

- DISCUSIÓN –

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

El uso de astrocitos en cultivo como modelo de estudio de estas células ha sido criticado por muchos autores. Su morfología en cultivo y su mayor expresión de GFAP han sido la base de que muchos consideren a estas células astrocitos reactivos (Wu y Schwartz, 1998). A pesar de estas críticas, se ha demostrado que algunas proteínas típicamente astrocitarias y funcionalmente importantes se expresan en cultivo con un patrón temporal semejante al que se observa en el cerebro del animal durante el desarrollo. Así por ejemplo, la expresión de glutamina sintetasa en astrocitos de cultivos primarios aumenta durante el desarrollo del cultivo con el mismo patrón temporal observado en el animal en desarrollo (Fages y col., 1988). Otro ejemplo de paralelismo entre el desarrollo *in vitro* e *in vivo* es la expresión de receptores de benzodiazepinas de tipo periférico (Itzhak y col., 1995). Estos datos sugieren semejanza en el comportamiento entre los astrocitos *in vivo* y en cultivo, y reafirman la utilidad de los cultivos como modelo de estudio.

Por otro lado, muchos estudios en astrocitos han sido realizados utilizando cultivos secundarios o terciarios. El proceso de subcultivación presenta varias ventajas: el cultivo se enriquece en astrocitos de tipo I (son cultivos más homogéneos) y disminuye la contaminación por microglía. Sin embargo, la subcultivación de las células también afecta a la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, se ha observado que, en cultivos subcultivados, los niveles del mRNA que codifica la glutamina sintetasa son mayores que los detectados en cultivos primarios (Passaquin y col., 1994). Por el contrario, la expresión del mRNA de la transferrina desaparece tras el subcultivo de las células (Passaquin y col., 1994). Trabajos anteriores del laboratorio (Agulló y col., 1995) han demostrado que en los astrocitos subcultivados la formación de cGMP en respuesta a NO es mucho menor que en cultivos primarios. También la disminución de la densidad de siembra durante la preparación de los cultivos primarios (modificación que conlleva igualmente la homogeneización de los cultivos y la disminución de la

microglía) provoca una reducción de la capacidad de los astrocitos de formar cGMP en respuesta a NO (Agulló y col., 1995). Teniendo en cuenta todos estos datos, hemos querido estudiar si la capacidad de formación de cGMP en respuesta al NO en astrocitos puede relacionarse con los cambios que sufren estas células en cultivo a nivel morfológico, de interacción con otros tipos de células o de estado proliferativo. El estudio se ha realizado mediante técnicas de RIA y inmunofluorescencia, y en este último caso se han marcando los astrocitos y las neuronas, células presentes en el cultivo capaces de formar cGMP (Baltrons y col., 1997).

Durante el desarrollo de los cultivos primarios de cerebelo se observan grandes cambios en su composición celular. En estadíos tempranos del cultivo (3 días), la mitad de las células son neuronas (Neu-N+), mientras que los astrocitos (GFAP+) suponen menos del 20 % del total de células. Sin embargo, en cultivos de 7 días y en cultivos confluentes (14 días) el número de neuronas es despreciable, mientras que los astrocitos constituyen el 60 y 75% de las células presentes (7 y 14 días, respectivamente). La morfología de las células GFAP-/Neu-N- de los cultivos de 7 y 14 días (células con ramificaciones o de morfología ameboide, con núcleos pequeños y redondos) coincide con la descripción de microglía (ramificada o ameboide) en estudios previos del grupo, según los cuales estas células pueden suponer hasta un 30% del total (Agulló y col., 1995). Al igual que en nuestros cultivos, varios autores han descrito una importante contaminación microglial (Castellano y col., 1991; Galea y col., 1992; Ganter y col., 1992). Además de estos tipos celulares (astrocitos, neuronas y microglia), muy esporádicamente se observan en los cultivos células con aspecto de fibroblasto (células grandes, dispuestas en mosaico o en empalizada, GFAP-, con un núcleo ovalado y grande) (datos no mostrados). Además, es posible que algunas de las células GFAP-/Neu-N- se correspondan con precursores de astrocitos, especialmente en cultivos jóvenes (Trotter y Schachner, 1989; Levi y col., 1987).

El número total de células apenas varía entre los días 3 y 7, y sin embargo se triplica en la segunda semana de cultivo. Por otro lado, las neuronas presentes en el 3º día *in vitro* desaparecen en los siguientes 4 días. Esta muerte neuronal durante los primeros días del cultivo se ve reflejada en la menor viabilidad (mayor actividad LDH extracelular) determinada en los cultivos más jóvenes (cultivos de 3 días). Estudios previos sobre la supervivencia de las

neuronas granulares de cerebelo en cultivo han demostrado que estas células requieren la presencia de altas concentraciones de K^+ (> 20 mM) en el medio de cultivo (Gallo y col., 1987), y la necesidad de este entorno despolarizante se manifiesta a partir del tercer día de cultivo (Gallo y col., 1987). Por lo tanto, la ausencia de altas concentraciones de K^+ en nuestros cultivos sería la causa que estas células desaparezcan a lo largo del desarrollo del cultivo.

La morfología de los astrocitos también varía a lo largo del desarrollo del cultivo. En los cultivos más jóvenes se observan astrocitos fusiformes, con 2 o 3 prolongaciones y una intensa expresión de GFAP. A los 7 días los astrocitos también presentan un marcaje para la GFAP intenso, aunque sus formas son más variadas: fusiformes, poligonales y formas intermedias. Sin embargo, en cultivos confluentes (14 días) la gran mayoría de los astrocitos son planos y poligonales, y su intensidad de marcaje para la GFAP es menor que la detectada en astrocitos de cultivos más jóvenes. La morfología fusiforme de los astrocitos de cultivos jóvenes es semejante a la que presenta *in vivo* la glia de Bergman (Hatten, 1984). Estas células, durante el desarrollo, parecen actuar como guías de los precursores de las neuronas granulares en su migración desde la capa granular externa a la capa granular interna (Komuro y Rakic, 1998).

La localización celular de la formación de cGMP a lo largo del desarrollo se ha estudiado mediante técnicas inmunocitoquímicas. Para ello se ha utilizado un anticuerpo de oveja preparado frente al complejo cGMP-folmaldehidotiroglobulina (De Vente y col., 1987; 1989). Su unión al cGMP requiere la fijación previa de las células con p-formaldehído. Este método ha sido utilizado satisfactoriamente en varios trabajos previos tanto *in vivo* como *in vitro* (De Vente y Steinbusch, 2000). Según los resultados obtenidos, a pesar de la presencia de un inhibidor de PDEs (IBMX) durante el ensayo, el cGMP formado en células no estimuladas no es detectado mediante dicha técnica en ninguna de las edades estudiadas, lo cual indica que la actividad sGC basal es muy baja. Sin embargo, el cGMP formado tras el tratamiento de las células con el donador de NO SNP (100 μ M) se detecta en los cultivos a todas las edades estudiadas. Los resultados indican que el cGMP formado en respuesta a NO se localiza exclusivamente en astrocitos (células GFAP+). Además, la intensidad del marcaje en cultivos de 3 y 7 días es mayor que la detectada en cultivos confluentes. Las dobles tinciones cGMP/Neu-N confirman que las neuronas de los cultivos de tres días no forman cGMP en respuesta a NO. Nuestro resultado

concuera con el descrito por Bellamy y col. (2000) en células disociadas de cerebelo de la misma edad, donde la formación de cGMP estimulada por NO se localiza en astrocitos, pero no en neuronas. Por el contrario, los cultivos enriquecidos en neuronas granulares de 7 días forman importantes cantidades de cGMP en respuesta a NO (Baltrons y col., 1997). Esta diferente respuesta al NO entre neuronas inmaduras y neuronas más maduras, que han desarrollado ramificaciones, puede relacionarse con la observación *in vivo* de varios autores de que las células granulares en estado de neuroblasto y durante las primeras etapas de diferenciación no poseen actividad sGC, pero van expresando el enzima a lo largo de la maduración (Ferrendelli, 1977; Garthwaite y Garthwaite, 1987; De Vente y col., 1990; Gibb y Garthwaite, 2001).

La cuantificación del cGMP mediante RIA también muestra diferencias en la capacidad de formar cGMP entre cultivos de distintas edades, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con NO. La formación de cGMP basal es mayor a los 3 días, y la estimulación con SNP durante 3 min produce un gran aumento de los niveles de cGMP en todas las edades estudiadas, pero es a los 7 días, cuando se detectan mayores niveles. Las diferencias en la acumulación de cGMP entre cultivos de distintas edades no se deben a una distinta salida del cGMP de las células, ya que en todos los casos el cGMP dependiente de NO se localiza principalmente dentro de las células (97,5 % del cGMP total). El hecho de que en nuestros cultivos sólo los astrocitos formen cGMP permite estimar la cantidad de cGMP formado por astrocito mediante la relación entre el cGMP detectado por RIA y el número de astrocitos presentes en cada cultivo. Dentro de cada cultivo, especialmente en cultivos jóvenes, los astrocitos son heterogéneos en cuanto a tamaño y forma, por tanto, el cGMP calculado por astrocito es un promedio, que se desvía más o menos en función de la heterogeneidad del cultivo. Por un lado, esta estimación indica que la formación de cGMP basal disminuye a lo largo del desarrollo de los cultivos. La mayor formación de cGMP basal en cultivos jóvenes no parece estar relacionada con una mayor producción de NO endógeno, ya que los nitritos determinados a lo largo del desarrollo no varían, y son muy bajos en todos los casos. Por otro lado, de acuerdo con los resultados inmunocitoquímicos, la formación de cGMP dependiente de NO en cultivos de astrocitos de 3 y 7 días es similar, y significativamente mayor que la observada en astrocitos de cultivos confluentes. Esta diferente respuesta al SNP podría ser debida al distinto grado de expresión de la sGC o a la expresión de determinadas isoformas, con distinto grado de

actividad en las distintas edades del cultivo. La sGC es un heterodímero α/β obligado, y hasta la fecha sólo se han demostrado activas las combinaciones de subunidades α_1/β_1 y α_2/β_1 (Russwurm y col., 1998; Gupta y col., 1997). La mayor parte de los trabajos sobre expresión de subunidades de la sGC publicados hasta la fecha se centran en las subunidades α_1 y β_1 , isoformas aparentemente más ubicuas. Ambas isoformas han sido localizadas en células gliales en cortes de cerebelo mediante inmunodetección (Gibb y Garthwaite, 2001). También se ha demostrado la expresión de la subunidad α_2 a nivel de mRNA (Gibb y Garthwaite, 2001), sin embargo, la expresión de esta subunidad a nivel de proteína aun no ha sido demostrada en ningún tipo de célula. La expresión de mRNA de la subunidad α_2 se ha demostrado mediante *northern blot* en distintas regiones del cerebro humano (Budworth y col., 1999), y trabajos recientes del laboratorio han demostrado mediante RT-PCR que el mRNA de esta subunidad está presente en cultivos de astrocitos confluentes (Pedraza y col., enviado).

La distribución intracelular del cGMP formado en respuesta a SNP presenta diferencias entre cultivos no confluentes y confluentes. En cultivos de 3 y 7 días, el cGMP se detecta a lo largo de todo el citoplasma y el núcleo de los astrocitos, pero se concentra principalmente en la región perinuclear. En los cultivos de 14 días, la distribución del cGMP es más homogénea a través de toda la célula. Esta diferente localización subcelular de cGMP podría indicar una variación de la localización del enzima sGC a lo largo de desarrollo del cultivo. Recientemente, Russwurm y col., (2001) han demostrado que la subunidad α_2 es capaz de asociarse a membranas postsinápticas neuronales mediante la unión a la proteína PSD-95 (a través de un dominio PDZ). Según los autores, este hecho clasificaría los distintos heterodímeros de sGC en dos clases: la sGC citosólicas (α_1/β_1) y la sGC asociadas a membrana (α_2/β_1). En la literatura existen pocos datos sobre la distribución intracelular del cGMP. En fibroblastos humanos en cultivo se ha descrito una acumulación citoplasmática difusa del cGMP formado en respuesta a SNP (Barsony y Marx, 1990). En neuronas de insecto se ha demostrado que la distribución intracelular del cGMP varía en función de la fase del desarrollo. En neuronas inmaduras en fase de crecimiento axonal la mayor parte del cGMP se concentra en el núcleo, mientras que en neuronas maduras el cGMP queda retenido en el citoplasma (Truman y col., 1996). Según los autores, la localización nuclear del cGMP durante el desarrollo podría estar reflejando su

implicación en la transcripción de genes. Hasta la fecha, no existen otros datos que describan la localización subcelular del cGMP en astrocitos.

La mayor expresión de GFAP en astrocitos jóvenes, paralela a la mayor capacidad de acumulación de cGMP en estas células, podría sugerir una relación entre reactividad glial y acumulación de cGMP. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis. Hemos estudiado la relación entre capacidad de formación de cGMP y reactividad de una manera indirecta, determinando el efecto sobre la formación de cGMP del tratamiento con LPS, un agente ampliamente utilizado para activar células gliales dando lugar a la expresión de NOS-2, liberación de IL-1 β , TNF α IL-6 y prostaglandina E (Eddleston y Mucke, 1993). Los resultados inmunocitoquímicos muestran que el tratamiento con LPS en cultivos de 7 días produce un cambio morfológico en los astrocitos; sus prolongaciones se vuelven más finas y el soma se condensa (modificaciones morfológicas características de activación astroglial). En células tratadas con LPS la cantidad de cGMP intracelular determinada mediante RIA aumenta, como consecuencia de la inducción de la NOS-2 en astrocitos y en la microglía contaminante (Murphy y col., 1993) y consecuentemente, la intensidad del marcaje del cGMP es mayor. Sin embargo, aunque los datos inmunocitoquímicos no permiten apreciar diferencias en la intensidad del marcaje de cGMP formado en respuesta a SNP en células tratadas y no tratadas con LPS, la determinación del cGMP formado mediante RIA indica que en células tratadas con LPS se genera tres veces menos tras la estimulación de la sGC por el donador que en células no tratadas. El desacuerdo entre los niveles de cGMP detectados mediante inmunofluorescencia y los determinados mediante RIA sugieren una falta de linealidad entre la intensidad del marcaje y la cantidad real de cGMP, lo cual implica que las diferencias en la intensidad del marcaje se puedan observar solamente para cierto rango de concentraciones de cGMP, pero para concentraciones mayores, la señal se satura. La disminución de formación de cGMP dependiente de NO tras el tratamiento con LPS ha sido previamente descrita en cultivos confluentes (14 días), donde las células también adquieren morfología reactiva (Baltrons y García, 1999). Además, el tratamiento con otros agentes inductores de reactividad glial (IL-1 β , péptido β -amiloide) también disminuyen la formación de cGMP en respuesta a NO (Pedraza y col., enviado; Baltrons y col., enviado).

Una mayor capacidad de acumulación de cGMP tampoco parece estar relacionada con el mayor grado de diferenciación morfológica de los astrocitos. Esta afirmación se concluye de la comparación mediante inmunofluorescencia indirecta frente a cGMP/GFAP de cultivos primarios de cerebelo confluentes (donde predominan los astrocitos poligonales de morfología poco diferenciada) con cultivos primarios de cerebelo enriquecidos en neuronas, en los que los astrocitos contaminantes no proliferan y expresan morfología estrellada más típica de las células diferenciadas (Hatten, 1985). Según nuestros resultados, en los cultivos enriquecidos en neuronas, son las neuronas las células más intensamente marcadas con el anticuerpo frente al cGMP cuando los cultivos son estimulados con SNP. Además, la intensidad del cGMP marcado en los astrocitos presentes en estos cultivos es igual o menor que la detectada en astrocitos de los cultivos libres de neuronas, donde su apariencia es más indiferenciada.

En cuanto a la relación entre la capacidad de formar cGMP y el contacto con las neuronas, observamos que en presencia de neuronas diferenciadas los astrocitos forman aparentemente menos cGMP que los astrocitos de cultivos de 3 días, donde gran parte de las células presentes también son neuronas. Hay que tener en cuenta que el grado de diferenciación neuronal y su capacidad de formar cGMP es distinto en ambas situaciones, y es posible que el contacto con neuronas con un determinado grado de diferenciación pueda afectar de distinta manera a la capacidad de formar cGMP de los astrocitos. Así, los progenitores de neuronas granulares o neuronas en fases iniciales de maduración, presentes en los cultivos jóvenes, podrían liberar factores que favoreciesen la expresión de sGC y la participación del cGMP glial en algunos aspectos de su maduración, como por ejemplo la migración a la capa granular interna. Por ejemplo, se ha demostrado que la glia de Bergmann en cerebelos inmaduros es capaz de formar cGMP en respuesta a donadores de NO (De Vente y Steinbusch, 1992), y se ha observado en cortes de cerebelo cultivados que el NO está implicado tanto en la diferenciación de la glia de Bergmann como en la migración de las células granulares desde la capa granular externa hacia la interna (Tanaka y col., 1994). Alternativamente, las neuronas maduras podrían liberar factores que disminuyesen la actividad sGC astrogial.

Diversos resultados obtenidos mediante microdialisis o mediante técnicas inmunicitoquímicas en cortes de tejido han demostrado que durante el desarrollo

del cerebro de la rata, a partir del día 0 postnatal, los niveles de cGMP de las distintas regiones cerebrales disminuyen, al igual que la capacidad de formar cGMP en respuesta a NO. Esta disminución también se observa durante la maduración y el envejecimiento (Schmidt y Thornberry, 1978; Puri y Volicer, 1981; Bungal y col., 1982; De Vente y col. 1990; De Vente y Steinbusch, 1992; Wei y col., 1993; Vallebuona y Raiteri, 1995; Markerink-Van Ittersum y col., 1997; Prickaerts y col., 1998). Estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo por De Vente y col. (1990) han demostrado que, en cerebelos inmaduros de ratas de 10 días, numerosos tipos celulares son capaces de formar cGMP (glia de Bergmann, astrocitos de la capa granular, neuronas granulares y fibras paralelas de capa molecular). En cerebelos de ratas adultas, aunque la distribución del cGMP es similar a la observada en ratas inmaduras, las cantidades de cGMP que se forman son menores (De Vente y col., 1990; De Vente y Steinbusch, 1992). La disminución de la actividad sGC con la edad no es exclusiva del tejido cerebral, ya que también se ha observado en arterias cerebrales y carótidas aisladas de ovejas (White y col., 2000). Además de la actividad sGC, también otro elemento de la vía NO-sGC-cGMP, la expresión de la NOS, se ve modificado durante el desarrollo. Así, varios estudios han demostrado que la expresión de la NOS aumenta durante el desarrollo embrional y postnatal en diversos tejidos de ratón y rata (Matsumoto y col., 1993; Li y col., 1996). De forma interesante, la mayor expresión de NOS parece coincidir con la sináptogénesis en distintos tejidos (Bredt y Snyder, 1994; Roskams y col., 1994; Keilhoff y col., 1996). Por otro lado, también durante el envejecimiento se observa una disminución en la expresión de NOS en todas las regiones cerebrales estudiadas (Brien y col., 1995; Mollace y col., 1995; Vaid y col., 1998). El conjunto de estos datos muestra que durante el desarrollo y en tejidos maduros jóvenes, situaciones con mayor grado de proliferación celular, la producción de cGMP es mayor, sugiriendo una relación entre la formación de cGMP y la capacidad proliferativa de las células. Esta relación también ha sido estudiada en nuestros cultivos, donde la cuantificación del grado de proliferación se realizó determinando la incorporación de [³H]-timidina en las células. Los resultados indican que el grado de proliferación es similar en los cultivos de 3 y 7 días, mientras que en cultivos de 14 días el grado de incorporación de timidina es significativamente menor (75 % respecto a los 7 días), diferencia que no es tan pronunciada como la disminución de formación de cGMP (20 % respecto a los 7 días). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la relación entre el número de células y el porcentaje de astrocitos presentes a cada edad del cultivo

(Fig. 6) indica que los astrocitos cuádruplican su número entre los días 3 y 7 después de la siembra, y de nuevo lo cuádruplican entre los días 7 y 14. Paralelamente, la contaminación de los cultivos por células Neu-N-/GFAP- no llega a duplicarse entre los días 3 y 7, pero si se duplica entre los días 7 y 14. Por lo tanto, los astrocitos son las células que presentan un mayor grado de proliferación durante las dos primeras semanas. Trabajos anteriores del laboratorio indican que, una vez los astrocitos han alcanzado la confluencia (alrededor del día 10), son las células microgliales las principales células proliferantes (Agulló y col., 1995). Confirmando estos datos, el estudio de la incorporación de BrdU y su consiguiente inmunodetección muestra que en los cultivos de 3 y 7 días, la mayoría de las células proliferantes son astrocitos. De forma contraria, en cultivos de 14 días, las células microgliales parecen ser las principales células proliferantes, y por lo tanto, las responsables de la incorporación de [³H]-timidina. El conjunto de estos resultados sugieren que existe un paralelismo entre el grado de proliferación de los astrocitos y su capacidad de formar cGMP en respuesta a NO, y apoyan la idea de que esta relación exista también *in vivo*. Existen datos antiguos que relacionan los niveles intracelulares de cGMP (basales) y el grado de proliferación en otras células en cultivo. Así, Tovey y col., (1980), en células de la línea L1210 de ratón, han observado que los niveles de cGMP intracelular aumentan 3,6 veces cuando el grado de proliferación celular se triplica (Tovey y col., 1980). La mayor capacidad de formación de cGMP en las células proliferantes sugiere un papel del cGMP en la regulación del ciclo celular. Confirmando esta idea, se ha observado que en fibroblastos, los niveles de cGMP intracelular aumentan aguda y transitoriamente coincidiendo con el paso por la fase G₁ de cultivos sincronizados, y cuando se estimula la proliferación de células bloqueadas en la fase G₀ (Seifert y Rudland, 1994), indicando que el cGMP jugaría un papel en el ciclo celular, actuando como señal promotora del paso de la fase G₁ a S.

2. Desensibilización de la sGC por exposición continuada a NO en astrocitos y neuronas en cultivo.

Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio han demostrado que el tratamiento de células astrogliales de cerebro de rata en cultivo con agentes inflamatorios como el LPS, las citoquinas IL-1 β y TNF α , y péptidos β -amiloides, agentes que inducen en mayor o menor medida la actividad NOS-2, disminuyen

la actividad sGC (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., enviado; Pedraza y col., enviado). Esta disminución es consecuencia de la disminución de la cantidad de la proteína enzimática, que va acompañada de una disminución de los niveles de mRNAs de las subunidades de la sGC. Este mismo fenómeno ha sido descrito en células de músculo liso vascular expuestas a LPS y citoquinas pro-inflamatorias (Papapetropoulos y col., 1996; Tsuchida y col., 1994; Takata y col., 2001). Sin embargo, mientras en estas últimas células el NO parece ser total o parcialmente responsable de la disminución de la actividad sGC, en células astrogliales el efecto de los agentes inflamatorios sobre dicha actividad es totalmente independiente de NO (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., enviado; Pedraza y col., enviado). En células de músculo liso y de otros tejidos se ha demostrado, además, que la administración de NO exógeno mediante la exposición a donadores de NO induce la disminución de la sGC (Papapetropoulos y col., 1996b; Davis y col., 1997; Ujiie y col., 1994). Con el objeto de averiguar si la sGC de las células nerviosas puede ser regulada por NO, en la segunda parte de este trabajo se ha estudiado el efecto de la exposición continuada a donadores de NO sobre la formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios de astrocitos y de neuronas granulares de cerebelo.

En astrocitos, las exposiciones a distintos donadores de NO (SNP, SNAP y varios NONOatos) durante diferentes tiempos producen una disminución de la acumulación de cGMP inducida por la estimulación aguda (3 min) con SNP. La ausencia de cambios en la distribución de la actividad LDH descarta que este efecto se deba a la muerte de las células. El hecho de que donadores de estructura química muy diferente produzcan el mismo efecto, hace suponer que el responsable del efecto inhibitorio es el propio NO (único componente que comparten), y no otros productos de la descomposición de estos agentes. Los experimentos iniciales muestran que la exposición a SNP o SNAP durante 2-24 horas produce una disminución de la acumulación de cGMP que ya es máxima en el primer tiempo estudiado (2 horas). El efecto del SNP se mantiene durante las siguientes 24 horas, mientras que a las 24 horas de tratamiento con SNAP se observa una ligera reversión. Los datos de acumulación de nitritos indican que la liberación de NO a partir de SNAP se produce durante las primeras horas, y por lo tanto esta reversión coincide con la ausencia de liberación de NO durante las últimas horas de tratamiento. Por otro lado, el SNP libera menores cantidades de NO que el SNAP, pero de forma más constante. Esta cinética de liberación de

NO a partir del SNAP está de acuerdo con la descrita en estudios previos (Bates y col., 1991; Murphy y Noack, 1994). Sin embargo, los datos sobre liberación de NO por parte del SNAP descritos por otros grupos son muy variables (Matthews y col., 1996; Singh y col., 1996; Lärffars y Gyllenhammar, 1995; Ferrero y col., 1999), probablemente debido a que la liberación de NO por parte de este donador es altamente dependiente de los componentes del sistema de estudio, particularmente de las concentraciones de tioles reducidos y metales de transición presentes (Dicks y Williams, 1996; Gordge y col., 1996; Singh y col., 1996). Estudios a tiempos de tratamiento más cortos con varios NONOatos (donadores de NO con una constante de descomposición fija y bien establecida) indican que la aparición de la inhibición es muy rápida (< 10 min). Además, la velocidad de inhibición en los primeros minutos está inversamente relacionada con la vida media de los NONOatos, y por lo tanto, directamente relacionada con la cantidad de NO que liberan. En astrocitos en suspensión y utilizando una aproximación experimental distinta (mediante el cálculo matemático de pendientes, en la curva de síntesis y degradación del cGMP), Bellamy y col. (2000) han sugerido que la desensibilización de la sGC por exposición a NO (usando DEA/NO como donador) aparece en el primer minuto de exposición.

El tratamiento de los astrocitos con los donadores también produce un pequeño aumento de los niveles de cGMP entre las 2-5 horas, que vuelve a los niveles basales a tiempos más largos. Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que el NO nitrosila reversiblemente residuos de cisteína de numerosas proteínas (Jaffrey y col., 2001), y se ha propuesto que esta interacción se utiliza en la célula para almacenar, transportar y prolongar la vida media del NO (Gaston y col., 1993; Kluge y col., 1997). De esta manera, parte del NO liberado durante nuestro tratamiento podría permanecer en las células una vez retirado el donador. Este aumento es más acentuado utilizando el SNAP como donador, lo cual puede deberse a diferencias en la cantidad y velocidad de liberación del NO entre el SNAP y el SNP. Por otro lado, el cGMP basal determinado en cultivos tratados con donadores también podría corresponder a cGMP formado durante el tratamiento.

Debido a su capacidad de difusión, el NO liberado por los astrocitos o la microglía durante situaciones de inflamación podría afectar a las neuronas del entorno causando muerte neuronal, como se ha demostrado *in vitro* (Hu y col., 1997; Hewett y col., 1994; Peuchen y col., 1997). Además, las mismas neuronas

son capaces de producir NO en grandes cantidades en situaciones de sobreexcitación de los receptores de glutamato de tipo NMDA (Kiedrowski y col., 1992; Novelli y col., 1987; Garthwaite y col., 1988). Por lo tanto, ya que las neuronas también pueden verse expuestas a NO durante largos periodos de tiempo, hemos estudiado su efecto sobre la formación de cGMP dependiente de NO en neuronas granulares de cerebelo. Los resultados han mostrado que, al igual que en astrocitos, el tratamiento con SNP y SNAP disminuye su capacidad de acumulación de cGMP en respuesta a NO. Dicha disminución alcanza su máximo a los 30-40 min de tratamiento y supone un 50 % del efecto. Sin embargo, tal como ha sido demostrado por otros autores (Bolaños y col., 1995), el estudio del efecto del NO en neuronas presenta ciertas limitaciones, ya que estas células son más sensibles al efecto citotóxico del NO que los astrocitos: El tratamiento continuado con los donadores de NO, SNP y SNAP, produce muerte neuronal, dentro de las primeras 24 horas de tratamiento. Los efectos citotóxicos producidos por el SNP son más severos y aparecen más rápidamente, a pesar de que la cantidad de NO que este donador libera es menor que el liberado por el SNAP. Este resultado reflejaría que parte de la citotoxicidad producida por el SNP se debe a la inhibición de la cadena respiratoria por el ión ferricianuro, compuesto altamente tóxico liberado tras la descomposición del SNP. La diferente sensibilidad a la citotoxicidad producida por el NO entre astrocitos y neuronas, podría deberse a su diferente capacidad de activación del metabolismo glicolítico, ya que se ha descrito que los astrocitos, mediante la activación del metabolismo glicolítico, previenen el colapso del potencial de membrana mitocondrial y mantienen la funcionalidad de la célula en situaciones en las que el NO inhibe la respiración mitocondrial. Sin embargo, esta vía metabólica no se activa en neuronas, y la exposición a NO conduce a la muerte celular (Almeida y col., 2001). Por lo tanto, el efecto citotóxico de los donadores sobre nuestros cultivos limita el tiempo de exposición a estos agentes en el estudio de su efecto sobre la formación de cGMP. Para evitar el riesgo de citotoxicidad, los tiempos elegidos para el estudio en neuronas no superaron las 2 horas de tratamiento.

Tanto en astrocitos como en neuronas, el efecto del SNAP sobre la acumulación de cGMP es dependiente de su concentración, y la potencia y efecto máximo son similares para ambos tipos de célula (EC_{50} : $7.9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ y $10,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$, astrocitos y neuronas respectivamente; E_{max} : $62.1 \pm 0.2 \%$ y $62,1$

± 0,2 %, astrocitos y neuronas respectivamente). En astrocitos, el efecto de SNP también es dependiente de su concentración, y la potencia y efecto máximo es similar a la calculada para el SNAP. Además, el rango de concentraciones de donador eficaces para inhibir la formación de cGMP en estas células es semejante (SNP 10-500 μ M) al descrito para inducir el mismo efecto en fibroblastos y células de músculo liso vascular (Zhang y col., 1993; Ujiie y col., 1994; Papapetropoulos y col., 1996b). Teniendo en cuenta la diferente cantidad de NO liberado por SNAP y SNP, cabe destacar que las pequeñas cantidades de NO liberadas por SNP son suficientes para producir una reducción máxima. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inactivación del NO en presencia de células es más rápida cuanto mayor es su concentración (Kharitonov y col., 1994; Goldstein y Czapski, 1995), y en consecuencia, la vida media de las altas cantidades de NO liberado por el SNAP podría ser menor a la vida media del NO liberado por el SNP. Además, recientemente se ha descrito en astrocitos la existencia de un sistema de inactivación del NO, mediado por una proteína aún no identificada, capaz de disminuir la vida media del NO hasta tiempos muy cortos (100 ms) (Griffiths y Garthwaite, 2001; Griffiths y col., 2002). Este sistema se encargaría de controlar los niveles de NO en la célula, y evitaría sus posibles efectos citotóxicos.

El efecto de exposiciones a donadores de NO sobre la acumulación de cGMP se debe a la acción del propio NO, y no al peroxinitrito (producto de oxidación del NO por superóxido), ya que la presencia de SOD, enzima que inactiva el anión superóxido, durante el tratamiento con SNAP no sólo no reduce el efecto inhibitorio del donador, sino que parece aumentarlo. El NO y el peroxinitrito reaccionan con dianas distintas dentro de la célula, y las características de estas reacciones son también diferentes. Así, el NO es capaz de reaccionar con metales de transición, mientras que la nitrosilación de tirosinas es una reacción características del peroxinitrito (Zhang y Snyder, 1992; Gow y Ischiropoulos, 2001). Además, aunque ambas moléculas pueden nitrosar residuos de cisteína, es probable que las dianas susceptibles de reaccionar con estas moléculas sean distintas (Gow y Ischiropoulos, 2001). Un ejemplo de las distintas acciones del NO y el peroxinitrito son los diferentes mecanismos por los que ambas compuestos inhiben la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial: el NO reacciona con la citocromo c oxidasa (complejo IV), inhibiendo su actividad de forma reversible en competición con el oxígeno (Beltran y col., 2000), mientras que el peroxinitrito actúa preferentemente sobre

la NADH ubiquinona reductasa (complejo I) inhibiéndola irreversiblemente y con posteriores efectos citotóxicos (Riobo y col., 2001). Otros ejemplos de proteínas susceptibles de ser inhibidas irreversiblemente por el peroxinitrito son los complejos mitocondriales II y V, la aconitasa y la creatina quinasa (Brown, 1999). Según estos datos, el hecho de que la inhibición de la formación de cGMP detectada en nuestras células se deba al NO y no al peroxinitrito podría sugerir la reversibilidad de su efecto. Y efectivamente, varios resultados muestran que la inhibición de la acumulación de cGMP producida por exposiciones cortas a NO es espontáneamente reversible. Por un lado, el efecto del tratamiento con DEA/NO, un donador de vida media muy corta (2,1 min) revierte espontáneamente a los 20 min de tratamiento (10 vidas medias), momento en el que ha cesado la liberación de NO. Por otro lado, el efecto inhibitorio del tratamiento con SNAP (2 horas) es espontáneamente reversible en las 24 horas siguientes a la retirada del donador.

Los niveles de cGMP detectados dentro de la célula son el resultado del equilibrio entre su síntesis (por sGC) y su degradación (por PDEs). En nuestro caso, la disminución en la acumulación de cGMP dependiente de NO en astrocitos expuestos a donadores de NO durante 2 horas no se debe a una activación de la PDE, ya que la inhibición de esta enzima con IBMX no afecta al porcentaje de descenso de los niveles de cGMP. Por otro lado, en fracciones citosólicas preparadas a partir de cultivos pretratados con SNAP 100 μ M durante 2 horas, la actividad sGC disminuye en la misma proporción que la acumulación de cGMP en células intactas, indicando que la inhibición de este enzima es responsable de la disminución en los niveles de cGMP. El hecho de que la disminución en la acumulación del cGMP se deba a una disminución de su síntesis, pero no a un aumento de su degradación, concuerda con los datos en células de músculo liso y células intersticiales de médula renal (Papapetropoulos y col., 1996b; Ujiie y col., 1994). Por otro lado, la inhibición de la actividad producida tras 2 horas de exposición a SNAP no parece deberse a la disminución de la cantidad de proteína enzimática, ya que no se altera la concentración de la subunidad β_1 (monómero común a los heterodímeros activos). La rápida aparición del efecto inhibitorio también apoya esta idea. Por lo tanto, en este caso la disminución de la actividad sGC parece deberse a un efecto directo sobre el enzima.

La incubación de las células astrogiales con el SNAP conjuntamente con distintos agentes reductores con grupos tiol (DTT, cisteína, GSH o su derivado permeable EEGSH) durante 2 horas evita el efecto inhibitor del donador sobre la formación de cGMP dependiente de NO. Sin embargo, la presencia de ácido ascórbico (500 μ M), reductor que no contiene grupos tioles, durante el tratamiento, no altera el efecto del SNAP. Estudios realizados en células de músculo liso vascular (Papapetropoulos y col., 1996b) indican una prevención parcial del mismo efecto por DTT y cisteína, y también por el ácido ascórbico (500 μ M). A mayor concentración de ácido ascórbico (2 mM), la reversión es total. Desde los estudios iniciales sobre la sGC (Mittal y Murad, 1982) se sabe que el estado redox es un factor importante en la regulación de su actividad. Los datos obtenidos en células de músculo liso sugieren que los agentes reductores podrían impedir la inhibición de la sGC manteniendo el hierro del hemo en estado reducido o impidiendo la oxidación de grupos tioles críticos para la actividad del enzima. Sin embargo, en nuestras células, el hecho de que los agentes con grupos tiol, pero no el ácido ascórbico, eviten la desensibilización de la sGC producida por el NO, no permite concluir que el mecanismo de ésta sea una simple oxidación del enzima. Además, la inhibición causada por el tratamiento con SNAP se previene tanto con agentes capaces de penetrar en la célula (EEGSH, cisteína, DTT) como con compuestos que no penetran (GSH). Por lo tanto, sabiendo que el NO se une de forma reversible a los grupos tioles (Becker y col., 1998) y que entre tioles se pueden producir reacciones de transnitrosilación, el efecto de la presencia de agentes reductores con grupos tiol se debe muy probablemente a que éstos capturan el NO liberado por el SNAP, impidiendo su acción inhibitoria sobre la sGC.

Además de prevenir el efecto del NO, los agentes reductores con grupos tiol también son capaces de revertirlo. Así, la reversión espontánea que se observa tras la retirada del donador SNAP (después de 2 horas de tratamiento) se acelera si EEGSH está presente en el medio. Estos resultados sugieren que el NO podría desensibilizar la sGC mediante la nitrosación de determinados grupos tioles críticos para la actividad del enzima. Stamler y col. (1997) han propuesto la secuencia de aminoácidos (K,R,H,D,E)(C)(D,E) como motivo consenso susceptible de nitrosación y dicha secuencia está presente en la guanilato ciclasa soluble.

Aunque muchas de las características de la inhibición producida por los donadores citadas hasta ahora son semejantes para las neuronas y los astrocitos en cultivo, la capacidad de reversión del efecto, sin embargo, difiere entre ambas células. Tras 1 hora de tratamiento con SNAP, la capacidad de formación de cGMP de las neuronas no revierte dentro de las 24 horas siguientes a la retirada del donador, mientras que en los astrocitos, aun con tiempos de exposición más largos (2 horas) revierten completamente. Además, aunque la presencia de un agente reductor con grupo tiol (EEGSH) revierte el efecto, dicha reversión es sólo parcial y aparece más tarde que en astrocitos. Por lo tanto, la inhibición por exposición a NO parece más persistente en neuronas. Curiosamente, hemos observado también una importante disminución de la producción de cGMP en respuesta a NO producida por el tratamiento con GSH en neuronas, que no ocurre en astrocitos. Hasta el momento no hemos encontrado datos que permitan explicar satisfactoriamente este efecto. La prontitud con la que los donadores de NO disminuyen la actividad sGC indican que, también en neuronas, el NO podría estar inhibiendo directamente el enzima sGC. Sin embargo, la falta de reversión espontánea y la lenta reversión en presencia de agentes reductores sugieren que esta inhibición directa no es simplemente una nitrosación. La nitrosación de tioles puede derivar, en función de las características del medio, en otras reacciones oxidativas que forman finalmente enlaces irreversibles, o más difícilmente reversibles (SOH, SSR) (Stamler y Hausladen, 1998). En numerosas ocasiones se ha descrito que las neuronas son células más sensibles a los agentes oxidantes que los astrocitos, debido a su menor capacidad reductora (Sanfeliu y col., 2001; Chen y col., 2001). Por lo tanto, sería aceptable que las mismas cantidades de NO fueran capaces de producir efectos más persistentes, en neuronas que en astrocitos. Es posible que la persistencia del efecto sobre la sGC sea dañina, y quizá este efecto pueda ser una de las causas que junto con oxidaciones en otros componentes de la célula cause la muerte celular detectada en las horas siguientes.

Los estudios de tratamientos con los distintos donadores han mostrado que en todos los casos existe una formación de cGMP resistente a la inhibición: la inhibición máxima nunca alcanza el 100%. Este fenómeno podría explicarse si la interacción del NO con el enzima produjese sólo una inhibición parcial de la actividad, o bien si existiesen isoformas del enzima resistentes a esta inhibición. Otra posibilidad es que la distinta localización de la sGC dentro de la célula

afecte a la capacidad de desensibilización del NO (ej.: en ciertos entornos intracelulares podrían concentrarse más moléculas “secuestradoras” de NO que impedirían su efecto inhibitorio sobre las sGC allí localizadas).

La prolongación de la exposición al NO conlleva importantes cambios en las características de la inhibición producida. Como ocurre con tratamientos de 2 horas, la disminución en la acumulación de cGMP dependiente de NO en astrocitos expuestos a NO durante 20 horas no se debe a una activación de la PDE, sino a la disminución de la actividad sGC. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre tras exposiciones de 2 horas, esta inhibición de la sGC se debe, al menos en parte, a una disminución de la cantidad de proteína enzimática, ya que los niveles de la subunidad β_1 disminuyen con este tratamiento. Ya que esta isoforma forma parte de los heterodímeros activos (Russwurm y col., 1998; Gupta y col., 1997), la reducción de la concentración enzimática de β_1 sería suficiente para producir disminución de la actividad. El hecho de que el efecto del tratamiento largo con NO se deba a una disminución de la proteína enzimática, se refleja también en la incapacidad de reversión del efecto después de 20 horas de tratamiento con SNAP. Además, la presencia de EEGSH durante la fase de recuperación no produce ningún efecto. La reversión de la actividad requiere en este caso la síntesis de nuevo enzima, un proceso más lento que la reducción o desnitrosación de tioles. Por otro lado, la inhibición de la actividad sGC producida por exposiciones prolongadas a NO (20 horas) en astrocitos está mediada por procesos de transcripción y traducción, ya que la presencia de actinomicina o cicloheximida durante el tratamiento reduce el porcentaje de inhibición. Este resultado sugiere que el NO estaría induciendo la expresión de una proteína encargada de degradar o promover la degradación de la sGC en los astrocitos. Este mismo efecto del NO se ha observado en células de músculo liso (Scott y Nakayama, 1998).

La inhibición de la sGC producida por la exposición a LPS y citoquinas proinflamatorias también está mediada por procesos de transcripción y traducción, sin embargo, el NO formado endógenamente (tras la inducción de la NOS-2) no está implicado en este mecanismo inhibitorio (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., enviado; Pedraza y col., enviado). Se ha descrito que en cultivos de astrocitos el LPS previene la depleción del GSH causada por NO (García-Nogales y col., 1999). Teniendo en cuenta que el GSH es capaz de revertir la inhibición producida por exposiciones a NO, hemos estudiado si

diferencias en los niveles de GSH intracelular podrían explicar la distinta capacidad inhibitoria del NO exógeno y el NO formado durante el tratamiento con LPS. Los resultados obtenidos indican que los niveles de GSH determinados en nuestros cultivos (comparables a los determinados por otros grupos (Vasquez y col., 2001), no se alteran con ninguno de los tratamientos, donador de NO o LPS, descartando esta hipótesis. Además, la previa depleción del glutation intracelular en astrocitos tampoco altera la capacidad inhibitoria del NO. la diferente capacidad inhibitoria del NO procedente de donador y del NO formado tras la estimulación con LPS no puede explicarse por diferentes niveles de glutation durante ambos tratamientos.

La exposición prolongada a NO en astrocitos también causa la disminución de los niveles de mRNA de las subunidades α_1 y β_1 de la sGC, al igual que se ha descrito previamente en células intersticiales de médula de rata y células de músculo liso vascular (Ujiie y col., 1994; Filippov y col., 1997). Esta disminución se detecta tras varias horas de tratamiento con NO (20 horas), pero no tras tratamientos más cortos (2 horas). En comparación con nuestros resultados, en células de músculo liso vascular la disminución de ambos mRNA es evidente a las 2 horas de exposición a SNP 1 mM y máxima a las 4 horas (Filippov y col., 1997). El hecho de que en nuestras condiciones no se aprecie disminución a las 2 horas de tratamiento, puede deberse a los distintos niveles de NO a los que las células son expuestas, ya que en ese mismo estudio se demuestra que la reducción de los niveles de mRNA es dependiente de la concentración de donador. Aunque en nuestras células la exposición a NO disminuye tanto los niveles de mRNA como de proteína enzimática, ambos efectos parecen independientes, es decir, la disminución del mRNA no es la causa de la disminución de proteína enzimática. Esta conclusión deriva de la observación de que el tratamiento de los cultivos con cicloheximida (agente que bloquea la traducción de proteínas) disminuye la actividad sGC en menor grado que la exposición a NO, lo cual indica que el tratamiento favorece la degradación de la proteína enzimática. Por lo tanto, las exposiciones prolongadas a NO producen dos efectos paralelos: inhiben la actividad sGC al disminuir cantidad de la proteína enzimática, y al mismo tiempo disminuyen los niveles de mRNA.

La disminución de los niveles de mRNA de la sGC también se ha observado en astrocitos expuestos a LPS y citoquinas proinflamatorias (Pedraza y col., enviado), efecto que es impedido con la presencia de un inhibidor de la

NOS durante el tratamiento, lo cual indica que, al igual que el NO procedente de donadores, el NO endógeno disminuye los niveles de mRNA de la sGC. Filippov y col. (1997), en estudios en células de músculo liso vacular, han observado que el NO disminuye la vida media de los mRNAs de las subunidades de la sGC de forma dependiente de transcripción y de síntesis de proteínas, y han propuesto que el NO induce la síntesis de una proteína implicada en dicha desestabilización, y así regula su expresión.

Para comprobar si, en neuronas, el NO formado endógenamente es capaz de producir el mismo efecto que el NO liberado por los donadores, hemos tratado las neuronas con NMDA, el agonista más eficaz en la estimulación de la NOS-1 en estas células (Kiedrowski y col., 1992; Novelli y col., 1987; Garthwaite y col., 1988). La estimulación de receptores de aminoácidos excitadores de tipo NMDA induce la entrada localizada de Ca^{2+} en la célula, que a su vez activa la NOS-1. Al igual que el NO exógeno, el tratamiento de las células con NMDA es capaz de disminuir la posterior formación de cGMP dependiente de NO. Aunque el efecto máximo que se observa es similar con ambos tratamientos, el efecto del NMDA es más rápido, alcanzando la inhibición máxima ($58,8 \pm 8,9$ %) en los primeros 10 min de tratamiento. Sin embargo, esta disminución de la acumulación del cGMP está mediada sólo en parte por el NO endógeno, ya que parte del efecto se conserva en condiciones en las que se ha impedido la producción de NO utilizando un inhibidor de la NOS (L-NMMA).

El hecho de que el NO no sea el único responsable del efecto del NMDA indica que, al igual que en astrocitos, en neuronas aparecen distintos mecanismos capaces de disminuir la acumulación de cGMP. En el caso de las neuronas, un posible mediador del efecto del NMDA es el Ca^{2+} , ya que se ha demostrado que el tratamiento con agentes que aumentan la concentración intracelular de Ca^{2+} disminuye la generación de cGMP dependiente de NO, tanto en neuronas granulares como en astrocitos en cultivo, mediante la activación de PDEs dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (Baltrons y col., 1997). También en sinaptosomas de cerebro de rata se ha descrito una activación de PDEs de cGMP por Ca^{2+} (Mayer y col., 1992). Por otro lado, recientemente se ha demostrado la inhibición de la sGC por Ca^{2+} mediante un mecanismo de interacción directa no competitivo (Parkinson y col., 1999).

Varios trabajos han implicado a procesos de fosforilación en la regulación de la actividad sGC. Estudios de Ferrero y col. (2000) en células cromafines bovinas han determinado que la activación de la PKG en estas células disminuye la actividad sGC a través de un efecto indirecto que favorece la defosforilación del enzima. En células de músculo liso también se ha descrito que la PKG inhibe la actividad sGC. Sin embargo, este efecto está mediado por una fosforilación directa de la sGC (Murthy y col., 2001). El hecho de que la regulación por la PKG, aun alcanzando un mismo efecto, transcurra por vías distintas en células cromafines y de músculo liso, sugiere especificidad de vías regulatorias entre tipos celulares, que podría estar causada por diferencias en el tipo de isoformas de PKG, PDEs u otras moléculas implicadas que se expresan, o por un diferente grado de su expresión. En nuestros cultivos, la inhibición producida por el tratamiento con SNAP no está mediada por la activación de PKG, ya que el uso de un inhibidor de esta enzima durante el tratamiento (KT-5823) no altera el porcentaje de inhibición.

Papapetropoulos y col. (1996), en células de músculo liso vascular, han descrito que la inhibición de la sGC producida por el NO, requiere actividad PKA. La activación de la PKA podría ocurrir como consecuencia de la elevación de los niveles de cAMP, debidos a la inhibición de una PDE por el cGMP formado en respuesta a NO. Además, en las mismas células y en fibroblastos pulmonares se ha demostrado que el aumento de cAMP intracelular disminuye la cantidad de proteína y mRNA de la sGC (Papapetropoulos y col., 1995; Shimouchi y col., 1993). En astrocitos tratados con SNAP durante 2 horas, la PKA no parece estar implicada en la inhibición de la sGC. Sin embargo, la inhibición producida por la exposición a NO durante periodos largos (20 horas) es bloqueada en parte por H-89, inhibidor de la PKA. Por otro lado, el tratamiento con H-89 disminuye ligeramente la acumulación de cGMP, en tratamientos cortos y largos (2 y 20 horas) probablemente debido a un efecto inespecífico del H-89 sobre la sGC al igual que pasa con otros inhibidores de PK.

A pesar de que los donadores de NO son agentes muy útiles en el estudio de los efectos del NO, resulta muy difícil mimetizar con ellos la producción endógena de NO. Así, aunque los niveles de nitritos acumulados en el medio de incubación tras los tratamientos con LPS o con donadores de NO son semejantes, la cinética de formación del NO no es igual en los dos casos, y es posible que tampoco lo sea la vida media del NO formado. Otra diferencia

importante entre la producción endógena de NO y el uso de donadores es la localización de la producción de NO. Debido a la importante relación localización-función, la distribución de proteínas a lo largo de la célula es un proceso muy regulado. Un ejemplo de ello es la triple asociación espacial de el receptor NMDA, NOS y el heterodímero formado por las subunidades α_2/β_1 de la sGC en neuronas, mediante la proteína PSD-95 (Russwurn y col., 2001). Es posible que la formación de NO endógeno tras la inducción de la NOS-2 muestre también una localización concreta. Por el contrario, el NO liberado a partir de donadores puede distribuirse por toda la célula. La suma de estos factores podrían ser la responsable de la diferente capacidad inhibitoria del NO exógeno y del NO formado tras el tratamiento con NO. De cualquier manera, estos resultados junto con el conjunto de los datos existentes sobre regulación de NO en astrocitos muestran que estas células poseen mecanismos alternativos que les permiten controlar eficientemente la producción de cGMP en situaciones en las que el NO está presente en altas cantidades, y estos mecanismos pueden ser mediados o no por el NO. La activación de la sGC por NO formado transitoriamente, durante periodos cortos, se regula eficazmente por su propio activador, el NO. Esta inhibición parece producirse por la nitrosación directa de la sGC y es reversible, de forma que el enzima recupera su capacidad funcional una vez el estímulo desaparece. Sin embargo, cuando las células se ven expuestas a NO durante periodos prolongados (situaciones de inflamación, isquemia-hipoxia,...) la formación de cGMP se reduce de forma más duradera, mediante la disminución de la cantidad de proteína sGC. Esta disminución requiere los procesos de transcripción y traducción, lo que significa que es necesaria la síntesis de una nueva proteína para que la inhibición se produzca. Cuando este mecanismo de inhibición es producido por LPS o agentes proinflamatorios, el NO formado endógenamente no está implicado en el efecto (Baltrons y García, 1999). Sin embargo, en ausencia de estos agentes, el NO proveniente de fuentes exógenas (donadores de NO) es capaz de inhibir la actividad sGC mediante un mecanismo de características similares, que además implica (al menos parcialmente) la actividad PKA. Un tercer mecanismo de regulación negativa de la sGC es la disminución de los niveles de mRNA de sus subunidades por NO. Este mecanismo se desencadena en las primeras 20 horas de exposición a este agente pero, debido a la larga vida media de la sGC, los efectos de esta disminución sobre la capacidad de formar cGMP en la célula aparecerían a mayor plazo, y se sumarían a los efectos producidos por los mecanismos anteriormente citados. La regulación de los niveles de mRNA de las

subunidades de la sGC también aparecen durante los tratamientos con LPS y citoquinas proinflamatorias, y en este caso el NO formado endógenamente sí es mediador del efecto (Pedraza y col., enviado). El NO también parece tener un papel regulador en neuronas, pero la mayor sensibilidad de estas células a los efectos citotóxicos del NO dificulta su estudio.

- CONCLUSIONES -

- En cultivos primarios establecidos a partir de cerebelo de rata de 7 días de edad en condiciones que favorecen el enriquecimiento en astrocitos, las células predominantes durante los primeros días del cultivo son neuronas que se disponen en agregados en asociación con células astrogiales de morfología propia de glia radial. Al cabo de 7 días las neuronas prácticamente han desaparecido, mientras que la astroglia ha proliferado y su morfología parece más variada. A los 14 días, edad a la que los cultivos suelen ser usados en muchos estudios, los astrocitos forman una monocapa confluyente de células poligonales que constituyen un 75% de las células presentes, siendo el resto mayoritariamente microglía.
- A lo largo del desarrollo del cultivo, la formación de cGMP en respuesta a NO detectada mediante inmunofluorescencia colocaliza con la proteína ácida fibrilar glial, lo cual indica que las únicas células que expresan sGC en los cultivos son los astrocitos.
- La capacidad astrogial de acumular cGMP en respuesta a NO varía a lo largo del desarrollo del cultivo. Los astrocitos presentes en cultivos no confluentes (3 y 7 días), forman mayor cantidad de cGMP/célula que los astrocitos de cultivos confluentes (14 días).
- La mayor capacidad de acumular cGMP de los astrocitos de cultivos no confluentes no parece ser debida a la expresión de mayor reactividad, ni al mayor grado de diferenciación de estas células. Sin embargo, si parece existir una relación entre la capacidad de formar cGMP y la tasa de proliferación astrogial, lo cual está de acuerdo con la implicación del cGMP en la regulación del ciclo celular.
- La exposición continuada a donadores de NO de astrocitos o de neuronas granulares de cerebelo en cultivo primario disminuye la capacidad de las células de formar cGMP en respuesta NO de forma dependiente del tiempo y de la concentración del donador.

- En astrocitos expuestos a donadores de NO durante periodos menores a 2 horas, la disminución de la acumulación de cGMP revierte espontáneamente durante las siguientes 24 horas. El efecto 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.
- Cuando los astrocitos son expuestos a donadores de NO durante tiempos más prolongados (20 horas), la pérdida de actividad sGC va acompañada de la reducción de la cantidad de proteína enzimática (subunidad β_1). Este efecto parece deberse a una disminución de la vida media del enzima y requiere transcripción y síntesis de proteínas. El tratamiento con los donadores también produce una disminución de los niveles de mRNA de las subunidades α_1 y β_1 .
- El hecho de que el NO formado endógenamente en los astrocitos tras la exposición a LPS no esté implicado en la disminución de la sGC inducida por este agente inflamatorio, no se debe a un aumento en los niveles de GSH intracelular. Además, los niveles de GSH son similares en células tratadas durante 20 horas con LPS o con donador de NO.
- 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 GSH.
- El tratamiento de las neuronas granulares con el principal activador de la NOS-1, el NMDA (100 μ M; 10–60 min), disminuye la capacidad de las células de formar cGMP en respuesta a NO. El NO endógenamente formado es parcialmente responsable de esta inhibición.

'All right,' said Deep Thought. 'The Answer to the Great Question . . .'

'Yes . . .!'

'Of life, the Universe and Everything . . .' said Deep Thought.

'Yes . . .!'

'Is . . .' said Deep Thought, and paused.

'Yes . . .!'

'Is . . .'

'Yes . . .!!! . . .?'

'Forty-two,' said Deep Thought, with infinite majesty and calm.

Douglas Adams
(The Hitch Hiker's Guide to the Galaxy)

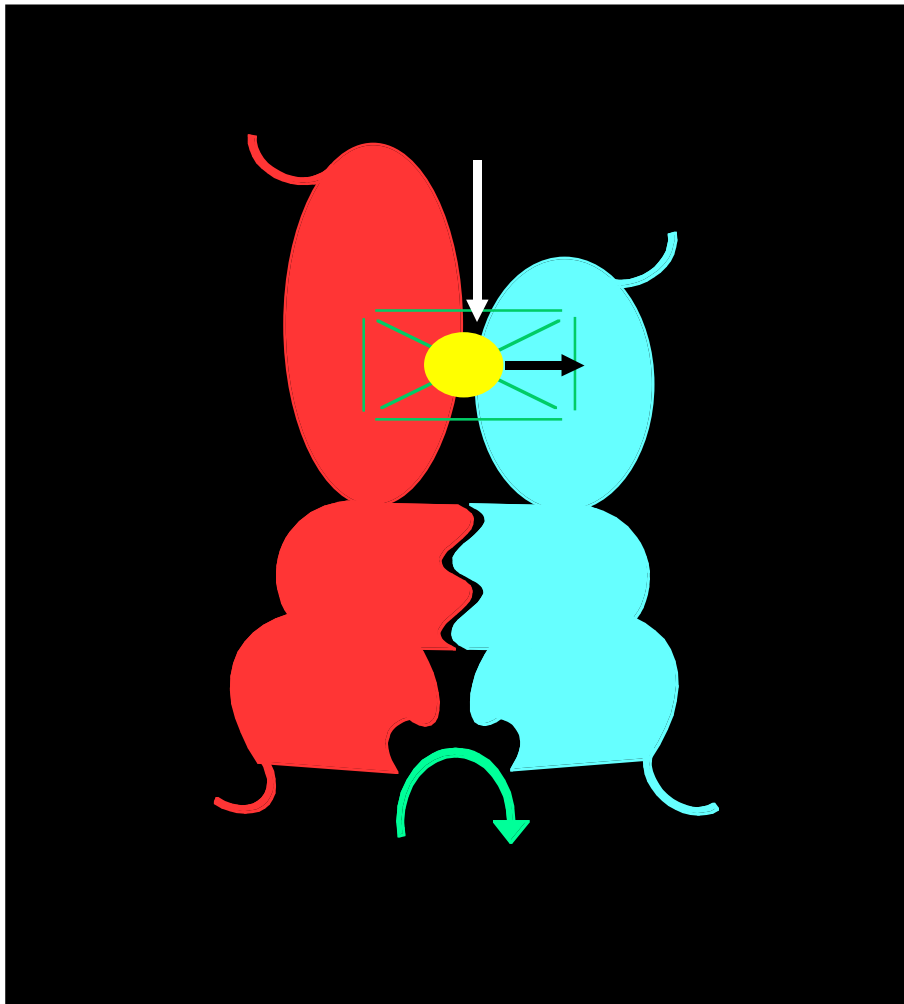
a Patrick y a mis padres

**Regulación de la formación de GMP
cíclico dependiente de NO en cultivos
primarios de células cerebelares 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 Sanchez

Institut de Biotecnologia i Biomedicina
"Vicent Villar i Palasí"
Abril, 2002

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



**Teresa Sardón Urtiaga
Abril, 2002**

Gracias a Tina por supervisar este trabajo, y gracias a mis compañeros de laboratorio (Marian, Anabel, Michele, Giulia y Carlos) por su simpatía. El trabajo ha sido mucho más ameno en su compañía.

Gracias a mis padres y a mis hermanas, por su apoyo incondicional y por la confianza que siempre depositan en mí. Gracias también a “mi familia catalana” por cuidarme y hacerme sentir como en casa.

Gracias a los compañeros y amigos del IBB. Esta tesis no habría sido la misma sin ellos. Gracias Paqui, Xavis, Andreu, Eduard, Esther, Betto Ninti, Pep, Gabi, Aura, Juan, Silvias, Mar, Anas, ... (y no están todos los que son).

Gracias a Xouse y Esther, Baldo, Betto, Teresa y Joan Marc por su constante buen humor.

Gracias a Eva por ser un ejemplo de constancia.

Gracias a Ana Kosoy por adelantarse siempre que necesitaba un apoyo.

Muchas gracias a Nati y a Carlos por su enorme amistad. Gracias también por haber sido mi ayuda en la distancia.

Gracias a Rob y a David, por su amistad, apoyo logístico y lectura crítica de esta tesis.

Las gracias más especiales son para Patrick, sin el que esta tesis no habría existido. Gracias por su apoyo y su paciencia (que ha demostrado ser infinita). Gracias por cuidarme tanto.

Gracias también a la Marató, la DGES y SGR por hacer esta tesis económicamente posible.