP en el organismo, no es de extrañar que existan diferentes mecanismos que regulen su síntesis tanto en estados fisiológicos como fisiopatológicos. La regulación de la actividad sGC puede realizarse a diferentes niveles: modificando la cantidad de sGC expresada, variando las isoformas de sGC que se expresan y regulando directamente la actividad del enzima sGC. Como se ha visto anteriormente (apartado 2.1.2.d), el grado de expresión y de actividad de la sGC en células del

SNC en condiciones fisiológicas puede variar mucho en función de la región cerebral, del tipo de célula, y de la fase de desarrollo. También en nuestro sistema de trabajo, los cultivos celulares enriquecidos en astrocitos o neuronas, se han observado diferencias en la actividad sGC entre células provenientes de diferentes regiones cerebrales (Agulló y col., 1995). Además, se ha observado que las características del cultivo pueden afectar notablemente a la capacidad de síntesis de cGMP. Por ejemplo, el cGMP formado tras la estimulación con SNP en los astrocitos de cultivos secundarios es sólo un 40% del que forman los astrocitos de cultivos primarios.

Además de la regulación fisiológica, distintos tratamientos farmacológicos pueden modificar la actividad sGC. Por ejemplo, la exposición crónica a aluminio disminuye la expresión de la sGC en ratas (Llansola y col., 1999) y la hiperamonemia crónica impide la activación del enzima (Miñana y col., 1999). También se ha descrito que el tratamiento de la sGC purificada con toxina pertúsica induce la ADP-ribosilación de la subunidad  $\beta$ , provocando un incremento de la actividad estimulada por NO (Tomita y col., 1997). Por otro lado, la fosforilación *in vitro* de la sGC tanto por la PKC como por la PKA produce también un incremento de la actividad (Zwiller y col., 1981; 1985). Igualmente, en células cromafines bovinas se ha descrito una relación entre el grado de fosforilación de la subunidad  $\beta_1$  y la actividad sGC. Además, la activación de la PKG en estas células provoca indirectamente la desfosforilación y consecuente inhibición de la sGC (Ferrero y col., 2000).

El desarrollo de tolerancia durante el tratamiento con nitrovasodilatadores ha revelado la existencia de un importante agente regulador de la sGC: su propio activador, el NO. Los mecanismos por los que se produce la tolerancia a estos compuestos generadores de NO todavía no están claros, pero varios estudios han implicado, al menos en parte, a la desensibilización de la sGC producido por el NO. Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición continuada a donadores de NO produce la inhibición de la sGC en células de músculo liso vascular, en cardiomiocitos y en células intersticiales de médula renal de rata (Papapetropoulos y col., 1996b; Davis y col., 1997; Ujiie y col., 1994). Los estudios en células de músculo liso vascular llevados a cabo por Papapetropoulos y col. (1996) parecen indicar que la desensibilización producida tras incubaciones no excesivamente largas (2 horas) con donadores, son debidas a procesos oxidativos, reversibles con agentes reductores, mientras que

la exposición a tiempos mayores (12-24 horas) reduce la actividad a través de la disminución de los niveles de mRNA y proteína sGC. En esta última vía parece estar implicado el aumento del nivel de cAMP, producido por la inhibición de una PDE por el cGMP generado en respuesta a los donadores. Los mismos autores habían observado anteriormente que agentes que aumentan los niveles intracelulares de cAMP son capaces de desensibilizar a la sGC en esas células (Papapetropoulos y col., 1995). También en la línea celular RFL-6, procedente de fibroblastos pulmonares, se ha descrito disminución del mRNA de la sGC y de la capacidad de la formación de cGMP dependiente de NO, tras tratamientos con esos agentes (Shimouchi y col., 1993). La disminución de los niveles de mRNA de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la sGC inducida por exposición a donadores de NO, ocurre a través de un mecanismo dependiente de transcripción y traducción en células de músculo liso (Filippov y col., 1997). El efecto inhibitorio del NO se ha demostrado también en el mismo tipo de células en situaciones en las que este agente se genera endógenamente, tras el tratamiento con LPS o con citoquinas proinflamatorias (Papapetropoulos y col., 1996; Tshuchida y col., 1994; Takata y col., 2001). Al igual que con los tratamientos largos con donadores de NO, esta desensibilización de la sGC se produce a través de la disminución de mRNA y proteína enzimática.

A diferencia de lo que ocurre en tejidos periféricos, la capacidad del NO de desensibilizar su principal diana aún no ha sido demostrada en células del sistema nervioso central. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que los tratamientos con LPS, citoquinas proinflamatorias y el péptido  $\beta$  amiloide (todos ellos agentes que inducen la NOS-2 en células gliales) disminuyen los niveles de mRNA y de proteína de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la sGC en astrogliá. Sin embargo, al contrario que en células de músculo liso vascular, la inhibición de la sGC no esta mediada por el NO (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., enviado; Pedraza y col., enviado).

## **2.2. Degradación del cGMP. Fosfodiesterasas (PDE).**

Los niveles intracelulares de cGMP están regulados, además de a través de su síntesis, mediante su degradación por fosfodiesterasas (PDEs), que hidrolizan el nucleótido cíclico a su correspondiente nucleósido-5'-monofosfato. Actualmente 11 subfamilias han sido identificadas en base a datos estructurales



y propiedades bioquímicas, comprendiendo más de 50 isoformas distintas. Las familias de PDEs 1, 2, 3, 10 y 11 hidrolizan tanto cGMP como cAMP, mientras que las otras familias hidrolizan específicamente cGMP (familias 5, 6 y 9) o cAMP (familias 4, 7 y 8) (Soderling y col., 1999; Soderling y Beavo, 2000; Hetman y col., 2000).

La observación mediante técnicas inmunohistoquímicas de que la acumulación de cGMP en respuesta a NO en neuronas granulares y células astrogiales de cortes de cerebelo es potenciada por inhibidores de PDEs (De Vente y col., 1990; Southam y col., 1992), indica que ambas células contienen actividad PDE de cGMP. En el cerebro, el cGMP es degradado predominantemente por PDEs dependientes de calcio y calmodulina (CaM-PDE) pertenecientes a la familia 1 (Sharma y col., 1984; Shenolikar y col., 1985; Mayer y col., 1992). Varias isoformas de este grupo han sido detectadas en cerebro en estructuras neuronales (Kincaid y col., 1987; Yan y col., 1994, 1996; Furuyama y col., 1994), aunque no han sido identificadas en células gliales. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la actividad PDE predominante tanto en neuronas como en astrocitos cerebelares en cultivo es dependiente de calcio y calmodulina (Baltrons y col., 1997), sugiriendo la presencia de una PDE-1, que además presenta características bioquímicas y farmacológicas similares en ambas células (Agulló y García, 1997). De forma contraria, estudios llevados a cabo por Bellamy y Garthwaite (2001) en células de cerebelo de rata de 7 días en suspensión utilizando diferentes inhibidores selectivos de PDEs sugieren la implicación de PDE-5, pero no de PDE-1, en la hidrólisis de cGMP en estas células. La expresión de una determinada clase de PDE depende, además del tipo celular y de la región cerebral, del momento del desarrollo. Por ejemplo, se ha demostrado una mayor expresión de un tipo específico de PDE (PDE-10A) en el cerebro humano durante el desarrollo (Kotera y col., 1999).

### **3. Sistemas efectores del cGMP.**

Hasta la fecha se han descrito tres grandes grupos de dianas moleculares del cGMP: proteína quinasas (PK), canales iónicos y PDE de nucleótidos cíclicos (ver revisiones: Lincoln, 1995; Wang y Robinson, 1997; Biel y col., 1998; Lucas y col., 2000).

### **3.1. Proteína quinasas.**

Las PKs dependientes de cGMP (PKG) son el principal mediador intracelular de las vías de señalización del cGMP. La activación de estas enzimas provoca la fosforilación de residuos de serina y treonina de diversas proteínas como canales iónicos, receptores y enzimas (Greengard, 1987). Se conocen hasta el momento dos tipos de PKGs (I y II) en tejidos de mamíferos. PKG-I se localiza en el citosol y PKG-II aparece asociada a membranas. Se han detectado altas concentraciones de PKG-I en células de Purkinje del cerebelo (Lohmann y col., 1981), y la PKG-II tiene una amplia distribución en el SNC de mamífero (Uhler, 1993; El-Husseini y col., 1995a). La observación de localización nuclear de la PKG (Gudi y col., 1997) y del cGMP (Truman y col., 1996) sugieren también una implicación del cGMP en la transcripción de genes. Aunque muchas proteínas son susceptibles de ser fosforiladas por PKGs *in vitro*, la fosforilación *in vivo* se ha demostrado en sólo unas pocas. Esta discrepancia puede explicarse por el hecho de que dentro de las células la especificidad de la PKG por el sustrato está dictada, además de por la secuencia de reconocimiento del sustrato, por su localización espacial intracelular.

### **3.2. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos.**

El cGMP modula directamente canales iónicos implicados en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a la célula (Kaupp, 1995; Biel y col, 1998). Los canales activados por cGMP aparecen ampliamente distribuidos en el cerebro (El-Husseini y col., 1995b; Bradley y col., 1997; Kingstone y col., 1999), y especialmente en fotorreceptores de la retina, donde fueron originalmente detectados (Fesenko y col., 1985). A través de estos canales, el cGMP media la fototransducción en células fotorreceptoras, conos y bastones, y regula la neurotransmisión de la retina.

### **3.3. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.**

Varias familias de PDEs poseen sitios alostéricos no catalíticos que

permiten al cGMP regular su actividad de diversas formas. La PDE-2 cataliza la hidrólisis de cGMP y cAMP, y la unión de cGMP a su sitio catalítico incrementa la hidrólisis de ambos nucleótidos. Este efecto posibilita un mecanismo de retroinhibición del cGMP y de regulación cruzada de los niveles de cAMP. De forma contraria, el cGMP inhibe la hidrólisis de cAMP por PDE-3, aumentando la concentración de este nucleótido cíclico. De hecho, algunos efectos del cGMP se basan en el incremento de los niveles de cAMP y posterior activación de la PKA. La PDE-5, enzima que hidroliza exclusivamente cGMP, se activa tras la unión de cGMP a su sitio alostérico (ver revisiones: Beavo, 1995; Garthwaite y Boulton, 1995; Lucas y col., 2000).

## - OBJETIVOS -

El objetivo general de este trabajo ha sido investigar la regulación de la formación de cGMP en respuesta a NO en células astrogliales. Para ello se han utilizado cultivos primarios enriquecidos en astrogliá obtenidos a partir de cerebelo de rata y el estudio de la formación de cGMP en respuesta a NO, se ha ceñido a dos aspectos: 1) regulación durante el desarrollo del cultivo; 2) regulación en células pretratadas con NO.

Trabajos anteriores del laboratorio (Agulló y col., 1995) habían demostrado que en astrocitos subcultivados, la formación de cGMP en respuesta a NO era mucho menor que en astrocitos en cultivos primarios. La subcultivación conduce a un menor grado de contaminación microglial y a una mayor homogeneidad en la población de astrocitos, que presentan mayoritariamente aspecto plano y poligonal, típico de astrocitos tipo I. Ciertas modificaciones en la preparación de los cultivos primarios, como es la disminución de la densidad de siembra, también conducen a una mayor homogeneidad en las células presentes en el cultivo y a una menor capacidad de los astrocitos de formar cGMP en respuesta a NO (Agulló y col., 1995). A la vista de estos datos nos planteamos como **primer objetivo** *estudiar si la pérdida de capacidad de respuesta al NO se podría relacionar con cambios morfológicos o funcionales en los astrocitos o con el aislamiento respecto a otros tipos celulares que tienen lugar a lo largo del desarrollo del cultivo.*

Por otro lado, otros estudios recientes del laboratorio habían puesto en evidencia que el tratamiento de los astrocitos con agentes inflamatorios como el LPS, la IL-1 $\beta$  o los péptidos  $\beta$ -amieloides que inducen la NOS-2, disminuyen la expresión de la sGC. Al contrario de lo que se ha descrito en células de músculo liso vascular, el NO no está implicado en este efecto de los agentes inflamatorios sobre la sGC. Teniendo en cuenta esta diferencia entre tipos celulares, nos planteamos como **segundo objetivo** *estudiar la regulación de la actividad sGC por exposición continuada a NO en los astrocitos cerebelares en cultivo primario. Por comparación, se realizaron algunos estudios en paralelo en las neuronas granulares de la misma región cerebral que expresan abundante sGC.*



## - MATERIALES Y MÉTODOS -

### 1. Materiales.

#### 1.1. Animales.

En este trabajo se han utilizado ratas albinas de una semana de edad, de la cepa Sprague-Dawley criadas en el estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales fueron mantenidos con la madre hasta el momento de ser sacrificados, en condiciones constantes de luz (ciclos de 12 horas luz-oscuridad) y temperatura (21-24°C), con acceso libre a comida y bebida.

#### 1.2. Reactivos.

- *Material de cultivos*: Las placas y frascos de cultivo fueron proporcionados por Costar; el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) por Flow o ICN Biomedicals; el suero fetal bovino (SFB) por Ingelheim Diagnóstica y Tecnología, BioWittaker o Biological Industries; los compuestos arabinósido de citosina, poli-L-ornitina, tripsina 10x, sulfato de estreptomycin, penicilina G y nigrosina por Sigma. Los medios y soluciones se prepararon con agua Milli-Q (Millipore) y fueron esterilizados por filtración utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,2 µm de tamaño de poro (Wahntman).

- *Donadores de NO*: Los donadores de NO SNAP, DETA/NO, SPER/NO y DEA/NO fueron suministrados por RBI, y el SNP por Sigma. Las soluciones de los distintos donadores de NO se prepararon inmediatamente antes de su utilización. El SNP y SNAP se disolvieron en tampón y se protegieron de la luz para evitar su descomposición. Los NONOatos (DEA/NO, SPER/NO y DETA/NO) se disolvieron en NaOH 10 mM (Keefer y col., 1996) para evitar su descomposición espontánea a pH neutro.

- *Otros reactivos*: Los compuestos 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), trizma maleato, cGMP, N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ditiotreitól (DTT), leupeptin, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsufonilo

(PMSF), FAD, FMN, pepstatina A, trietilamina, carbón activado, GTP, creatina fosfato, creatina kinasa, etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), Tween 20, azul de bromofenol, bromuro de etidio, L-butionin-R,S—sulfoximina (L-BSO), etilesterglutation (EEGSH), glutation oxidado (GSSG), glutation reducido (GSH), ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), 2-vinilpiridina, lactato, cloruro de (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium (INT), oxamato, NAD<sup>+</sup>, NADPH, ácido acetilsalicílico, cicloheximida, cloroformo, isopropanol, Tris-base, Tris-HCl y albúmina bovina (BSA) fueron suministrados por Sigma; el etanol y el metanol, por Scharlau; el acetato sódico por Carlo Erba; el antisuero de conejo anti-proteína acídica fibrilar glial (anti-GFAP), y el medio de montaje glicergel por Dako; el antisuero de cabra anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o rodamina, y el antisuero de cabra anti-ratón conjugado con FITC, por Southern Biotechnology Associates. Inc.; el antisuero anti-subunidad  $\beta_1$  de la sGC, por Cayman o Calbiochem; los compuestos H-89 y KT-5823 por Calbiochem; el antisuero de ratón anti-Neu-N, el antisuero de ratón anti-GFAP y el antisuero de conejo anti-ratón conjugado con rodamina por Chemicon; el antisuero anti-conejo conjugado con peroxidasa por Amersham Life Science; [<sup>3</sup>H]-cGMP (33 ó 34.5 Ci/mmol) y [<sup>3</sup>H]-timidina (2 mCi/mmmol) por New England Nuclear; el líquido de centelleo biodegradable BCS por Amersham; los filtros de fibra de vidrio GF/C, por Whatman; los compuestos ácido etilen diaminotetraacético (EDTA), urea, dodecilsulfato sódico (SDS),  $\beta$ -2-mercaptoetanol, glicerol, p-formaldehído, tritón X-100, acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico, nitrito sódico, sacarosa, glucosa, NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaOH, glicina, sulfanilamida y anhídrido acético, por Fluka; el TEMED, la agarosa y las membranas de nitrocelulosa, por BioRad; la leche desnatada en polvo por Molico; el film fotográfico por Kodak; los compuestos ácido ascórbico, ácido fosfórico y benzamidina, por Merck; la cisteína, por Kyowa; los reactivos Trizol, el enzima Superscript-II, los hexámeros random, la mezcla de nucleótidos, el enzima taq DNA polimerasa, por Gibco, BRL; el kit de detección de BrdU mediante inmunofluorescencia, por Boehringer Mannheim. El anticuerpo anti-cGMP utilizado en el radioinmunoensayo se obtuvo en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Brooker y col. (1979). El anticuerpo de oveja anti-cGMP utilizado en las inmunotinciones fue amablemente cedido por el Dr. J.de Vente (Maastricht University).

## **2. Métodos.**

### **2.1. Cultivos primarios de cerebelo de rata.**

#### **2.1.1. Cultivos primarios enriquecidos en astrocitos.**

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se prepararon a partir de cerebelos de ratas de siete días de edad, por el método rutinariamente utilizado en el laboratorio (Agulló y col., 1995). Las ratas se sacrificaron por decapitación y se diseccionó el cerebro mantenido en un medio salino (medio D<sub>1</sub>: NaCl 137 mM; KCl 5,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,22 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,17 mM; glucosa 5 mM y sacarosa 58,5 mM) a pH 7,4. La disgregación del tejido se realizó por pasos sucesivos a través de dos mallas de nylon de 210 y 135 µm de poro en el medio D<sub>1</sub>. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 500 g durante 5 min a 20°C y las células se resuspendieron en medio de cultivo (90 % DMEN, 10 % SFB, 20 unidades de penicilina y 20 µg/ml de estreptomina) a 37°C. En esta suspensión se realizó un recuento de células utilizando un hemocitómetro, determinando la viabilidad por exclusión del colorante vital nigrosina (concentración final 0,25 % p/v). Las células se sembraron a una concentración de 0,6 x 10<sup>5</sup> células viables / ml en placas de cultivo de 35 mm, 60 mm ó 100 mm de diámetro, o placas de 12 ó 24 pocillos, y se incubaron a 37°C en atmósfera de 90 % aire-10 % CO<sub>2</sub> con una humedad del 95 %. Estudios previos del laboratorio en cultivos obtenidos por este método, describen que la mayoría de las células presentes en cultivos confluentes de 14 días son GFAP positivas. La contaminación por neuronas y oligodendrocitos es escasa, y la presencia de células de microglia puede variar considerablemente de una preparación a otra, pudiendo alcanzar un 30 % del total de células (Agulló y col., 1995). Para estudiar el cultivo a lo largo de su desarrollo (Resultados, Apartado 1) se utilizaron cultivos de 3, 7 y 14 días, en los que se realizaron cambios de medio al día 4 para los utilizados a los 7 días y a los 4, 7 y 11 días para los utilizados el día 14. El estudio de la regulación de la formación de cGMP por NO (Resultados, Apartado 2) se llevo a cabo en cultivos de 14 días, en los que el cambio de medio se realizó el día 7.

#### **2.1.2. Cultivos enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo.**

Los cultivos primarios enriquecidos en neuronas granulares se



prepararon a partir de cerebelos de ratas de 7 días (Baltrons y col., 1995). Los cerebelos se obtuvieron y se disgregaron tal y como se indica en el apartado 2.1.1. en DMEN-10 % SFB y antibióticos. Las células se resuspendieron en DMEM suplementado con KCl 25 mM y 10 % SFB (Levi y col., 1989) y se sembraron a una concentración de  $12 \times 10^5$  células viables / ml en placas de cultivo de 35 mm de diámetro, previamente tratadas un mínimo de 2 horas con poliornitina (0,01 % p/v en tampón borato 0,15 M, pH 8,4) a 37°C. A las 24 horas, se añadió arabinósido de citosina a una concentración final de 10  $\mu$ M . Las células destinadas al estudio de la regulación de la sGC por NO se mantuvieron en este medio hasta el día 7 en que fueron usadas. Estudios previos del laboratorio en cultivos obtenidos siguiendo este método indican que más del 95 % de las células presentes en el cultivo son positivas para la enolasa específica de neuronas (Agulló y col., 1995). En el estudio ontogénico, los cultivos de neuronas se procesaron de la misma manera que los cultivos de astrocitos, para posibilitar la comparación entre ambos: el medio se cambió los días 4, 7 y 11, y las células se utilizaron el día 14.

## **2.2. Técnicas inmunocitoquímicas.**

### **2.2.1. Determinación del porcentaje de astrocitos y neuronas .**

Para calcular los porcentajes de células astrogliales y de neuronas a lo largo del desarrollo de los cultivos se utilizaron dobles marcajes con un marcador celular específico (proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para astrocitos y proteína nuclear de neuronas (Neu-N) para neuronas) junto con el marcador nuclear 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los pasos seguidos fueron:

- *Fijación*: Después de aspirar el medio y lavar las monocapas con tampón salino tamponado con fosfato (PBS: NaCl 150 mM, tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4) a 37°C, las células se fijaron con paraformaldehído 4 % (p/v) en PBS, durante 1 hora a 4°C.

- *Permeabilización y bloqueo de uniones inespecíficas* : Tras lavados (3 x 2 min) con tampón salino tamponado con Tris (TBS) a temperatura ambiente, las células se incubaron primero con tritón X-100 al 0,2 % (v/v) en TBS durante 10 min, y a continuación con SFB 10 % (v/v) en TBS durante 30 min.

- *Incubación con el primer anticuerpo:* Las células se incubaron durante 16-20 horas a 4°C y en cámara húmeda con 650 µl del primer antisuero a las siguientes diluciones: anti-GFAP de ratón 1:300, anti-Neu-N de ratón 1:400, en TBS-5 % SFB.

- *Incubación con el segundo anticuerpo:* Tras varios lavados (3 x 10 min) con PBS, las células se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con IgG de conejo anti-ratón conjugada con rodamina (dilución 1:350 en PBS-5% SFB). El marcador nuclear DAPI 0,4 µg/ml se añadió a la solución del segundo anticuerpo. Éste y los sucesivos pasos se realizaron en la oscuridad. Como control de inespecificidad de los segundos anticuerpos se utilizaron placas que fueron procesadas en ausencia del primer anticuerpo.

- *Lavados y montaje:* A continuación, las células se lavaron (3 x 10 min) con PBS y (2 x 5 min) con agua destilada. Sobre las monocapas se montaron cubreobjetos con el medio de montaje glicergel. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioplan D-7082).

### **2.2.2. Localización celular de la formación de cGMP.**

Para estudiar la localización celular de la formación de cGMP en los cultivos se utilizó IgG de oveja frente al complejo cGMP-folmaldehido-tiroglobulina, amablemente cedida por el Dr. J. De Vente (De Vente y col., 1987; 1989). En algunas preparaciones se realizó una doble tinción cGMP/GFAP. El protocolo seguido fue:

- *Estimulación de la formación de cGMP dependiente de NO:* De la misma manera que para la medida cuantitativa de cGMP por RIA, las monocapas se lavaron y preincubaron 10 min con medio de incubación PBS-HEPES. A continuación las células se estimularon añadiendo sobre este medio IBMX 1 mM con o sin SNP 100 µM. Tres min después se aspiró el medio de incubación y se fijaron las células con paraformaldehido 4 % en PBS a 4°C durante 1 hora.

- *Permeabilización y bloqueo de uniones inespecíficas:* Tras lavados con TBS (3 x 5 min), las células se permeabilizaron con triton X-100 0,2 % en TBS y

posteriormente se incubaron con 10 % SFB en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

- *Incubación con el primer anticuerpo:* Las células se incubaron durante 16-20 horas a 4°C con 650 µl de IgG de oveja anti-cGMP (1:4000 en TBS-5 % SFB). En el caso de las dobles tinciones cGMP/GFAP, en la misma solución se añadió IgG de ratón anti-GFAP (1:350).

- *Incubación con el segundo anticuerpo:* Tras lavados con PBS (3 x 10 min), las células se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con IgG de burro anti-oveja/cabra conjugada con FITC (dilución 1:100 en PBS-5 % SFB) y DAPI 0,4 µg/ml. En las dobles tinciones cGMP/GFAP también se añadió IgG de conejo anti-ratón conjugada con rodamina (1:350). A continuación, las células se lavaron con PBS (3 x 10 min) y con agua destilada (2 x 5 min). Sobre las monocapas se montaron cubreobjetos con el medio de montaje glicergel.

Como controles de la unión inespecífica de los segundos anticuerpos se utilizaron placas sin el primer anticuerpo, incubadas con el segundo anticuerpo. Como control de la unión cruzada entre anticuerpos en las dobles tinciones, se utilizaron en paralelo placas incubadas con los primeros y segundos anticuerpos cruzados (IgG de oveja anti-cGMP + IgG de conejo anti-ratón conjugada con rodamina; IgG de ratón anti-GFAP + IgG de burro anti-oveja conjugada con FITC).

### **2.2.3. Determinación de la incorporación de BrdU.**

La incorporación de BrdU (análogo de timidina) por las células, seguida de su detección mediante inmunofluorescencia indirecta, y el doble marcaje con anti-GFAP permitió estudiar que tipo de células proliferaban a cada edad del cultivo. Los reactivos utilizados pertenecen al kit de inmunodetección de BrdU de Boehringer Mannheim. Los pasos seguidos fueron:

-*Incorporación de BrdU:* Los cultivos astrogiales de distintas edades se incubaron con BrdU (1:1000) en medio fresco (DMEM-10 % SFB) durante las 24 horas anteriores a cumplir 3, 7 ó 14 días.

*-Fijación:* Tras 3 lavados rápidos con PBS, las monocapas se fijaron con etanol 70 %-glicina 30 % durante 20 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*-Permeabilización y bloqueo inespecífico:* Después de 3 lavados con PBS, las células se incubaron con Triton X-100 0,1 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, y a continuación se bloquearon las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos tratando las monocapas con SFB 3 % durante 30 min a temperatura ambiente.

*-Incubación con los primeros anticuerpos:* Las células se incubaron con IgG de ratón anti-BrdU (1:10) o IgG de conejo anti-GFAP (1:300) durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para realizar dobles marcajes BrdU/GFAP las células se incubaron simultáneamente con ambos anticuerpos.

*-Incubación con los segundos anticuerpos:* Tras varios lavados con PBS (3 x 10 min) las monocapas se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC (1:150) y/o IgG de cabra anti-conejo conjugada con rodamina (1:150) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el exceso de segundos anticuerpos con varios lavados (4 x 10 min), y tras el montaje, las preparaciones se examinaron al microscopio.

Como controles de inespecificidad se utilizaron placas no incubadas con BrdU y placas sin primeros anticuerpos.

### **2.3. Medida de la formación de cGMP.**

La formación de cGMP se determinó en cultivos de astrocitos y de neuronas por radioinmunoensayo (RIA), según el método de Brooker y col. (1979), con algunas modificaciones (Agulló y García, 1992).

#### **2.3.1. Material utilizado.**

*- [ $^3\text{H}$ ]-cGMP:* El [ $^3\text{H}$ ]-cGMP comercial se diluyó en etanol- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) hasta lograr una concentración de 25 pmoles / 50  $\mu\text{l}$  y se distribuyó en alícuotas de 40  $\mu\text{l}$ . Éstas se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para la realización del radioinmunoensayo las alícuotas se evaporaron en una centrífuga de vacío

("Speed-VAC") y se resuspendieron en 700  $\mu$ l de tampón acetato 5 mM, pH 4,8.

- *Soluciones patrón de cGMP*: Para obtener los patrones de cGMP de la curva estándar se preparó una disolución de 20  $\mu$ M en tampón acetato 5 mM, pH 4,8. Esta disolución se diluyó 100 veces y se distribuyó en alícuotas que se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. A partir de éstas se obtuvieron soluciones patrón en un intervalo de concentraciones de 10 a 5.120 fmoles / 150  $\mu$ l.

- *Antisuero frente a cGMP succinilado*: El anticuerpo anti-cGMP se obtuvo previamente en el laboratorio por inmunización de conejos con cGMP succinilado según el protocolo descrito por Brooker y col. (1979).

### **2.3.2. Estimulación de las células.**

Las células fueron pretratadas o no con diversos donadores de NO y otros agentes en las condiciones habituales de cultivo. Después de aspirar el medio de cultivo fueron lavadas una vez y preincubadas 10 min con 900  $\mu$ l de una solución (medio de incubación) que contenía NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM, glucosa 10 mM y HEPES 20 mM, ajustada a pH 7,4 con NaOH. Seguidamente, las monocapas se estimularon añadiendo 100  $\mu$ l de medio de incubación conteniendo IBMX (1 mM) con o sin SNP (100  $\mu$ M). Una vez finalizada la incubación se aspiró el medio de estimulación y se añadió 1 ml de etanol absoluto a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los extractos etanólicos y los medios de estimulación se evaporaron en una centrifuga de vacío ("Speed-VAC") y los extractos secos se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el radioinmunoensayo.

### **2.3.3. Radioinmunoensayo.**

Los extractos secos se resuspendieron por agitación en tampón acetato 5 mM, pH 4,8. Las muestras y las soluciones patrones se distribuyeron en tubos de pirex (volumen final 150  $\mu$ l) y se acetilaron como describen Brooker y col. (1979), añadiendo trietilamina (2  $\mu$ l/100  $\mu$ l de muestra) y anhídrido acético (1  $\mu$ l/100  $\mu$ l de

muestra), agitando después de cada adición. Seguidamente en cada tubo se añadieron 50  $\mu$ l de [ $^3$ H]-cGMP acetilado (100 fmoles; 33 ó 34,5 Ci/mmol) y posteriormente 100  $\mu$ l de la solución de antisuero frente a cGMP succinilado (1:1.000 dilución final; 25-35 % de unión al [ $^3$ H]-cGMP acetilado).

Después de 18-24 horas de incubación a 4°C, se adicionó a cada tubo 1 ml de una suspensión de carbón activado al 0,5 % (p/v) en tampón fosfato 100 mM, pH 6,3, con albúmina al 0,25 %. Al cabo de 15 min, se centrifugaron los tubos a 4.000 g, 10 min y se tomaron 900  $\mu$ l del sobrenadante para contar la radioactividad presente, que se determinó en un contador Packard Tri-Carb 2100 TR, después de añadir 4 ml de líquido de centelleo biodegradable BCS de Amersham, con una eficiencia del 40-45 %. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

#### 2.3.4. Análisis de los resultados.

Los valores de radioactividad obtenidos se transformaron en fmoles de cGMP por interpolación en la curva estándar, ajustada mediante un programa de regresión no lineal a la ecuación "*four-parameter logistic*" (Dudley y col., 1985):

$$\text{cpm}([\text{}^3\text{H}]\text{-cGMP unido}) = \frac{a - d}{1 + (\log \text{cGMP}_f/c)^b} + d$$

donde cpm ([ $^3$ H]-cGMP unido) representa la radioactividad recuperada en el sobrenadante y  $\text{cGMP}_f$  la cantidad de cGMP no marcado añadido en cada caso. Los parámetros ajustados a, d, c y b hacen referencia al máximo y mínimo de la curva, al punto de inflexión de la sigmoide y a la pendiente, respectivamente.

#### 2.4. Medida de la actividad sGC.

##### 2.4.1. Preparación de fracciones citosólicas de astrocitos y neuronas de cerebelo destinados a la medida de la actividad sGC.

Para la obtención de homogenados se utilizaron cultivos primarios de

astrocitos de 14-15 días o cultivos de neuronas de 7 días. Las células fueron pretratadas o no con SNAP 100  $\mu\text{M}$  en las condiciones habituales de cultivo. Después de aspirar el medio y lavar 2 veces las monocapas con PBS a 4°C, las células fueron despegadas de las placas de cultivo con la ayuda de una espátula y se homogeneizaron en un tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,4 a 37°C) (1ml / placa de 100 mm) que contenía 1 mM EDTA, 0,2 mM leupeptin, 10 mg/l inhibidor de tripsina y 100 mg/l PMSF, 1 mg/l pepstatina A, y 0,2 mM benzamidina a 4°C. Todas las homogenizaciones se realizaron mediante 10 subidas y bajadas en un Potter-Elvehem. Las fracciones citosólicas de los homogenados se obtuvieron centrifugando las muestras a 100.000 g durante 1 hora. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron a 4°C y fueron utilizadas el mismo día de su preparación.

#### **2.4.2. Medida de la actividad.**

Alícuotas de fracciones citosólicas de astrogliá o neuronas (30-50  $\mu\text{g}$ ) se incubaron 10 min a 37°C en presencia de 1 mM GTP, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM creatina fosfato, 200 mg/l creatina kinasa, 1 mM IBMX y 1 mM EGTA, con o sin SNP 100  $\mu\text{M}$  (muestras estimuladas o basales respectivamente). La reacción se paró añadiendo 0,4 ml de tampón acetato sódico 20 mM (pH 3,9), tras lo cual las muestras se mantuvieron a 100°C durante 5 min. El cGMP producido se determinó por radioinmunoensayo, como se ha descrito previamente en el apartado 2.3.3. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

#### **2.5. Determinación de los niveles de la subunidad $\beta_1$ de la sGC por *Western Blot*.**

Para la determinación de la cantidad de enzima sGC en las células tras los distintos tratamientos se realizaron ensayos de inmunotransferencia a partir de extractos celulares. Los pasos seguidos fueron:

##### **2.5.1. Preparación de extractos celulares de astrocitos de cerebelo destinados a la medida de la cantidad de proteína sGC (*Western Blot*).**

Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS , se recogieron en urea 8 M (0,5 ml / placa de 100 mm) con la ayuda de una espátula, y se homogeneizaron mediante 10 subidas y bajadas en un Potter-Elvehim. A continuación los homogenados se centrifugaron a 12.000 g durante 20 min y se recogió el sobrenadante. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron a 4°C. Tras separar una alícuota para la determinación de proteínas, los homogenados se mezclaron con tampón de carga (concentraciones finales: Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0,03 %) y se incubaron a 100°C durante 5 min. Las muestras se conservaron a –80°C hasta su utilización.

### 2.5.2. Western blot.

- *Preparación del gel de poliacrilamida (7,5 %):*

a) *Preparación de soluciones:*

- Solución A: 29,2 % acrilamida, 0,8 % bisacrilamida.

- Solución B: Tris 1,5 M, SDS 0,4 % , pH 8,8.

- Solución C: Tris 0,5 M, SDS 0,4 % , pH 6,8.

b) *Gel separador (7,5 %):* Sobre 2,5 ml de agua se añadieron 1,25 ml de solución B y 1,25 ml de solución A. Después de desgasificar esta mezcla durante 10 min, se añadieron 2,5 µl de TEMED y 25 µl de persulfato amónico 10 %, y se dejó polimerizar el gel.

c) *Gel apilador (3,5 %):* El gel apilador se preparó mezclando en estricto orden 1,9 ml de agua, 0,75 ml de solución C, 0,35 ml de solución A, 3 µl de TEMED y 15 µl de persulfato amónico 10 %.

- *Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):* Las muestras (25-35 µg de proteína de los extractos de urea) se cargaron en el gel apilador, y seguidamente las proteínas se separaron mediante electroforesis en tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %). Estándares premarcados (Bio-rad) se usaron como marcadores de peso molecular.

- *Electrotransferencia:* Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por medio de una exposición a 100 V durante 1,5 horas a 4°C, en tampón Tris-glicina-metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %).



- *Bloqueo de uniones inespecíficas*: Para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se incubaron en tampón PBS-5 % (p/v) leche desnatada en polvo durante 16-24 horas a 4°C.

- *Incubación con el primer anticuerpo*: Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo que reconocieron predominantemente a la subunidad  $\beta_1$  de la sGC (dilución 1:1000 en PBS-5 % leche desnatada) durante 2 horas a temperatura ambiente.

- *Incubación con el segundo anticuerpo*: Después de varios lavados (3 x 15 min) con el tampón de lavado (0,05 % Tween 20 en PBS), las membranas se incubaron con IgGs anti-conejo conjugadas con peroxidasa (dilución 1:4000 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente.

- *Visualización del segundo anticuerpo*: Tras varios lavados (3 x 15 min) con tampón de lavado, el segundo anticuerpo se visualizó mediante quimioluminiscencia (Supersignal Ultra analysis system; Pierce), siguiendo el protocolo que indica este producto. La intensidad de las bandas marcadas en el film fotográfico se cuantificó mediante el programa Molecular Analyst (BioRad).

## **2.6. Determinación de la variación de niveles de mRNAs de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la sGC por RT-PCR.**

### **2.6.1. Extracción de RNA.**

Cultivos de astrocitos cerebelares de 14 días (sembrados en placas de 60 mm de diámetro) fueron tratados 2 o 20 horas con SNAP 100  $\mu$ M. A continuación se extrajo el RNA de las células con el reactivo Trizol (Gibco, BRL), siguiendo el protocolo sugerido con este producto: Tras aspirar el medio de incubación, se añadió 1ml del reactivo Trizol sobre la monocapa. El lisado celular se agitó varias veces con la pipeta, se recogió en un tubo eppendorf y se incubó a temperatura ambiente 5 min para completar la disociación de complejos nucleoproteicos. Sobre el lisado se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente 15 s, se incubaron a temperatura ambiente 5 min y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa y se precipitó el RNA añadiendo 0,5 ml de isopropanol. Los tubos

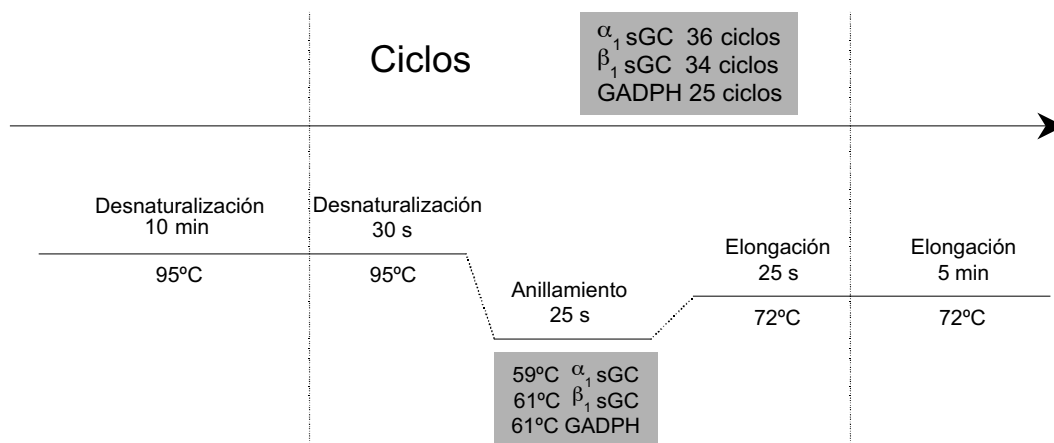
se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°C, el precipitado formado se lavó con 1 ml de etanol 75 % y se dejó secar al aire. Una vez evaporado el etanol, el RNA se redisolvió en 30-50 µl de agua estéril libre de RNAasas. La concentración resultante de RNA se determinó por espectrofotometría, y su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %).

### 2.6.2. RT-PCR.

- *Retrotranscripción del RNA*: La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo usando la transcriptasa inversa Superscript-II y hexámeros random (ambos de Gibco, BRL). En un volumen final de 20 µl de tampón de reacción 1x se añadieron 1 µg de RNA total, 1 U de Superscript-II, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (200 mM cada uno), DTT 20 mM y cebadores random 0,3 µg/µl. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 42°C durante 1 hora, y se finalizó calentando la mezcla 5 min a 95°C. El producto resultante se diluyó 5 veces con agua estéril.

- *PCR*: Mediante PCR se amplificaron las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la sGC y la GADPH (control). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía 5 µl de solución de cDNA (producto de la RT), 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 0,5 U de *taq* DNA polimerasa (Gibco, BRL) y 400 ng de cebador específico, y se desarrolló como muestra el esquema de la Fig. 4.

Los cebadores usados para la amplificación de  $\alpha_1$  sGC fueron: *Forward* 5'-ATACGGGTGAGGAGATGGGATAACT-3', correspondiente a las bases 1495-1520, y *Reverse* 5'-CCTCATTGAACTTCTTGGCTTGC-3', complementario a las bases 1844-1869. Para amplificar la  $\beta_1$  sGC, los cebadores usados fueron: *Forward* 5'-GCCAAAAGATACGACAATGTGACCA-3', correspondiente a las bases 1281-1306 y *Reverse* 5'-TTGCCATCTACTTGAAGTTGACCAG-3', complementaria a las bases 1536-1561. La amplificación de la GADPH se uso para controlar la diferencia de eficiencia en la síntesis de cDNA entre distintas muestras. Los cebadores empleados fueron: *Forward* 5'-GCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3', y *Reverse* 5'-TCCAGGGGTTTC TTA CTCTTGGGA-3'.



**Figura 4. Representación esquemática de los tiempos y temperaturas empleados en la PCR.** Los ciclos empleados para la amplificación del cDNA estaban compuestos por 30 s a 95°C, 25 s a la temperatura de anillamiento (59°C para  $\alpha_1$  sGC y 61°C para  $\beta_1$  sGC y GADPH) y 25 s a 72°C. El número de ciclos fue 25, 34 ó 36 para la GADPH, la  $\beta_1$  sGC ó la  $\alpha_1$  sGC respectivamente. Al comienzo de la PCR las muestras se incubaron 10 min a 95°C para asegurar la correcta desnaturalización de las muestras. Tras los correspondientes ciclos, las muestras se incubaron durante 5 min a 72°C.

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (agarosa 2 %- bromuro de etidio 0,5 mg/ml) y se visualizaron con luz ultravioleta. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa Molecular Analyst (BioRad). Según estudios previos del laboratorio, la amplificación del cDNA resultó lineal entre 33-37 ciclos para la  $\alpha_1$  sGC, entre 32 y 36 ciclos para la  $\beta_1$  sGC, y entre 20 y 26 ciclos en el caso de la GADPH.

## 2.7. Otros métodos.

### 2.7.1. Cuantificación de la proliferación mediante incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina.

Los cultivos astrogiales de distintas edades (sembrados en placas de 24 pocillos) se incubaron con [<sup>3</sup>H]-Timidina 1  $\mu$ Ci/ml en medio fresco (DMEM-10 % SFB) durante las 24 horas anteriores a cumplir 3, 7 ó 14 días. Tras este periodo, las monocapas se lavaron 2 veces con 1ml de PBS, y se levantaron con una solución de tripsina 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l (0,5 ml/pocillo). La suspensión celular y dos lavados posteriores de los pocillos (2 x 1 ml PBS) se recogieron, y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman) mediante vacío. Los filtros,

con las células retenidas, se introdujeron en viales, se añadió líquido de centelleo y se determinó la radiactividad. Otros pocillos de los mismos cultivos se usaron para determinar el número de células a cada edad del cultivo.

### **2.7.2. Medida de la concentración de glutatión.**

Para determinar el efecto de los distintos tratamientos sobre la cantidad de glutatión intracelular se siguió el protocolo descrito por Eyer y Podhradsky (1969). Este ensayo se basa en las reacciones cíclicas de oxidación de glutatión reducido (GSH) (reaccionando con DTNB) y reducción de glutatión oxidado (GSSG) (consumiendo NADPH), en las que la velocidad de consumo de NADPH es proporcional a la concentración de GSH y GSSG.

- *Extracción de las muestras:* Después de los correspondientes tratamientos, las células (sembradas en placas de 12 pocillos) se lavaron dos veces con 1 ml de PBS a 4°C, y se recogieron en 500 µl de ácido acetilsalicílico 1 % con la ayuda de una espátula. Los lisados celulares se centrifugaron a 13.000 g durante 5 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación del glutatión según el método de Tietze (1969). Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

- *Medida de la concentración de glutatión total (GS<sub>x</sub>):* La concentración de glutatión total se calculó utilizando soluciones de GSSG 0-50 µM en ácido sulfosalicílico como estándares. Tras la preparación de los estándares, 10 µl de las muestras y los estándares se diluyeron con 90 µl de agua en placas de 96 pocillos. Sobre estas muestras se añadieron 100 µl de la mezcla de reacción (EDTA 1mM, DTNB 0,3 mM, NADPH 0,4 mM y 1 U/ml glutatión reductasa) e inmediatamente se monitorizó el aumento de absorbancia a 405 nm cada 15 s durante 2,5 min. La concentración de glutatión se calculó interpolando la pendiente del aumento de absorbancia de las muestras en las pendientes obtenidas con los estándares. Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

- *Medida de la concentración de GSSG:* Previamente a la medida del GSSG, el GSH se conjugó con 2-vinilpiridina para evitar su oxidación a GSSG. Con este fin

130  $\mu\text{l}$  de cada muestra y de los estándares (GSSG 0-5  $\mu\text{M}$ ) se incubaron con 5  $\mu\text{l}$  de 2-vinilpiridina y 30-40  $\mu\text{l}$  de Tris-base 0,2 M (pH final 5-7), durante 1 hora a 4°C. Tras esta incubación se siguió el protocolo descrito anteriormente para la medida del glutation total.

- *Medida de la concentración de GSH:* La concentración de GSH se calculó a través de la diferencia  $\text{GS}_x - (2 \times \text{GSSG})$ .

### **2.7.3. Medida de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).**

Después de los distintos tratamientos, se recogió el medio de incubación de las muestras y la monocapa se incubó con Triton X-100 1 % en PBS. La actividad LDH se determinó en el medio de incubación y en el extracto de Triton X-100, según el método de Decker y Lohmann-Matthes (1988).

Sobre 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra dispuestos en una placa de 96 pocillos se añadieron 15  $\mu\text{l}$  de lactato (36 mg/ml en PBS) y 15  $\mu\text{l}$  de INT (2 mg/ml en PBS). Seguidamente se inició la reacción enzimática añadiendo a cada pocillo 15  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción ( $\text{NAD}^+$  3 mg/ml, diaforasa 2,3 mg/ml, BSA 0,03 % y sacarosa 1,2 % en PBS). Tras 5 min de incubación se paró la reacción añadiendo otros 15  $\mu\text{l}$  de oxamato (16,6 mg/ml). Midiendo la absorbancia a 490 nm se calculó el porcentaje de actividad extracelular de las muestras. Todas las determinaciones se realizaron en triplicado.

### **2.7.4. Determinación de la concentración de nitritos.**

Para determinar la concentración de nitritos en los medios de cultivo se utilizó la reacción de Griess (Baltrons y García, 1999). Después de los correspondientes tratamientos o días en cultivo, 150  $\mu\text{l}$  del medio donde se incubaban las células se pasaron a una placa de 96 pocillos, donde se mezclaron con el mismo volumen de solución de reacción: sulfanilamida 0,5 % (p/v), ácido fosfórico 2,5 % (v/v) y NEDA 0,05 % (p/v). Tras 30 min de incubación a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 540 nm. La concentración de nitritos acumulados se calculó utilizando soluciones de nitrito sódico de

concentraciones conocidas (0–100  $\mu\text{M}$ ) procesadas en paralelo como estándares.

### **2.7.5. Determinación de la concentración de proteínas.**

Para determinar la cantidad de proteínas en los cultivos celulares se lavaron las monocapas 2 veces con 1 ml del tampón de incubación y se trataron durante 18-20 horas con NaOH 1 N. Después de verificar que la monocapa de células se había levantado y disgregado, se determinó la cantidad de proteína mediante el método descrito por Lowry y col. (1951) utilizando albúmina bovina como estándar.

## **2.8. Tratamiento de los resultados.**

### **2.8.1. Determinación de $EC_{50}$ y $E_{max}$ .**

Las concentraciones de las sustancias que producen la mitad del efecto máximo ( $EC_{50}$ ) se obtuvieron mediante el ajuste no lineal (Sigmaplot) de las curvas concentración-efecto a la ecuación:

$$E = B_0 + \frac{C^h \cdot E_{max}}{C^h + E_{max}^h}$$

donde E es el efecto observado a una concentración C del compuesto estudiado,  $E_{max}$  el efecto máximo,  $B_0$  el efecto en ausencia del compuesto y h el índice de Hill.

### **2.8.2. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó mediante el test de la t de Student no apareado. Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0,05$ .

