

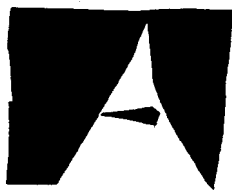
Universitat Autònoma de Barcelona
Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Regulación de la formación de GMP cíclico
dependiente de óxido nítrico por agentes
inflamatorios en células nerviosas**

**Memoria presentada por Carlos E. Pedraza Lentino para obtener el
grado de Doctor en Bioquímica**

**Trabajo realizado bajo la dirección de la Dra. Agustina García, Catedrática
del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en el Instituto de
Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autònoma de Barcelona**

Bellaterra, Abril de 2003



Universitat Autònoma de Barcelona
Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Regulación de la formación de GMP cíclico
dependiente de óxido nítrico por agentes
inflamatorios en células nerviosas**

Carlos E. Pedraza Lentino

Bellaterra, Abril de 2003

ABREVIATURAS

ACT-D, actinomicina-D

BSA, albúmina bovina

cAMP, adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico

cGMP, guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico

CHX, cicloheximida

Cit-Ara, arabinósido de citocina

DEX, dexametasona

DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbeco

DTT, ditionitrito

EA, Enfermedad de Alzheimer

EDTA, ácido etilendiamino tetracético

EGTA, ácido etilenbis(oxietileno nitrilo) tetracético

EM, esclerosis múltiple

GAPDH, gliceraldehido-fosfato-deshidrogenasa

IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina

IL-1 β , Interleucina-1beta

IL-1ra, antagonista del receptor de la IL-1

INF- γ , Interferón-gamma

L-NMMA, N-monometil-L-arginina

LPS, lipopolisacárido bacteriano

MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos

NMDA, N-metil-D-aspartato

NO, óxido nítrico

NOS, óxido nítrico sintasa

PDE, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos

Péptido A β , péptido beta-amiloide

pGC, guanilil ciclasa particulada

PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc

PKG, proteína quinasa dependiente de GMPc

RIA, radioinmunoensayo

SDS, sodio duodecil sulfato

SFB, suero fetal bovino

sGC, guanilil ciclasa soluble

SNC, sistema nervioso central

SNP, nitroprusiato sódico

TNF- α , factor de necrosis tumoral-alfa

VIH, virus de la inmunodeficiencia humana

I. INTRODUCCIÓN

1. Células gliales e inflamación en el SNC	1
2. El óxido nítrico como mensajero biológico	2
2.1. Biosíntesis de NO	4
2.2. El NO en el sistema nervioso central	5
3. Síntesis de cGMP	6
3.1. Guanilil ciclasas	6
3.2. Expresión de la sGC en el SNC	8
3.3. Regulación de la actividad y la expresión de la sGC	9
4. Degradación del cGMP. Fosfodiesterasas	11
5. Salida de cGMP al medio extracelular	12

II. OBJETIVOS 14

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL	15
1.1. Animales	15
1.2. Reactivos	15
2. MÉTODOS	16
2.1. Cultivos primarios de cerebro de rata	16
2.1.1. Cultivos primarios enriquecidos en astrocitos	16
2.1.2. Cultivos primarios enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo	17
2.2. Experimentos <i>ex vivo</i>	18
2.2.1. Animales	18
2.2.2. Inyecciones intracraneales	18
2.2.3. Obtención del tejido y procesamiento de las muestras	18
2.3. Medida de la formación de cGMP	19
2.3.1. Material utilizado	19
2.3.2. Estimulación de las células	20
2.3.3. Radioinmunoensayo	20

2.3.4. Análisis de resultados	21
2.4. Medida de la actividad sGC y PDE	21
2.4.1. Preparación de las fracciones citosólicas de astrocitos de cerebelo destinados a la medida de la actividad sGC y PDE	21
2.4.2. Medida de la actividad sGC	22
2.4.3. Medida de la actividad PDE	22
2.5. Determinación de los niveles de la subunidad beta de la sGC por western blot	23
2.5.1. Preparación de extractos celulares	23
2.5.2. <i>Western blot</i>	23
2.6. Determinación de la variación de niveles de mRNA de las subunidades α_1 , α_2 y β_1 de la sGC por RT-PCR	25
2.6.1. Extracción de RNA	25
2.6.2. RT-PCR	25
2.7. Otros métodos	27
2.7.1. Determinación de la concentración de nitritos	27
2.7.2. Determinación de la concentración de proteínas	27
2.8. Análisis estadístico	28

IV. RESULTADOS

1. Efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO en astrogía	29
1.1. Efecto de la IL-1 β , el TNF- α y el INF- γ sobre la acumulación intracelular de cGMP	29
1.2. Efecto de la IL-1 β sobre la salida del cGMP al medio extracelular	34
1.2.1. Acumulación extracelular del cGMP formado en células tratadas con IL-1 β	34
1.2.2. Estimulación por IL- β de la salida del cGMP formado en células tratadas con LPS o estimuladas con un donador de NO. Implicación de un transportador.	38

2. Mecanismo del efecto inhibitorio de la IL-1β sobre la acumulación intracelular de cGMP dependiente de NO en astrogía cerebelar	41
2.1. Efecto de la IL-1β sobre los enzimas responsables del metabolismo del cGMP	41
3. Mecanismo de la disminución de la actividad sGC inducida por IL-1β	43
4. Efecto de distintos agentes neuroinflamatorios sobre los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC	48
4.1. Efecto de la IL-1β y del LPS	48
4.1.2. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en astrogía en cultivo. Dependencia del NO	48
4.1.3. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en cerebro de rata adulta	50
4.2. Efecto del péptido β-amiloide (1-40)	52
4.2.1. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en astrogía en cultivo	52
4.2.2. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en cerebro de rata adulta	53
V. DISCUSIÓN	55
VI. CONCLUSIONES	66
VII. BIBLIOGRAFÍA	68

I. INTRODUCCIÓN

1. Células gliales e inflamación en el SNC

La inflamación es una respuesta inmediata y localizada, causada por infecciones o traumatismos, que se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos en el área afectada. La respuesta inflamatoria incluye vasodilatación local, aumento de la permeabilidad de los capilares, infiltración de células del sistema inmunitario y activación de mecanismos moleculares dirigidos a eliminar el agente infeccioso o las células dañadas.

El sistema nervioso central (SNC) ha sido considerado un sistema inmunológicamente privilegiado ya que el aislamiento que le proporciona la barrera hematoencefálica le protege de la invasión de agentes inflamatorios y de la respuesta desencadenada por los mismos. Sin embargo, el SNC se ve afectado por procesos inflamatorios en respuesta a infecciones bacterianas, como consecuencia del daño tisular causado por traumatismos y en los procesos relacionados con la patogénesis de trastornos neurológicos degenerativos como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (EA), la esclerosis múltiple (EM) o la demencia asociada a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (revisiones en Minagar y col, 2002; Wyss-Coray y Mucke, 2002).

Para contrarrestar las acciones de los agentes inflamatorios o de las situaciones inductoras de inflamación, las células del SNC poseen sus propios mecanismos de protección. La microglía y la astrogλία son las células del SNC que participan más activamente en los procesos neuroinflamatorios y su activación constituye una de las características más notables de la respuesta inflamatoria en el tejido nervioso (revisión en Piehl y Lidman, 2001). La activación glial incluye cambios morfológicos, como la transformación de la microglía ramificada quiescente en células ameboides o la condensación de filamentos en la astrogλία, y moleculares, como el aumento de la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar de glía) en astrocitos y de diferentes proteínas inmunoreguladoras (citocinas y quemocinas) y mediadores de inflamación (especies reactivas de oxígeno y NO) en los dos tipos celulares (revisiones en Dong y Benveniste, 2001; Aloisi, 2001).

La reactividad glial y expresión aumentada de citocinas proinflamatorias son características comunes del proceso inflamatorio asociado a las patologías neurodegenerativas (revisión en Rothwell y col., 1996). Las citocinas son

proteínas de bajo peso molecular (entre 8 y 26 KDa) que se sintetizan en casi todos los tipos celulares (revisión en Benveniste, 1998). Se identificaron primero en células linfoides leucocitarias y se han clasificado en proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , INF- γ , IL-6, etc) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-12, etc). En el SNC se ha detectado IL-1 β y TNF- α en el cerebro adulto de animales de experimentación y en tejido post-mortem de humanos sanos (revisión en Vitkovic y col., 2000) y se ha descrito su participación en procesos fisiológicos como la regulación del sueño (Krueger y col., 1998) y del apetito (Plata-Salaman., 2001). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la neurobiología de estas citocinas se centran en su participación en procesos patológicos en los que junto a las células del sistema inmunitario infiltradas, la microglía y los astrocitos son los principales productores de estos mediadores de inflamación. Este hecho ha sido comprobado por inmunohistoquímica en muestras post-mortem de tejido cerebral de pacientes de enfermedades neurodegenerativas como las ya mencionadas (Sheng y col., 1996; Hermans y col., 1997) y en modelos animales que reproducen características de enfermedades del SNC. También en cultivos celulares de astrogliía y microglía de roedores y humanos se ha demostrado liberación de citocinas en respuesta a estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Chung y Benveniste, 1990), los péptidos β -amiloides (Hu y col., 1998) o las propias citocinas IL-1 β , TNF- α y combinaciones de las mismas con INF- γ (revisión en Benveniste, 1997).

2. El óxido nítrico como mensajero biológico

El óxido nítrico (NO) fue considerado hasta hace pocos años un gas tóxico sin aplicaciones terapéuticas conocidas y se pensaba que su biosíntesis se limitaba a bacterias nitrificantes y desnitrificantes. Sin embargo, el descubrimiento del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y su identificación como NO demostró que las células de mamífero son capaces de sintetizarlo y evidenció la participación del mismo en importantes procesos fisiológicos (Ignarro y col., 1987; Palmer y col., 1987).

El NO es una molécula no cargada, que posee un electrón desapareado y que presenta un carácter altamente hidrofóbico. Debido a su condición de radical libre el NO reacciona rápidamente con otras moléculas. Así por ejemplo,

reacciona con el oxígeno formando NO_2 , en una reacción que implica dos moléculas de NO y una de O_2 . Esta reacción es lenta aumentando su velocidad a concentraciones altas de NO y se produce a través de intermediarios como el N_2O_3 , formándose nitrito como producto. Otra reacción del NO fisiológicamente importante es la que ocurre con el anión superóxido dando lugar a la formación de peroxinitrito (OONO). Este compuesto y su forma protonada, el ácido peroxinitroso, son moléculas muy reactivas y capaces de oxidar irreversiblemente prácticamente todas las biomoléculas (revisiones en Stamler y col., 1992; Försterman, 1994).

La interacción del NO con grupos tiol puede tener varias funciones fisiológicas en las células induciendo la S-nitrosilación de numerosas proteínas. Por un lado, puede provocar la oxidación de tioles críticos para el funcionamiento de la proteína causando su inhibición, como ocurre con el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Lipton, 1998) y con la adenilil ciclasa (AC), o su activación, como en el caso de la proteína quinasa C (PKC) (revisión en Lander y col., 1996). Por otro, puede suponer un mecanismo que permita secuestrar NO producido en exceso y así evitar sus efectos neurotóxicos, como se ha descrito en el caso de la unión del NO a la proteína rica en grupos tiol metalotioneína (Montoliu y col., 2000).

Se sabe que el NO reacciona rápidamente con metales de transición. De esta manera, se une a los centros ferrosulfurados de diversos enzimas inhibiendo su actividad, así como al Fe^{2+} del grupo hemo, lo que hace que las hemoproteínas sean potenciales dianas moleculares del NO. Se ha descrito, que el NO se une con alta afinidad a los grupos hemo de la mioglobina y hemoglobina impidiendo la unión del O_2 (revisión en Patel, 2000). También la hemoproteína cicloxigenasa (COX), que cataliza el paso limitante de la síntesis de prostaglandinas, tromboxano A2 y prostaciclina a partir de ácido araquidónico, es inhibida por NO a altas concentraciones pero activada a bajas concentraciones (Wu, 1995). Sin embargo, la interacción fisiológica más importante del NO es su unión al Fe^{2+} del grupo hemo de la guanilil ciclasa soluble produciendo la activación del enzima que cataliza la formación de GMP cíclico (cGMP) a partir de GTP. Este nucleótido cíclico ha sido implicado en muchas de las acciones fisiológicas del NO, tanto en tejidos periféricos como el vascular, donde media la vasodilatación o la inhibición de la agregación plaquetaria (revisión en Ignarro y col, 1998), como en el SNC, donde modula

procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria, procesamiento sensorial y visual, desarrollo cerebral, secreción neuroendocrina y regulación del flujo sanguíneo cerebral.

2.1. Biosíntesis del NO

El NO es sintetizado por las óxido nítrico sintasas (NOS) (EC 1.14.13.39), enzimas que utilizan O₂ y NADPH como cosustratos y oxidan el grupo guanidino de la L-arginina generando L-citrulina como coproducto (Moncada y col., 1991). La reacción oxidativa implica 5 electrones y ésta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre. Se han descrito tres isoformas de NOS, productos de genes distintos, que se pueden distinguir por la dependencia de calcio (NOS-1 y NOS-3) y por la inducibilidad (NOS-2) (Schmidt y col., 1992; Förstermann y col., 1994). La NOS-1 o nNOS y la NOS-3 o eNOS son enzimas constitutivas que fueron originalmente identificadas en neuronas y células endoteliales, respectivamente (Bredt y Snyder, 1990). Posteriormente, se identificó la NOS-2 o NOS inducible (iNOS), clonada originalmente a partir de macrófagos (revisiones en Förstermann y Kleinert, 1995; Alderton y col., 2001). La NOS-1 se ha localizado, además de en células nerviosas, en epitelio pulmonar, en células beta del páncreas, en la mácula densa del riñón y en músculo esquelético (Schmidt y col., 1992), mientras la NOS-3 se expresa también en determinadas poblaciones neuronales (Dinerman y col., 1994). La NOS-2 puede expresarse en muy diversos tipos celulares como condrocitos (Charles y col., 1993), hepatocitos (Geller y col., 1993), células gliales (Murphy y col., 1993) y neuronas (Minc-Golomb y col., 1996). Las actividades NOS-1 y NOS-3 son estimuladas como consecuencia del aumento de la concentración intracelular de calcio y generan niveles moderados de NO (picomoles) que modulan procesos rápidos como la neurotransmisión y la dilatación de los vasos sanguíneos. La NOS-2, que se induce a nivel transcripcional, genera altas cantidades de NO (nanomoles) por largos periodos de tiempo que pueden tener efectos citotóxicos (Nathan, 1997).

2.2. El NO en el sistema nervioso central

La amplia distribución de las isoformas de NOS en el cerebro indica que el NO es un importante mensajero biológico en multitud de procesos en el sistema nervioso central (SNC). Se ha detectado NOS-1 en poblaciones neuronales concretas de cerebelo, bulbo olfatorio accesorio, giro dentado del hipocampo, bulbo olfatorio principal, colículos superiores e inferiores, núcleo supraóptico, corteza cerebral y caudado putamen (Bredt y col., 1991). También ha sido localizada en astrocitos de hipocampo y cerebelo (Kugler y Drenkhahn, 1996). La NOS-3 se expresa en neuronas del hipocampo y de la capa granular interna del bulbo olfatorio (Dinermann y col., 1994), y en astrocitos corticales (Wiencken y Casagrande, 1999). La microglía y los oligodendrocitos no parecen expresar actividad NOS constitutiva (Keilhoff y col., 1998).

En cuanto a la NOS-2, se ha detectado su inducción en microglía y/o astrogliá en animales con infecciones víricas crónicas o agudas (Sun y col., 1995; Grzybivki y col., 1997), en modelos animales de EM (encefalitis alérgica experimental, EAE) (Okuda y col., 1997), de isquemia cerebral (Endoh y col., 1994; Loihl y col., 1999), de EA (Lüth y col., 2001) o tras la inducción de lesiones cerebrales (Grzybivki y col., 1998). En humanos se ha detectado NOS-2 en astrogliá reactiva de cerebros de pacientes de EM (Bö y col., 1994), EA (Wallace y col., 1997), enfermedad de Parkinson (Hunot y col., 1996) y de Krabbe (Giri y col., 2002) y en el nervio óptico de pacientes de glaucoma (Liu y Neufeld, 2000). También existe evidencia de la expresión de NOS-2 en neuronas inmunoestimuladas de roedores y humanos (revisión en Heneha y Feisntein, 2001). Sin embargo, en oligodendrocitos la expresión de NOS-2 ha sido demostrada únicamente en células de roedores en cultivo (Merrill y col., 1997; Molina-Holgado y col., 2001)

Estudios de células en cultivo demuestran que en astrocitos y microglía de roedores, se induce NOS-2 en respuesta a LPS o combinación de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e INF- γ (Hewett y col., 1993; Simmons y Murphy, 1993), mientras que en astrocitos humanos se produce en respuesta a IL-1 β en combinación con TNF- α e INF- γ , pero no a LPS sólo o en combinación con citocinas (Hu y col., 1995; Zhao y col., 1998). Hay datos sobre la inducción de NOS-2 en microglía humana en respuesta a combinaciones de citocinas

(Colasanti y col., 1995; Ding y col., 1997) aunque otros autores niegan su expresión en estas células (Liu y col., 1996).

3. Síntesis de cGMP

3.1. Guanilil ciclasas

El cGMP es producido por una familia de guanilil ciclasas (GC; pirofosfato-liasa ciclasa; EC 4.6.1.2) que catalizan su formación a partir de GTP. Se ha identificado actividad GC en la fracción soluble y particulada de la mayoría de las células y se ha demostrado que esas actividades corresponden a dos enzimas diferentes: la GC de membrana o particulada (pGC) y la GC citosólica o soluble (sGC).

Las pGC son enzimas cuya actividad es regulada por péptidos específicos, poseen un dominio extracelular de unión al ligando (extremo N-terminal), un dominio transmembrana y un dominio intracelular con alta homología con dominios tirosina quinasa, además del dominio ciclasa (revisiones en Garbes, 1999; Lucas y col., 2000). Las pGC que se expresan en el SNC pertenecen a la familia de receptores de péptidos natriuréticos. Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se ha detectado acumulación de cGMP en respuesta al péptido natriurético atrial (ANP) en astrocitos de regiones concretas del cerebro de rata adulta y en pocas estructuras neuronales (De Vente y Steinbusch, 1992), pero no en oligodendrocitos, ni en células microgliales (Tanaka y col., 1997)

La sGC es un enzima formado por subunidades alfa (α) y beta (β) que contiene ferroprotoporfirina IX como grupo prostético, el cual constituye el sitio de unión del NO. Todas las subunidades de la sGC tienen un dominio catalítico ciclasa en el extremo C-terminal, homólogo al dominio catalítico de las pGC y las adenilil ciclasas (AC), un dominio central relacionado con la dimerización y un dominio N-terminal implicado en la unión al grupo hemo.

Se conocen dos isoformas de cada subunidad de la sGC, α 1, α 2, β 1 y β 2 cada una de ellas codificadas por un gen diferente (Koesling y col., 1991; Koesling y Friebe, 1999). Las subunidades α 1 y β 1 se purificaron como

heterodímero a partir de pulmón bovino y de rata obteniéndose proteínas $\alpha 1$ de 82 KDa (rata) y 73 KDa (bovina) y $\beta 1$ de 70 KDa (Koesling y col., 1988, 1990; Nakane y col., 1988, 1990). Las isoformas $\alpha 2$ (82 KDa) y $\beta 2$ (76 KDa) 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 diferentes tejidos de rata (revisión en Koesling, 1999). Los heterodímeros $\alpha 1/\beta 1$ y $\alpha 2/\beta 1$ han sido detectados a nivel de proteína y presentan una actividad enzimática similar (revisiones en Denninger y Marletta, 1999; Russwurm y Koesling, 2002). La subunidad $\beta 2$ presenta actividad catalítica en respuesta a NO en ausencia de otras subunidades (Koglin y col., 2001), aunque también se ha demostrado, mediante el uso de sistemas de expresión, que puede formar dímeros catalíticamente activos con la $\alpha 1$ pero menos sensibles a NO que la combinación $\alpha 1/\beta 1$ (Gupta y col., 1997).

El heterodímero $\alpha 1/\beta 1$ es la forma mayoritaria de la sGC en múltiples tejidos, pero estudios recientes demuestran una elevada localización del heterodímero $\alpha 2/\beta 1$ en pulmón y en cerebro de ratón (Mergia y col., 2003). En los heterodímeros que contienen la subunidad $\beta 1$, el grupo hemo se une a la enzima mediante un enlace de coordinación entre el Fe^{2+} y un nitrógeno imidazólico de la histidina 105 de esa subunidad (Foerster y col., 1996; Koesling y Friebe, 1999).

Se han postulado dos hipótesis diferentes para explicar el mecanismo de activación de la sGC por unión del NO a su grupo hemo. La primera propone que el NO se une a la sexta posición de coordinación del Fe^{2+} del grupo hemo provocando la ruptura del enlace entre el Fe^{2+} y la histidina 105. Aunque no está del todo claro, parece que la activación se debe a que el cambio conformacional inducido por el desplazamiento de la histidina axial expone la región catalítica al GTP citosólico (revisiones en Koesling, 1999; Denninger y Marletta, 1999). La segunda hipótesis, propuesta recientemente por Lawson y col. (2000), sugiere que el NO se une al hemo por el lado proximal, rompiendo el enlace Fe^{2+} -histidina y ocupando el NO la quinta posición de coordinación. En el caso de la activación de la sGC por CO, el cual puede unirse también al grupo hemo del enzima activándolo, parece que éste no rompe el enlace con la histidina 105 produciendo un efecto poco significativo sobre la actividad catalítica del enzima,

a pesar de que la afinidad del CO por el grupo hemo de la sGC parece ser muy alta (Deinum y col., 1996).

3.2. Expresión de la sGC en el SNC

Mediante hibridación *in situ*, se ha demostrado tanto en cerebro de ratas adultas (Matsuoka y col., 1992; Furuyama, 1993), como recién nacidas (Gibb y Garthwaite, 2001), una amplia expresión del mRNA de la subunidad $\beta 1$, mientras que la localización de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es mas limitada y no se ha detectado la presencia de la subunidad $\beta 2$. Los primeros estudios inmunohistoquímicos, realizados con anticuerpos monoclonales frente a la sGC purificada de cerebro de rata, demostraron inmunoreactividad en neuronas y astrocitos (Ariano y col., 1982; Nakane y col., 1983). De acuerdo con esto, en cortes histológicos de diferentes regiones del cerebro de rata estimulados con donadores de NO también se ha detectado inmunoreactividad frente a cGMP en neuronas y en astrocitos (revisión en De Vente y Steinbusch, 2000). Sin embargo, en oligodendrocitos se ha detectado inmunoreactividad frente a cGMP en cerebros de ratas recién nacidas, pero no de rata adulta, y parece que las células microgliales no acumulan cGMP en respuesta a NO (Tanaka y col., 1997). También se ha detectado la formación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios de astrocitos de diferentes regiones cerebrales de rata, pero no en microglía (Agulló et al., 1995).

En humanos se ha demostrado mediante *northern blot* la expresión de mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ en diferentes regiones de cerebro fetal y adulto. En este ultimo la expresión de $\beta 1$ es mayor que la de $\alpha 1$ en todas las regiones estudiadas. También se ha detectado por la misma técnica, expresión de la subunidad $\alpha 2$ en cerebro humano con una distribución diferente a la $\alpha 1$ (Budworth et al., 1999; Zabel et al., 1998). Por otro lado, se ha demostrado acumulación de cGMP en cultivos primarios de astrocitos de cortex fetal humano tras la inducción de NOS-2 (Ding y col., 1997) y en respuesta a donadores de NO (García y Baltrons, en prensa).

3.3. Regulación de la actividad y la expresión de la sGC

La sGC requiere cationes divalentes como cofactores para alcanzar la máxima activación. 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) (revisión en Waldman y Murad, 1987). Por el contrario el Ca^{2+} inhibe la actividad sGC, al parecer, mediante la interacción con la región catalítica del enzima que disminuye su afinidad por el sustrato (Parkinson y col., 1999; Serfass y col., 2001).

En estudios con la proteína sGC purificada se ha descrito un aumento de su actividad enzimática por fosforilación por PKC y por proteína quinasa A (PKA) (Zwiler y col., 1981, 1985). Igualmente, en células cromafines bovinas se ha demostrado una relación entre el grado de fosforilación de la subunidad $\beta 1$ y la actividad sGC y se ha descrito, que la activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) produce indirectamente la desfosforilación y consecuente inhibición de la sGC (Ferrero y col., 2000).

Estudios en diferentes tipos celulares demuestran que la exposición continuada a donadores de NO produce la inhibición de la sGC (Ujie y col., 1994; Papapetropoulos y col., 1996a; Davis y col., 1997). En células de músculo liso vascular esta inhibición se ha relacionado con el fenómeno de la tolerancia a los nitrovasodilatadores. Papapetropoulos y col. (1996a) observaron una disminución de la acumulación de cGMP en respuesta a nitroprusiato sódico (SNP) en células de músculo liso de aorta de rata que era prevenida inicialmente por agentes reductores con grupos tiol y que posteriormente implicaba una disminución de la sGC producida por un mecanismo sensible a cGMP y PKA. Los mismos autores habían demostrado previamente que agentes que causan un aumento en la concentración intracelular de cAMP son capaces de disminuir la expresión de la sGC mediante un mecanismo que implica la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Papapetropoulos y col., 1995). Estudios posteriores llevados a cabo también en células de músculo liso de vasos sanguíneos han demostrado que la disminución de la proteína y del mRNA de la sGC causada por exposiciones prolongadas a donadores de NO es dependiente de transcripción y síntesis de proteínas (Filippov y col., 1997). Por otro lado, en células cromafines bovinas, el mismo efecto está parcialmente mediado por la proteína quinasa G (PKG) (Ferrero y col., 2002).

En células cerebelares de rata en suspensión, se ha demostrado que el fenómeno de la desensibilización de la sGC por NO es rápido, ocurre tras escasos segundos de poner en contacto el sistema celular con la fuente de NO y la recuperación se produce algo más lentamente requiriendo varios minutos (Bellamy y col., 2000). En nuestro laboratorio también se ha observado una rápida disminución de la formación de cGMP dependiente de NO en astrocitos cerebelares en cultivo pre-expuestos a donadores de NO (Sardón y col., en preparación). A tiempos de exposición inferiores a 2 horas, la desensibilización de la sGC es revertida por agentes reductores con grupos tiol, pero después de 18-20 horas se produce una inhibición irreversible de la sGC que va acompañada de una ligera disminución de los niveles de la subunidad $\beta 1$ y una disminución más evidente del mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC.

En células de músculo liso vascular, agentes capaces de aumentar los niveles endógenos de NO, como el LPS o citocinas proinflamatorias también producen una disminución de los niveles de proteína y de mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC que es dependiente de NO (Tsuchida y col., 1994; Papapetropoulos y col., 1996b; Takata y col., 2001). Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el tratamiento de astrocitos de rata con LPS o con péptidos β -amiloides ($A\beta$) produce una disminución de la actividad sGC que va acompañada de una disminución de la subunidad $\beta 1$ y es independiente de NO (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., 2002). Una disminución de los niveles de sGC ha sido demostrada también en células de feocromocitoma de rata PC12 expuestas al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Liu y col., 1997) y en neuronas de ratas expuestas a aluminio (Llansola y col., 1999) o hiperamonemia (Miñana y col., 1999). En humanos existen pocos datos sobre regulación de sGC en células nerviosas. Se ha descrito la disminución de la actividad sGC en el lóbulo temporal de pacientes de Alzheimer (Bonkale et al. 1995) y alteraciones en la expresión de las subunidades de la sGC en tejido cerebral de pacientes con insuficiencia hepática (Corbalan y col., 2002).

El contenido de cGMP y el grado de estimulación de su síntesis en el cerebro de rata disminuyen durante la maduración y el envejecimiento (De Vente y Steimbusch, 1992). Si bien la localización de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$ en distintas regiones cerebrales, demostrada por hibridación *in situ*, es semejante

en ratas recién nacidas y adultas, en estas últimas es más débil su señal (Matsuoka y col., 1992; Gibb y Garthwaite, 2001). También en humanos se ha demostrado una disminución de la expresión de las subunidades de la sGC dependiente de la edad (Ibarra y col., 2001).

4. Degradación del cGMP. Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) son los enzimas responsables de la hidrólisis del cGMP y el cAMP a sus correspondientes nucleósido 5'-monofosfato (revisión en Beavo, 1995). Las PDEs conocidas hasta la fecha se pueden clasificar en tres grupos: 1: PDEs que hidrolizan tanto cGMP como cAMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11); 2: PDEs que hidrolizan cAMP (PDE4, PDE7 y PDE8) y 3: PDEs específicas de cGMP (PDE5, PDE6 y PDE9A). De este último grupo, la PDE6 es específica de fotoreceptores donde está implicada en procesos de fototransducción y la PDE9 muestra la más alta afinidad por cGMP de las estudiadas hasta ahora (Soderling y col., 1998; Andreeva y col., 2001).

En células gliales y en neuronas de diferentes regiones cerebrales se ha detectado una mayor acumulación de cGMP en respuesta a donadores de NO en presencia de un inhibidor inespecífico de PDEs, indicando la presencia de actividad PDE en esas células (De Vente y Steinbusch, 2000). En estudios de hibridación *in situ* se ha descrito la expresión de PDE9 y PDE5 en células de cerebelo de rata (Andreeva y col., 2001; Kotera y col., 1997). La PDE9 también ha sido detectada en hipocampo y bulbo olfatorio donde presenta una distribución similar a la de la NOS-1 y la sGC (Andreeva y col., 2001). Por otro lado, se ha descrito una importante actividad cGMP-PDE dependiente de calcio-calmodulina (PDE1) en cerebro de rata (Shenolikar y col., 1985), y han sido localizadas diferentes isoformas de esta familia en estructuras neuronales de diversas regiones (Sharma y col., 1984; Kinkaid et al., 1987; Yan et al., 1994; 1996; Furuyama et al., 1994). En estudios previos de nuestro grupo se describió, en cultivos neuronales y de astrocitos obtenidos a partir de cerebelo de rata, la implicación de una PDE dependiente de Ca^{2+} -CaM en la degradación del cGMP (Baltrons y col., 1997) de características bioquímicas y farmacológicas similares, en los dos grupos celulares (Agulló y García, 1997). Otros autores utilizando inhibidores selectivos de PDEs han implicado a la PDE5 y, en menor medida a la

PDE4, pero no a la PDE1 en la hidrólisis de cGMP en células aisladas de cerebelo de rata de una semana de edad (Bellamy y Garthwaite 2001).

5. Salida de cGMP al medio extracelular

Desde hace tiempo se sabe que los nucleótidos cíclicos pueden salir de las células. Se ha detectado cGMP en fluidos como la orina, plasma y fluido cerebroespinal y en el medio extracelular de diferentes tejidos (Heuze-Joubert, 1992, Tjörnhammar y col., 1983; Hamet y col., 1989; Schultz y col., 1998) incluido el cerebro (Kapoor y Krishna, 1977; Tjörnhammar y col., 1986). También se ha detectado cGMP en el medio extracelular de cultivos de diferentes tipos celulares, como hepatocitos tras la inducción de NOS-2 por citocinas proinflamatorias y LPS (Billiar y col., 1992), plaquetas activadas (Wu y col., 1993) y eritrocitos en respuesta a aumentos en la concentración de cAMP (Schultz y col., 1998). En la mayoría de los estudios la salida de cGMP se ha relacionado con la concentración intracelular del nucleótido y se ha interpretado como un mecanismo que junto a la acción de las fosfodiesterasas limitaría el aumento en la concentración intracelular de cGMP. Sin embargo, actualmente existen evidencias en diversos tipos celulares, incluidos los astrocitos, de que la salida del cGMP es sensible a inhibidores de transportadores de aniones orgánicos (Touyz y col., 1997; Schultz y col., 1998). En membranas de eritrocitos se ha caracterizado un sistema de transporte de cGMP que es dependiente de energía (Sunkvist y col., 2002). Este transportador podría ser un miembro de la familia de las *Multidrug Resistance Proteins* (MRPs). En estudios recientes se ha demostrado que el cGMP es un sustrato de alta afinidad de una de las isoformas de esta familia de transportadores de aniones orgánicos, la MPR5 (Jedlitschky y col, 2000).

Estudios en células nerviosas en cultivo indican que el cGMP extracelular puede regular la actividad de proteínas de membrana a través de interacciones con sitios extracelulares. Se ha descrito que en neuronas granulares de cerebelo el cGMP extracelular inhibe respuestas mediadas por receptores de cainato (Pouloupoulou y Novak, 1998) y protege de la toxicidad inducida por glutamato (Montoliu y col., 1999). En astrocitos, el cGMP liberado después de la estimulación de la pGC con péptidos natriuréticos inhibe a un intercambiador de Na^+/H^+ conduciendo a la acidificación del medio intracelular, lo cual podría

afectar funciones astrogiales como la conductancia al K^+ o la proliferación celular (Touyz y col., 1997).

II. OBJETIVOS

Datos previos obtenidos en el laboratorio donde se realizó este trabajo habían demostrado que agentes inflamatorios capaces de inducir la NOS-2 en células gliales, tales como el LPS y los A β , disminuyen la actividad sGC en astrogliía de rata en cultivo. Teniendo en cuenta que estos compuestos son capaces de inducir la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias en células gliales y que muchas de sus acciones son mediadas por dichas citocinas, el primer objetivo de esta tesis fue **estudiar el efecto de citocinas proinflamatorias sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO en cultivos primarios enriquecidos en astrogliía de cerebro de rata.**

Los resultados demostraron que, al igual que el LPS y los A β , la IL-1 β hace disminuir la actividad sGC, así como los niveles de la proteína enzimática, por un mecanismo independiente de NO, pero dependiente de transcripción y de síntesis de proteínas. Dado que en distintos tipos de células, incluidos los astrocitos, la exposición prolongada a donadores de NO es capaz de desensibilizar a la sGC y hacer disminuir el nivel del mRNA de sus subunidades, el segundo objetivo de esta tesis fue **estudiar si estos tres agentes inflamatorios afectaban a los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC en cultivos enriquecidos en astrogliía y en el cerebro del animal adulto.**

Durante el transcurso de la caracterización del efecto de la IL-1 β sobre la formación de cGMP en la astrogliía, se observó que el nucleótido formado tras la inducción de la NOS por la citocina se acumulaba en el medio extracelular y no en el intracelular, por lo que otro objetivo que se planteó fue **estudiar el efecto de la IL-1 β sobre la salida de cGMP .**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Animales

Para los estudios en cultivos se utilizaron ratas albinas recién nacidas o 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. Para los estudios *ex vivo* se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas de 250-300 g de peso criadas en el estabulario de la Universidad de Bonn, Alemania (ver apartado 2.2.1).

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 estreptomicina, 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 (Whatman).

- *Otros Reactivos*: Las citocinas recombinantes de rata IL-1 β , TNF- α e INF- γ fueron suministrados por Pepto Tech; el compuesto U107 por RBI; los compuestos SB202190, U0126, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), trizma maleato, cGMP, N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ditiotreitól (DTT), leupeptina, inhibidor de tripsina, fluoruro de fenilmetilsufonil (PMSF), 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, cicloheximida, cloroformo, isopropanol, Tris-base, Tris-HCl, nitroprusiato sódico

(SNP), albúmina sérica bovina (BSA) y el veneno de serpiente *crotalus atrox* fueron suministrados por Sigma; los compuestos H89, KN-93 y KT5823 por Calbiochem; los compuestos ácido ascórbico, ácido fosfórico y benzamidina, por Merck; el etanol y el metanol, por Scharlau; el acetato sódico por Carlo Erba; [³H]cGMP (33 ó 34.5 Ci/mmol) y [³H]guanosina (7 mCi/mmol) por New England Nuclear; el líquido de centelleo biodegradable BCS por Amersham; los compuestos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), urea, dodecilsulfato sódico (SDS), β-2-mercaptoetanol, glicerol, acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico, nitrito sódico, sacarosa, glucosa, NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂, 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; el Trizol, el enzima Superscript-II, los hexámeros de desoxinucleótidos aleatorios, la mezcla de desoxinucleótidos (dNTP), el enzima taq DNA polimerasa, por Gibco, BRL; el antisuero anti-subunidad β₁ de la sGC, por Cayman o Calbiochem; el antisuero anti-conejo conjugado con peroxidasa por Amersham Life Science; el antisuero anti-cGMP utilizado en el radioinmunoensayo se obtuvo en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Brooker y col. (1979).

2. MÉTODOS

2.1. Cultivos primarios de cerebro de rata

2.1.1. Cultivos primarios enriquecidos en astrocitos

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se prepararon a partir de cerebelo de ratas de siete días de edad o a partir de cortex e hipocampo de ratas recién nacidas 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 D₁: NaCl 137 mM; KCl 5,5 mM; KH₂PO₄ 2,22 mM; Na₂HPO₄ 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 mallas de nylon de 210 y 135 μm de poro en el medio D₁. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 500 g durante 5 min 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 viables 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 $0,6 \times 10^5$ células viables / ml en placas de cultivo de 35 mm (2 ml / placa), 60 mm (5 ml / placa) ó 100 mm de diámetro (10 ml / placa) y se incubaron a 37°C, en atmósfera de 90 % aire-10 % CO₂, con una humedad del 95 %. El medio se cambió a los 7 días y los cultivos fueron utilizados a los 14 días. Estudios previos del laboratorio en cultivos obtenidos por este método, demuestran 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 (Agulló y col., 1995). Para los estudios en los que se disminuyó la contaminación microglial se trataron las células con el citostático arabinósido de citosina (10 µM) a partir del día 10 en cultivo hasta el día de su utilización (día 14). Este tratamiento disminuye la contaminación microglial hasta alrededor de un 2 % del total de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio (Agulló y col., 1995).

2.1.2. Cultivos enriquecidos en neuronas granulares de cerebelo

Los cultivos primarios enriquecidos en neuronas granulares se prepararon a partir de cerebelo de ratas de 7 días (Baltrons y col., 1995). Los cerebelos se disgregaron tal y como se indica en el apartado 2.1. en DMEN-10% SFB y antibióticos. Las células se resuspendieron en DMEM suplementado con KCl 25 mM y 10 % SFB y se sembraron a una concentración de 12×10^5 células viables / ml en placas de cultivo de 35 mm de diámetro (2 ml / placa), 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 (cit-ara) a una concentración final de 10 µM. 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).

2.2. Experimentos ex vivo

2.2.1. Animales

Ratas Sprague Dawley (250-300 g de peso) fueron mantenidas en grupos de 3 en condiciones estandar de estabulación (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y acceso libre a agua y comida). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg / Kg) intraperitonealmente y fijados en un aparato estereotáxico (Stoelting, USA). Con una broca de 0,2 μm de diámetro se practicó un orificio de 0.3 μm de profundidad en el punto de inyección. Los tratamientos se realizaron en el laboratorio del Dr. Michael Heneka en la Universidad de Bonn (Alemania), donde se hacen en rutina, y siguiendo un protocolo aprobado por el comité ético de dicha universidad.

2.2.2. Inyecciones intracraneales

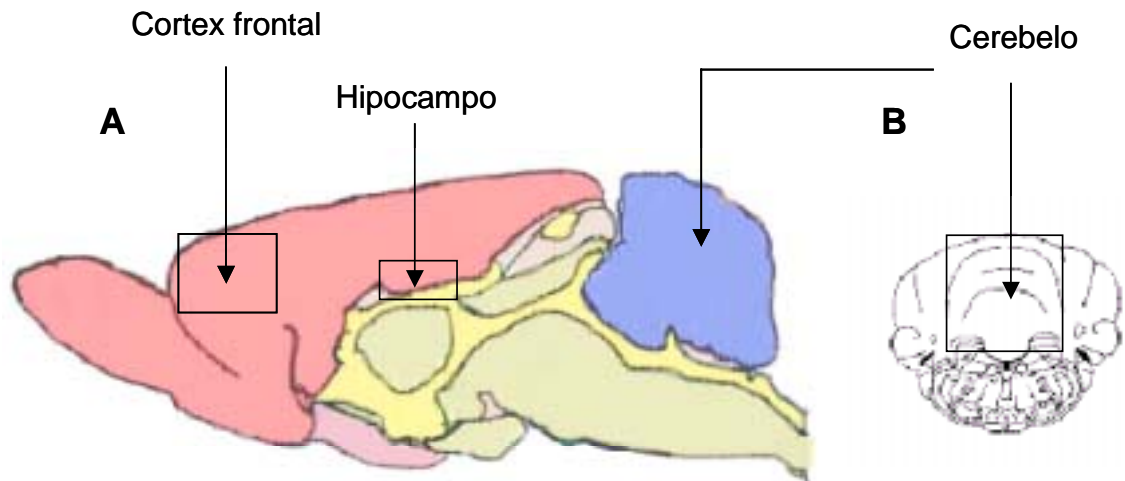
Los agentes inmunoestimulantes (IL-1 β , 5 μg / ml; LPS, 5 mg / ml; péptido β -amiloide 1-40 agregado 0,5 μg / ml) o el vehículo (salino tamponado con fosfato, PBS: NaCl, 155.1 mM; KH₂PO₄, 1.06 mM; Na₂HPO₄, 2.9 mM) fueron inyectados bilateralmente en cortex frontal (+/- 2,5 rostral; +/- 2.5 lateral; y +/- 4.0 ventral), hipocampo (+/- 3.0 anteroposterior; +/- 2.0 lateral; y +/- 5 ventral) y vermis cerebelar (+/- 12.5 anteroposterior; +/- 0.0 lateral y +/- 5.0 ventral) usando una jeringa Hamilton de 2 μl durante 120 segundos (Esquema 1). La aguja se dejó en el sitio de la inyección durante 3 min para evitar el reflujo de las soluciones. Finalmente el orificio fue tapado con cera para huesos (Bondwax, Sigma) y la herida cerrada con puntos de sutura.

2.2.3. Obtención del tejido y procesamiento de las muestras

A las 6, 24 ó 48 horas los animales fueron decapitados después de una sobredosis de pentobarbital. Se extrajo cuidadosamente el cerebro completo y se diseccionaron las partes inyectadas. En el caso de las inyecciones en cortex frontal, se tomo una fracción de tejido a partir de 0.5 cm del punto de inyección,

el hipocampo fue extraído en su totalidad, así como el vermis cerebelar, que se utilizaron para extracción de RNA total y posterior RT-PCR.

Esquema 1. Sección longitudinal (A) y transversal (B) de cerebro de rata donde se muestra los puntos de inyección intracraneal.



2.3. Medida de la formación de cGMP

La formación de cGMP se determinó en cultivos de astrocitos y de neuronas por radioinmunoensayo, según el método de Brooker y col (1979), con algunas modificaciones (Agulló y García, 1997).

2.3.1. Material utilizado

- [^3H]cGMP: El [^3H]cGMP comercial se diluyó en etanol- H_2O (1:1, v/v) hasta una concentración de 25 pmoles / 50 μl y se distribuyó en alícuotas de 40 μl . Éstas se mantuvieron a -20°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 μl 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 μM en tampón acetato 5 mM, pH 4,8,

se diluyó 100 veces y se distribuyó en alícuotas que se mantuvieron a -80°C hasta su utilización. A partir de éstas se obtuvieron soluciones patrón en un intervalo de concentraciones de 10 a 5.120 fmoles / 150 μl .

- *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 las citocinas proinflamatorias y otros agentes en ausencia de suero. Después del tratamiento, el medio de cultivo fue recogido para la determinación de nitritos y de cGMP extracelular. Las monocapas fueron lavadas, se añadieron 900 μl de una solución (medio de estimulación) que contenía NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgSO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, glucosa 10 mM y HEPES 20 mM, ajustada a pH 7,4 con NaOH y seguidamente se estimularon añadiendo 100 μl de medio de estimulación conteniendo o no 100 μM SNP. Una vez finalizada la incubación se aspiró el medio de estimulación y se añadió 1 ml de etanol absoluto a 4°C . Los extractos de etanol, los medios de cultivo y los medios de estimulación se evaporaron en una centrífuga de vacío (*Speed-VAC*) y los extractos secos se guardaron a -20°C hasta el momento de realizar la medida del cGMP por radioinmunoensayo. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

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 μl) y se acetilaron como describen Brooker y col. (1979), añadiendo trietilamina (2 μl / 100 μl de muestra) y anhídrido acético (1 μl / 100 μl de muestra), agitando después de cada adición. Seguidamente en cada tubo se añadieron 50 μl de [^3H]cGMP acetilado (100 fmoles; 34,5 Ci / mmol) y posteriormente 100 μl de la solución de antisuero frente a cGMP succinilado

(1:1.000 dilución final; 25-35 % de unión al [³H]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 minutos, se centrifugaron los tubos a 4.000 g, 10 minutos y se tomaron 900 µl del sobrenadante para contar la radioactividad presente. Esta se determinó después de añadir 4 ml de líquido de centelleo biodegradable BCS (Amersham), en un contador Packard Tri-Carb 2100 TR con una eficiencia del 40-45 %.

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):

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

donde cpm (³H]cGMP unido) representa la radioactividad recuperada en el sobrenadante y cGMP_i 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 de cerebelo destinados a la medida de las actividades enzimáticas sGC y PDE

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 leupeptina, 10 mg/l

inhibidor de tripsina y 100 mg/l fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF), 1 mg/l pepstatina A, y 0,2 mM benzamidina a 4°C. Todas las homogenizaciones se realizaron mediante 10 subidas y bajadas manuales en un homogenizador tipo 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 sGC

Alícuotas de fracciones citosólicas de astrogía (30-50 µg) se incubaron 10 min a 37°C en presencia de 1 mM GTP, 4 mM MgCl₂, 15 mM creatina fosfato, 200 mg / l creatina kinasa, 1 mM IBMX y 1 mM EGTA, con o sin SNP 100 µM. La reacción se paró añadiendo 0,4 ml de 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. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

2.4.3. Medida de la actividad PDE

Alícuotas de 75 µl (15-20 µg) de las fracciones citosólicas obtenidas a partir de astrocitos fueron incubadas en un volumen final de 100 µl de 50 mM Tris / HCl (pH 7.4), conteniendo 10 µM [³H]cGMP (0.075 µCi), 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA en presencia o ausencia de 25 µM CaCl₂. La concentración de Ca²⁺ en la solución de reacción fue calculada por medio del programa RECIPC (S. Robertson, Universidad de Cincinnati, 1981) siendo menos de 1 nM cuando no se añadió CaCl₂. Las mezclas se incubaron durante 5 min (+Ca²⁺) o 30 min (-Ca²⁺) a 37°C. Después de detener la reacción por ebullición de las muestras a 100°C por 5 min, se añadieron 50 µg de veneno de serpiente (*crotalus atrox*) en 1 ml de agua para transformar el [³H]GMP en [³H]guanosina, incubándose la mezcla por 15 min a 37 °C. Los restos de proteína desnaturalizada fueron separados por centrifugación de las muestras (1.500 g, 10 min) y los sobrenadantes fueron pasados por columnas de resina de intercambio catiónico

(Dowex-X4, 200-400 mesh). Finalmente, la [³H]guanosina fue eluida de las columnas con una solución 3 M de hidróxido de amonio. Alrededor del 95 % de la [³H]guanosina fue recuperada de las columnas.

2.5. Determinación de los niveles de la subunidad β_1 de la sGC por *western blot*

2.5.1. Preparación de extractos celulares

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 homogenizador tipo Potter-Elvehem. A continuación los homogenados se centrifugaron a 1.600 g durante 20 minutos 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: Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0,03 % (concentraciones finales) 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 minutos, se añadieron 2,5 μ l de TEMED y 25 μ l 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 μ l de TEMED y 15 μ l de persulfato amónico 10 %.

- *Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*: Las muestras (25-35 μ g 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-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %). Marcadores premarcados (Bio-rad) se usaron como indicadores de peso molecular.

- *Electrotransferencia*: Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V durante 1,5 horas a 4°C, en tampón 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 % leche desnatada durante 16-24 horas a 4°C.

- *Incubación con el primer anticuerpo*: Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo contra la subunidad β_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 minutos) 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 x15 minutos) 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 del nivel del mRNA de las subunidades de la sGC por RT-PCR

2.6.1. Extracción de RNA

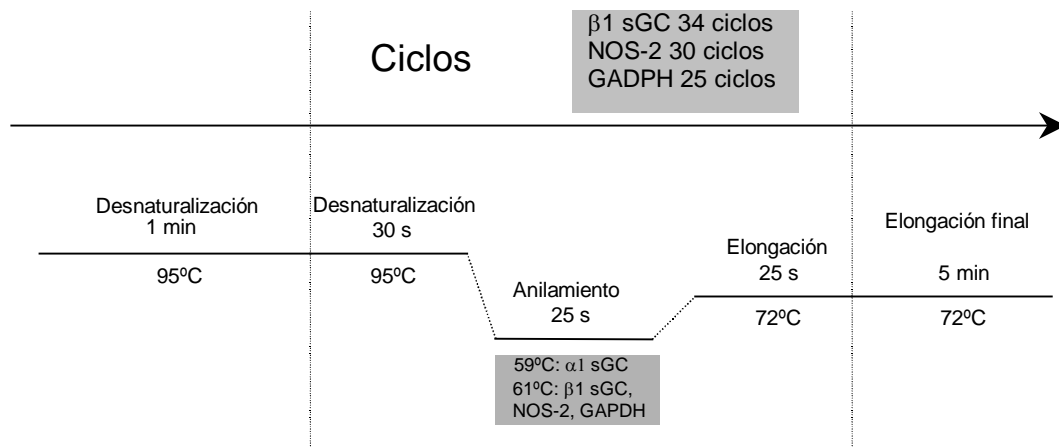
El RNA se extrajo de las células o de las regiones cerebrales inyectadas con el reactivo Trizol (Gibco-BRL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras aspirar el medio de incubación, se añadió 1 ml de reactivo Trizol sobre la monocapa o sobre el tejido inyectado, el lisado se agitó varias veces 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 100 μ l de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente 15 seg, 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 1.600 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 disolvió en 30-50 μ l de agua estéril libre de RNAsas. 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*: En un volumen final de 20 μ l de tampón de reacción se añadieron 1 μ g de RNA total, 1 U de Superscript-II, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (200 mM cada uno), DTT 20 mM y cebadores hexaméricos aleatorios 0,3 μ g/ μ l. 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 libre de RNAsas

- *PCR*: Mediante PCR se amplificaron secuencias específicas de los cDNAs de las subunidades α_1 y β_1 de la sGC, la NOS-2 y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenía 5 μ l de solución de cDNA (producto de la RT), 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,2 U de *taq* DNA polimerasa (Gibco, BRL) y 0.5 pmoles/ml de cebadores específicos, y se

desarrolló como muestra el siguiente esquema:



Esquema 2. Representación esquemática de los tiempos y temperaturas empleados en la PCR.

Los cebadores usados para la amplificación fueron:

α_1 sGC

Forward (F): 5'-ATACGGGTGAGGAGATGGGATAACT-3'

Reverse (R): 5'-CCTCATTGAACTTCTTGGCTTGC-3'

β_1 sGC:

F: 5'-GCCAAAAGATACGACAATGTGACCA-3'

R: 5'-TTGCCATCTACTTGAACCTGACCAG-3'

NOS-2:

F: 5'-CTGCATGGAACAGTATAAGGCAAAC-3'

R: 5'-GAGACAGTTTCTGGTTCGATGTCATGA-3'

La amplificación de la GAPDH se usó para controlar la diferencia de eficiencia en la síntesis de cDNA entre distintas muestras. Los cebadores empleados fueron:

F: 5'-GCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3'

R: 5'-TCCAGGGGTTTC TTA CTCTTGGGA-3'.

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). La amplificación del cDNA resultó lineal entre 33-37 ciclos para la α_1 sGC, entre 32 y 36 ciclos para la β_1 sGC, entre 28 y 32 ciclos para la NOS-2 y entre 20 y 26 ciclos en el caso de la GAPDH.

2.7. Otros métodos

2.7.2. Determinación de la concentración de nitritos

La determinación de nitritos se realizó mediante la reacción de Greiss. Se pasaron 150 μ l del medio de incubación a placas 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 minutos 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 μ M) procesadas en paralelo como estándares.

2.7.3. 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 de tampón PBS y se dejaron 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). Para determinar la cantidad de proteína en homogenizados citosólicos, se usó el reactivo de Bradford para disminuir interferencias con los reactivos presentes en la solución. En los dos casos se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

2.8.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test de la t de Student apareado. Las diferencias entre medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. Efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO en astroglía

1.1. Efecto de la IL-1 β , el TNF- α y el INF- γ sobre la acumulación intracelular de cGMP

El tratamiento de cultivos primarios enriquecidos en astrocitos de cerebelo con 10 ng/ml de IL-1 β durante 20 horas produce la acumulación de nitritos en el medio (Fig. 1B), probablemente como consecuencia de la inducción de NOS-2. Sin embargo, no se observa una acumulación significativa de cGMP intracelular (Fig. 2). Por otro lado, en células tratadas durante tiempos largos con IL-1 β y posteriormente estimuladas con SNP (100 μ M, 3 min) se observa una menor capacidad de acumular cGMP (Fig. 1A). El tratamiento con TNF- α (10 ng/ml, 20 h) no produce acumulación de nitritos en el medio (Fig. 1B), ni de cGMP intracelular (Fig. 2), pero sí disminuye la acumulación de cGMP en respuesta a SNP, aunque en menor medida que la IL-1 β (Fig. 1A). El tratamiento con INF- γ (10 ng/ml, 20 h) no produce acumulación de nitritos y disminuye ligeramente (17 %) la acumulación de cGMP en respuesta a SNP (Fig. 1). Sin embargo, aunque potencia la acumulación de nitritos inducida por la IL-1 β (Fig. 1B), no potencia la disminución de la acumulación de cGMP dependiente de NO observada en células tratadas con la citocina (Fig. 1A). Al tratar las células con la combinación IL-1 β + TNF- α (10 ng/ml, 20 h) no se produce mayor acumulación de nitritos ni disminución en los niveles de cGMP que con IL-1 β sola (Fig. 1). La no aditividad de los efectos de estas dos citocinas sugiere que actúan por un mecanismo similar por lo que en este estudio se ha caracterizado principalmente el efecto de la IL-1 β .

El efecto de la IL-1 β ó el TNF- α sobre el cGMP acumulado en respuesta a SNP es dependiente del tiempo y de la concentración de citocina. Como se observa en la Fig. 2, la disminución en los niveles de cGMP es máxima a la concentración de 10 ng/ml para las dos citocinas y es evidente después de 3 horas de tratamiento. A las 20 horas la inhibición de la formación de cGMP en células tratadas con IL-1 β es de un 81 % (88.9 ± 7.5 y 17.0 ± 1.9 pmoles/mg proteína en células no tratadas y tratadas respectivamente, $n = 10$) y un 51 % en

células tratadas con $\text{TNF-}\alpha$ (97.0 ± 12.6 y 46.3 ± 6.2 pmoles/mg proteína en las células no tratadas y tratadas respectivamente, $n = 5$).

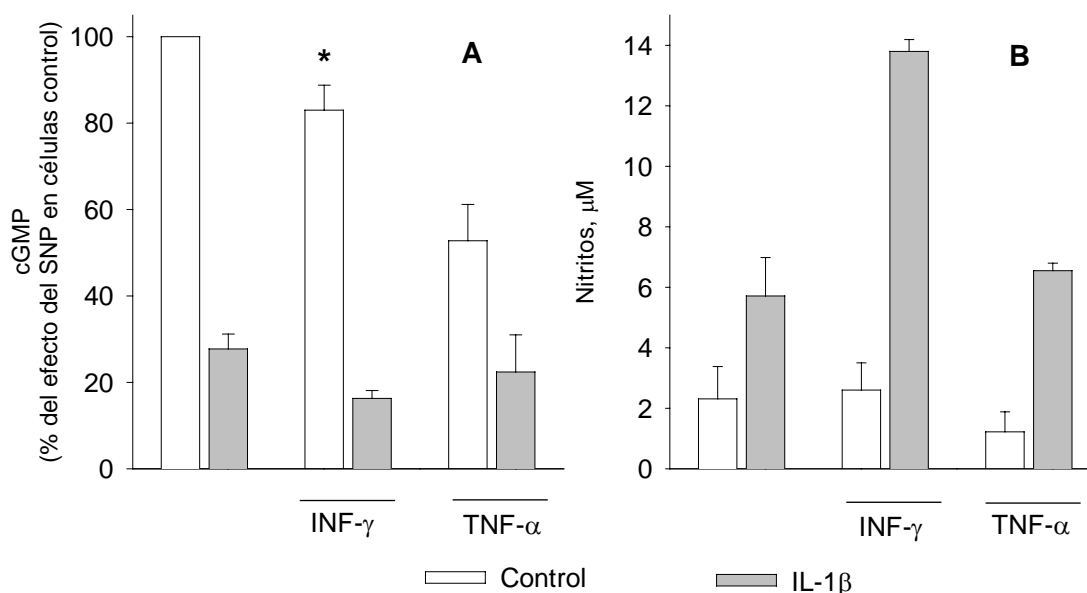


Figura 1. Efecto de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e INF- γ sobre la acumulación de cGMP y de nitritos en respuesta a SNP en cultivos primarios de astrocitos cerebelares. Los cultivos fueron tratados durante 20 horas con 10 ng/ml de IL-1 β , TNF- α o INF- γ o las combinaciones indicadas. Después del tratamiento se aspiró el medio para la determinación de la acumulación de nitritos y las monocapas fueron lavadas y estimuladas con SNP 100 μM durante 3 minutos. El cGMP fue medido por radioinmunoensayo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados, expresados como % del efecto del SNP en células no tratadas, en el caso del cGMP, son media \pm SEM de 3-5 experimentos (* $p < 0.05$ respecto al efecto del SNP en células control, test apareado de la t de Student).

Las principales células contaminantes en los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos son las células microgliales, que según estudios anteriores del laboratorio donde se ha realizado esta tesis, pueden llegar a constituir el 30 % del total (Agulló y col., 1995). Teniendo en cuenta que la microglía tiene la capacidad de producir y de responder a citocinas inflamatorias, se determinó si la presencia de microglía contribuía al efecto de la IL-1 β sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO, utilizando cultivos en los que está

disminuida la contaminación microglial. Para este propósito se trataron las células con el citostático arabinósido de citosina (cit-ara, 10 μ M) desde el día 10 de cultivo, cuando se alcanza la confluencia de la monocapa de astrocitos, hasta el día 14 en que las células son utilizadas. Este periodo corresponde al de máxima proliferación microglial (Agulló y col., 1995). Como se muestra en la Fig. 3, el tratamiento de los cultivos con cit-ara no altera significativamente los niveles de cGMP tras la estimulación con SNP. Por otro lado, la disminución en los niveles de cGMP provocada por la IL-1 β tampoco se ve alterada (Fig. 3).

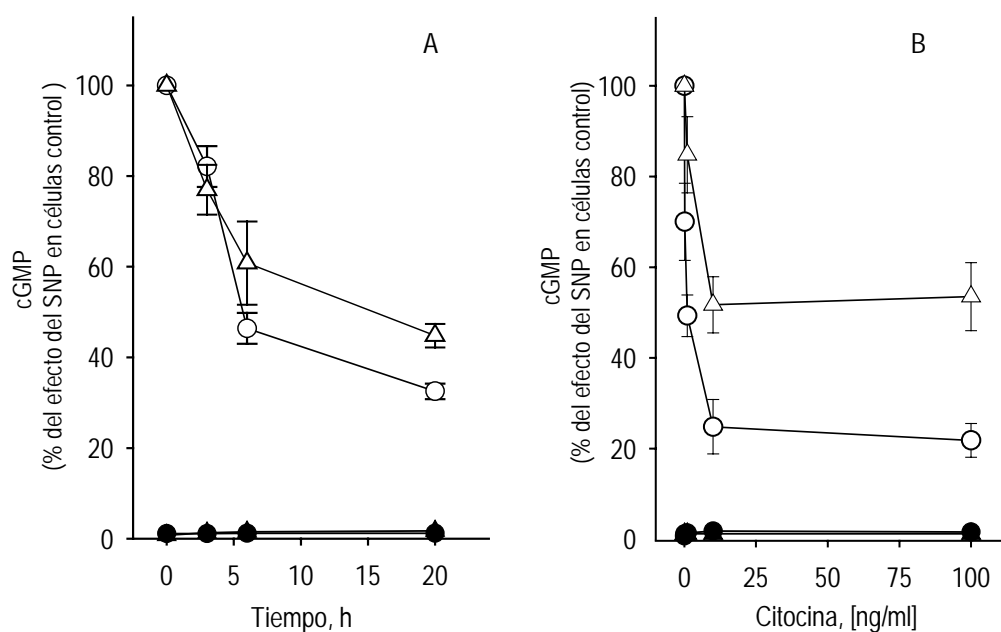


Figura 2. El tratamiento de astrocitos de cerebelo en cultivo primario con las citocinas proinflamatorias IL-1 β o TNF- α disminuye la acumulación de cGMP dependiente de NO de forma dependiente del tiempo y de la concentración. Las células fueron tratadas con 10 ng/ml de IL-1 β (\circ , \bullet) o TNF- α (Δ , \blacktriangle) durante los tiempos indicados (A) o con diferentes concentraciones de citocina durante 20 horas (B). Después de cada tratamiento las monocapas fueron lavadas y estimuladas (símbolos abiertos) o no (símbolos cerrados) con SNP 100 μ M durante 3 minutos. Los resultados, expresados como % del efecto de SNP en células no tratadas, son media \pm rango de dos experimentos realizados por triplicado en diferentes preparaciones celulares.

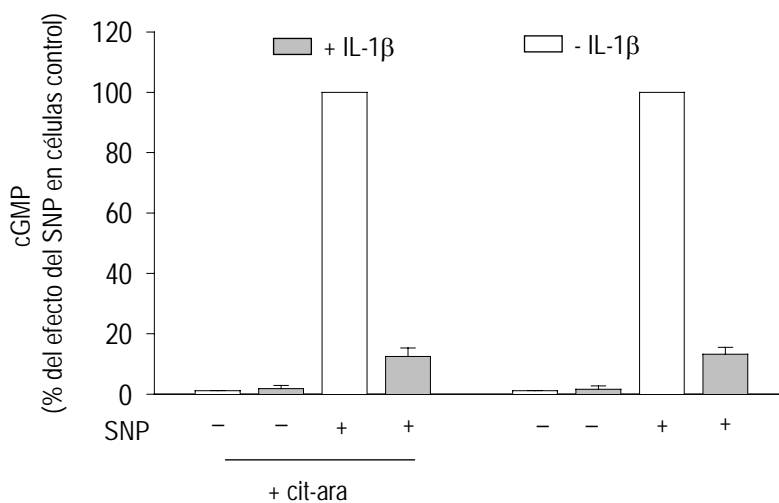


Figura 3. Efecto de la IL-1 β sobre la acumulación de cGMP en respuesta a SNP en cultivos de astrocitos cerebelares tratados con arabinósido de citosina. Células tratadas o no con arabinósido de citosina (cit-ara, 10 μ M) desde el día 10 de cultivo hasta su utilización el día 14, fueron incubadas con IL-1 β (10 ng/ml) durante 20 horas, lavadas y estimuladas con SNP (100 μ M, 3 minutos). Los resultados son media \pm SEM de tres experimentos realizados en diferentes cultivos.

La acumulación de nitritos en el medio, así como la disminución en la acumulación de cGMP producidas por la IL-1 β , no son respuestas limitadas a astrocitos cerebelares. En cultivos primarios enriquecidos en astrocitos provenientes de cortex y de hipocampo se observa una acumulación de nitritos de similar magnitud (Fig. 4 B). Sin embargo, la disminución de la acumulación de cGMP inducida por el tratamiento con IL-1 β es menor que en astrocitos cerebelares (Fig. 4 A). En astrocitos de cortex la IL-1 β (10 ng/ml, 20 h) disminuye la acumulación de cGMP en respuesta a SNP en un 37,6 % y en hipocampo en un 47,3 %.

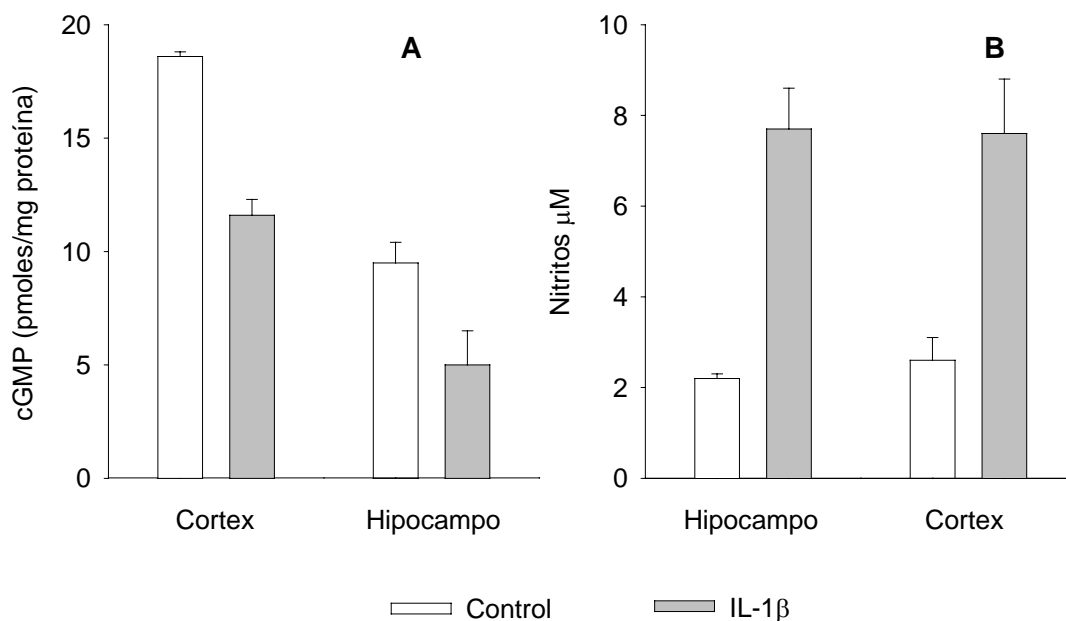


Figura 4. Efecto de la IL-1 β sobre la acumulación de cGMP y de nitritos en cultivos de astrocitos de cortex e hipocampo. Las células provenientes de las regiones cerebrales indicadas fueron incubadas con IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas) y posteriormente estimuladas con SNP (100 μ M, 3 minutos) en presencia del inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas IBMX (1 mM). Los resultados son media \pm rango de dos experimentos realizados en diferentes cultivos.

En neuronas granulares de cerebelo, población neuronal en la que se han descrito respuestas a citocinas inflamatorias como la inducción de NOS-2 (Minc-Golomb y col., 1994), el tratamiento con las citocinas proinflamatorias IL-1 β , INF- γ o TNF- α no afecta significativamente a la acumulación de cGMP (Fig. 5)

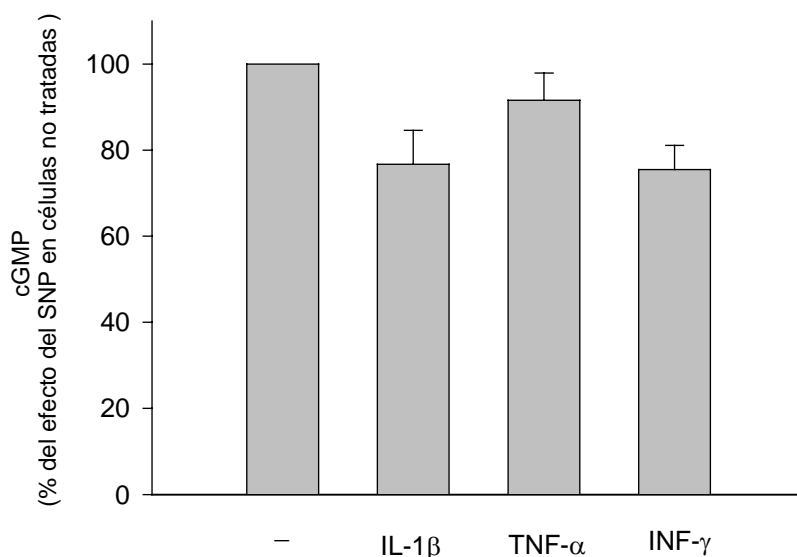


Figura 5. Efecto de citocinas inflamatorias sobre la acumulación de cGMP en respuesta a SNP en neuronas granulares de cerebelo. Los cultivos de neuronas granulares fueron tratados durante 20 horas con las citocinas IL-1 β , TNF- α o INF- γ (10 ng/ml) y posteriormente se determinó el cGMP acumulado en respuesta a SNP. Los datos son media \pm SD de un experimento representativo de tres realizados en preparaciones celulares independientes.

1.2. Efecto de la IL-1 β sobre la salida del cGMP al medio extracelular

1.2.1. Acumulación extracelular del cGMP formado en células tratadas con IL-1 β

Como se ha visto en el apartado anterior, el tratamiento de cultivos primarios enriquecidos en astroglia con IL-1 β produce acumulación de nitritos en el medio (Fig. 1) lo cual indica que se está formando NO como consecuencia de la inducción de NOS-2 y por tanto, es esperable la formación de cGMP por estimulación de la sGC. Ya que no se había detectado una acumulación significativa de cGMP intracelular, se examinó la posibilidad de que el nucleótido saliese de la célula y se acumulase en el medio extracelular.

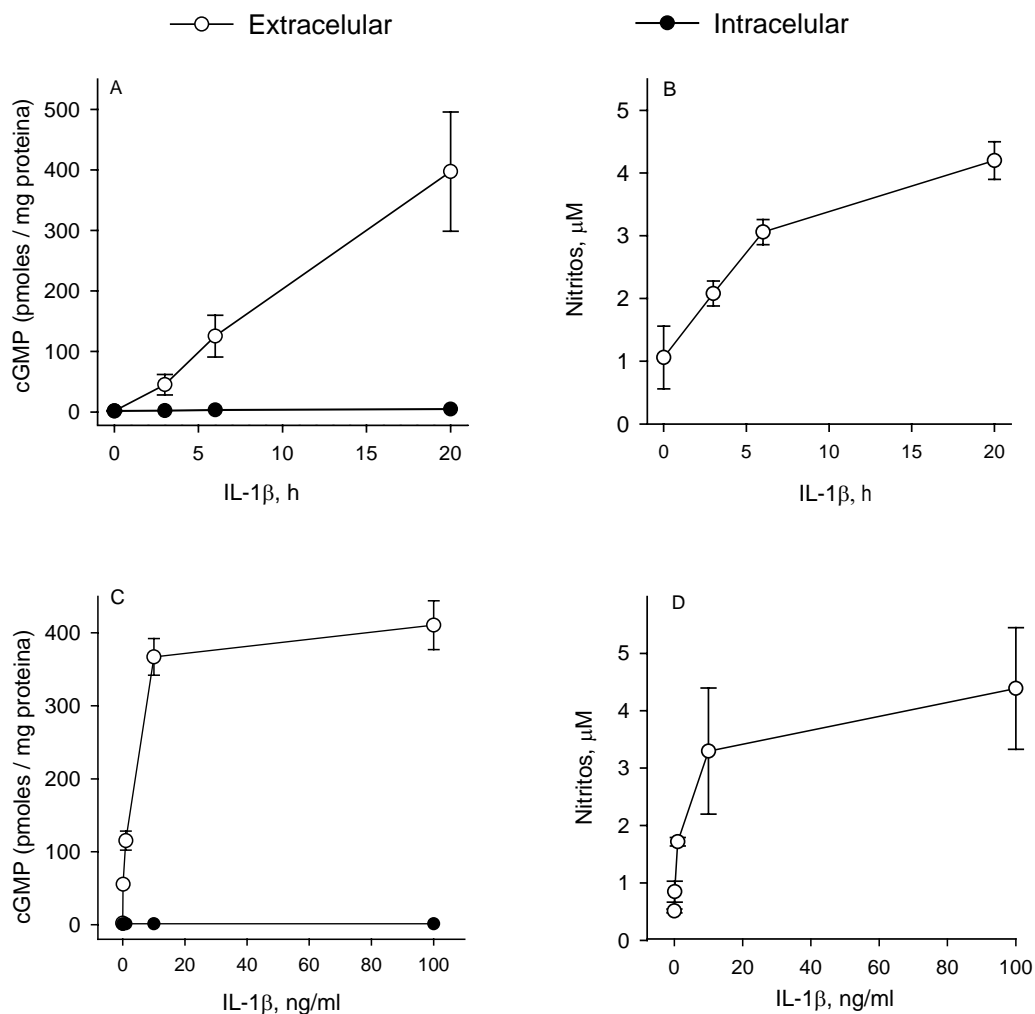


Figura 6. La IL-1 β estimula la acumulación extracelular de cGMP y de nitritos en astrocitos cerebelares. Las células fueron tratadas con IL-1 β (10 ng/ml) durante los tiempos o con las concentraciones indicadas (20 horas). El medio de cultivo fue recolectado para la determinación de cGMP extracelular (A, C) o de nitritos (B, D). El cGMP intracelular fue determinado en las monocapas después de lavadas. Los resultados son media \pm SEM de tres (A, B) o media \pm rango de dos (C, D) experimentos realizados en diferentes cultivos.

Como puede observarse en la Fig. 6 (A, C), el cGMP producido en células tratadas con IL-1 β se acumula en el medio extracelular donde empieza a detectarse después de las 3 horas de tratamiento y aumenta linealmente por lo menos hasta las 20 horas, máximo tiempo estudiado. La salida de cGMP inducida por IL-1 β presenta un patrón dosis-efecto/tiempo-efecto que concuerda con el de la acumulación de nitritos en el medio (Fig. 6 B, D). El INF- γ o el TNF- α no producen acumulación extracelular de cGMP, pero tal como ocurre con la acumulación de nitritos, el INF- γ potencia la acumulación extracelular de cGMP inducida por IL-1 β (Fig. 7).

La acumulación extracelular de cGMP y de nitritos inducida por la IL-1 β es una respuesta mediada por el receptor de IL-1 de tipo I (IL-1RI) ya que se bloquea al coincubar las células con el antagonista de dicho receptor, IL-1ra (2 μ g/ml) (Tabla 1). Igualmente, el pretratamiento de las células con el inhibidor de NOS, L-NMMA (1 mM) inhibe la acumulación extracelular de nitritos y de cGMP. Este último efecto de la IL-1 β es bloqueado por el inhibidor específico de la sGC, ODQ (1 mM) (Tabla 1). Estos resultados indican que el cGMP acumulado en el medio extracelular proviene de la activación de la sGC por el NO generado tras la inducción de la NOS-2 por IL-1 β .

TABLA 1. Efecto de diferentes agentes sobre la acumulación extracelular de cGMP y de nitritos inducida por IL-1 β en cultivos primarios de astroglia

Tratamiento	% del efecto de IL-1 β		de IL-1 β	
	cGMP Extracelular		Nitritos	
	-IL-1 β	+ IL-1 β	-IL-1 β	+ IL-1 β
Control	1.1 \pm 0.3	100	43 \pm 6	100
IL-1Ra, 2 μg/ml	1.0 \pm 0.3	16 \pm 1	39 \pm 6	43 \pm 8
L-NMMA, 1mM	0.3 \pm 0.1	2 \pm 1.2	36 \pm 13	40 \pm 13
ODQ, 1mM	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	ND	ND

Las células fueron tratadas con IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas) en ausencia o presencia de los compuestos indicados, añadidos 1 hora antes. Los resultados están expresados como % del efecto de la IL-1 β y son media \pm SEM de tres a cinco experimentos realizados por triplicado en diferentes preparaciones. ND: no determinado.

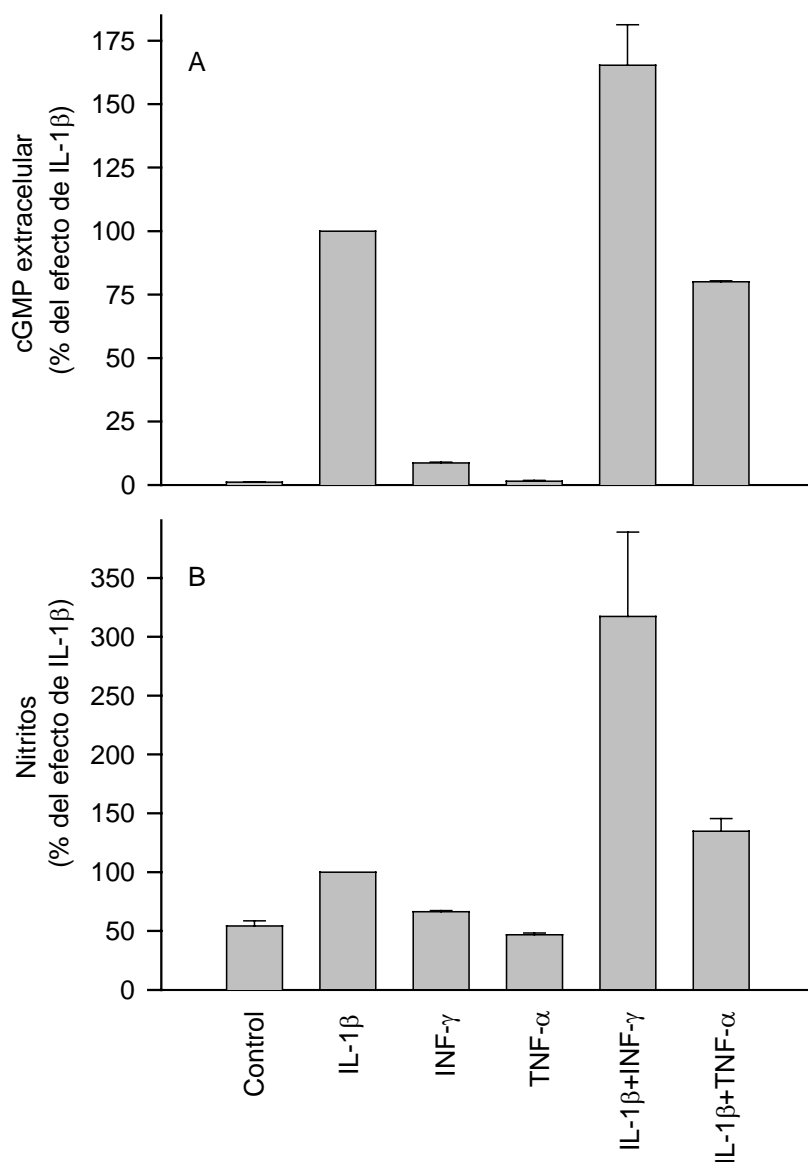


Figura 7. Acumulación extracelular de cGMP (A) y de nitritos (B) en astrocitos cerebelares tratados con citocinas proinflamatorias. Las células fueron tratadas con IL-1 β , INF- γ o TNF- α (10 ng/ml) solas o en combinación durante 20 horas. El cGMP extracelular y los nitritos fueron determinados en el medio de incubación. El cGMP intracelular fue indetectable en todos los casos. Los datos, expresados como % del efecto de la IL-1 β , son media \pm SEM de tres experimentos.

1.2.2. Estimulación por IL- β de la salida del cGMP formado en células tratadas con LPS o estimuladas con un donador de NO. Implicación de un transportador.

El tratamiento de astrocitos cerebelares en cultivo primario con lipopolisacárido de la pared celular de bacterias gram negativas (LPS, 10 ng/ml, 20 h) produce una acumulación de nitritos en el medio mayor que la inducida en respuesta a 10 ng/ml de IL-1 β (17.5 ± 2.4 y 3.0 ± 0.6 μ M respectivamente, $n = 6$). Además se observa una notable acumulación de cGMP intracelular, pero no extracelular (Fig. 8). El tratamiento de las células con la combinación IL-1 β + LPS causa una acumulación de nitritos aditiva (20.4 ± 0.9) y una acumulación extracelular de cGMP 5 veces mayor que la inducida por IL-1 β , mientras que el cGMP intracelular tiende a disminuir. Estos resultados indican que la IL-1 β estimula la salida del cGMP producido en respuesta a LPS.

Con el fin de investigar si la salida del cGMP en respuesta a la IL-1 β está mediada por un transportador, estudiamos el efecto de algunos inhibidores de transportadores de aniones orgánicos. La incubación de las células con probenecid (1 mM) o verapamil (10 μ M) afecta a la acumulación intracelular de cGMP en respuesta al LPS que disminuye un 56.8 % y un 44.1 % respectivamente (Fig. 8), probablemente por inhibición de la actividad sGC (Hewet y col., 1993). Sin embargo, la presencia de estos inhibidores bloquea completamente la salida de cGMP inducida por IL-1 β (Fig. 8). Estos resultados concuerdan con la presencia de un transportador de cGMP cuya actividad es potenciada por la IL-1 β .

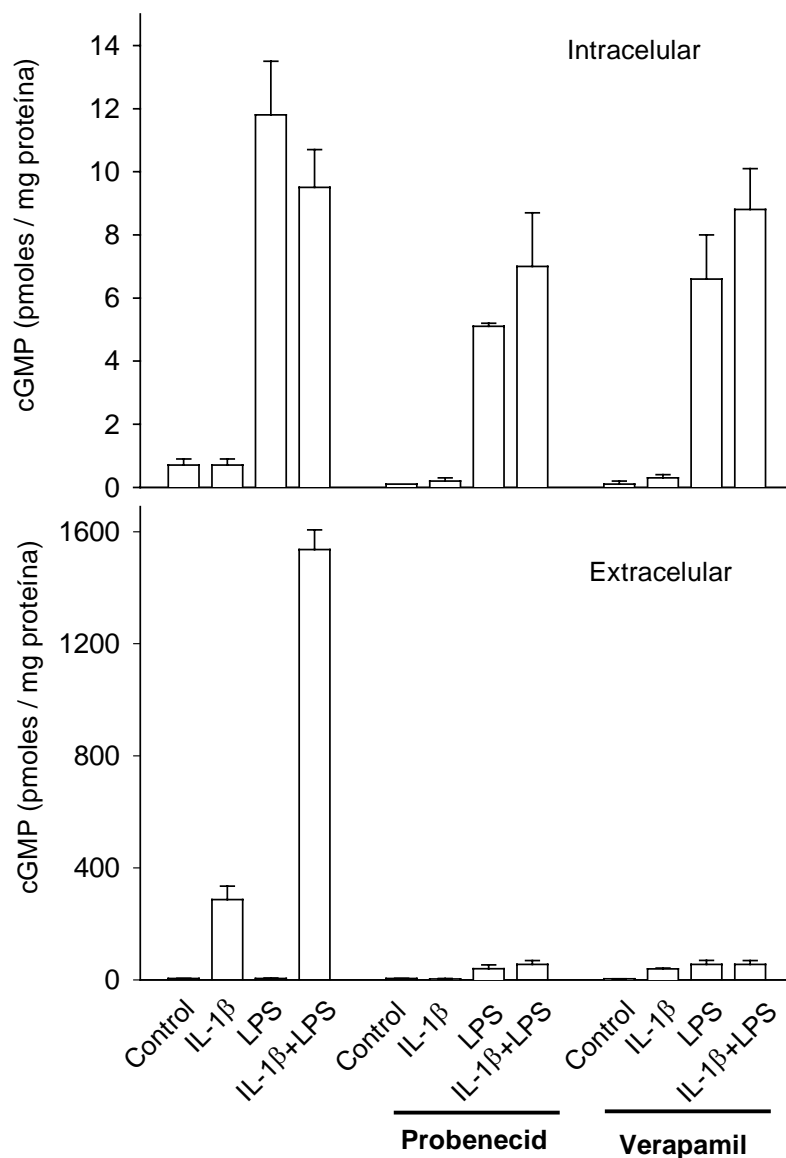


Figura 8. Efecto del probenecid y del verapamil sobre la acumulación intracelular y extracelular de cGMP en astrocitos cerebelares tratados con IL-1 β y LPS. Las células fueron tratadas o no con IL-1 β y/o LPS (10 ng/ml, 20 horas) en ausencia o presencia de probenecid (1 mM) o verapamil (10 μ M) añadidos 1 hora antes. El cGMP extracelular fue medido en el medio de incubación. Las monocapas fueron lavadas y recogidas para determinación de cGMP intracelular. Los resultados son media \pm SD de triplicados en un experimento representativo que fue repetido seis veces sin inhibidores, tres con probenecid y dos con verapamil en diferentes preparaciones celulares con resultados similares.

El tratamiento con IL-1 β también estimula la salida del cGMP formado en respuesta a SNP. Como se observa en la Fig. 9, en células tratadas o no con IL-1 β durante 20 horas y estimuladas por diferentes tiempos con SNP (100 μ M), la acumulación de cGMP intracelular es mayor a los 3 minutos que a tiempos más largos, pero en células tratadas con IL-1 β la acumulación de cGMP intracelular es un 70 a 80 % menor que en células control a los tres tiempos estudiados. Por otro lado, tanto en células control como en células tratadas con IL-1 β se observa un aumento gradual de la acumulación extracelular de cGMP. Sin embargo, es evidente que en células tratadas con IL-1 β la proporción de cGMP extracelular es mucho mayor con respecto al intracelular (Fig. 9). Por otro lado, al estimular las células con SNP en medio de estimulación carente de Na⁺ disminuye ligeramente la acumulación intracelular de cGMP y se bloquea su liberación al medio extracelular. Sin embargo, en las células tratadas con IL-1 β no se restablecen los niveles intracelulares de cGMP alcanzados en células control. Estos resultados demuestran que la salida de cGMP en astrocitos es dependiente del gradiente de Na⁺, y probablemente de ATP y que en células tratadas con IL-1 β la estimulación de la salida de cGMP no es responsable de la disminución de la acumulación intracelular del nucleótido.

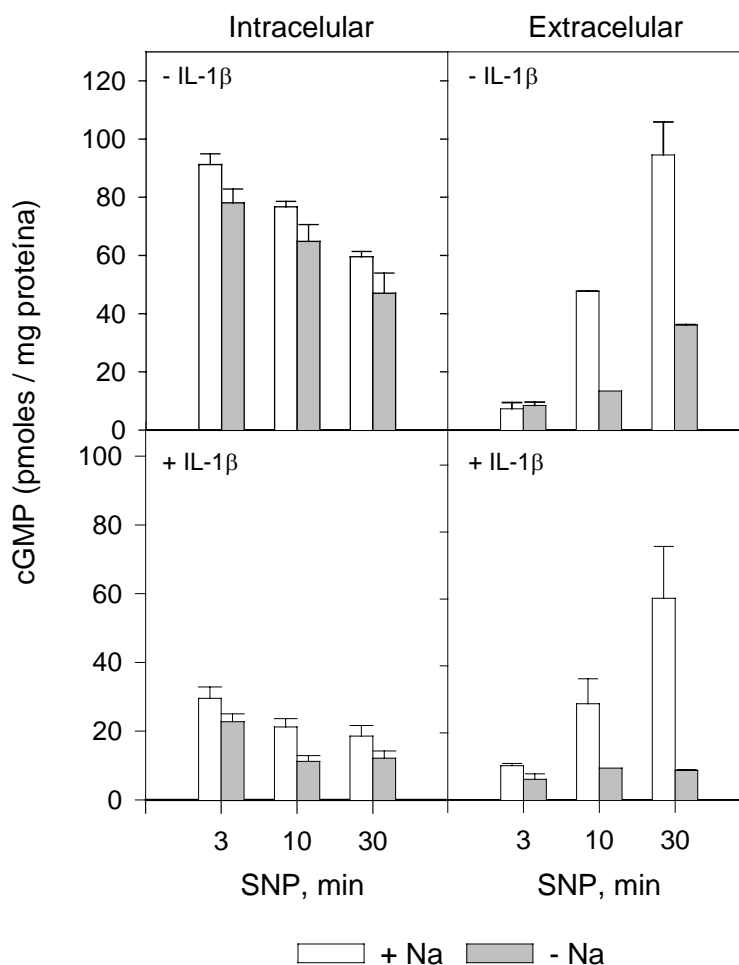


Figura 9. La IL-1 β estimula la acumulación extracelular de cGMP formado en respuesta a SNP en cultivos primarios de astrocitos cerebelares de forma dependiente del gradiente de Na⁺. Las células fueron tratadas o no con IL-1 β (10 ng/ml) durante 20 horas y posteriormente expuestas a SNP durante los tiempos indicados en medio conteniendo NaCl (118 mM) o colina (125 mM). EL cGMP extracelular se midió en el medio de estimulación. Las monocapas fueron lavadas y procesadas para medición de cGMP intracelular. Los resultados son media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado en diferentes preparaciones celulares.

2. Mecanismo del efecto inhibitorio de la IL-1 β sobre la acumulación intracelular de cGMP dependiente de NO en astrogía cerebelar

2.1. Efecto de la IL-1 β sobre los enzimas responsables del metabolismo del cGMP

Los niveles intracelulares de cGMP tras estimulación con NO dependen de la velocidad de su síntesis y degradación por las actividades sGC y PDEs respectivamente. Así, la disminución en la capacidad de las células para acumular cGMP en respuesta a SNP producida por el tratamiento con IL-1 β podría ser causada por una disminución de la actividad sGC o un aumento de la actividad PDE. Para establecer cual de las actividades enzimáticas es afectada por dicho tratamiento se estudió la estimulación de la formación de cGMP por SNP durante diferentes tiempos (0-120 segundos), en presencia del inhibidor inespecífico de PDEs IBMX (1 mM).

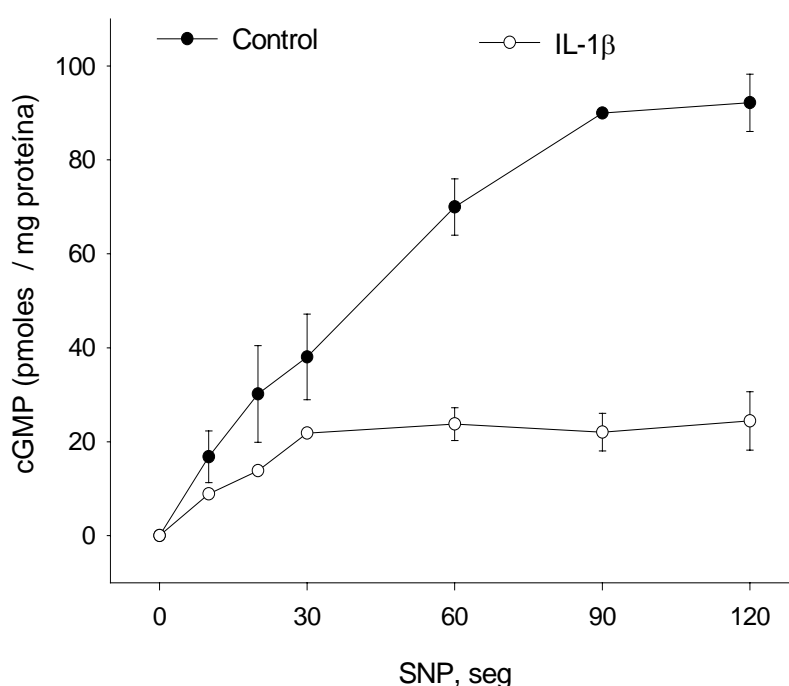


Figura 10. Efecto de la IL-1 β sobre la formación de cGMP en respuesta a SNP en presencia de IBMX en función del tiempo. Las células fueron tratadas o no (controles) con IL-1 β durante 20 horas y estimuladas durante los tiempos indicados con SNP (100 μ M) en presencia del inhibidor de PDEs IBMX (1 mM). Los resultados se expresan como media \pm SEM de dos experimentos realizados por triplicado en diferentes preparaciones.

Como se observa en la Fig. 10, tanto en células no tratadas (control), como en las que han sido expuestas a IL-1 β , el aumento del cGMP intracelular es ya evidente a los 10 segundos. En células control se alcanza un estado estacionario a los 90 segundos (92.1 ± 6.1 pmoles / mg proteína) mientras que en células tratadas con IL-1 β , la velocidad inicial de síntesis de cGMP es aproximadamente la mitad que en células control y se alcanza un estado estacionario a los 30 segundos (21.8 ± 0.3 pmoles / mg proteína). Estos resultados sugieren que el tratamiento de las células con IL-1 β afecta a la velocidad de síntesis de cGMP. Para confirmarlo se determinaron las actividades sGC y PDE en la fracción soluble de homogenados provenientes de astrocitos cerebelares tratados con IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas). El tratamiento no modifica las actividades PDE dependientes o independientes de calcio (Fig. 11 A). Sin embargo, al medir la actividad sGC se observó una tendencia a disminuir en la actividad basal y una disminución de un 70-75 % en la actividad estimulada por SNP (Fig. 11 B).

Con el objeto de investigar si la disminución de la actividad sGC inducida por IL-1 β se debía a una disminución de la proteína enzimática, se analizaron, mediante *western blot*, los niveles de la subunidad $\beta 1$ de la sGC, para la cual se dispone de anticuerpo. Como puede observarse en la Fig. 11, el tratamiento de las células con IL-1 β produce una notable disminución de la subunidad $\beta 1$ de la sGC (inserto).

2.2. Mecanismo de la disminución de la actividad sGC inducida por IL-1 β

En células de tejidos periféricos se ha demostrado que la exposición prolongada a NO conduce a una disminución de la expresión de la sGC (Filippov y col., 1997; Takata y col., 2001). Teniendo en cuenta que el tratamiento de cultivos primarios enriquecidos en astrocitos con IL-1 β produce un aumento en la acumulación de nitritos en el medio indicativa de la generación de NO, con el objeto de averiguar si es el NO el responsable de la disminución de la sGC se examinó el efecto de la IL-1 β en células cotratadas con el inhibidor de la actividad NOS L-NMMA (1 mM) o el

inhibidor de la inducción de NOS-2 dexametasona (10 μ M). Como se observa en la Fig. 12, la disminución de la formación de cGMP en respuesta a NO causada por la IL-1 β no es bloqueada al inhibirse la síntesis de NO. Sin embargo, el TPCK inhibidor de serina-proteasas implicadas en la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B, 10 μ M), bloquea tanto la acumulación de nitritos, como la disminución en los niveles de cGMP inducida por el tratamiento con IL-1 β (Fig. 12). Por otro lado, tal como se ha observado previamente en células tratadas con LPS (Baltrons y García, 1999), los inhibidores de la transcripción, actinomicina-D (4 μ g/ml) y de la síntesis de proteínas, cicloheximida (20 μ M), impiden la disminución de los niveles de cGMP causada por IL-1 β o TNF- α indicando que estos agentes inducen la expresión de una proteína directa o indirectamente implicada en la disminución de la sGC (Fig.13). En trabajos complementarios del grupo de investigación donde se realizó esta tesis se ha comprobado que en células tratadas con LPS o IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas) la disminución de la subunidad β 1 de la sGC es independiente de NO y dependiente de transcripción y síntesis de proteínas. Además se ha demostrado que es debida a una disminución de la vida media de la proteína ya que los niveles de dicha subunidad disminuyen más rápidamente que en células tratadas con cicloheximida (Pedraza y col., enviado).

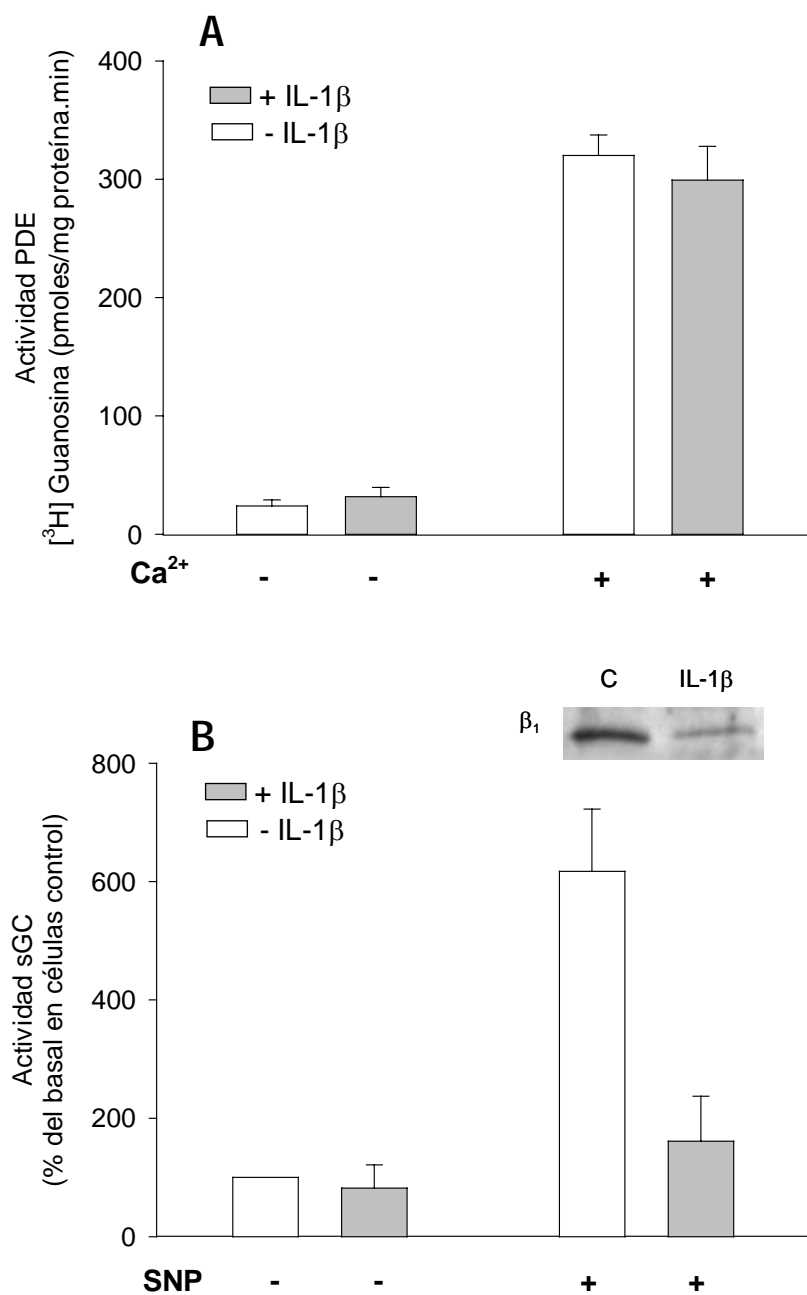


Figura 11. Efecto del tratamiento de astrocitos cerebelares con IL-1 β sobre las actividades enzimáticas PDE y sGC y sobre la subunidad β 1 de la proteína sGC. Las actividades enzimáticas y la inmunodetección de la subunidad β 1 de la sGC fueron determinadas, tal como se describe en Materiales y Métodos, en la fracción soluble de homogenados celulares de astrocitos tratados con 10 ng/ml de IL-1 β durante 20 horas. Los resultados se expresan como media \pm SEM de cinco (PDE) o cuatro (sGC) ensayos realizados por triplicado en distintas preparaciones celulares. El *western blot* (inserto) es representativo de tres realizados en las mismas preparaciones en las que se midió la actividad sGC.

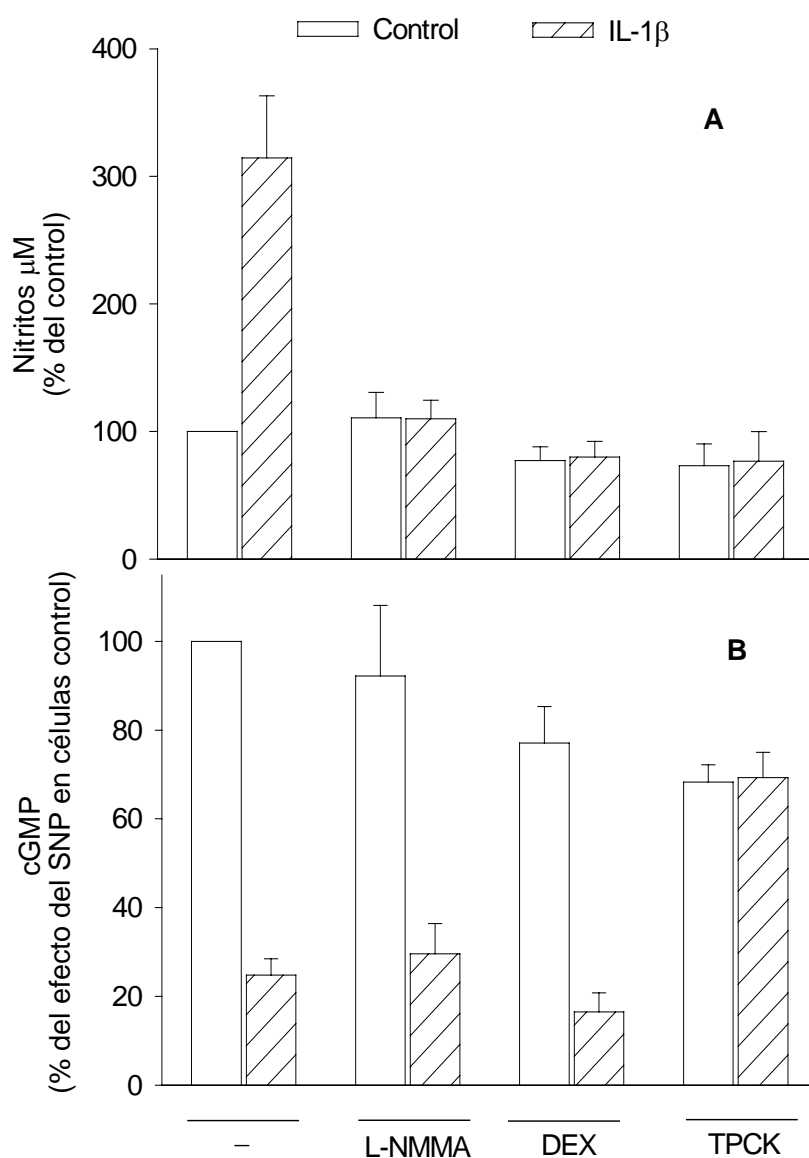


Figura 12. El efecto de la IL-1 β sobre los niveles de cGMP es independiente de NO e implica la activación de serina-proteasas. Las células fueron tratadas con IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas) en presencia o ausencia de L-NMMA (1 mM), TPCK (10 μ M) o dexametasona (10 μ M), añadidos una hora antes. Después de los tratamientos se determinaron los nitritos (A) y el cGMP intracelular (B) tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son media \pm SEM de tres experimentos con L-NMMA y TPCK y media \pm rango de dos con dexametasona (DEX).

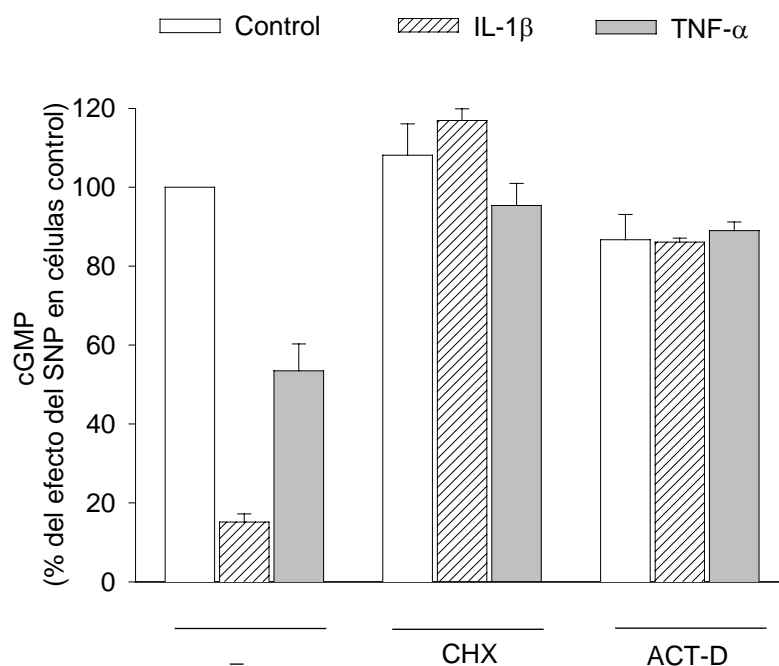


Figura 13. La disminución de la formación de cGMP en respuesta a NO inducida por IL-1 β y TNF- α es dependiente de transcripción y síntesis de proteínas. Los inhibidores cicloheximida (CHX, 20 μ M) y actinomicina-D (ACT-D, 4 μ g/ml) fueron añadidos una hora antes que las citocinas IL-1 β o TNF- α (10 ng/ml). Después de 20 horas de tratamiento se determinó el cGMP acumulado en respuesta a SNP. Los resultados son media \pm rango de dos experimentos.

La disminución en los niveles de cGMP causada por el tratamiento con IL-1 β es mediada por unión de la citocina a su receptor de tipo I, ya que la proteína antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra, 2 μ g/ml) bloquea dicho efecto (Fig. 14). Para averiguar qué componentes de las vías de señalización desencadenadas por la activación del receptor de la IL-1 β están implicados en la disminución de la actividad sGC, se estudió el efecto de diferentes inhibidores. Inhibidores de fosfolipasas C/A, (U107, 1 μ M) y de proteína quinasas dependientes de cGMP (KT5823, 2 μ M), de cAMP (H-89, 2 μ M) y de calcio calmodulina (Ca²⁺/CaM, KN93, 10 μ M) no previenen la disminución de los niveles de cGMP inducida por IL-1 β . Por otro lado, el inhibidor de proteína quinasa C estaurosporina (20 nM), el inhibidor inespecífico de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs),

apigenina (25 μM), así como los inhibidores específicos de ERK 1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares) U0126, (10 μM) y MAPK p38, SB202190 (5 μM), son capaces de impedir la disminución de los niveles de cGMP inducidos por el tratamiento con IL-1 β (Fig. 14).

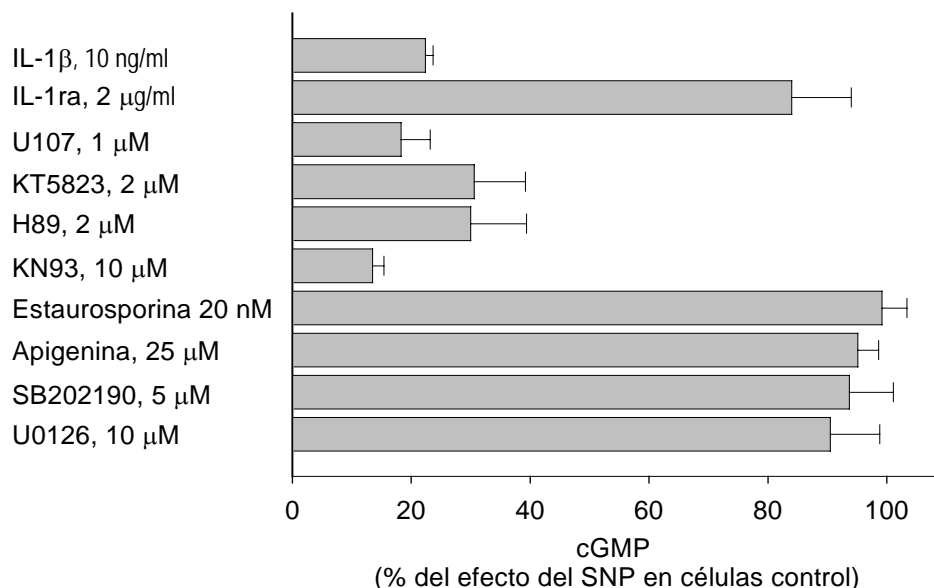


Figura 14. Efecto de diferentes compuestos sobre la disminución de la acumulación de cGMP inducida por IL-1 β . Los agentes indicados fueron añadidos al medio de incubación 1 hora antes que la IL-1 β (10 ng/ml, 20 horas). Los resultados, expresados como % del efecto del SNP en células no tratadas, son medias \pm SEM de tres a cinco experimentos realizados por triplicado en distintas preparaciones celulares.

3. Efecto de distintos agentes neuroinflamatorios sobre los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC

3.1. Efecto de la IL-1 β y del LPS

3.1.2. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en astroglía en cultivo. Dependencia del NO

Trabajos de otros autores en células de músculo liso de vasos sanguíneos demuestran que agentes que inducen la producción de NO producen una disminución del mRNA de las subunidades de la sGC (Papapetropoulos y col., 1996a; Takata y col., 2001). En este trabajo se ha estudiado mediante RT-PCR el efecto del tratamiento de astrocitos cerebelares con IL-1 β o con LPS (10 ng/ml, 20 horas) sobre los niveles de mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC. Como se observa en la Fig. 15 y en la tabla 2, se produce una disminución significativa del mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC tanto en respuesta a IL-1 β (29 % y 33 % respectivamente) como a LPS (30 % y 35 %, respectivamente). Por otro lado, al cotreatar las células con el inhibidor de NOS, L-NMMA (1 mM), o con los inhibidores de la expresión de NOS-2, PDTC (100 μ M) que bloquea la activación del NF κ B, y cicloheximida (20 μ M), se previenen los efectos del LPS y la IL-1 β , indicando la implicación del NO (Tabla 2).

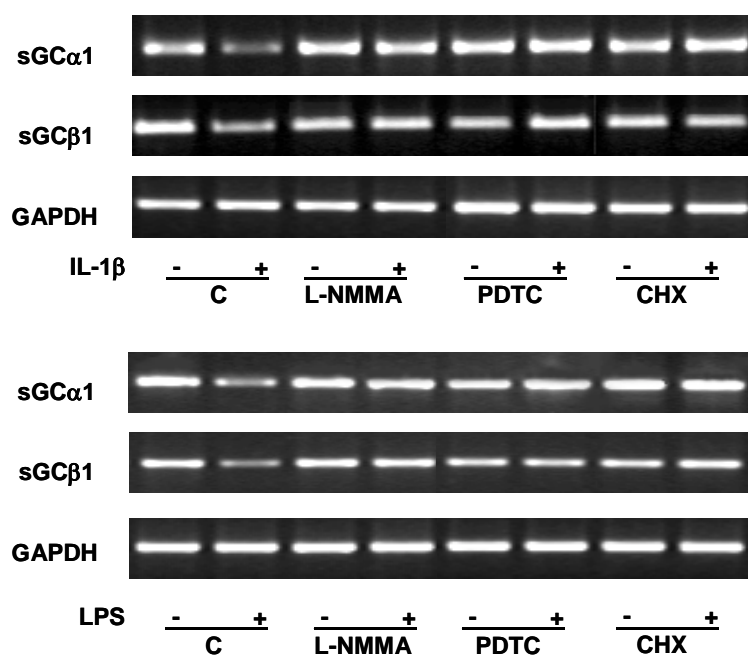


Figura 15. La IL-1 β y el LPS disminuyen los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC de forma dependiente de NO. Los inhibidores L-NMMA (1 mM), cicloheximida (20 μ M) y PDTC (100 μ M) fueron añadidos al medio de incubación una hora antes que el LPS o la IL-1 β (10 ng/ml). El RNA total se procesó para RT-PCR como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Este experimento es representativo de tres realizados en diferentes preparaciones celulares.

TABLA 2. Análisis densitométrico de los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC en astrocitos tratados con IL-1 β o LPS

	% DEL CONTROL						
	IL-1 β	L-NMMA	L-NMMA +IL-1 β	PDTC	PDTC +IL-1 β	CHX	CHX +IL-1 β
$\alpha 1$	71 \pm 3.1*	105 \pm 7.5	97 \pm 5.4	106 \pm 6.3	111 \pm 10.1	96 \pm 3.6	109 \pm 4.4
$\beta 1$	67 \pm 3.1*	100 \pm 6.5	103 \pm 6.2	89 \pm 7.7	95 \pm 1.1	99 \pm 3.2	93 \pm 3.0
	LPS	L-NMMA	L-NMMA +LPS	PDTC	PDTC +LPS	CHX	CHX +LPS
$\alpha 1$	70 \pm 2.5*	105 \pm 7.5	111 \pm 7.6	110 \pm 26.8	123 \pm 10.5	123 \pm 13.5	119 \pm 14.2
$\beta 1$	65 \pm 0.1**	98 \pm 3.8	92 \pm 8.0	89 \pm 0.7	97 \pm 1.0	93 \pm 4.2	91 \pm 5.0

Los resultados se expresan como % de cada subunidad con respecto al control previamente normalizado por los valores de GAPDH en cada tratamiento y son media \pm SEM de tres experimentos (* p< 0.05; ** p< 0.01 respecto al control, test apareado de la *t* de Student).

3.1.3. Disminución del mRNA de las subunidades de la sGC en cerebro de rata adulta

Para determinar si el efecto inhibitorio de la IL-1 β y el LPS sobre la expresión de los mRNAs de las subunidades de la sGC observado en astrocitos en cultivo primario también se producía *in vivo*, se realizaron tratamientos mediante inyecciones intracraneales (i.c.) de IL-1 β (5 μ g/ml) o LPS (5 mg/ml) en el cortex frontal y en el vermis cerebelar de ratas Sprague Dawley, utilizando las coordenadas estereotáxicas descritas por Patxinos y col. (1985) tal como se explica en Materiales y Métodos. Se analizó por medio de RT-PCR la variación en los niveles de mRNA de la NOS-2 y de las subunidades de la sGC en el tejido después de 6 y 24 horas de la inyección con los agentes indicados. Como se observa en la Fig. 16 A, después de 6 horas de la inyección en el vermis cerebelar se produce un considerable aumento de los niveles de mRNA de la NOS-2 que disminuyen después de 24 horas. También se observa una disminución en los niveles de mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC que es evidente a las 6 horas en respuesta a LPS pero no a IL-1 β . La disminución causada por el LPS en las dos subunidades se acentúa después de 24 horas, tiempo al que también se observa una disminución en respuesta a IL-1 β (Fig. 16 A y Tabla 3).

La inyección de IL-1 β o LPS en el cortex frontal induce un ligero aumento del mRNA de la NOS-2 después de 6 horas que se mantiene pasadas 24 horas en animales tratados con LPS y parece volver a los niveles del control en animales tratados con IL-1 β . En cuanto a las subunidades de la sGC se observa una notable disminución del mRNA de las subunidades α 1 y β 1 después de 24 horas de inyección con LPS, mientras que el tratamiento con IL-1 β disminuye significativamente el mRNA de la subunidad α 1 de la sGC (Fig. 16 B y Tabla 3).

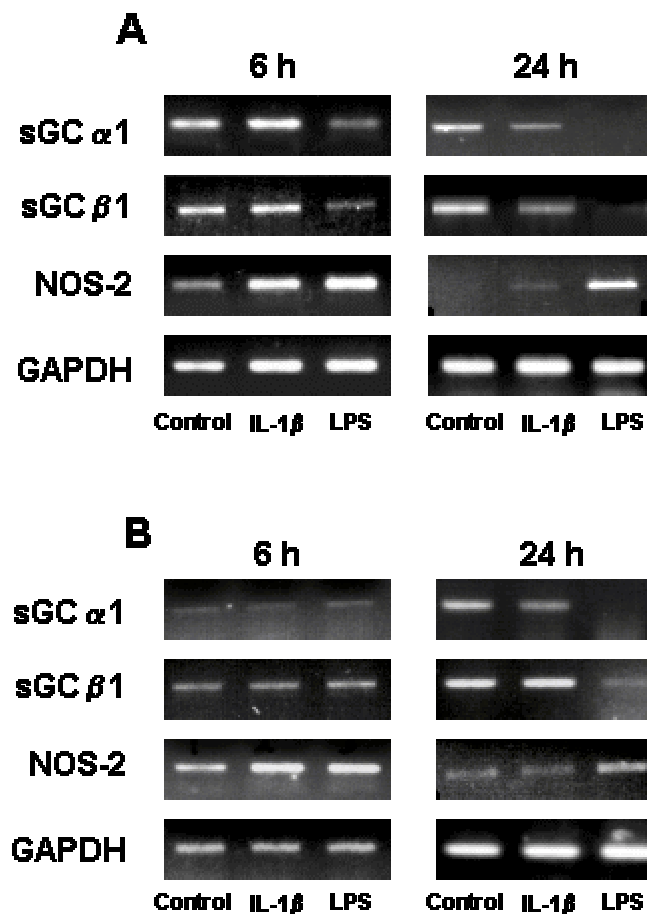


Figura 16. Efecto de la inyección intracraneal de IL-1 β y LPS sobre los niveles de mRNA de la NOS-2 y de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC. Las ratas fueron anestesiadas e inyectadas intracranealmente en el vermis cerebelar (A) o en el cortex frontal (B) con IL-1 β (5 μ g/ml) o LPS (5 mg/ml). Después de 6 o 24 horas fueron decapitadas y la zona inyectada fue separada, como se indica en Materiales y Métodos, y procesada para extracción de RNA y posterior RT-PCR. Los resultados son de un animal representativo de otros dos.

Tabla 3. Análisis densitométrico de la expresión de los mRNAs de las subunidades de la sGC en ratas inyectadas intracranealmente con IL-1 β o LPS

Tiempo después de la inyección	% DEL		CONTROL	
	6 h		24 h	
<u>Cerebelo</u>	α1	β1	α1	β1
IL-1 β	97.1 \pm 4.5	98.0 \pm 1.1	78.7 \pm 3.2*	73.5 \pm 5.4*
LPS	63.4 \pm 3.2**	45.2 \pm 2.2**	1.5 \pm 0.3**	7.9 \pm 0.8**
<u>Cortex</u>	α1	β1	α1	β1
IL-1 β	96.7 \pm 6.5	97.5 \pm 1.3	81.6 \pm 0.7*	94.6 \pm 9.4
LPS	98.3 \pm 3.2	99.0 \pm 3.5	9.7 \pm 1.9**	17.0 \pm 1.1**

Los resultados se expresan como % de cada subunidad con respecto al control previamente normalizado por los valores de GAPDH de cada tratamiento y son media \pm SEM de tres animales (*p< 0.05; **p<0.01 con respecto al control, test apareado de la *t* de Student)

3.2. Efecto del péptido β -amiloide (1-40)

3.2.1. Disminución de los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC en astrogía en cultivo

Datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que la exposición de astrocitos en cultivo primario durante periodos prolongados de tiempo (48 horas) a péptidos β -amiloide (A β) disminuye la actividad sGC y los niveles de la subunidad β 1 de la proteína enzimática (Baltrons y col., 2002). En este trabajo hemos examinado el efecto del tratamiento de astrocitos cerebelares con el péptido A β 1-40 agregado (20 μ M) sobre los niveles de mRNA de las subunidades de la sGC. Como se observa en la Fig. 17, el tratamiento disminuye el mRNA de las subunidades α 1 (40 %) y β 1 (44 %) de la sGC (Fig. 17).

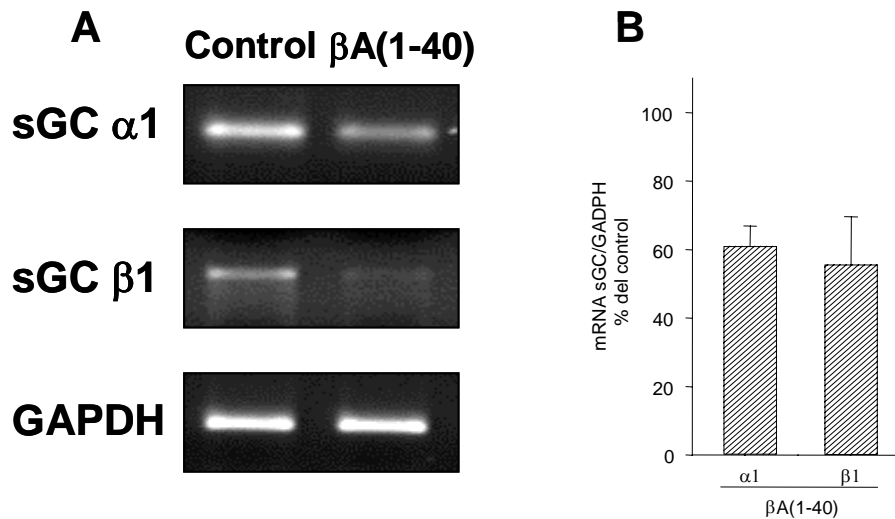


Figura 17. Efecto del péptido A β (1-40) sobre los niveles de mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC. Las células fueron tratadas durante 48 horas con el péptido A β (1-40) (20 μ M), previamente agregado (5 días a 37 $^{\circ}$ C). El RNA total fue extraído y procesado para RT-PCR. Los resultados del análisis densitométrico (B) se expresan como % de cada subunidad con respecto al control previamente normalizado por los valores de la GAPDH y son media \pm SEM de tres experimentos, como el presentado en A, realizados en preparaciones celulares diferentes.

3.2.2. Disminución de los mRNAs de las subunidades de la sGC en cerebro de rata adulta

La inyección i.c. de péptido A β (1-40) en estado agregado (0,5 μ g/ μ l) en cerebelo produce una disminución del mRNA de las subunidad β 1 de la sGC que se evidencia después de 24 horas (44.2 %) y se mantiene por lo menos hasta las 48 horas de tratamiento (30.4 %). Esta disminución en la subunidad β 1 se observa también en hipocampo 48 horas después de la inyección (32.6 %). Los niveles de mRNA la subunidad α 1 parecen no afectarse en respuesta a A β (1-40) (Fig. 18 y Tabla 3).

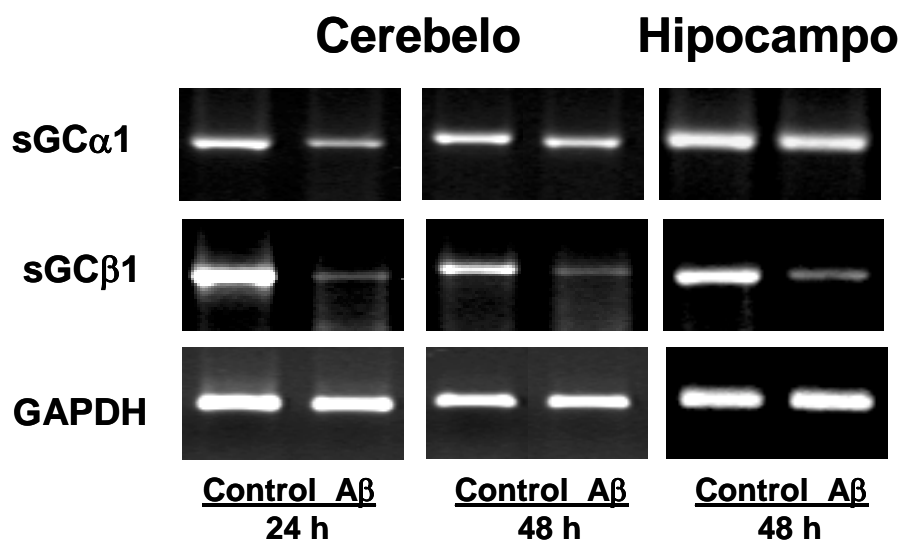


Figura 18. El péptido A β (1-40) inyectado intracranealmente disminuye el mRNA de la subunidad β 1 de la sGC. El péptido A β 1-40 (0.5 μ g/ml), previamente agregado (5 días a 37 °C), fue inyectado intracranealmente en el vermis cerebelar y en el hipocampo como se describe en Materiales y Métodos. Después de cada tiempo de tratamiento la zona inyectada fue procesada para extracción de RNA y posterior RT-PCR. El resultado es de un animal representativo de otros dos.

Tabla 3. Análisis densitométrico de la expresión de los mRNAs de las subunidades de la sGC en ratas inyectadas intracranealmente con A β 1-40

Tiempo después de la inyección de A β (1-40)	% DEL CONTROL			
	24 h		48 h	
<u>Cerebelo</u>	α 1	β 1	α 1	β 1
	90.8 \pm 16.1	55.8 \pm 8.9**	91.1 \pm 20.1	69.6 \pm 16.6*
<u>Hipocampo</u>	α 1	β 1	α 1	β 1
	ND	ND	90.5 \pm 6.4	67.4 \pm 12.6*

Los resultados se expresan como % de cada subunidad con respecto al control (ratas inyectadas con vehículo) previamente normalizado por los valores de GAPDH de cada tratamiento y son media \pm SEM de tres animales (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ con respecto al control, test apareado de la t -Student). ND: no determinado.

V. DISCUSIÓN

En los procesos inflamatorios del SNC causados por traumatismos, infecciones o enfermedades neurodegenerativas, los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α se encuentran elevados debido a su aumentada síntesis en las células gliales reactivas y en las células infiltradas del sistema inmunitario (Benveniste y Benos, 1995; Rothwell y Luheshi, 2000). Las citocinas proinflamatorias, a su vez, inducen en las células del SNC la expresión de NOS-2 provocando una producción elevada y sostenida de NO. En muchos estudios se han descrito los efectos neurotóxicos del NO cuando se produce en elevadas concentraciones (revisión en Murphy, 2000). Por el contrario, existen evidencias sobre el papel neuroprotector del cGMP, segundo mensajero fisiológico del NO (Rauhala y col., 1998; Pantazis y col., 1998). Se sabe muy poco sobre la regulación de la formación de cGMP dependiente de NO en células del SNC durante la neuroinflamación. En el presente trabajo se aportan evidencias que demuestran que agentes inflamatorios como las citocinas IL-1 β y TNF- α , el LPS y los péptidos A β regulan el metabolismo de cGMP en células astrogiales de rata en cultivo, así como en el cerebro de la rata adulta, indicando que durante la neuroinflamación la señalización vía NO-cGMP se encuentra alterada.

Efecto de la IL-1 β , el TNF- α y el INF- γ sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO

El tratamiento de astrocitos cerebelares en cultivo primario con IL-1 β produce una acumulación de nitritos en el medio extracelular como consecuencia de la inducción de NOS-2, efecto que se ve potenciado por el cotratamiento con INF- γ . La inducción de la expresión de NOS-2 por agentes inflamatorios como el LPS o combinaciones de citocinas ha sido ya descrita en astroglia en cultivo (Murphy y col., 1993; Hewett y col., 1993). También ha sido descrita la acumulación intracelular de cGMP como consecuencia de la activación de la sGC por el NO generado en células expuestas a LPS (Baltrons y García 1999). Sin embargo, en este trabajo no se ha observado una acumulación significativa de cGMP intracelular en respuesta al tratamiento con ninguna de las citocinas solas o en combinación, pero si se ha observado acumulación extracelular del nucleótido en respuesta a IL-1 β o a la combinación IL-1 β /INF- γ , tal como se discute más adelante.

Por otro lado, los resultados presentados demuestran que el tratamiento de astrocitos de cerebelo de rata por largos periodos de tiempo (mas de 3 horas) con IL-1 β o TNF- α disminuye la acumulación de cGMP producida en respuesta al donador de NO SNP, de forma dependiente del tiempo y de la concentración de citocina (máxima a 10 ng/ml). El INF- γ (10 ng/ml) también disminuye significativamente la acumulación de cGMP después de 20 horas de tratamiento, aunque en mucho menor medida que la IL-1 β y el TNF α . Contrariamente a lo que ocurre con la acumulación de nitritos, el INF- γ no potencia la inhibición de la acumulación de cGMP inducida por IL-1 β , sugiriendo la implicación de mecanismos diferentes en estos efectos.

El LPS y las citocinas proinflamatorias inducen liberación de citocinas y expresión de NOS-2 en las células microgliales (Chao y col., 1992; Zielasek y col., 1992; Boje y Arora, 1992), principales contaminantes en los cultivos primarios enriquecidos en astrogía de cerebro de rata (Agulló y col., 1995). Sin embargo, la microglía no parece contribuir a la disminución de la acumulación de cGMP inducida por IL-1 β . Este parece ser un efecto directo sobre las células astrogiales ya que no se ve alterado al disminuir la presencia de microglía mediante el tratamiento de los cultivos con cit-ara (Agulló y col., 1995). Nuestros resultados también demuestran que el efecto de la IL-1 β no es específico de astrocitos cerebelares ya que en astrocitos provenientes de cortex cerebral e hipocampo también se observa una disminuida acumulación de cGMP. Sin embargo, en neuronas granulares de cerebelo, células que también responden a citocinas proinflamatorias, por ejemplo con la inducción de NOS-2 (Minc-Golomb y col., 1994; Sato y col., 1995), no se observa una disminución significativa de la acumulación de cGMP en respuesta a ninguna de las citocinas, indicando que al menos en esta población neuronal, el metabolismo del cGMP se regula de diferente manera que en astrocitos.

Estimulación por IL-1 β de la salida de cGMP al medio extracelular.

Al analizar el medio de incubación de astrocitos tratados con IL-1 β se detectó una notable acumulación extracelular de cGMP que aumentaba linealmente durante el tiempo de tratamiento y era dependiente de la concentración de la citocina. La salida del cGMP se bloqueaba al inhibir las

actividades NOS y sGC, indicando que se trataba de cGMP formado por la sGC en respuesta al NO producido tras la inducción de la NOS-2. En contraste, en células tratadas con LPS, potente inductor de NOS-2, se produce una elevada acumulación intracelular de cGMP, pero no hay acumulación del nucleótido en el medio extracelular. Sin embargo, cuando las células son cotratadas con IL-1 β , parte del cGMP acumulado intracelularmente en respuesta a LPS sale al medio extracelular. Igualmente, en células pretratadas con IL-1 β y estimuladas de forma aguda con SNP se observa una mayor proporción del cGMP formado en el medio extracelular en comparación con células no tratadas. Estos datos demuestran por primera vez que la IL-1 β estimula la salida del cGMP en la astrogliá.

Desde que se descubrió en la orina (Ashman y col., 1963), se sabe que el cGMP sale al medio extracelular en diferentes tejidos, incluido el nervioso (Tjörnhmmar y col., 1986; Vallebuona y Raiteri, 1993), pero se conoce muy poco acerca de la regulación de su salida. Se ha descrito que el cGMP producido por activación de la pGC en células de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, sale de las células en contra de un gradiente de hasta 7 ordenes de magnitud y que esta salida es bloqueada por el inhibidor de transportadores de aniones orgánicos probenecid (Hamet y col., 1989). Inhibidores de estos transportadores también inhiben la salida del cGMP formado tras la estimulación con péptidos natriuréticos en astrocitos corticales (Touyz y col. 1997) o la inducida por IL-1 β en este trabajo. En este último caso, el transporte requiere la integridad del gradiente de Na⁺ lo cual sugiere que depende de energía. Estas características también las presenta el transportador de alta afinidad para el cGMP de eritrocitos humanos (Schultz y col., 1998; Sundkvist y col., 2002). Recientemente, se ha descrito que uno de los transportadores de aniones orgánicos perteneciente a la familia de las *multidrug resistance proteins* (MRPs), la MRP5, presenta elevada afinidad por el cGMP (Jedlitschky y col., 2000). Este transportador se expresa en astrogliá (Hirrlinger y col., 2002), así pues, la salida del cGMP estimulada por IL-1 β observada en este trabajo podría estar mediada por dicha MRP y sería interesante investigar si la citocina aumenta su actividad.

En muchos estudios se ha interpretado la acumulación extracelular de cGMP, como un mecanismo que junto a la acción de las PDEs retornaría el cGMP intracelular a niveles basales tras la estimulación de su síntesis. Sin

embargo, diversas evidencias indican que el cGMP podría regular actividades celulares mediante la interacción con sitios de unión extracelulares en proteínas de membrana. Por ejemplo, en neuronas granulares de cerebelo se ha demostrado que el cGMP extracelular inhibe respuestas celulares mediadas por receptores de kainato (Pouloupoulou y Nowak, 1998) y protege de la toxicidad inducida por glutamato (Montoliu y col., 1999). En astrocitos corticales, el cGMP extracelular induce la acidificación del medio intracelular al inhibir la actividad de un intercambiador de Na^+/H^+ (Touyz y col., 1997), lo cual podría afectar funciones astrogliales tan relevantes como el mantenimiento de la concentración extracelular de potasio.

Mecanismo de la disminución de la acumulación de cGMP dependiente de NO inducida por IL-1 β .

La acumulación intracelular de cGMP en células estimuladas con NO depende de la velocidad de su síntesis por parte de la sGC, de su degradación por parte de las PDEs o de su salida al medio extracelular. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la salida de cGMP inducida por IL-1 β no es responsable de la disminución de la acumulación intracelular del nucleótido formado en respuesta a SNP, ya que al bloquear el supuesto transportador de cGMP, usando probenecid o verapamil o depletando el medio extracelular de Na^+ , no se restituyen los niveles intracelulares del nucleótido.

Estudios de diferentes autores han demostrado actividad PDE en células gliales (De Vente y Steinbusch, 2000). En resultados previos de nuestro grupo, utilizando inhibidores específicos, se demostró una actividad PDE dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (PDE1) capaz de hidrolizar cGMP tanto en neuronas, como en astrocitos cerebelares en cultivo (Agulló y García, 1997; Baltrons et al. 1997). Otros autores, utilizando células de cerebelo de ratas de una semana en suspensión, han descrito la implicación de las PDEs independientes de Ca^{2+} , PDE5 y en menor medida de la PDE4, en la hidrólisis del cGMP (Bellamy y Garthwaite 2001). En este trabajo, el hecho de que la disminución en la acumulación de cGMP en células tratadas con IL-1 β se observara en presencia de un inhibidor inespecífico de PDEs, el IBMX (1 mM), sugería que no era debido a un aumento en dicha actividad. De acuerdo con estos resultados, la determinación de la actividad PDE en extractos celulares demostró que ni la

actividad PDE dependiente, ni la independiente de Ca^{2+} eran afectadas por el tratamiento con IL-1 β , lo que está de acuerdo con que la disminución de la acumulación de cGMP causada por esta citocina se debe a una disminuida síntesis.

El tratamiento con IL-1 β disminuye la actividad enzimática sGC, efecto que se correlaciona con una disminución de los niveles de proteína sGC analizados por *western blot*, usando un anticuerpo que en extractos de nuestras células reconoce la subunidad $\beta 1$ del enzima. La disminución en la subunidad $\beta 1$ de la proteína enzimática, podría explicar la disminuida actividad sGC causada por el tratamiento con IL-1 β , ya que esta subunidad forma parte de los heterodímeros catalíticamente activos $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$. Estos dos heterodímeros presentan una actividad enzimática similar y son las isoformas más abundantes y extendidas en cuanto a su distribución en los diferentes tejidos (revisión en Koesling y Friebe, 1999). En estudios previos del laboratorio donde se realizó esta tesis doctoral se describió un efecto similar sobre la actividad sGC y los niveles de la subunidad $\beta 1$ en respuesta al tratamiento con LPS (Baltrons y García, 1999). Ya que este agente inflamatorio es capaz de inducir la expresión de citocinas proinflamatorias en varios tipos celulares (Lieberman y col., 1989; Chung y Benveniste, 1990), se podría pensar en la mediación por IL-1 β de su efecto sobre la formación de cGMP. Sin embargo, en trabajos realizados en el laboratorio con la colaboración de M. A. Baltrons (Pedraza y col. En revisión), hemos observado que mientras la acumulación de nitritos inducida por LPS es parcialmente bloqueada por el antagonista del receptor de la citocina (IL-1ra), la disminución de la acumulación de cGMP prácticamente no se ve afectada, lo que indica que este último efecto del LPS no es mediado por IL-1 β . También se ha observado que la disminución de la subunidad $\beta 1$ en células tratadas con IL-1 β o LPS es más rápida que en células tratadas con cicloheximida, lo que sugiere que después de 20 horas de tratamiento, los mencionados agentes inflamatorios aumentan la velocidad de degradación del enzima (Pedraza y col., enviado). Por otro lado, resultados previos sobre el efecto del LPS (Baltrons y García, 1999) y los péptidos βA (Baltrons y col., 2002) y los presentados en este trabajo con la IL-1 β , demuestran que la inducción de la disminución en la formación de cGMP es dependiente de transcripción y síntesis de proteínas, lo que indica que estos agentes inducen la expresión de una proteína involucrada de manera directa o indirecta en aumentar la velocidad de degradación de la sGC. Es probable que la

proteasa implicada en la degradación de la sGC sea una serina-proteasa tal como lo sugiere la inhibición por TPCK.

Diferentes estudios describen la participación del NO en la regulación de la actividad y expresión de la sGC en varios tipos celulares. (Ujie y col., 1994; Papapetropoulos col., 1996a; Filippov y col., 1997; Tsuchida y col., 1994; Liu y col., 1997). Muchos de esos estudios se han llevado a cabo en células de músculo liso vascular, en las que la incubación prolongada con donadores de NO disminuye la actividad, la proteína y el mRNA de las subunidades de la sGC, lo cual se ha sugerido como un mecanismo que podría participar en el desarrollo de tolerancia a los nitrovasodilatadores (Papapetropoulos col., 1996a; Tsuchida y col., 1994). Resultados recientes de nuestro grupo, demuestran que en astrocitos en cultivo, la exposición a donadores de NO también desensibiliza la actividad sGC. A tiempos de exposición de hasta 2 horas, el efecto es revertido por agentes reductores con grupos tiol, sin embargo después de 20 horas de tratamiento la disminución en la actividad sGC va acompañada de una ligera disminución en el nivel de la subunidad $\beta 1$ y una disminución más pronunciada en el nivel de mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ del enzima (Sardon y col., 2001., en preparación). Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores en células cromafines bovinas (Ferrero y col., 2002) y en células intersticiales de médula de rata (Ujie y col., 1994).

Los estudios sobre los efectos del NO administrado exógenamente sugerían la posibilidad de que el aumento de los niveles de NO producido endógenamente tras la inducción de la NOS-2 en respuesta a la exposición a agentes inflamatorios, podría estar implicado en la disminución de la sGC provocada por dichos agentes. De hecho, en investigaciones realizadas en células de músculo liso vascular expuestas a IL-1 β o LPS se ha descrito una disminución de la acumulación de cGMP que es total o parcialmente dependiente de NO (Papapetropoulos y col., 1996b; Tsuchida y col., 1994). Sin embargo, en astrocitos, a pesar de que se forma NO en respuesta a IL-1 β , la disminución de la actividad y proteína de la sGC inducida por la citocina después de 20 horas tratamiento, es independiente del NO generado ya que el inhibidor de NOS, L-NMMA o el inhibidor de la inducción de NOS-2, dexametasona, que bloquean completamente la formación de nitritos, no impiden la disminución de los niveles de cGMP. Resultados similares fueron obtenidos en investigaciones

previas de nuestro grupo sobre la disminución de sGC inducida por tratamiento de astrocitos con LPS o β A (Baltrons y García, 1999; Baltrons y col., 2002).

El tratamiento de los astrocitos durante 20 horas con IL-1 β , LPS o β A también provocó una disminución el nivel de mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC. En este caso, a diferencia de lo que ocurre con la disminución en la proteína, si parece estar implicado el NO ya que el efecto es revertido por el inhibidor de NOS L-NMMA, por el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida y por un inhibidor de la translocación al núcleo del NF- κ B (PDTC), factor de transcripción implicado en la inducción de la NOS-2. La disminución del nivel de los mRNA, no es responsable de la disminución de la proteína sGC observado a las 20 horas de tratamiento con IL-1 β o LPS, ya que durante ese tiempo el tratamiento de las células con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida, no produce una disminución significativa de la subunidad β 1 de la sGC (Pedraza y col., en revisión). Esta observación está de acuerdo con que la SGC es una proteína de vida media larga (Shimouchi y col., 1993; Papapetropoulos y col., 1995) y sugiere que la disminución en los niveles de mRNA contribuiría a la disminución en la proteína enzimática a tiempos más largos de tratamiento con los agentes inflamatorios. Por otro lado, ese efecto podría explicar resultados previos de nuestro laboratorio, en los que se demostró que astrocitos que habían sido tratados durante 20 horas con LPS, una vez eliminado este agente, requerían una semana para la recuperación total de la capacidad de sintetizar cGMP (Baltrons y García, 1999). En el esquema 3, se representan los dos mecanismos a través de los cuales la IL-1 β y el LPS pueden disminuir la actividad sGC en células astrogiales, la disminución inicial de la vida media del enzima de manera independiente de NO pero dependiente de transcripción y síntesis de proteínas y la disminución a más largo plazo del mRNA de las subunidades α 1 y β 1 del enzima de forma dependiente de NO.

Recientemente se ha descrito que inhibidores de la PKG impiden parcialmente la disminución de la subunidad β 1 de la sGC en células cromafines bovinas expuestas a donadores de NO (Ferrero y col., 2002). También se ha implicado a la PKA en la disminución de la sGC en células de músculo liso vascular (Papapetropoulos y col., 1995; Papapetropoulos y col., 1996a). En astrocitos, la disminución de la formación de cGMP inducida IL-1 β no es prevenida por el cotratamiento con inhibidores de PKG, PKA o Ca²⁺/CamPK. Sin

embargo, resultados de este trabajo y de estudios complementarios, indican la implicación de MAPKs en el efecto tanto de la IL-1 β como del LPS, aunque con algunas diferencias. Los inhibidores de ERK1/2 (U0126 10 μ M) o de p38 (SB202190 5 μ M) bloquean tanto la acumulación de nitritos como la disminución de la formación de cGMP inducidas por IL-1 β independientemente, indicando la implicación de las dos vías en la inducción de NOS-2 y la disminución de la sGC. Mientras que en el caso del LPS, la acumulación de nitritos es bloqueada sólo por SB202190 indicando la participación de la p38 en la inducción de la NOS-2, pero es necesaria la presencia de los dos inhibidores para restablecer los niveles de cGMP (Pedraza y col., en revisión). El efecto de la IL-1 β es mediado por su receptor de tipo I (IL-1RI) el cual pertenece a la familia de receptores "Toll-like" (TLRs), al igual que el receptor de LPS TLR4, y en ambos casos las MAPKs están implicadas en las vías de señalización (O'Neal y Dinarello, 2000).

Efecto de la inyección intracraneal de los agentes inflamatorios IL-1 β , LPS y péptidos A β en ratas adultas

Para determinar si el efecto de los agentes inflamatorios sobre la expresión de la sGC observado en células en cultivo, se produce también *in vivo*, realizamos inyecciones intracraneales de los agentes inflamatorios y analizamos los niveles de mRNA de la NOS-2 y de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC tras 6 y 24 horas de tratamiento con IL-1 β y LPS y 24 y 48 horas de tratamiento con péptido β A. La inyección intracraneal de los agentes inflamatorios utilizados en este estudio reproduce las características de la neuroinflamación que se presenta en infecciones bacterianas o enfermedades neurodegenerativas tal como se ha establecido en investigaciones de diferentes autores, en los que se ha utilizado este sistema como modelo de neuroinflamación y en los que se ha descrito, por ejemplo, la inducción de la expresión de NOS-2 en respuesta a la inyección de IL-1 β (Lopez-Figueroa, y col., 2000), o en respuesta a LPS e INF- γ (Heneka y col., 2000). Nuestros resultados demuestran que la inducción de la expresión de NOS-2 tras la inyección de IL-1 β o LPS es evidente después de 6 horas de tratamiento, y decae después de las 24 horas, aunque a ese tiempo aun se observa una aumentada expresión con respecto a las ratas inyectadas con vehículo (control). Esta cinética concuerda con la inducción de la expresión de NOS-2, descrita por Lopez-Figueroa y col. (2000), tras la inyección

intracraneal de IL-1 β y en astrocitos en cultivo en respuesta al tratamiento con citocinas y LPS descrito por diferentes autores (Hewett y col., 1993; Simmons y Murphy, 1993). Por el contrario, la disminución del mRNA de las subunidades de la sGC es patente a las 6 horas sólo en respuesta a LPS, mientras que a las 24 horas se observa una mayor disminución y también el tratamiento con IL-1 β es efectivo. Aunque se desconoce si la disminución del nivel de los mRNAs de las subunidades de la sGC en el cerebro del animal adulto es dependiente de NO, estos resultados indican que el efecto sobre la sGC es mas lento y por tanto, compatible con una implicación del NO generado por la temprana inducción de la NOS-2.

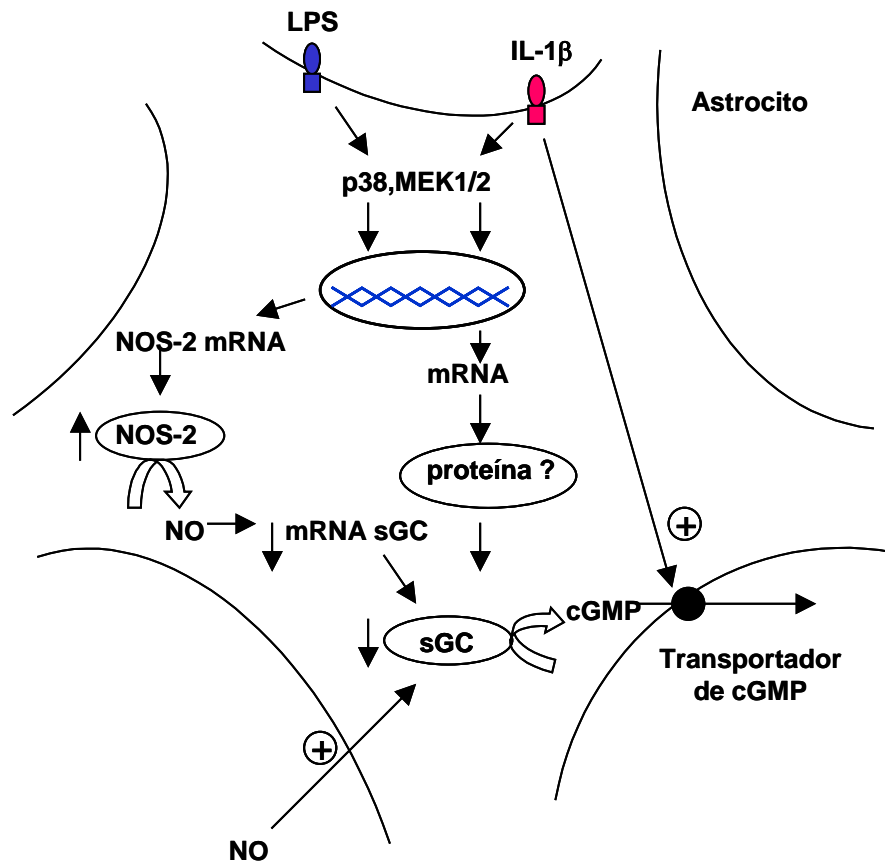
Paralelamente se analizaron los niveles de proteína sGC, en el tejido cerebelar tras 24 horas de la inyección intracraneal con IL-1 β o LPS, mediante *western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce mayoritariamente la subunidad β 1 del enzima. En esos experimentos, realizados por M. A. Baltrons, se observó que la disminución del mRNA de las subunidades de la sGC se corresponde con una disminución de la subunidad β 1 de la proteína sGC (Pedraza y col., en revisión) sugiriendo que también en el tejido cerebral adulto los heterodímeros de la sGC que contienen esta subunidad se encuentran disminuidos en presencia de los agentes inflamatorios estudiados.

En nuestros resultados parece más evidente el efecto de la inyección de LPS y la IL-1 β sobre el mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC y de la NOS-2 en tejido proveniente de cerebelo que en el obtenido a partir de cortex frontal. Es probable que esta diferencia se deba a que la zona del cortex frontal que se selecciona para la extracción de RNA total y posterior RT-PCR es de mayor tamaño que la de cerebelo, lo que hace que la cantidad de células que entran en contacto con el agente sea más pequeña y la disminución del mRNA de las subunidades de la sGC sea menor. También existen variables no controlables como la difusión de la solución en una u otra región.

También se observa una disminución del nivel del mRNA de la subunidad β 1 de la sGC en vermis cerebelar y en hipocampo de ratas adultas inyectadas con el péptido A β 1-40 agregado. Este efecto es evidente después de 24 horas de tratamiento y se mantiene hasta al menos 48 horas. Sin embargo, los niveles de la subunidad α 1 no disminuyen significativamente. No tenemos, de momento

ninguna explicación para este hecho y hacen falta mas datos para saber si hay una regulación diferencial del mRNA de las dos subunidades por este agente. También desconocemos si el efecto del A β 1-40 es directo o mediado por la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β que ocurriría como consecuencia del tratamiento. En cualquier caso, la disminución de la subunidad β 1 haría disminuir los niveles de los heterodímeros de la sGC que contienen esta subunidad y por tanto la señalización vía NO/cGMP en la zona afectada por los depósitos de A β 1-40. A este respecto, es importante reseñar que se ha descrito que la actividad sGC está disminuida en el lóbulo temporal de pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Bonkale y col., 1995).

Muchas de las importantes acciones del NO en el SNC son mediadas por la activación de la sGC y la consecuente producción de cGMP. Este nucleótido ha sido implicado en la regulación por NO de la liberación y recaptación de neurotransmisores, de procesos de plasticidad sináptica potencialmente implicados en la formación de la memoria, en la diferenciación neuronal, la secreción neuroendocrina y el procesamiento sensorial (revisiones en Garthwaite y Boulton 1995; Zhang y Snyder, 1995). El hecho de la importancia fisiológica de este segundo mensajero hace necesario que su concentración intracelular y extracelular, esté altamente controlada. Una disminución de la sGC durante los procesos neuroinflamatorios impediría una excesiva señalización por cGMP ante una elevada producción de NO en las células del SNC o en célula del sistema inmunitario infiltradas. Alternativamente, una formación de cGMP disminuida podría contribuir al proceso neurodegenerativo.



Esquema 3. Representación del efecto de la IL-1 β y el LPS sobre la acumulación de cGMP dependiente de NO en células astrogiales

VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de astrogliía de rata en cultivo con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α produce una disminución de la acumulación de cGMP en respuesta donadores de NO, que es dependiente del tiempo y de la concentración de las citocinas. El INF- γ también induce una disminución de la acumulación de cGMP, pero en menor medida que la IL-1 β y el TNF- α y no potencia el efecto de éstas. Estos efectos no son observados en neuronas granulares de cerebelo.
2. En las células astrogliales, la IL-1 β induce la actividad NO sintasa y la estimulación de la sGC por el NO formado, pero el cGMP producido se acumula en el medio extracelular y no en el intracelular. La salida del cGMP en células tratadas con la IL-1 β parece producirse mediante un transportador sensible a inhibidores de transportadores de aniones orgánicos y dependiente del gradiente de Na⁺. La salida del cGMP al medio extracelular inducida por IL-1 β no es responsable de la disminuida acumulación intracelular del nucleótido causada por el tratamiento con la citocina.
3. La disminución de la acumulación de cGMP dependiente de NO que se produce en células tratadas con IL-1 β no es debida a la estimulación de la salida del nucleótido, ni a un aumento en la actividad cGMP fosfodiesterasa, sino a una disminución de la actividad sGC que parece ser consecuencia de la disminución de al menos una de las subunidades de la sGC, la β 1.
4. El efecto de la IL-1 β sobre la sGC está mediado por el receptor de tipo I, requiere actividad MAPK del tipo ERK 1/2 y p38 y transcripción y síntesis de proteínas, pero es independiente de la inducción de la NOS.
5. El tratamiento de astrocitos de rata en cultivo con IL-1 β o con otros agentes inflamatorios como el LPS o el A β 1-40, que también inducen disminución de la sGC de forma independiente de NO, produce la disminución del nivel de mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la

sGC. Al menos en el caso de la IL-1 β y el LPS ésta disminución es dependiente de NO y no parece ser responsable de la bajada de la proteína durante las primeras 20 horas del tratamiento.

6. La inyección intracraneal de IL-1 β y LPS produce una disminución del nivel de mRNA de las subunidades α 1 y β 1 de la sGC en corteza y cerebelo de la rata adulta. La inyección del A β 1-40 agregado también produce una disminución del mRNA de la subunidad β 1 en cerebelo e hipocampo. Estos resultados indican que la señalización vía NO/cGMP se encontrará alterada durante la neuroinflamación asociada a infecciones y a enfermedades neurodegenerativas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agulló L, Baltrons M, García A.** (1995) Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Res.* **686**, 160-168.
- Agullo L, Garcia A.** (1997) Ca²⁺/calmodulin-dependent cyclic GMP phosphodiesterase activity in granule neurons and astrocytes from rat cerebellum. *Eur. J. Pharmacol.* **323**, 119-25
- Alderton W, Cooper C, Knowles R.** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593-615.
- Aloisi F.** (2001) Immune function of microglia. *Glia.* **36**:165-79
- Andreeva S, Dikkes P, Epstein P, Rosenberg P.** (2001) Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *J Neurosci.* **21**, 9068-76
- Ariano M, Lewicki A, Brandwein H, Murad F.** (1982) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 1316-1320
- Ashman D, Lipton R, Melicow M, Price T.** (1963) Detection of cyclic nucleotides in urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 330-334
- Baltrons M, Saadoun S, Agullo L, Garcia A.** (1997) Regulation by calcium of the nitric oxide/cyclic GMP system in cerebellar granule cells and astroglia in culture. *J Neurosci Res.* **49**, 333-41
- Baltrons M, García A.** (1999) Nitric oxide-independent down-regulation of soluble guanylyl cyclase by bacterial endotoxine in astroglial cells. *J. Neuroch.* **73**, 2149-2157
- Baltrons M, García, A.** (2001) The nitric oxide/ cyclic GMP system in astroglial cells, in *Progress in Brain Res.*, (Castellano B. and Nieto-Sampedro M., eds). pp. 335-347. Elsevier Science.
- Baltrons M, Pedraza C, García A.** (2002) β -Amyloid peptides decrease soluble guanylyl cyclase expression in astroglial cells. *Neurobiol. Dis.* **10**, 138-149
- Beavo J.** (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* **75**, 725-48
- Bellamy T, Garthwaite J.** (2001) "cAMP-specific" phosphodiesterase contributes to cGMP degradation in cerebellar cells exposed to nitric oxide. *Mol Pharmacol.* **59**, 54-61
- Bellamy T, Wood J, Goodwin D, Garthwaite J.** (2000) Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 2928-2933.
- Benveniste N, Benos J.** (1995) TNF- α - and IFN- γ -mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J.* **9**, 1577-84
- Benveniste EN.** (1997) Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.* **69**, 31-75
- Benveniste EN.** (1998) Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 259-75
- Billiar T, Curran R, Harbrecht B, Stadler J, Williams D, Ochoa J, Di Silvio M, Simmons R, Murray S.** (1992) Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol.* **262**, C1077-82
- Bö L, Dawson T, Wesselingh S, Mork S, Choi S, Kong P, Hanley D, Trapp B.** (1994) Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann. Neurol.* **36**, 778-786.
- Boje M, Arora P.** (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587**, 250-256.
- Bonkale W, Winblad B, Ravid R, Cowburn R.** (1995) Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **187**, 5-8
- Bredt D, Glatt C, Hwang P, Fotuhi M, Dawson T, Snyder S.** (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* **7**: 615-624.
- Bredt DS, Snyder SH.** (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**, 682-5
- Brooker G, Harper J, Terasaki W, Moylan R.** (1979) Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10**, 1-33.
- Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K.** (1999) Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun.* **263** (3):696-701
- Colasanti M, Persichini T, Di Pucchio, T, Gremo F, Lauro G.** (1995) Human ramified microglial cells produce nitric oxide upon Escherichia coli lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha stimulation. *Neurosci. Lett.* **200**, 144-6
- Corbalan R, Chatauret N, Behrends S, Butterworth R, Felipo V.** (2002) Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology.* **36**, 1155-62
- Chao C, Hu S, Molitor T, Shaskan E, Peterson P.** (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* **149**, 2736-2741.
- Charles I, Palmer R, Hickery M, Bayliss M, Chubb A, Hall V, Moss D, Moncada S.** (1993) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 11419-23
- Chung I, Benveniste E.** (1990) Tumor necrosis factor- α production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN- γ , and IL-1 β . *J Immunol.* **144**, 2999-3007
- Davis J, Vo X, Sulakhe P.** (1997) Altered responsiveness of soluble guanylyl cyclase to nitric oxide following treatment of cardiomyocytes with S-nitrosoD, L-acetylpenicillamine and sodium nitroprusside. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* **238**, 351-356
- De Vente J, Steinbusch H.** (1992) On the stimulation of soluble and particulate guanylate cyclase in the rat brain and the involvement of nitric oxide as studied by cGMP immuno-cytochemistry. *Acta Histochem.* **92**, 13-38

- De Vente J, Steinbusch H.** (2000) Nitric oxide-cGMP signaling in the rat brain. In handbook of chemical neuroanatomy (Steinbusch H.W.M., De Vente J, and Vincent S, eds), pp. 355-415. Elsevier Science, SV.
- Deinum G, Stone JR, Babcock GT, Marletta MA.** (1996) Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with Resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*. **35**, 1540-7
- Denninger J, Marletta M.** (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*. **1411**, 334-350.
- Dinerman J, Dawson T, Schell M, Snowman A, Snyder S.** (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci*. **91**, 4214-8
- Ding M, St Pierre B, Parkinson J, Medberry P, Wong J, Rogers N, Ignarro L, Merrill J.** (1997) Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. A kinetic analysis. *J Biol Chem*. **272**, 11327-35
- Dong Y, Benveniste EN.** (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*. **36**, 180-90
- Endoh M, Maiese K, Wagner J.** (1994) Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*. **651**, 92-100
- Ferrero R, Rodríguez-Pascual F, Miras-Portugal M, Torres M.** (2000) Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Activity Inhibition Through Cyclic GMP-Dependent Dephosphorylation. *J. Neurochem*. **75**, 2029-2039
- Ferrero R, Torres M.** (2002) Prolonged exposure of chromaffin cells to nitric oxide down-regulates the activity of soluble guanylyl cyclase and corresponding mRNA and protein levels. *BCM Biochem*. **3**, 26
- Filippov G, Bloch D, Bloch K.** (1997) Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Clin. Invest*. **100**: 942-948.
- Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D.** (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of α_1 and β_1 subunits. *Eur. J. Biochem*. **240**, 380-386.
- Förstermann U, Closs E, Pollock J, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H.** (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. **23**, 1121-31.
- Förstermann U, Kleinert H.** (1995) Nitric oxide synthase: expression and expression control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's arch. Pharmacol*. **356**, 351-364.
- Furuyama T, Inagaki S, Takagi H.** (1993) Localizations of α_1 and β subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Mol. Brain Res*. **20**, 335-344.
- Furuyama T, Iwahashi Y, Tano Y, Takagi H, Inagaki S.** (1994) Localization of 63-kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase mRNA in the rat brain by in situ hybridization and histochemistry. *Brain Res. Mol. Brain Res*. **26**, 331-336.
- Garbers D.** (1999) The guanylyl cyclase receptors. *Methods*. **19**, 477-484
- García A, Baltrons M.** The nitric oxide/cyclic GMP pathway in CNS glial cells. (en prensa)
- Garthwaite J., Boulton C. L.** (1995) Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol*. **57**: 683-706.
- Geller D, Di Silvio M, Nussler A, Wang S, Shapiro R, Simmons R, Billiar T.** (1993) Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes in vivo during hepatic inflammation. *J Surg Res*. **55**, 427-32
- Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G.** (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett*. **132**: 71-74.
- Gibb B, Garthwaite J.** (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur. J. Neurosci*. **13**, 539-544.
- Giri S, Jatana M, Rattan R, Won J, Singh I, Singh A.** (2002) Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine mediated inducible nitric oxide synthases via AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe's disease. *FASEB J*. **16**, 661-672
- Grzybicki D, Kwack K, Perlman S, Murphy S.** (1997) Nitric oxide synthase II expression by different cell types in MHV-JHM encephalitis suggests distinct roles for nitric oxide in acute versus persistent virus infection. *J. Neuroimmunol*. **73**, 15-27.
- Grzybicki D, Moore S, Schelper R, Glabinski A, Ransohoff R, Murphy S.** (1998) Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and nitric oxide synthase-2 following cerebral trauma. *Acta Neuropathol*. **95**, 98-103
- Gupta G, Azam M, Yang L, Danzyger R.** (1997) The β_2 subunit inhibits stimulation of the α_1/β_1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J. Clin. Invest*. **100**, 1488-1492.
- Hamet P, Pang S, Tremblay J.** (1989) Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem*. **264**, 12364-9
- Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G.** (1991) Molecular cloning and expression of a new α -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the α -subunits of the enzyme. *FEBS Lett*. **292**, 217-222.
- Heneka M, Dumitrescu L, Loschmann PA, Wullner U, Klockgether T.** (2000) Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Chem Neuroanat*. **18**, 167-79
- Heneka M. T., Feinstein D. L.** (2001) Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J. Neuroimmunol*. **114**, 8-18.
- Hermans G, Stinissen P, Hauben L, Van Der Verg- loonen E, Raus J, Zheng JT.** (1997) Cytokine of myelin basic protein reactive T cells in multiple sclerosis and healthy individuals. *An Neurol*. **42**, 18-27
- Heuze-Joubert I, Mennecier P, Simonet S, Laubie M, Verbeuren TJ.** (1992) Effect of vasodilators, including

- nitric oxide, on the release of cGMP and cAMP in the isolated perfused rat kidney. *Eur J Pharmacol.* **220**, 161-71
- Hewett S. J., Corbett J. A., McDaniel M. L., Choi D.W.** (1993) Interferon- γ and interleukin-1 β induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.* **164**, 229-232
- Hirrlinger J, König J, Dringen R.** (2002) Expression of mRNAs of multidrug-resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J. Neurochem.* **82**, 716-719.
- Hu J, Akama K, Krafft G, Chromy B, Van Eldik L.** (1998) Amyloid- β peptide activates culture astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res.* **785**, 195-206
- Hu S, Sheng W, Peterson P, Chao C.** (1995) Differential regulation by cytokines of human astrocyte nitric oxide production. *Glia.* **15**, 491-4
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouattprigent A, Agid Y, Hirsch E.** (1996) Nitric oxide synthase and neural vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* **72**, 355-363.
- Ibarra C, Nedvetsky PI, Gerlach M, Riederer P, Schmidt HH.** (2001) Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain. *Brain Res.* **907**, 54-60
- Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, Chaudhuri G.** (1987) Endothelium-derived relaxin factor produced and released from artery and vein in nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 9265-9269
- Ignarro L, Ignarro L, Cirino G, Casini A, Napoli C.** (1998) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* **34**, 879-86
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D.** (2000) The multidrug resistance 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **275**, 30069-30074.
- Kapoor C, Krishna G.** (1977) Hormone-induced cyclic guanosin monophosphate secretion from guinea pig pancreatic lobules. *Science.* **196**, 1003-1005.
- Kaupp UB.** (1995) Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* **5**, 434-42
- Keilhoff G, Seidel B, Wolf G.** (1998) Absence of nitric oxide synthase in rat oligodendrocytes: a light and electron microscopy study. *Acta Histochem.* **100**, 409-417
- Kinkaid R, Balaban C, Billingsley M.** (1987) Differential localization of calmodulin-dependent enzymes in rat brain: evidence for selective expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase in specific neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 1118-1122.
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hirsch K, Mulsch A, Bohme E, Schultz G, Frank R.** (1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* **239**, 29-34.
- Koesling D, Harteneck C, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, Bohme E.** (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* **266**, 128-32.
- Koesling D, Bohme E, Schultz G.** (1991) Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* **5**, 2785-2791.
- Koesling D.** (1999) Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods.* **19**, 485-493
- Koesling D, Friebe A.** (1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**, 41-65.
- Koglin M, Vehse K, Budaeus L, Scholz H, Behrends S.** (2001) Nitric oxide activates the β 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 30737-30746.
- Kotera J, Yanaka N, Fujishige K, Imai Y, Akatsuka H, Ishizuka T, Kawashima K, Omori K.** (1997) Expression of rat cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal cerebral development. *Euro. J. Biochem.* **249**, 434-442.
- Krueger J, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J.** (1998) Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci. USA.* **856**, 148-59
- Kugler P, Drenckhahn D.** (1996) Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia.* **16**, 165-73
- Lander H, Millbank A, Tauras J, Hajjar D, Hempstead B, Schwartz G, Kraemer R, Mirza U, Chait B, Burk S, Quilliam L.** (1996) Redox regulation of cell signaling. *Nature.* **381**, 380-381.
- Lawson D, Stevenson C, Andrew C, Eady R.** (2000) Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *EMBO J.* **19**, 5661-5671.
- Lieberman A, Pitha M, Shin S, Shin L.** (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 6348-6352.
- Lipton S, Rayudu P, Choi Y, Sucher N, Vincent Chen H.** (1998). Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res.* **118**, 73-82.
- Liu B, Neufeld A.** (2000) Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes in the human glaucomatous nerve head. *Glia.* **30**, 178-186
- Liu J, Zhao M, Brosnan C, Lee S.** (1996) Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: Role of IL-1 beta and IL-1 antagonists. *J. Immunol.* **157**, 3569-3576
- Liu H, Force T, Bloch K.** (1997) Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 6038-6043.
- Lohil A, Campbell I, Murphy S.** (1999) The expression of NOS-2 following permanent focal ischemia and the role of NO in infarct generation in male, female and NOS-2 deficient mice. *Brain Research.* **830**, 155-164
- Lopez-Figueroa M., Day H., Lee S., Rivier C., Akil H., Watson S.** (2000) Temporal and anatomical distribution of nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production during central nervous system inflammation. *Brain Res.* **852**, 239-46

- Lüth H, Holzer M, Gartner U, Staufenbiel M, Arendt T.** (2001) Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* **913**, 57-67
- Lucas K, Pitari G, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik K, Waldman S.** (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**, 375-413.
- Llansola M, Miñana M, Montoliu C, Saez R, Corbalan R, Manzo L, Felipo V.** (1999) Prenatal exposure to aluminum reduces expression of neuronal nitric oxide synthase and of soluble guanylate cyclase and impairs glutamatergic neurotransmission in rat cerebellum. *J Neurochem.* **73**, 712-8
- Matsuoka I, Giulli G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G, Hanoune J.** (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J. Neurosci.* **12**, 3350-3360.
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G, Koesling D.** (2003) Major occurrence of the new alpha(2)beta(1) isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal.* **15**, 189-95
- Merrill J, Murphy S, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp J, Ding M, Griscavage J, Ignarro L, Lowenstein C.** (1997) Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **48**, 372-384
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C.** (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* **202**, (1-2): 13-23
- Minc-Golomb D, Tsarfaty I, Schwartz JP.** (1994) Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol.* **112**, 720-2
- Minc-Golomb D, Yadid G, Tsarfaty I, Resau J, Schwartz J.** (1996) In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem.* **66**, 1504-9
- Miñana M, Corbalan R, Montoliu C, Teng C, Felipo V.** (1999) Chronic hyperammonemia in rats impairs activation of soluble guanylate cyclase in neurons and in lymphocytes: a putative peripheral marker for neurological alterations. *Biochem Biophys Res Commun.* **257**, 405-9
- Molina-Holgado E, Vela J, Arevalo-Martin A, Guaza C.** (2001) LPS/INF- γ cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 493-502
- Moncada S, Palmer R, Higgs E.** (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **43**, 109-42
- Montoliu C, Llansola M, Kosenko E, Corbalan R, Felipo V.** (1999) Role of cyclic GMP in glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology.* **38**, 1883-91
- Montoliu C, Monfort P, Carrasco J, Palacios O, Capdevila M, Hidalgo J, Felipo V.** (2000) Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J Neurochem.* **75**, 266-73
- Murphy S, Simmons M, Agulló L, García A, Feinstein D, Galea E, Reis D, Minc-Golomb D, Schwartz J.** (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* **16**, 323-328
- Murphy S.** (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia.* **29**, 1-14.
- Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F.** (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1139-47.
- Nakane M, Ichikawa M, Deguchi T.** (1983) Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain. *Brain Res.* **273**, 9-15.
- Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F.** (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Bol. Chem.* **265**, 16841-16845.
- Nathan C.** (1997) Inducible nitric oxide synthase. *J. Clin. Inves.* **100**, 2417-2423.
- Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T.** (1997) NO via an inducible isoform of NOS is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the SNC of mice with EAE. *J. Neuroimmunol.* **73**, 107-116
- O'Neill L.** (1995) Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin-1. *Biochim Biophys A.* **1266**, 31-44
- O'Neill LA, Dinarello CA.** (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology today.* **21**, 206-209
- Palmer R, Ferrige A, Moncada S.** (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxin factor. *Nature.* **327**, 524-526
- Pantazis N, West J, Dai D.** (1998) The nitric oxide-cyclic GMP pathway plays an essential role in both promoting cell survival of cerebellar granule cells in culture and protecting the cells against ethanol neurotoxicity. *J Neurochem.* **70**, 1826-38
- Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F, Catravas J.** (1995) Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension.* **26**, 696-704.
- Papapetropoulos A, Go C, Murad F, Catravas J.** (1996a) Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 147-155.
- Papapetropoulos A, Abou-Mohamed G, Marczin N, Murad F, Cadwell W, Catravas J.** (1996b) Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 β . *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1359-1366.
- Patel L.** (2000) Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: implications for Hb-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med.* **28**, 1518-25
- Parkinson S, Jovanovic A, Jovanovic S, Wagner F, Terzic A, Waldman S.** (1999) Regulation of nitric oxide-

- responsive recombinant soluble guanylyl cyclase by calcium. *Biochem.* **38**, 6441-6448
- Pedraza C. E., Baltrons M. A., García A.** Interleukin-1 β stimulates cyclic GMP efflux in brain astrocytes. *FEBS Letters.* 2001. **507**, 303-306.
- Pedraza C, Baltrons M, García A. (2003)** Interleukin-1 β and lipopolysaccharide decrease soluble guanylyl cyclase in brain cells: NO-independent destabilization of protein and NO-dependent decrease of mRNA. Enviado
- Piehl F, Lidman O. (2001)** Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol. Rev.* **184**, 212-225.
- Plata-Salaman C.** (1995) Cytokines and feeding suppression: an integrative view from neurologic to molecular levels. *Nutrition.* **11**, 674-7
- Plata-Salaman C.** (2001) Cytokines and feeding. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **25**, 5:S48-52
- Pouloupoulou C, Nowak L.** (1998) Extracellular 3',5' cyclic guanosine monophosphate inhibits kainate-activated responses in cultured mouse cerebellar neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **286**, 99-109
- Rauhala P, Lin M, Chiueh C.** (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J.* **12**, 175. 173
- Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S.** (1996) Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther.* **69**, 85-95
- Rothwell J, Luheshi N.** (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* **23**, 618-625
- Russwurm M, Koesling D.** (2002) Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem.* **230**, 159-164.
- Sato I, Kim Y, Himi T, Murota S.** (1995) Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* **184**, 145-148.
- Schultz C, Vaskinn S, Kildalsen H, Sager G.** (1998) Cyclic AMP stimulates the cyclic GMP egression pump in human erythrocytes: effects of probenecid, verapamil, progesterone, theophylline, IBMX, forskolin, and cyclic AMP on cyclic GMP uptake and association to inside-out vesicles. *Biochemistry.* **37**, 1161-6
- Serfass L, Carr H, Aschenbrenner L, Burstyn J.** (2001) Calcium ion downregulates soluble guanylyl cyclase activity: evidence for a two-metal ion catalytic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 47-56.
- Sharma R, Adachi A, Adachi K, Wang J.** (1984) Demonstration of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **259**, 9248-9254.
- Sheng J, Skinner R, Mrak R, Rovnaghi C, Van Eldik L, Griffin W.** (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine IL-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurol Aging.* **17**, 761-766
- Shenolikar S, Thompson W, Strada S.** (1985) Characterization of a Ca²⁺-calmodulin-stimulated cyclic GMP phosphodiesterase from bovine brain. *Biochem.* **24**, 672-677.
- Shimouchi S, Janssen St. P., Bloch D, Zapol W, Bloch K.** (1993) cAMP regulates soluble guanylate cyclase β 1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **265**, L456-461.
- Schmidt H, Pollock J, Nakane M, Forstermann U, Murad F.** (1992) Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium.* **13**, 427-34
- Simmons M, Murphy S.** (1993) Cytokines regulate L-Arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 825-831.
- Soderling S, Bayuga S, Beavo J.** (1998) Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem.* **273**, 15553-8.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**, 1898-902
- Sun N, Grzybicki D, Castro R, Murphy S, Perlman S.** (1995) Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotrophic coronavirus. *Virology.* **213**, 482-493.
- Sundkvist E, Jaeger R, Sager G.** (2002) Pharmacological characterization of the ATP-dependent low K(m) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) transporter in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* **63**, 945-9
- Takata M, Filippov G, Liu H, Ichinose F, Janssens S, Bloch D, Bloch K.** (2001) Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L272-L278.
- Tanaka J, Markerink-van, Ittersum M, Steinbusch H, De Vente J.** (1997) Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. *Glia.* **19**, 286-97
- Tjornhammar M, Lazaridis G, Bartfai T.** (1983) Cyclic GMP efflux from liver slices. *J Biol Chem.* **258**, 6882-6
- Tjornhammar M, Lazaridis G, Bartfai T.** (1986) Efflux of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate from cerebellar slices stimulated by L-glutamate or high K⁺ or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Neurosci Lett.* **68**, 95-9
- Touyz R, Picard S, Schiffrin E, Deschepper C.** (1997) Cyclic GMP inhibits a pharmacologically distinct Na⁺/H⁺ exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. *J Neurochem.* **68**, 1451-61
- Tsuchida S, Hiraoka M, Sudo M, Kigoshi S, Muramatsu I.** (1994) Attenuation of sodium nitroprusside responses after prolonged incubation of rat aorta with endotoxin. *Am. J. Physiol.* **267**, H2305-H2310.
- Ujii K, Hogarth L, Danziger R, Drewett J, Yuen P, Pang I, Star R.** (1994) Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **270**, 761-7
- Vallebuona F, Raiteri M.** (1993) Monitoring of cyclic GMP during cerebellar microdialysis in freely-moving rats as an index of nitric oxide synthase activity. *Neuroscience.* **57**, 577-85

Vitkovic L, Bockaert J, Jaque C. (2000) "Inflammatory" cytokines: Neuromodulators in normal brain ?. *J. Neuroch.* **74**, 457-471.

Waldman S, Murad F. (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Farmacol. Rev.* **39**, 163-193.

Wallace M Geddes J, Farquhar D, Masson M. (1997) Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to β -amyloid plaques. *Exp. Neurol.* **144**, 266-272.

Wiencken, A.E., Casagrande, V.A. (1999) Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia.* **26**, 280-90.

Wu K. (1995) Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv. Pharmacol.* **33**, 179-207

Wu X, Brune B, Von Appen F, Ullrich V. (1993) Efflux of cyclic GMP from activated human platelets. *Mol Pharmacol.* **43**, 564-8

Wyss-Coray T, Mucke L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron.* **35**, 419-32

Yan C, Bentley J, Sonnenburg W, Beavo J. (1994) Differential expression of the 61 kDa and 63 KDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *J. Neurosci.* **14**, 973-984.

Yuen P, Potter L, Garbers D. (1990) A new form of guanylyl cyclase expression is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry.* **29**, 10872-10878.

Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt H. (1998) Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem. J.* **335**, 51-57.

Zhang J., Snyder S. H. (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 213-233.

Zhao, M.L., Liu, J.S., He, D., Dickson, D.W., Lee, S.C. (1998) Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Res.* **813**, 402-5.

Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP. (1992) Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cell Immunol.* **141**, 111-20

Zwiller J, Revel MO, Basset P. (1981) Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **101**, 1381-7

Zwiller J, Revel M, Malviya A. (1985) Protein kinase C catalyses phosphorylation of guanylyl cyclase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **260**, 1350-1353