

**D. ENRIQUE CASTRO LÓPEZ-TARRUELLA SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLÓGICA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 8 de mayo de 2009 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada:

**“Modulación por adenosín-trifosfato y derivados purinérgicos de mecanismos proinflamatorios en el sistema nervioso central: inducción de la enzima óxido nítrico sintasa de tipo 2”**

Cuya memoria esta escrita en castellano e incluye un resumen en inglés en forma y estructura de acuerdo con el artículo 2º del reglamento vigente para la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de tesis doctorales con opción a la solicitud de acreditación de doctorado europeo de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Presentada por el doctorando D Dionisio Lorenzo Lorenzo Villegas y dirigida por el Doctor D. Enrique Castro López Tarruella.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en

Las Palmas de Gran Canaria, a 8 de mayo de 2009



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,**  
**FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**“CÁNCER: BIOLOGÍA Y CLÍNICA”**

**TÍTULO**

“Modulación por adenosín-trifosfato y derivados purinérgicos  
de mecanismos proinflamatorios en el sistema nervioso  
central: inducción de la enzima óxido nítrico sintasa de tipo 2”

*Title*

*Role of ATP and adenosine in the modulation of pro-inflammatory  
mechanisms within the Central Nervous System: induction of the enzyme  
Nitric Oxide Synthase Type 2.*

**Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran  
Canaria presentada por el licenciado D. Dionisio Lorenzo Lorenzo Villegas**

---

**Fdo.: El Doctorando**

**Fdo.: El Director**

**Dionisio Lorenzo Lorenzo Villegas**

**Enrique Castro López-Tarruella**

En Las Palmas de Gran Canaria a 8 de mayo de 2009



**D. ENRIQUE CASTRO LÓPEZ-TARRUELLA, PROFESOR TITULAR DE BIOQUÍMICA DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

**CERTIFICA,**

Que D. Dionisio Lorenzo Lorenzo Villegas, licenciado en Biología por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el trabajo de investigación titulado:

**“Modulación por adenosín-trifosfato y derivados purinérgicos de mecanismos proinflamatorios en el sistema nervioso central: inducción de la enzima óxido nítrico sintasa de tipo 2”**

Una vez revisada la presente memoria, escrita en castellano y que incluye un resumen en inglés en forma y estructura de acuerdo con el artículo 2º del reglamento vigente para la elaboración, tribunal, defensa y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, la encuentra apta para su defensa pública ante tribunal para la obtención del título de Doctor con mención de Doctorado Europeo por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos donde convenga, extiende la presente certificación en

Las Palmas de Gran Canaria, a 8 de mayo de 2009.

Fdo.: D. Enrique Castro López-Tarruella



## **AGRADECIMIENTOS.**

En estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todos los que de un modo u otro han estado presentes durante la realización de este trabajo:

En primer lugar, quiero agradecer a Ana Belén Moraleda Merlo el haberme iniciado en la labor investigadora hace ya no poco tiempo.

Al Dr. Enrique Castro López-Tarruella porque de su ejemplo he aprendido y he obtenido los conocimientos y la experiencia para poder realizar este trabajo y los que vengan.

A los Drs. Carlos Manuel Ruiz de Galarreta y Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez por aceptarme en su departamento y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio sintiéndome plenamente integrado desde el primer momento.

Gracias también a los compañeros que han pasado por el laboratorio, Hermes, Mayeya, Raquel y especialmente a la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Salmerón Peña, y los que pasarán, Sara, Fernando, Juan, Noelia, Susana, Pepe y Cristina por el apoyo que he recibido en todo momento y en quienes he encontrado una sonrisa cada vez que la he necesitado. Todos ellos han hecho del día a día algo enriquecedor.

Un especial agradecimiento a mis correctores de tesis, los doctores Vandí e Ignacio, y a la doctora M<sup>a</sup> Pino Santana, porque su amistad durante estos años ha sido un verdadero regalo para mí.

No quiero olvidar a mis compañeros de despacho Germán y Carlos y a todos los del laboratorio de al lado que hicieron este tiempo muy agradable e inolvidable, Raquel y Germán, Laura, Luis, Carlos y, muy especialmente, la doctora Cristina Bilbao, inestimable compañera en la “odisea macaronésica” y Ruymán, que tanto se ha implicado personalmente en el proceso de elaboración de este trabajo.

Quisiera destacar mi enorme aprecio y mayor gratitud al Dr. Bonifacio Nicolás Díaz Chico, quien me ofreció la oportunidad de expandirme profesionalmente en muchas otras áreas complementarias a mi trabajo de investigación doctoral.

Finalmente quiero agradecer a los doctores Leandro Fernández y Amílcar Flores-Morales por interceder a mi favor ante los que serían mis compañeros en el Instituto Karolinska, así como al Dr. Bengt Winblad por acogerme cálidamente en su laboratorio de este Instituto en Huddinge (Suecia) y suministrarme cuanto necesité. También quiero agradecer a los miembros de la que allí fuera mi “familia urbana”, al Dr. Ángel Cedazo-Mínquez, a mis compañeros y amigos Patxi, Mónica, Nuria, Jonathan, Pipi, Álex, Juan Carlos, Juanma, y especialmente a Maite Solas, compañera de residencia y despacho, y a la doctora Laura Mateos-Montejo, irreprochable instructora y mejor amiga.

Quiero destinar un efusivo abrazo a mis colegas de “Jägargatan Lang”, especialmente a Francisco Ríos, Elisa Storelli, Lisa Stone, Anke Böhmer y a mi compañera de *chococapuccinos*, Karina Hentrich.

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una Beca de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria y de una Beca de Investigación del Programa Innova de la Fundación Universitaria de Las Palmas, patrocinada por Vidrieras Canarias S.A.. Así mismo ha contado con la financiación de los proyectos de investigación CAC PI2001/106 de la Comunidad Autónoma Canaria y BFI-2002/02521 de la DGCyT. Para finalizar, debo reconocer la excelente labor que realiza el Instituto Canario de Investigación del Cáncer en lo que respecta al desarrollo profesional, especialmente internacional, de los jóvenes investigadores.

## **SUMMARY.**



## BACKGROUND

Nitric oxide (NO $\cdot$ ) is an important signalling molecule involved in the regulation of diverse physiological and pathophysiological mechanisms {Aktan, 2004}, on the other hand, it is a free oxygen radical (NO $\cdot$ ) and the excessive production of NO $\cdot$  by activated astrocytes (the most abundant glial cell type in the CNS {Zhai *et al.*, 2004}) is a main pathway for neuronal damage in several pathological processes {Jana *et al.*, 2005}. NO $\cdot$ -toxicity has been implicated in neurodegenerative diseases and in ischemia-reperfusion excito-toxicity, it is also well documented in inflammation-related disease states {Aktan, 2004; Jana *et al.*, 2005}.

During inflammation, astrocytes are activated to become a major source of pro-inflammatory mediators within the CNS {Bonnard *et al.*, 2000}.

The excessive, damage-provoking, NO $\cdot$  production by reactive astrocytes is generated by transcriptional activation of the iNOS gene (the inducible form of Nitric Oxide Synthase) by pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ ,  $\gamma$ -interferon, TNF- $\alpha$ ) or bacterial LPS {Murphy *et al.*, 1995; Aktan, 2004; Jana *et al.*, 2005}. An optimal combination in primary astroglial cultures is  $\gamma$ -IFN together with IL-1 $\beta$ . These agents cause activation of the transcription factors STAT1 and NF- $\kappa$ B, respectively, and their translocation into the nucleus, where they bind to promoter response elements of the iNOS gene {Murphy, 2000; Jana *et al.*, 2005}.

In relation with the participation of MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) in the induction pathway, specially the SAPKs (Stress Activated Protein Kinases) p54 JNK and p38 MAPK. It has been recently described p38 MAPK as an essential kinase for the cytokines-induced expression of iNOS gene (IL-1 {Funakoshi *et al.*, 2001}) in glial cells {Bhat *et al.*, 2002}, additionally, several authors support an association between PI3-kinase and the IL-1 receptor {Schmidt *et al.*, 2004}.

According to our previous results, this effect of ATP pre-treatment is mediated, in astrocytes, by blockade of p38 MAPK activation by pro-inflammatory cytokines, however, the mechanism of the purinergic interference remains unclear.

A key transcription factor for this process is NF- $\kappa$ B (but not only, depending on the cell type, CREB, AP-1 or Oct transcription factors do participate in iNOS transcriptional regulation) {Da Silva *et al.*, 1997; Nishiya *et al.*, 2000; Marcus *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2004}. In fact, although several agents such as TGF- $\beta$  can modulate the induction of iNOS expression by acting on iNOS mRNA stability {Vodovotz *et al.*, 1993}, most transmitters regulate iNOS gene induction by interfering with NF- $\kappa$ B signalling: catecholamines or PGE2 can inhibit NF- $\kappa$ B transactivation of iNOS gene expression through a cAMP-dependent mechanism {Feinstein, 1998}, while pre-treatment with glutamate or ATP has been reported to interfere with NF- $\kappa$ B transactivatory function in both rat and human astrocytes {Murphy *et al.*, 1995; Fenoglio *et al.*, 1997; Liu y Neufeld, 2000}.

This effect of ATP pre-treatment has been claimed to be mediated, in primary astrocytes, by blockade of NF- $\kappa$ B activation {Liu y Neufeld, 2000} or by reducing its DNA-binding activity {Lin y Murphy, 1997}, so the mechanism of the purinergic interference is far from evident.

The canonical way to NF- $\kappa$ B activation requires its previous release from I $\kappa$ B (through I $\kappa$ B phosphorylation) in the cytoplasm {Aktan, 2004} but more recently it has been shown a basal shuttling state of NF- $\kappa$ B in mouse astrocytes {Zhai *et al.*, 2004}. Additionally, that cytosolic phosphorylation of NF- $\kappa$ B itself can be an obligatory step for its transcriptional activity {Karin y Ben-Neriah, 2000; Schmitz *et al.*, 2001; Chantome *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006}, so NF- $\kappa$ B participation is worthy to be

studied in the pro-inflammatory cytokines-induced expression of iNOS in rat primary astrocytes.

The suppressive effect of ATP has been attributed to P2Y receptors but it is still poorly understood the mechanism by which the purinergic pre-treatment blocks the induction. Additionally, those studies which suggest this down-regulation did not consider the extracellular degradation of ATP into adenosine, which is very fast within the neural parenchyma. So, adenosine has been proposed to have any effect on iNOS-induction.

## **OBJECTIVES**

- Determinate the intracellular pathway for iNOS induction by cytomix (the combination IL-1 $\beta$  +  $\gamma$ -IFN).
- Identify the real effector as well as the receptor subtype and the intracellular pathway mediating the suppressive effect.

## **METHODS**

### **Cell culture**

Primary glial cultures were prepared from cerebella of 6-day old rats as described previously {Jimenez *et al.*, 1999}. Briefly, rats were killed by decapitation and the cerebellum removed immediately. After eliminating meninges, the tissue was chopped into small pieces and digested with trypsin (0.25 mg/ml) for 20 min at 37°C in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>- free medium. The proteolysis was stopped with an excess of soybean trypsin inhibitor. The dissociated cells were plated in culture flasks (50,000 cells/cm<sup>2</sup>) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. The cultures

were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air for 10-12 days.

### **Purification of type-1 astrocytes.**

Then the flasks were shaken at 250-300 rpm for 18 h at 37°C in an orbital shaker to purify type 1 astrocytes. The supernatant was eliminated and the adherent cells, mainly type 1 astrocytes, were grown until confluency. The type 1 astrocytes, finally, were passed by trypsinization in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>- free PBS. The cells were seeded in DMEM plus 10% FCS and maintained as above until confluency, then the cells were seeded in 24-well plates (nitrite measurement), FCS-covered glasses (immunocytochemistry) or p60 dishes (Western Blot analysis).

### **Induction protocol and other treatments.**

We used the combination  $\gamma$ -IFN (50 UI/ml) + IL-1 $\beta$  (500 ng/ml) as *cytomix* offers the greatest expression of iNOS and nitrites accumulation in primary astrocyte cultures.

Both,  $\gamma$  - interferon (human recombinant) and interleukin 1 $\beta$  (0.5  $\mu$ g/ml) were from Roche.

Cells were pre-treated for an hour with ATP {Laroche-Joubert *et al.*, }, PI3-kinase inhibitor (SIGMA-ALDRICH), MAPK inhibitors (Calbiochem) SB203580, PD98059 or SP600125 at the indicated concentrations.

The combined treatment was present for 24h (nitrite measurement) or 1h (immunotechniques).

### **Nitrite measurement.**

In accord with previous studies {Aktan, 2004; Jana *et al.*, 2005}, incubation of primary astrocyte cultures with a maximal dose of *cytomix* resulted in linear accumulation of

nitrites in the culture medium. Nitrites accumulation was detectable after 24h of incubation and it was similar to the accumulation observed after 48h of incubation.

NOS activity was measured in triplicate by the accumulation of nitrites (NO<sub>2</sub>) in the culture medium (for 24h) using the Griess reaction by mixing 100 µl of astrocyte culture supernatant with 100 µl of Griess reagent (custom made reagents), as described {Privat *et al.*, 1997}. OD was measured at 540 nm in a plate reader.

Background NO<sub>2</sub> levels amounted to 5-10 nM accumulated after 24h per 10-mm-diameter well and were subtracted from sample values.

Data are expressed as % of *cytomix*-elicited nitrites-accumulation. In some experiments, the nitrites accumulation was expressed as µM.

The nitrite production from constitutive isoforms of NOS is negligible in the range studied, and do not change in this time-scale (days *vs.* min).

### **Immunotechniques (p65 and phospho-p65).**

#### Western Blot Analysis.

Confluent astrocyte cultures in 56-mm dishes were scraped and pelleted in 200µl and resuspended in 1ml Loading Buffer, then they were harvested for 1h.

Either 100 µg (iNOS or p38 MAPK) of total protein was separated in 12.5% SDS-PAGE (12.5% Acrylamide/Bis 19:1, BIORAD), then transferred to PVDF membrane (BIORAD). The blots were blocked in TBS containing 10% skimmed milk and 0.1% Tween-20, and then incubated with antibodies to p38, total or phospho-specific, or iNOS at 1:1000 dilution in TBS-T. Following overnight incubation at 4 °C, the blots were washed in TBS-T and then further incubated with secondary antibodies at 1:2500 in 5% skimmed milk/TBS-T for 1h at RT.

Antibody binding was revealed using Supersignal<sup>®</sup> {Lo *et al.*, } chemiluminiscence.

Immunocytochemistry.

Cultured cells were fixed with 4% p-formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 1h at room temperature (RT), washed with PBS and transferred into blocking solution (6% BSA plus 0.1% Triton Tx-100 in PBS) at RT for 1h. After that the samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, and, after 3 washes with PBS and 1h-incubation at 37°C with secondary antibodies (indirect immunofluorescence), they were analyzed by a fluorescence confocal laser scanning microscopy.

1<sup>st</sup> Ab in both technics:

- Rabbit anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
- Rabbit anti-p38 MAPK (Cell Signaling Technology).
- Rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology).

2<sup>nd</sup> Ab:

- Cy3-conjugated Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) for immunocytochemistry.
- Horseradish peroxidase linked Donkey anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment (Amersham Biosciences) for Western Blot.

**RESULTS**

**THE INDUCTION PATHWAY.**

FTI-277, a selective Farnesyl-Transferase inhibitor, inhibits Ras processing but it does not inhibit geranylgeranylated-Rap1A function. As FTI-277 treatment suppressed iNOS induction, Ras participation was demonstrated to be essential in the induction by cytokines in cerebellar astrocytes. According to bibliography, mainly related to interleukin.

Ras has been described as activator of many different proteins such as PI3-kinase, and the three families of MAPKs. In order to elucidate the target protein of Ras in the pathway towards iNOS-gene induction, different experiments were designed. These experiments consisted of several studies focused on the possible participation of p38 MAPK, ERK 1/2, JNK and/or PI3-kinase by pharmacological analysis involving their specific antagonists (SB203580, PD98059, SP600125, and LY-294002, respectively).

### **PI3-kinase.**

In the added presence of LY-294002 (up to 20  $\mu$ M), nitrites accumulation after 24h of incubation was similar as the cytomix-only-treated cells, suggesting that this kinase is not involved in cytomix-induced iNOS-expression in rat primary astrocytes.

### **Effects of SB203580, PD98059 or SP600125 pre-treatment on NO $\cdot$ production.**

An initial screening was performed with 20  $\mu$ M of drugs. When stimulated with cytomix, the results showed that pre-treatment with SB203580, PD98059 and SP600125 had quite different effects on rat astrocyte iNOS. Whereas the p38 inhibitor potently inhibited iNOS and the subsequent nitrites accumulation, the JNK or MEK inhibitors had little or no effect.

Dose-response studies were carried out to determine the suppressive effect of SB203580 concluding that the inhibition of cytokines-induced iNOS expression by the p38 MAPK inhibitor was dose dependent, with 50% of maximal suppression occurring at  $\sim$  10  $\mu$ M SB203580. The maximal inhibition was obtained at 20  $\mu$ M SB203580.

These results indicate that p38 MAPK plays a specific and potent stimulatory role in cytomix-induced iNOS expression in rat astrocytes.

Additionally, the activation of p38 by IL-1beta/gamma-IFN required ras function, since was blocked by a ras-farnesylation inhibitor (FTI-277 200nM).

**Anisomycin over-roads FTI-277-suppression of p38 MAPK activation.**

Anisomycin is a specific permeable activator of MAPKs p38 and JNK. As anisomycin treatment prevented FTI-277 suppression of Ras-activation of p38MAPK, but not SB-203580 suppression, it was confirmed that Ras was coupled to p38 MAPK pathway, in addition to the classical ERKs and that p38MAPK was located downstream p21Ras in the induction pathway.

**p38MAPK induced NF-kappaB phosphorylation but not translocation into the nucleus.**

SB203580 pre-treatment blocked p65 subunit phosphorylation at serine 536, whereas anisomycin induced *per se* Ser536 phosphorylation at this subunit. Thus, p65 (Ser536) is a target for p38 MAPK activity. However, the p38-phosphorylation of p65 elicited by anisomycin was not enough to activate NF-kappaB as it remained in the cytoplasm. So, the nuclear factor required a second activating step also provided by cytomix but p38-independent.

Taken together the previous results with the phosphorylation as an essential step in NF- $\kappa$ B activation described in the bibliography {Karin y Ben-Neriah, 2000; Schmitz *et al.*, 2001; Chantome *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006}, it is important to study if p38 MAPK is a NF- $\kappa$ B upstream kinase in the *cytomix*-induced NF- $\kappa$ B activation in rat primary astrocytes.

**EFFECTS OF ATP PRE-TREATMENT ON NO· PRODUCTION.**

In this study we examined the effects of ATP pre-treatment on the induction of iNOS and the production of NO· in astroglial cells stimulated with IL-1 $\beta$ / $\gamma$ -IFN to elucidate the intracellular effectors of exogenous ATP.

When cells were pre-incubated in a ATP-containing medium for one hour, nitrites accumulation didn't occur. Thus, ATP was supposed to be a suppressive agent for iNOS induction.

**Effect of ATP on p38 MAPK phosphorylation/activation by cytokines.**

To establish the mechanism by which the suppression of cytomix-induced iNOS expression by ATP pre-treatment was mediated, control and ATP-pre-treated astrocytes were exposed to cytomix. After that, the samples were taken at different times and analysed by Western-Blot to quantify iNOS synthesis and p38 MAPK phosphorylation at Thr180/Tyr182. The results demonstrated that the suppressive effect is due to an ATP blockade of cytomix-induction pathway just at p38 activation level.

**ATP pre-treatment does not affect I $\kappa$ B degradation but it does affect cytokines-induced NF- $\kappa$ B activation.**

Once our results demonstrated ATP blockade of p38 phosphorylation and been described previously the NF- $\kappa$ B activation by this MAPK {Wilms *et al.*, 2003}, we tried to elucidate if NF- $\kappa$ B was an essential factor within the cytomix-elicited iNOS-expression and, in this case, if ATP could alter NF- $\kappa$ B activation by cytomix-induced p38 MAPK.

In both, control and ATP-pre-treated astrocytes, cytomix induced I $\kappa$ B degradation, thus suggesting that the suppressive effect of ATP is not due to a blockade of NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus. Similar results were obtained when pre-treating the cells with SB203580, which suggests that NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus is p38 MAPK independent.

Taken together the previous results and considering the phosphorylation as an essential step in NF- $\kappa$ B activation described in the bibliography {Karin y Ben-Neriah, 2000;

Schmitz *et al.*, 2001; Chantome *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006}, it was important to study if p38 MAPK was a NF- $\kappa$ B upstream kinase in the cytomix-induced NF- $\kappa$ B activation in rat primary astrocytes.

According to that, we analyzed NF- $\kappa$ B translocation and subunit p65 phosphorylation at serine 536 by confocal laser scanning microscopy. Samples were taken from both, control and ATP- or SB203580- pre-treated, cytomix-induced astrocytes, and anisomycin-treated astrocytes.

Anisomycin promoted p38 activation and p65 phosphorylation but not translocation, so there was no iNOS-expression. On the other hand, either ATP- or SB203580- pre-treatments, both inhibiting cytomix-induced p38 MAPK activation, blocked NF- $\kappa$ B phosphorylation but not translocation, so there was no iNOS-expression.

These results support our previous conclusion about NF- $\kappa$ B participation as an essential step in cytomix-induced iNOS-expression and it needs both, its translocation into the nucleus and its p65-subunit phosphorylation at serine 536.

However, as we tested iNOS induction or suppression after 24 hours and been described a fast ATP-degradation in culture media. Experiments were designed to corroborate whether ATP was the suppressor agent or not, and in that case, to identify the real effector of ATP-elicited suppression.

### **Extracellular degradation of ATP.**

The steady-state concentration of extracellular ATP in culture medium was extremely low after 24h incubation. Even if exogenous ATP was added. ATP in this range is usually ineffective in biochemical and pharmacological assays for P2Y and P2X receptors.

Extracellular ATP in culture medium was rapidly hydrolyzed by both serum esterases and by ecto-nucleotidases in cell membranes. In order to slow-down this process, the modulation of iNOS by ATP was tested in FCS-free medium. Even so, ATP was completely degraded in less than 3 hours.

Both serum esterases and ecto-nucleotidases had comparable activity hydrolysing ATP so its persistence in medium was brief, so the purinergic was unable to modulate long-term induction of iNOS by cytokines, a process that takes several hours.

As adenosine is generated from ATP it could be the real effector of ATP suppression. According to that, adenosine (Ado) did suppress the induction of iNOS

#### **Effects of adenosine pre-treatment on NO $\cdot$ production.**

Dose-response studies were carried out to determine the suppressive effect of adenosine concluding that the inhibition of cytokines-induced iNOS expression by the purinergic was dose dependent, with 50% of maximal suppression occurring at 6-8  $\mu$ M. The maximal inhibition was obtained at 10  $\mu$ M adenosine. These results indicated that adenosine reproduced the inhibitory effect of ATP.

Additionally, ADA (adenosine deaminase) blocked the suppressive effect of both adenosine and ATP, and the non-hydrolyzable analog of ATP,  $\alpha,\beta$ -me-AMP, did not reproduce the down-regulatory effect. So, ATP transformation into adenosine was essential for its suppressive action.

Taken together the previous results, adenosine generated from ATP-degradation, but not ATP, was the physiological signal that modulated the expression of iNOS, reducing its induction by pro-inflammatory cytokines.

**Role of P2 ATP receptors.**

P2 antagonists suramin (300 microM), PPADS (25 microM) and Reactive Blue 2 (25 mM) failed to block the suppressive effect, Thus suggesting that P2 receptors are not involved in this effect.

**Role of adenosine receptors.**

Once we had proposed adenosine as the real effector of ATP suppression and been observed that adenosine antagonists blocked the action (DPCPX, 8-CPT 1-10 µM). Experiments were conducted to identify the subtype of adenosine receptors involved in the suppressive signalling cascade from extracellular purinergics to intracellular suppression. In order to that, pharmacological studies including specific antagonists and agonists for the four known subtypes of adenosine receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>) were carried out.

Experiments focused on elucidate A1 or A3 involvement on purinergic suppression of iNOS-induction does not suggest any participation of these subtypes as specific pharmacological antagonists failed to prevent adenosine suppression and agonists didn't reproduce the suppressive effect. On the contrary, results suggest a participation of A2 subtypes, mainly A2B, in the purinergic suppression as it was blocked by the specific antagonist and the agonist reproduced the adenosine effect.

It has been described a general association between subtypes A1 and A3 with intracellular adenylyate-cyclase (AC) inhibition as they are typically coupled to inhibitory G-proteins. On the contrary, both subtypes A2 are related to excitatory G-proteins which, in turn, activate intracellular AC thus elevating the [cAMP].

As A<sub>2B</sub> receptors are typically related to AC activation, we tried to confirm the activation of intracellular AC as the signal-transductor from extracellular

ATP/adenosine to intracellular suppressive signal, according to that some experiments by adding forskoline (a specific activator of AC) or MDL-12,330A (specific inhibitor of AC) previously to *cytomix* induction were carried out.

The results of these experiments are shown at figure.5, where it is clearly mimicked by forskoline the suppressive effect of ATP/adenosine pre-treatment on *cytomix*-induced iNOS-expression suggesting a participation of adenylate-cyclase, this idea is corroborated by the MDL-12,330A study, as it dramatically impedes purinergic suppression. So we could conclude that purinergic suppression of iNOS induction depends on AC activation, thus pointing to an elevation of intracellular [cAMP] as the intracellular effector of extracellular purinergic stimulus.

**Purinergics reduce NOS-2 induction by cytokines in a cAMP-dependent but PKA-independent manner.**

Dibutyl cAMP (dbc-AMP), a permeable analog of cAMP, reproduces the effect observed with ATP or adenosine treatment on Cytokines induced iNOS expression. Thus, the pathways involved in the suppressive effect are both cAMP-dependent.

However, the pharmacological inhibitors of PKA, KT-5720 or H-89, failed to prevent the inhibitory effect of ATP, adenosine or dbc-AMP on accumulation of nitrites.

According to these results, PKA is not involved in this effect, suggesting the involvement of other cAMP target distinct from PKA. Epac/rap is a candidate.

In addition to the previous conclusion, the cAMP analogue 6-Phe-cAMP (specific for PKA with little effect on Epac) didn't reproduce the suppressive effect of ATP on iNOS induction while the cAMP analogue 8-pCPT-2'-O-me-cAMP (specific activator of Epac which does not activate protein kinase A) mimicked the purinergic suppression, thus targeting the small GTP-coupled proteins Epacs 1/2 as effectors of the suppressive effect.

### **Role of Ras & Rap in the p38 MAPK-mediated induction of NOS-2 in astrocytes**

GGTI-286, a selective Geranyl-Geranyl-Transferase I inhibitor, inhibits the processing of Rap1A protein to the plasma membrane, without affecting Ras signalling. GGTI-286 blocked the suppressive effect of purinergics. This effect of GGTI-286 in both Cytokines- and Cytokines/ATP- treated cells suggest the involvement of Rap in the ATP-evoked suppressive effect observed in primary astrocytes.

Complementary, anisomycin over-rode rap-suppression of p38 MAPK activation by Ras. Thus, determining that Rap1A suppressed the induction by blocking the p38MAPK activation by p21Ras.

These results supported our previous hypothesis that there is a balance between p21Ras and Rap1A, acting Rap1A as a p21Ras antagonist. And supports the idea that in rat primary astrocytes there is a delicate balance between *ras* and *rap*, controlling the activation of p38 MAPK and downstream NF-kappaB activation and iNOS induction during the process leading to reactive astrocytes.

### **ATP/Ado does not affect IκB degradation but it does affect cytokines-induced NF-κB activation.**

Once our results had demonstrated ATP/Ado blockade of p38 phosphorylation and been described previously the NF-κB activation by this MAPK {Wilms *et al.*, 2003} we tried to elucidate if NF-κB is an essential factor within the *cytomix*-elicited iNOS-expression and if ATP pre-treatment could alter NF-κB activation by its *cytomix*-induced p38-activation.

In both control and ATP-pre-treated astrocytes, *cytomix* treatment induced IκB degradation suggesting that the suppressive effect of ATP/Ado is not due to a blockade

of NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus, nor does the SB203580 pre-treatment, suggesting that NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus is p38 MAPK independent.

According to that, NF- $\kappa$ B translocation and subunit p65 phosphorylation at serine 536 were analysed by confocal laser scanning microscopy. Samples consisted of *cytomix*-induced control and ATP- or SB203580- pre-treated astrocytes, and anisomycin-treated (specific activator of p38 MAPK and JNK) cells.

Anisomycin promoted p38 activation and p65 phosphorylation but not translocation, so there was no iNOS-expression. On the other hand, either ATP- or SB203580- pre-treatments, both inhibiting *cytomix*-induced p38 MAPK activation, blocked NF- $\kappa$ B phosphorylation but not translocation, so there was no iNOS-expression.

According to that, NF- $\kappa$ B participation is an essential step in *cytomix*-induced iNOS-expression and it needs both its translocation into the nucleus and its p65-subunit phosphorylation at serine 536.

## DISCUSSION.

As described previously for human astrocytes {Hua *et al.*, 2002}, our results indicate that p38 MAPK plays a specific and potent stimulatory role in *cytomix*-induced iNOS expression in rat astrocytes as its specific inhibitor SB203580-pre-treatment suppresses *cytomix*-induction iNOS-expression in a dose-dependent manner with a maximal inhibition at 20  $\mu$ M (Fig. 3). Additionally, the lack of effect on nitrites accumulation of pre-treatments with the specific inhibitors of JNK, ERK and PI3-kinase (SP600125, PD98059 and LY-294002, respectively) up to 20  $\mu$ M, highlights p38 as the only MAPK involved in *cytomix*-induced iNOS-expression in rat primary astrocytes.

To study the possible effect of ATP-pre-treatment on p38 MAPK activation as an essential kinase in the induction pathway we analysed by Western Blot p38 MAPK

phosphorylation at Thr180/Tyr182 as it is the target of cytokines phosphorylation {Raingeaud *et al.*, 1995; Palsson *et al.*, 2000} in samples taken after control and ATP-pre-treated astrocytes were *cytomix*-induced. The results of this study clearly demonstrate that ATP-pre-treatment blocks dramatically p38 phosphorylation Thr180/Tyr182 and, thus p38 MAPK activation, by *cytomix*.

Once we had identified p38 as target of the ATP suppression and being described in the bibliography the suppressive effect of ATP-pre-treatment on NF- $\kappa$ B participation at *cytomix*-induced iNOS-expression {Murphy *et al.*, 1995; Fenoglio *et al.*, 1997; Lin y Murphy, 1997; Liu y Neufeld, 2000} and, on the other hand, a p38 MAPK-dependent NF- $\kappa$ B-activation {Madrid *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Wilms *et al.*, 2003}, our goal was to determine if there were any relation between p38 MAPK and NF- $\kappa$ B under our experimental conditions.

NF- $\kappa$ B participation is an essential step in *cytomix*-induced iNOS-expression, and it needs both translocation into the nucleus and phosphorylation at, at least, subunit p65 (serine 536).

Our results demonstrate that NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus is p38 MAPK independent as is not affected by its specific inhibitor SB203580 nor by its specific activator anisomycin, thus supporting the idea that the ATP/Ado suppressive effect on *cytomix*-induced iNOS-expression in rat primary astrocytes, although due to a p38 MAPK blockade, does not affect NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus. This conclusion is supported by the similar time-course curves of Cytomix-induced I $\kappa$ B degradation, in which there were no differences between control and ATP-pre-treated astrocytes.

In relation to the purinergic effect on NF- $\kappa$ B activity, ATP/Ado or SB203580 doesn't block p65 activation but does p65 phosphorylation (at serine 536), thus suppressing iNOS-expression induction by cytokines. Complementary, the result obtained after

anisomycin treatment (p65 phosphorylation in a closely similar way to positive control) strongly supports our hypothesis about two different and independent processes, both essential for NF- $\kappa$ B participation on iNOS induction by cytokines.

This ATP/Ado suppressive effect on NF- $\kappa$ B phosphorylation (but not on its release from I $\kappa$ B) strongly suggests that the previously observed ATP alteration of NF- $\kappa$ B transactivatory function in rat and human astrocytes {Murphy *et al.*, 1995; Fenoglio *et al.*, 1997; Liu y Neufeld, 2000} could be caused by ATP blockade of the cytokines-induced p38 MAPK activation and its subsequent NF- $\kappa$ B phosphorylation at, at least, serine 536 from p65 subunit.

According to that, the phosphorylation by p38 MAPK on serine 536 from p65 subunit is supposed to be an essential step for NF- $\kappa$ B transactivatory function and a possible target for pharmacology intervention on inflammatory diseases in which NF- $\kappa$ B plays an important role.

In relation to the suppressive pathway, cAMP is the intracellular signal which mediates the suppression by its effectors Epacs proteins, as the suppressive effect was mimicked by a permeable cAMP analogue and it was not prevented by PKA blockade (KT-5720, H-89, 6-Phe-cAMP), but by epacs blockade (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP). Additionally, the down-regulatory effect was prevented by an inhibitor of geranyl-geranylation (GGTI-286), confirming that cAMP action may be mediated by Epac-activation of rap1 (GGTI-286 did not affect iNOS induction *per se*).

## CONCLUSIONS

In the cytokines-induced iNOS-expression pathway, p38 MAPK (but not p42/p44 ERKs, p54 JNK or PI3-kinase) acts downstream p21Ras and plays an essential

upstream role in the activating cascade for NF- $\kappa$ B. The nuclear factor seems to be an essential mediator of the iNOS gene induction as the interference of its transactivatory function by ATP treatment suppresses dramatically iNOS induction.

We found that ATP/Ado-induced suppression of iNOS induction is just achieved by blockade of p38 MAPK activation. Which, in turn, impedes the subsequent p65-phosphorylation, thus disabling its transactivatory function, because p65 (NF- $\kappa$ B) transcriptional activity depends on both its translocation capability into the nucleus (elicited by cytokines treatment) and phosphorylation at, at least, serine 536 by p38 MAPK (activated by cytokines treatment).

Our results are consistent with a model that implies the activation of adenylyl-cyclase-coupled A2 receptors, elevation of cAMP and activation of rap1. Reportedly primary astrocytes lack B-raf, thus activation of rap1 by cAMP-Epac would block signalling from p21ras to p38 MAPK, preventing the induction of iNOS and increased NO-production by pro-inflammatory cytokines.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**TESIS DOCTORAL**

**MODULACIÓN POR ADENOSÍN-TRIFOSFATO Y DERIVADOS  
PURINÉRGICOS DE MECANISMOS PROINFLAMATORIOS EN  
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: INDUCCIÓN DE LA  
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA DE TIPO 2.**

**Dionisio Lorenzo Lorenzo Villegas**



<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>1. ESTRUCTURA DEL CEREBELO.</b>	<b>3</b>
1.1. Estructura interna del cerebelo.	4
1.2. Células gliales.	8
<b>2. ÓXIDO NÍTRICO (NO·) Y ACTIVIDAD NOS-2.</b>	<b>11</b>
2.1. NO·. Introducción.	11
Propiedades físico-químicas del óxido nítrico.	13
Acciones directas del NO·.	15
Acciones indirectas: Metabolitos de NO·.	16
2.2. Producción intracelular de NO·.	20
2.3. La actividad óxido nítrico sintasa (NOS).	21
Mecanismo de acción de la NOS.	22
2.4. Las óxido nítrico sintasas (NOSs).	24
nNOS, NOS neuronal, NOS-I, o NOS-1.	25
eNOS, NOS endotelial, NOS-III, o NOS-3	26
iNOS, NOS inducible, NOS-II, o NOS-2.	27
2.5. Expresión astrogliar de NOS-2 en el SNC.	28
Infección vírica.	29
Enfermedades desmielinizantes.	29
Trauma.	30
Neurodegeneración.	30
Isquemia cerebral.	31
2.6. Regulación y modificación de NOS.	32
2.7. Activación del gen de NOS-2.	33
Ruta IL-1 $\beta$ $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B.	35
Ruta IL-1 $\beta$ $\rightarrow$ proteínas quinasas intracelulares.	37
MAPKs y NF- $\kappa$ B en la inducción del gen de NOS-2.	38
Regulación de NF- $\kappa$ B independientemente de IKK-I $\kappa$ B.	39
2.8. Supresores del gen de NOS-2.	41
Regulación por NO·.	41

Otros reguladores del gen en astrocitos. _____	41
El ATP altera la unión de NF- $\kappa$ B al DNA. _____	42
Quinasas intracelulares. _____	43
Supresión por cAMP. _____	43
Supresión por otros moduladores. _____	44
Rap1 y p21 <sup>Ras</sup> . _____	45
<b>3. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN PURINÉRGICA. _____</b>	<b>46</b>
3.1. Las purinas en la comunicación neurona-glía. _____	46
3.2. Origen del ATP extracelular. _____	47
3.3. Degradación extracelular del ATP y formación de adenosina. _____	49
3.4. Liberación de adenosina. _____	51
3.5. Metabolización de la adenosina. _____	51
3.6. Funciones de la adenosina en el sistema nervioso. _____	52
3.7. Receptores purinérgicos en neuronas y glía. _____	53
Receptores P2. _____	55
Receptores de adenosina. _____	60
<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS. _____</b>	<b>71</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS. _____</b>	<b>77</b>
<b>1. MATERIAL. _____</b>	<b>79</b>
Material general de laboratorio. _____	79
Cultivos celulares. _____	80
RT-PCR. _____	80
Reactivos y productos químicos. _____	81
<b>2. MÉTODOS. _____</b>	<b>84</b>
2.1. Obtención de astrocitos primarios cerebelosos de rata. _____	84
2.2. Agitación de las botellas para purificación del cultivo. _____	87
2.3. Pasaje de células subcultivo. _____	89
2.4. Tratamiento de cubreobjetos de vidrio estériles _____	90
2.5. Tratamientos. _____	90
Protocolos de tratamiento y de recogida de muestras. _____	90

2.6. Determinaciones funcionales. _____	91
Medición de ATP: Método de luciferina/luciferasa. _____	91
Determinación de nitritos en el medio extracelular. _____	92
Determinación semicuantitativa de la expresión de NOS-2 (RT-PCR). _____	95
2.7. Técnicas inmunológicas. _____	97
Western-Blot _____	97
Inmunocitoquímica – microscopía de fluorescencia. _____	102
Ensayos de producción de cAMP. _____	104
<b>RESULTADOS. _____</b>	<b>107</b>
<b>1. Inducción de NOS-2 y su supresión por ATP. _____</b>	<b>109</b>
1.1. La inducción de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias. _____	109
1.2. El ATP inhibe la inducción de NOS-2 por acción de las citoquinas. _____	111
1.3. Estudio dosis-respuesta a ATP. _____	112
1.4. Mecanismo de acción del ATP. Sistema de segundo mensajero asociado al ATP. _____	113
Las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ . _____	113
Las variaciones en la $[cAMP]_i$ . _____	114
Estudio de la variación de $[cAMP]_i$ por ATP. _____	115
Estudio de la participación de la AC (Adenilil Ciclasa). _____	117
<b>2. Naturaleza del agente purinérgico. _____</b>	<b>119</b>
2.1. ATP o adenosina. _____	119
El ATP extracelular es rápidamente degradado. _____	119
Los receptores P2 de ATP y A de adenosina. _____	122
<b>3. Receptores de adenosina. _____</b>	<b>126</b>
3.1. Estudio dosis-respuesta a adenosina. _____	126
3.2. Estudio de la participación del subtipo $A_1$ de receptor de adenosina. _____	128
3.3. Estudio de la participación del subtipo $A_{2A}$ de receptor de adenosina. _____	130
3.4. Estudio de la participación del subtipo $A_{2B}$ de receptor de adenosina. _____	132
3.5. Estudio de la participación del subtipo $A_3$ de receptor de adenosina. _____	133

<b>4. Mecanismo de acción de las citoquinas y de la supresión.</b>	<b>136</b>
4.1. Mecanismo de la supresión.	136
Elevación de la [cAMP] <sub>i</sub> .	136
Efectores del cAMP intracelular: PKA y proteínas Epacs 1/2.	139
4.2. Vía de la inducción.	144
Estudio de la participación de PI3-quinasa.	144
Estudio de la participación de las diferentes MAPKs.	146
Participación de p21 <sup>Ras</sup> y de Rap1.	149
Fosforilación y activación de p38 <sup>MAPK</sup> .	152
4.3. Estudio de la participación de NF-κB en la inducción de NOS-2 por las citoquinas.	157
Translocación de NF-κB al núcleo.	157
Cinética de degradación de IκBα.	159
Fosforilación de NF-κB en la inducción de NOS-2 por las citoquinas.	161
4.4. Expresión del gen de NOS-2.	165
Estudios sobre la proteína NOS-2.	165
Estudios sobre el gen de NOS-2 (RT-PCR del mRNA).	168
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>175</b>
Inducción de NOS-2 en astrocitos cerebelosos.	178
Translocación de NF-κB al núcleo.	183
Fosforilación de NF-κB (Ser <sup>536</sup> de p65).	184
Acción supresora de los compuestos purinérgicos en la inducción de NOS-2.	184
Mecanismo de la supresión de la inducción de NOS-2 por compuestos purinérgicos.	186
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>195</b>
<b>CONCLUSIONS.</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>203</b>
<b>ANEXO. GLOSARIO DE AGENTES FARMACOLÓGICOS.</b>	<b>227</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

Figura 1. Morfología externa del cerebelo. ....	3
Figura 2. La corteza cerebelosa se divide en tres capas o estratos: .....	4
Figura 3. Organización general de la corteza cerebelosa.....	7
Figura 4. Efectos reguladores, protectores y deletéreos del NO·.....	12
Figura 5. Química fisiológica del NO·. ....	14
Figura 6. ROS y NOS derivados de células microgliales y astrocitos reactivos.....	17
Figura 7. Difusión e interacción de NO· con superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	19
Figura 8. Biosíntesis del NO·. ....	20
Figura 9. Estructura general de la NOS.....	21
Figura 10. Potenciales redox y flujo de electrones en NOS-1. ....	23
Figura 11. Formación de NO· por NOS.....	23
Figura 12. Dominios estructurales de los genes codificantes para NOS-1, NOS-2 y NOS-3 humanas.....	25
Figura 13. Secuencias consenso en el promotor del gen de NOS-2 humano y de rata. ....	28
Figura 14. Activación de las rutas de señalización de NF-κB y de STAT1 tras el tratamiento de las células con IL-1β e IFN-γ, respectivamente. ....	34
Figura 15. La IL-1 activa cuatro cascadas de proteínas quinasas en las células.....	36
Figura 16. Secuencias del promotor de NOS-2 relacionadas con la actividad de p38 <sup>MAPK</sup> . ....	39
Figura 17. Diagrama de dominios de la proteína p65.....	40
Figura 18. Secuencias del promotor de NOS-2 relacionadas con la elevación de [cAMP] <sub>i</sub> . ....	44
Figura 19. Cinética de la activación de p21 <sup>Ras</sup> y Rap1 por IL-1β. ....	45
Figura 20. Liberación de purinas. ....	48
Figura 21. Enzimas implicadas en la metabolización de ATP y derivados. ....	49
Figura 22. Metabolización intracelular de la adenosina. ....	52
Figura 23. La familia de receptores purinérgicos. ....	54
Figura 24. Receptores de membrana para ATP extracelular. ....	55
Figura 25. Receptores de membrana para adenosina extracelular.....	61
Figura 26. Síntesis y degradación de cAMP.....	67
Figura 27. Estructura común de las diferentes formas de AC. ....	68

Figura 28. Obtención de astrocitos primarios cerebelosos de rata.....	87
Figura 29. Fotografías de inmunocitoquímica de fluorescencia en cultivos agitados y no agitados. ....	88
Figura 30. Reacción de Griess para cuantificación de nitritos.....	93
Figura 31. Reacción de DAN/NAT para cuantificación de nitritos.....	93
Figura 32. Cinética de producción de nitritos inducida por citoquinas proinflamatorias. ....	94
Figura 33. Cinética de fosforilación de p38 <sup>MAPK</sup> .....	100
Figura 34. Cinética de fosforilación de p65.....	101
Figura 35. Ejemplo de la utilidad y necesidad de la microscopía confocal. ....	104
Figura 36. Técnica de ELISA competitivo. ....	105
Figura 37. Valores de [cAMP] utilizados en el estudio. ....	106
Figura 38. Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ + IL-1 $\beta$ sobre la actividad de NOS-2. ....	110
Figura 39. El pretratamiento con ATP inhibe la inducción de NOS-2 por el citomix. ....	111
Figura 40. Efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la acumulación de nitritos inducida por citoquinas pro-inflamatorias. ....	112
Figura 41. Participación de las variaciones en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (BAPTA-AM). ....	114
Figura 42. El dibutiril-cAMP reproduce los efectos de ATP.....	115
Figura 43. Producción de cAMP por estimulación de AC por forskolina. ....	116
Figura 44. Producción de cAMP por estimulación de AC por ATP.....	116
Figura 45. Participación de la Adenilil Ciclasa. ....	118
Figura 46. El ATP exógeno está completamente degradado tras 24h en el medio. ....	120
Figura 47. Cinética de degradación extracelular del ATP exógeno.....	121
Figura 48. Participación de los receptores P2 en la acción supresora del ATP. ....	122
Figura 49. Estudio de la participación de los receptores de adenosina en la acción supresora de adenosina. ....	123
Figura 50. Estudio dosis-respuesta a DPCPX.....	124
Figura 51. Estudio dosis-respuesta a adenosina. ....	126
Figura 52. Los astrocitos expresan los cuatro subtipos de receptores de adenosina.....	127
Figura 53. Efecto del agonista CPA (A <sub>1</sub> ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas. ....	128
Figura 54. Efecto del antagonista DPCPX (A <sub>1</sub> ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas. ....	129

Figura 55. Efecto del agonista CGS-21680 ( $A_{2A}$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas...	130
Figura 56. Efecto del antagonista ZM-241385 ( $A_{2A}$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.....	131
Figura 57. Efecto del agonista NECA ( $A_{2B}$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas. ....	132
Figura 58. Efecto del antagonista MRS-1754 ( $A_{2B}$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.....	133
Figura 59. Efecto del agonista IB-MECA ( $A_3$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.	134
Figura 60. Efecto del antagonista MRS-1523 ( $A_3$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.....	135
Figura 61. Estudio de la variación de [cAMP] <sub>i</sub> . Forskolina, adenosina y agonistas.....	137
Figura 62. Estudio de la variación de [cAMP] <sub>i</sub> . Adenosina y antagonistas.....	139
Figura 63. Estudio de la participación de PKA en la supresión de la inducción (KT-5720 y H-89).....	140
Figura 64. Los astrocitos primarios de rata expresan las proteínas Epac 1 y 2.....	141
Figura 65. Efectores de cAMP: PKA y Epacs (6-fenil-cAMP).....	142
Figura 66. Efectores de cAMP: PKA y Epacs (8-CPT-2'-O-Me-cAMP).....	143
Figura 67. Efecto del inhibidor LY-249002 sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.....	145
Figura 68. Tratamientos supresores de cada una de las tres familias de MAPKs.....	147
Figura 69. Estudio de la participación de p38 <sup>MAPK</sup> (SB-203580).....	148
Figura 70. La anisomicina no puede sustituir a ninguno de los componentes del citomix.....	149
Figura 71. Esencialidad de Rap1 y p21 <sup>Ras</sup> (GGTI-286 y FTI-277, respectivamente).....	150
Figura 72. Efecto de antagonistas tras la activación directa de p38 <sup>MAPK</sup> por anisomicina.....	151
Figura 73. Adenosina, FTI-277 y SB-203580 impiden la fosforilación de p38 <sup>MAPK</sup> .....	153
Figura 74. Efecto sobre la fosforilación de p38 <sup>MAPK</sup> de los agonistas de receptores de adenosina.....	155
Figura 75. Efecto sobre la fosforilación de p38 <sup>MAPK</sup> de los antagonistas de receptores de adenosina.....	156
Figura 76. Localización de p65 en cultivos celulares una hora tras la inducción.....	158
Figura 77. Cinéticas de degradación de IκBα.....	160
Figura 78. Procesos asociados a la translocación nuclear de NF-κB.....	161
Figura 79. Los inhibidores de p38 <sup>MAPK</sup> y de p21 <sup>Ras</sup> impiden la fosforilación de p65 en Ser <sup>536</sup> .....	162
Figura 80. Agentes purinérgicos y agonista de Epacs suprime la fosforilación de p65.....	163
Figura 81. Fotografías confocales de cultivos celulares una hora tras la inducción.....	164

Figura 82. Cinética de proteína NOS-2 tras tratamientos citomix y citomix+adenosina.....	166
Figura 83. Estudio de la supresión de la expresión del gen de NOS-2 (proteína). .....	167
Figura 84. Cinética de expresión de mRNA de NOS-2 tras tratamiento citomix. ....	169
Figura 85. Síntesis del RNA mensajero de NOS-2 en distintos tratamientos.....	170
Figura 86. Estabilidad del transcrito: Actinomicina D. ....	171
Figura 87. Estabilidad del transcrito: Actinomicina D + TGF- $\beta$ y Actinomicina D + Adenosina.....	172
Figura 88. Estabilidad del transcrito: figuras 89 y 90.....	173
Figura 89. Esquema del tratamiento inductor de dos señales utilizado en este trabajo. ....	179
Figura 90. La ruta de la IL-1 $\beta$ implica a p21 <sup>Ras</sup> . ....	182
Figura 91. Participación de las proteínas epac 1 y 2 en la ruta supresora.....	188
Figura 92. Duelo de homólogos en la fosforilación de p38 <sup>MAPK</sup> . ....	190
Figura 93. La participación de NF- $\kappa$ B en la ruta inductora requiere su liberación de I $\kappa$ B y la fosforilación de la subunidad p65 en Ser <sup>536</sup> por p38 <sup>MAPK</sup> . ....	192

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de los astrocitos. ....	9
Tabla 2. Funciones fisiológicas de los astrocitos.....	9
Tabla 3. Funciones propuestas para los astrocitos.....	10
Tabla 4. Receptores purinérgicos en las células gliales.....	54
Tabla 5. Características de los receptores purinérgicos P <sub>2X</sub> .....	57
Tabla 6. Características de los receptores mediados por purinas. P <sub>2Y</sub> . ....	59
Tabla 7. Distribución y farmacología de los receptores mediados por purinas. P <sub>1</sub> .....	62
Tabla 8. Efectores intracelulares de los receptores de adenosina. ....	64
Tabla 9. Técnicas de inmunofluorescencia.....	81
Tabla 10. Cultivos celulares. ....	82
Tabla 11. Agentes farmacológicos utilizados. ....	82
Tabla 12. Productos relacionados con determinaciones funcionales.....	83
Tabla 13. Composición del medio de aislamiento.....	84
Tabla 14. Composición del medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).....	85
Tabla 15. Soportes de cultivo adecuados a cada determinación.....	89
Tabla 16. Protocolo de tratamiento: fármacos añadidos 60' antes que <i>citomix</i> . ....	90
Tabla 17. Protocolo de tratamiento: fármacos añadidos 90' antes que <i>citomix</i> . ....	91
Tabla 18. Protocolo de recogida de muestras. ....	91
Tabla 19. Protocolo de determinación de ATP mediante luminometría.....	92
Tabla 20. Protocolo de transcripción inversa y composición del tampón de PCR. ....	95
Tabla 21. Protocolo de PCR. ....	96
Tabla 22. Composición de los tampones. ....	97
Tabla 23. Composición del tampón de carga (LB).....	98
Tabla 24. Composición de TBS-T.....	99
Tabla 25. Dilución de los anticuerpos primarios utilizados.....	102



## ABREVIATURAS.

<b>[cAMP]<sub>i</sub></b> :	Concentración intracelular de AMP cíclico.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> :	Concentración intracelular de catión calcio libre.
<b>·Ab</b> :	+ 100 UI/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomina.
<b>2b-cAMP</b> :	Dibutilil-AMP cíclico.
<b>6-Phe-cAMP</b> :	N <sup>6</sup> -fenil-AMP cíclico
<b>8-CPT</b> :	8-ciclopentil-1,3-dimetil-xantina.
<b>8-pCPT-2'-O-Me-cAMP</b> :	8-(4-clorofeniltio)-2'-O-metil-AMP cíclico.
<b>aa</b> :	Aminoácido(s).
<b>AC</b> :	Adenilil-ciclasa.
<b>ADA</b> :	Adenosina-desaminasa, de mucosa intestinal bovina, tipo VI.
<b>Ado</b> :	Adenosina.
<b>ADP</b> :	Difosfato de adenosina.
<b>α,β-meATP</b> :	alfa,beta-metilén-ATP.
<b>cAMP</b> :	Monofosfato cíclico-3',5' de adenosina.
<b>mRNA</b> :	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>ATP</b> :	Trifosfato de adenosina.
<b>ATPmr</b> :	Reactivo de monitorización de ATP ( <i>ATP monitoring reagent</i> ).
<b>BAPTA-AM</b> :	Éster acetoximetílico del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etil-tetracético.
<b>BCA</b> :	Ácido bicinconínico.
<b>bFGF</b> :	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
<b>BHE</b> :	Barrera hematoencefálica
<b>BH<sub>4</sub></b> :	Tetrahidro-biopterina
<b>BSA</b> :	Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> ).
<b>Ca<sup>2+</sup></b> :	Catión divalente calcio.
<b>CaM</b> :	Calmodulina.
<b>CPA</b> :	N <sup>6</sup> -ciclopentil-adenosina.
<b>CGS-21680</b> :	Ácido 4-[2-[[6-amino-9-(N-etil-β-D-ribofuranuronamidósil)-9H-purin-2-il] amino] etil] bencenopropanoico.
<b>CRE</b> :	Elemento de respuesta al cAMP ( <i>cyclic AMP response element</i> ).
<b>CREB</b> :	Proteína de unión a CRE ( <i>CRE binding protein</i> ).
<b>DAN</b> :	2,3-diamino-naftaleno
<b>DEPC</b> :	Diethyl-piro-carbonato
<b>DLP</b> :	Depresión a largo plazo.
<b>DMEM</b> :	Medio Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> ).
<b>DMSO</b> :	Dimetil-sulfóxido.
<b>DNA</b> :	Ácido desoxirribonucleico.
<b>DNasa I</b> :	Desoxirribonucleasa 1.

<b>DPCPX :</b>	8-ciclopentil-1,3-dipropil-xantina.
<b>EDRF :</b>	Factor relajante derivado del endotelio ( <i>endothelium derived relaxing factor</i> ).
<b>EDTA :</b>	Ácido etilén-diamino-tetraacético.
<b>ELISA :</b>	Inmunoensayo con enzima ligada ( <i>enzyme linked immunoassay</i> ).
<b>Epac :</b>	Proteína de intercambio activada directamente por cAMP ( <i>exchange protein directly activated by cAMP</i> ). También Rap-GEF.
<b>ERK :</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares ( <i>extracellular signal – regulated kinase</i> ).
<b>FAD :</b>	Dinucleótido de flavina y adenina ( <i>flavin adenine dinucleotide</i> ).
<b>FCS :</b>	Suero bovino fetal ( <i>foetal calf serum</i> ).
<b>FMN :</b>	Mononucleótido de flavina ( <i>flavin mononucleotide</i> ).
<b>FTI :</b>	Inhibidor de la enzima farnesilo-transferasa ( <i>farnesyl transferase inhibitor</i> ).
<b>GCs :</b>	Guanilato ciclasa soluble.
<b>GEF :</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina ( <i>guanine exchange factor</i> ).
<b>GFAP :</b>	Proteína ácida fibrilar glial ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> ).
<b>GGTI :</b>	Inhibidor de la enzima geranil-geranilo-transferasa ( <i>geranyl-geranyl-transferase inhibitor</i> ).
<b>GMP :</b>	Monofosfato de guanosina.
<b>GMPc :</b>	GMP cíclico.
<b>GSH :</b>	Glutación reducido.
<b>GSSG :</b>	Dímero de glutación oxidado.
<b>GTP :</b>	Trifosfato de guanosina.
<b>HEPES :</b>	Ácido N-(2-hidroxietil)piperacín-N'-2-etanosulfónico.
<b>HRP :</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> ).
<b>IB-MECA :</b>	1-desoxi-1-6-[(3-yodofenil)metil]amino]-9H-purin-9-il)-N-metil-β-D-ribofuranuronamida).
<b>IBMX :</b>	3-isobutil-1-metil-xantina.
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Ki <sub>50</sub> .
<b>IFN-γ :</b>	Interferón gamma.
<b>IgG :</b>	Inmunoglobulina G.
<b>IκB :</b>	Inhibidor de NF-kappaB.
<b>IKK :</b>	Proteína quinasa de IkappaB.
<b>IL-1β :</b>	Interleuquina-1 beta.
<b>IP<sub>3</sub> :</b>	Inositol-trifosfato.
<b>IRAK :</b>	Quinasa asociada al receptor de interleuquina ( <i>interleukin receptor associated kinase</i> ).
<b>JAK :</b>	Quinasa Jano ( <i>janus kinase</i> ).
<b>JNK :</b>	Proteína quinasa N-terminal de c-jun ( <i>c-jun N-terminal kinase</i> ).
<b>kDa :</b>	Kilodalton(s).
<b>Ki<sub>50</sub> :</b>	Concentración de inhibidor que produce el 50 % de su actividad máxima.
<b>LB :</b>	Tampón de carga ( <i>loading buffer</i> ).
<b>LPS :</b>	Lipopolisacárido de la pared bacteriana de <i>E. Coli</i> , serotipo O111:B4.

**MAPK :** Proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*).

**MAPKK/MKK :** Proteína quinasa de MAPK (*mitogen activated protein kinase kinase*).

**Mg<sup>2+</sup> :** Cation divalente magnesio libre.

**MRS-1523 :** 3-propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2-fenil-4-propil-3-piridin-carboxilato.

**MRS-1754 :** 8-[4-[(4-cianofenil)carbamil-metil]oxi]fenil]-1,3-di(n-propil)xantina.

**NA :** Noradrenalina.

**NAD<sup>+</sup> :** Dinucleótido de adenina y nicotinamida (*nicotinamide adenine dinucleotide*).

**NADP<sup>+</sup> :** Fosfato de NAD<sup>+</sup> (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).

**L-NAME :** Éster metílico de N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (*N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester*).

**NANC :** Nervios no-adrenérgicos – no-colinérgicos.

**NECA :** 5'-(N-etilcarboxamido)-adenosina.

**NF-κB :** Factor nuclear kappaB (*nuclear factor kappaB*).

**NGF :** Factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*).

**NGS :** Suero normal de cabra (*normal goat serum*).

**NO· :** Radical óxido nítrico.

**NOS-1/nNOS :** Enzima óxido nítrico sintasa 1/neuronal.

**NOS-2/iNOS :** Enzima óxido nítrico sintasa 2/inducible.

**NOS-3/eNOS :** Enzima óxido nítrico sintasa 3/endotelial.

**pb :** Par de bases de ácidos nucleicos.

**PBS :** Suero salino tamponado con fosfato (*phosphate buffered saline*).

**PBS W/O :** PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (*PBS without neither Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>*).

**PCR :** Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

**PD-98059 :** Inhibidor de las MAPKs p42/p44, ERKs 1/2. 2'-amino-3'-metoxi-flavona.

**PDE :** Fosfodiesterasa (*phosphodiesterase*).

**PKA :** Proteína quinasa dependiente de cAMP.

**PKG :** Proteína quinasa dependiente de GMPc.

**PPADS :** Ácido piridoxal fosfato-6-azo-(benceno-2,4-disulfónico).

**PPSE :** Potencial post-sináptico excitador.

**PSD :** Densidad post-sináptica (*post-synaptic density*).

**PVDF :** Fluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride*).

**Rap-GEF :** Factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Rap (*Rap- guanine nucleotides exchange factor*).

**RB 2 :** Azul reactivo 2. Ácido 1-amino-4-[[4-[[4-cloro-6-[[3 (ó 4)-sulfofenil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-3-sulfofenil]amino]-9,10-dihidro-9,10-dioxo-2-antracén-sulfónico

**RGB :** Tampón del gel de resolución (*resolving gel buffer*).

**RNasa :** Ribonucleasa.

**rpm :** Revoluciones por minuto.

**RT-PCR :** PCR acoplada a transcriptasa inversa o reverso-transcriptasa (*Reverse transcriptase-PCR*).

**SB-203580 :** 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol. Inhibidor de p38<sup>MAPK</sup>

<b>SBTI :</b>	Inhibidor de tripsina tipo I-S obtenido de legumbre de soja ( <i>soybean trypsin inhibitor</i> ).
<b>SDS :</b>	Sulfato de dodecilo sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> ).
<b>SDS-PAGE :</b>	Electroforesis en gel de poli-acrilamida ( <i>poly-acrylamide gel electrophoresis</i> ), en presencia de SDS.
<b>SGB :</b>	Tampón del gel de apilamiento ( <i>stacking gel buffer</i> ).
<b>SOD :</b>	Superóxido dismutasa.
<b>SP-600125 :</b>	Inhibidor de JNK. 1,9-pirazoloantrona.
<b>STAT :</b>	Factor de transducción de señal y activador de la transcripción ( <i>signal transducer and activator of transcription factor</i> ).
<b>TAB-1 :</b>	Proteína de unión a TAK-1 – 1 ( <i>TAK-1-binding protein 1</i> ).
<b>TAK-1 :</b>	Quinasa activada por TGF- $\beta$ – 1 ( <i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i> ).
<b>TBS :</b>	Suero salino tamponado con Tris ( <i>Tris-buffered saline</i> ).
<b>TBS-T :</b>	TBS con Tween <sup>®</sup> 20.
<b>TEMED :</b>	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamina.
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> ).
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> ).
<b>Tween<sup>®</sup>-20 :</b>	Monolaurato de sorbitan-polioxietileno.
<b>ZM-241385 :</b>	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-il-amino]etil)fenol.

## **INTRODUCCIÓN.**



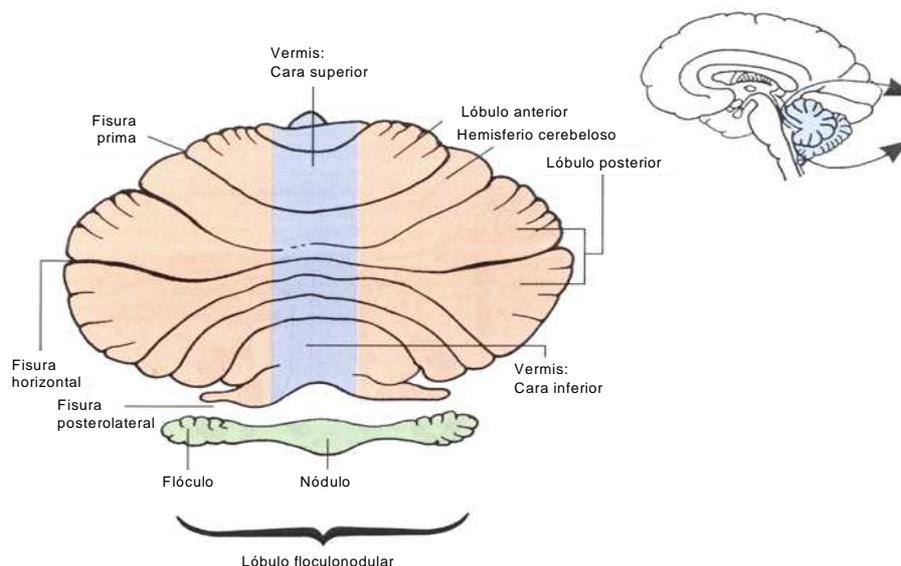
## 1. ESTRUCTURA DEL CEREBELO.

El cerebelo es la parte más grande del rombencéfalo (cerebro posterior) y a pesar de ser relativamente simple contiene seis tipos diferentes de neuronas entre los que se incluye la neurona granulosa cerebelosa, el tipo de neurona más abundante del encéfalo, representando casi la mitad de neuronas del total.

Las funciones del cerebelo son completamente motoras y opera a un nivel inconsciente. Controla el mantenimiento del equilibrio, influye en la postura y en el mantenimiento del tono muscular y coordina los movimientos.

El cerebelo consta de dos hemisferios localizados lateralmente unidos en la línea media por el vermis (Fig. 1). La cara superior del cerebelo se sitúa por debajo de la tienda del cerebelo y la parte superior del vermis queda elevada en la línea media, en la cara inferior el vermis se sitúa en un surco profundo entre los hemisferios.

La superficie del cerebelo está plegada formando un patrón regular de pliegues paralelos entre los que destacan unas fisuras de profundidad variable que constituyen elementos de referencia para dividir anatómicamente el cerebelo en tres lóbulos.



**Figura 1. Morfología externa del cerebelo.**

En la cara superior, la profunda fisura prima separa el lóbulo anterior, relativamente pequeño, del lóbulo posterior, mucho mayor. Por la cara inferior, la sobresaliente fisura posterolateral delimita la localización de pequeñas regiones de los hemisferios (flóculos) y del vermis (nódulo), que juntas forman el lóbulo floculonodular. Adaptado de Crossman & Neary (2002).

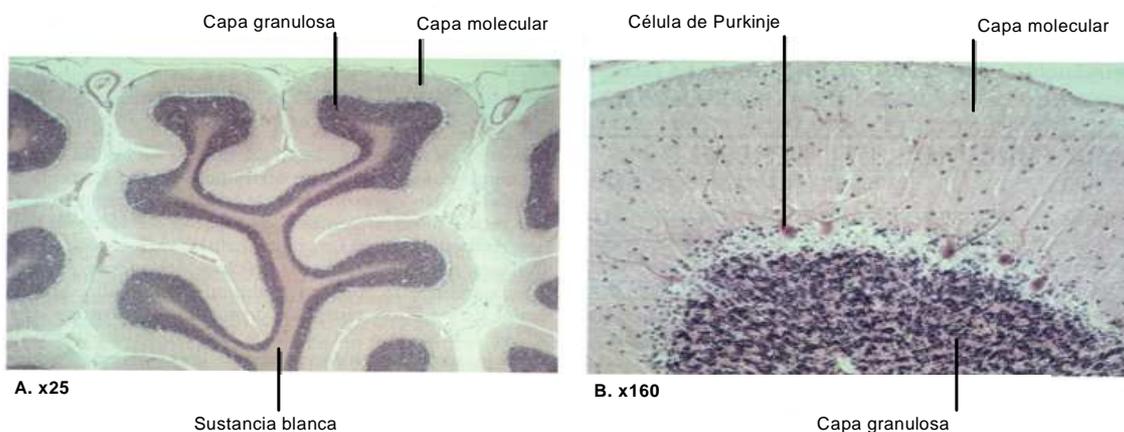
### 1.1. Estructura interna del cerebelo.

Fundamentalmente, el cerebelo consta de una capa externa de sustancia gris, la corteza cerebelosa (*córtex cerebeloso*), que rodea un núcleo interno de sustancia blanca. La sustancia blanca del cerebelo está formada por fibras nerviosas aferentes y eferentes que van y vienen del córtex cerebeloso.

Profundamente sumergidos en la sustancia blanca hay cuatro pares de núcleos del cerebelo que tienen importantes conexiones con la corteza cerebelosa y con ciertos núcleos del tronco del encéfalo y del tálamo.

#### *Corteza Cerebelosa.*

La corteza cerebelosa está profusamente plegada y forma numerosas láminas estrechas orientadas transversalmente (*folia*). Dentro de la corteza cerebelosa se sitúan los cuerpos celulares, dendritas y conexiones sinápticas de la mayoría de las neuronas del cerebelo. La organización celular de la corteza cerebelosa es la misma en todas las regiones, distinguiéndose tres capas (Fig. 2):



**Figura 2. La corteza cerebelosa se divide en tres capas o estratos:**

La más externa, rica en fibras, es la capa molecular. La intermedia es la capa de Purkinje (capa de las células de Purkinje). La más interna es la capa granulosa, dominada por las células granulosas. Adaptado de Crossman & Neary (2002).

### Capa granulosa.

Esta capa interior está formada por los apretados cuerpos de las células granulosas, a las que llegan señales aferentes a través de las fibras musgosas, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el tronco del encéfalo.

### Capa media o de Purkinje.

La capa de las células de Purkinje es una capa unicelular formada por los cuerpos de estas neuronas, que extienden profusamente sus dendritas irregularmente ramificadas en la capa molecular. Las de Purkinje son las únicas neuronas eferentes de la corteza cerebelosa, las cuales envían señales a través de sus largas prolongaciones hacia el interior del cerebelo, y de ahí a otras partes del encéfalo.

### Capa molecular.

En esta capa, denominada molecular por su apariencia estructural homogénea en las tinciones histológicas clásicas, tienen lugar las funciones fundamentales del cerebelo. Aquí, siguiendo un patrón tridimensional, las proyecciones dendríticas y axónicas se hallan en íntima interrelación.

Esta capa externa contiene las arborizaciones dendríticas de las neuronas de Purkinje, aplanadas y orientadas en ángulos rectos respecto al eje longitudinal del pliegue, por lo que son atravesadas por las fibras paralelas de las que reciben sinapsis excitadoras.

### ***Circuito y su procesamiento.***

Las proyecciones aferentes al cerebelo se originan principalmente en la médula espinal (fibras espinocerebelosas), núcleo olivar inferior (fibras olivocerebelosas), núcleos vestibulares (fibras vestibulocerebelosas) y puente (fibras pontocerebelosas). La mayor parte de los axones aferentes terminan excitando las neuronas de la corteza cerebelosa. Las fibras entran en el cerebelo por uno de los pedúnculos cerebelosos y siguen hacia la corteza.

Las aferencias que se originan en la oliva inferior terminan como fibras musgosas, que se ramifican y acaban en la capa granulosa, donde establecen contactos sinápticos con las células granulosas (Fig. 3).

Las células granulosas se originan a partir de distintos grupos celulares del tronco cerebral, sobre todo los núcleos pontinos que transmiten información desde la neocorteza cerebral. De cada célula surge una prolongación eferente hasta la capa molecular, donde se bifurca en dos ramas en forma de T de varios milímetros de longitud denominadas fibras paralelas, que atraviesan las “arborizaciones” dendríticas de varias células de Purkinje, dispuestas en un plano perpendicular a ellas (Fig. 3).

Los únicos axones que salen de la corteza cerebelosa, principalmente hacia los núcleos del cerebelo, son los de las células de Purkinje, que utilizan el ácido gamma-amino-butírico (GABA) como neurotransmisor, lo que significa que la respuesta de casi toda la corteza cerebelosa es mediada por la inhibición de las células de los núcleos del cerebelo.

Las células estrelladas y las células en cesta establecen contactos con las células de Purkinje a través de los cuales inhiben su actividad, también sus neuritas receptoras corren perpendiculares a las fibras paralelas cuyos estímulos registran (Fig. 3).

El otro tipo de fibras aferentes que entra en la corteza cerebelosa, las fibras trepadoras, surgen de la oliva inferior del bulbo raquídeo (que integra la información procedente de los propioceptores musculares) y llegan hasta las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje a las que excitan, también sus colaterales axónicas excitan las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos.

La actividad de las fibras trepadoras es registrada por las células de Golgi, cuyas prolongaciones se ramifican entre las células granulosas y les transmiten una señal inhibitoria, procurando que la actividad general de la corteza cerebelosa no sea excesiva.

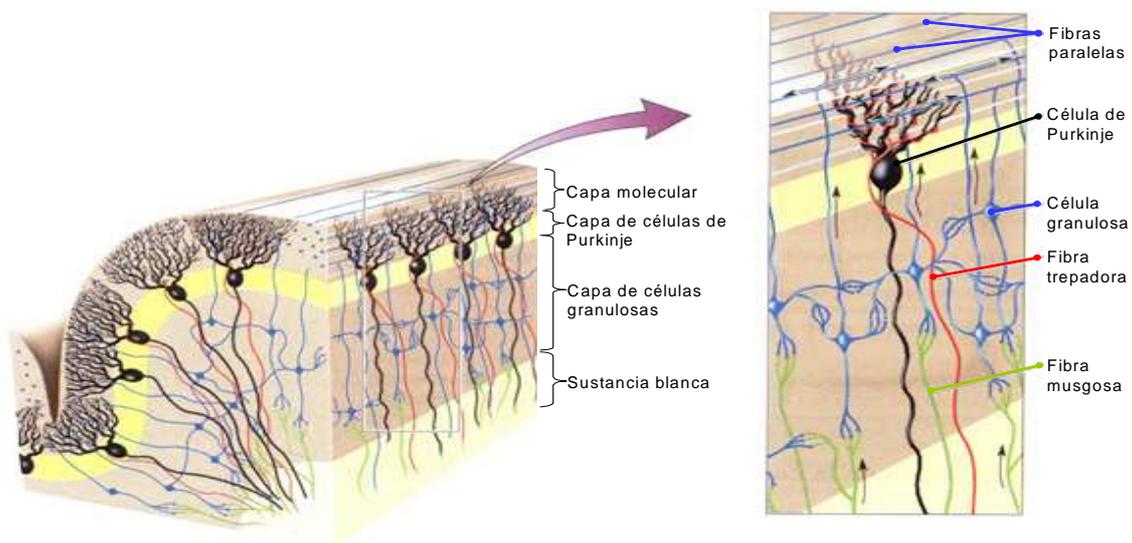
#### Plasticidad sináptica en la corteza cerebelosa y depresión a largo plazo (DLP).

El cerebelo es un importante lugar de aprendizaje motor donde se llevan a cabo las correcciones cuando el resultado de los movimientos no satisface las expectativas.

Los tres factores implicados en este proceso son las aferencias excitadoras de fibras trepadoras y paralelas y las dendritas de las neuronas de Purkinje de la siguiente forma: una célula de Purkinje recibe una sola aferencia de una fibra trepadora pero de cientos de sinapsis excitadoras, generando un PPSE excepcionalmente amplio. A diferencia de esto, una célula de Purkinje recibe aferencias mono-sinápticas de muchas fibras paralelas distintas (Fig. 3).

Se ha propuesto que la aferencia de la fibra trepadora conduce las señales de error de un movimiento que no ha logrado satisfacer las expectativas y las correcciones se efectúan ajustando las aferencias de las fibras paralelas a la célula de Purkinje.

En relación a esto se ha descrito la depresión a largo plazo (DLP), consistente en una menor respuesta post-sináptica de la neurona de Purkinje a la activación de las fibras paralelas cuando se ha estimulado previamente al mismo tiempo con aferencias trepadoras y paralelas, esta modificación puede durar como mínimo una hora.



**Figura 3. Organización general de la corteza cerebelosa.**

El esquema muestra una circunvolución cerebelosa en sentido vertical, tanto en su eje longitudinal (parte derecha) como transversal (parte izquierda). En negro se muestran las neuronas de Purkinje, en azul, las células granulosas y sus axones ascendentes (fibras paralelas); en rojo, las fibras trepadoras; y en verde, las fibras musgosas. Adaptado de Bear *et al.* (2002).

## **1.2. Células gliales.**

Existen tres clases principales de células gliales en el cerebelo: oligodendrocitos, microglía y células astrogliales, todas ellas con funciones diferentes.

### ***Oligodendrocitos.***

Son los encargados de la mielinización de los axones neuronales en el SNC, por lo cual se encuentran en gran número en la sustancia blanca. Cada oligodendrocito forma la mielina internodal de 3 a 50 fibras y también rodea a muchas otras fibras sin formar vainas de mielina. A pesar de esta función mielinizante expresan una serie de moléculas inhibitoras del crecimiento axónico, pudiendo contribuir al fracaso de la regeneración de neuronas dañadas en el SNC del individuo adulto.

### ***Células microgliales.***

La microglía tiene su origen en el sistema reticuloendotelial y se encuentra en las sustancias blanca y gris del SNC. Son células fagocitarias importantes en la mediación de las respuestas inflamatorias dentro del SNC, entre las que se incluyen la alta producción de óxido nítrico y de citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina-1 $\beta$ , especialmente relevantes en nuestro estudio puesto que la presencia de células microgliales en nuestros cultivos podría constituir una fuente significativa de óxido nítrico (NO $\cdot$ ) no astrogliar y una producción endógena de interleuquina-1 $\beta$ , utilizada como inductor de NOS-2 en nuestras células.

### ***Células astrogliales.***

Los astrocitos son pequeñas células estrelladas que se encuentran en todo el SNC, de forma que ocupan la mayor parte del espacio que no está ocupado por otras células o capilares. Son las células más abundantes en el SNC y se pueden clasificar en función de su morfología o de su ontogenia (tabla 1). En la corteza cerebelosa predominan los astrocitos protoplásmicos entre los que destaca un tipo peculiar denominado glía de Bergmann. Cuyo soma se halla en proximidad de las células de Purkinje y se relaciona estrechamente con las sinapsis que establece esta neurona.

**Tabla 1. Clasificación de los astrocitos.**

Morfológica	Protoplasmáticos	Estructura poco fibrosa. Mas frecuentes en la sustancia gris.
	Fibrosos	Numerosos filamentos. Más frecuentes en la sustancia blanca.
Ontogénica	Tipo I	Derivan de una célula progenitora 1A astrogial.
	Tipo II	Derivan de una célula progenitora O-2A* que también puede dar lugar a oligodendrocitos.

\*En nuestras condiciones experimentales de cultivo celular de astrocitos primarios, es un artefacto del propio cultivo. Adaptado de Barker & Barasi (2002).

Los astrocitos no son simples células de sostén pasivas, sino que desempeñan muchas funciones importantes dentro del SNC (tabla 2) (Markiewicz y Lukomska, 2006), entre las que destacan su participación en la defensa inmunológica del parénquima neural y sus funciones en procesos patológicos.

**Tabla 2. Funciones fisiológicas de los astrocitos.**

<p>Constitución de un armazón estructural y de soporte (barreras hematoencefálica y pial-glial).</p> <p>Mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica.</p> <p>Compartimentación metabólica (recaptura de neurotransmisores en las sinapsis y suministro de éstos a neuronas).</p> <p>Secuestro o redistribución de <math>K^+</math> durante la actividad neural.</p> <p>Guía neuronal durante el desarrollo (glía radial y de Bergmann).</p> <p>Defensa inmunológica del SNC.</p>
---

El SNC tiene un relativo privilegio inmunológico si se le compara con el SNP y con muchas otras partes del cuerpo. Esto es debido al pobre desarrollo del sistema de drenaje linfático del SNC, al bajo nivel de expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y a que la barrera hematoencefálica (BHE) normalmente impide que los linfocitos, macrófagos y anticuerpos penetren en él.

En el estado de reposo, algunos linfocitos T activados son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y circular dentro del SNC. Sin embargo, en un estado de inflamación en el que se altera la integridad de la BHE, una vez desencadenada una respuesta inmunitaria, puede ser amplificada y propagada por la liberación de citoquinas y la expresión del MHC. En estas circunstancias, los astrocitos actúan como células presentadoras de antígeno y, junto a la microglía, participan en la defensa inmunológica

del SNC mediante su proliferación y la producción de óxido nítrico (los astrocitos y las células microgliales son las principales fuentes de este radical en el SNC). Respecto a la de las células microgliales, la activación de los astrocitos es menos intensa y generalmente depende de ciertas citoquinas pro-inflamatorias liberadas por la microglía activa. Sin embargo, los astrocitos son mucho más numerosos y su interacción con los linfocitos T cooperadores es crucial para la generación de una reacción inmunológica completa aunque no sea necesaria para una reacción inflamatoria.

Por otro lado, los astrocitos pueden participar en procesos patológicos. El trastorno clínico más común de los astrocitos es su proliferación anormal en los tumores denominados **astrocitoma, astroglioma, glioma o glioblastoma multiforme** (según el estadio de desarrollo y la agresividad del tumor). Otra acción patológica de los astrocitos es la limitación de la capacidad regenerativa del SNC del adulto ya que producen señales que detienen el crecimiento de los axones. Esta actividad es más notoria en el momento en que el SNC sufre una agresión, situación en la que estas células gliales se dividen, se activan y forman una cicatriz glial. De forma adicional, se han propuesto muchas otras funciones fisiológicas y patológicas (tabla 3) que se describen detalladamente en la serie “*New roles for astrocytes*” (Cotrina y Nedergaard, 2002; Horner y Palmer, 2003; Nedergaard *et al.*, 2003; Newman, 2003; Ransom *et al.*, 2003; Slezak y Pfrieger, 2003).

**Tabla 3. Funciones propuestas para los astrocitos.**

<b>Fisiológicas</b>	<b>Patológicas</b>
Proveer de sustratos energéticos a las neuronas. Compartir sustratos energéticos derivados del glucógeno con neuronas. Homeostasis hídrica. Mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica. Regulación del pH extracelular. Modulación de sinapsis excitadoras e inhibitoras. Regulación de la sinaptogénesis. Regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto (hipocampo). Detoxificación de radicales libres.	Encefalopatía hepática. Modulación del infarto neural (secuestro de radicales libres, homeostasis del glutamato, expression de conexinas). Modulación trófica de la reparación neural y regeneración axónica tras un daño. Liberación de citoquinas y quimoquinas. Neuroinflamación.

## 2. ÓXIDO NÍTRICO (NO·) Y ACTIVIDAD NOS-2.

### 2.1. NO·. Introducción.

El descubrimiento de que las células de mamífero sintetizan óxido nítrico supuso un hito en el campo de la fisiología y fisiopatología e inició un enorme número de estudios. La actividad del NO· media distintos procesos fisiológicos en una gran variedad de tejidos (Moncada y Palmer, 1991; Moncada *et al.*, 1991), tales como la regulación del tono vascular (Furchgott y Zawadzki, 1980), la relajación intestinal (Desai *et al.*, 1991a; Desai *et al.*, 1991b), la erección del pene (Burnett *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 1992; Rajfer *et al.*, 1992) y la inhibición de la agregación plaquetaria (Inoue, 2004) en el sistema cardiovascular; la citotoxicidad mediada por células (macrófagos y neutrófilos) (Marletta, 1989) en el sistema inmunitario.

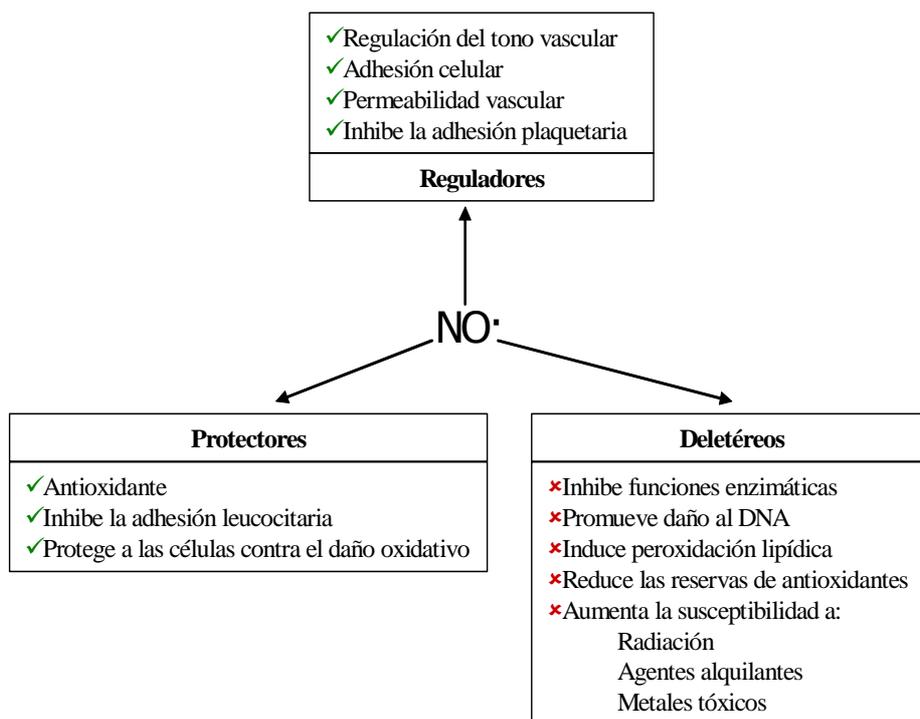
Junto a lo dicho anteriormente, el NO· formado endógenamente participa en un gran número de procesos inflamatorios crónicos tales como artritis, entre otras, shock séptico, y algunos desórdenes autoinmunes (Loscalzo y Welch, 1995; Nathan, 1997; Grisham *et al.*, 1998; Hierholzer *et al.*, 1998).

Este radical libre diatómico es una importante molécula de señalización cuya vía de transducción de señales mayoritaria en condiciones fisiológicas transcurre mediante su unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (Ignarro *et al.*, 1982), siendo el GMPc el efector real que regula la fisiología celular por activación de proteínas quinasas, apertura de canales iónicos, y alteración de los niveles de nucleótidos cíclicos mediante regulación de las fosfodiesterasas (PDEs) (Waldman y Murad, 1987). Además de esta vía de transducción NO·/cGMP, el NO· puede ejercer acciones distintas mediante otros mecanismos que no requieren proteínas efectoras y que son consecuencia de la propia reactividad química del radical (Fig. 4).

En el sistema nervioso, el NO· es clave en distintos procesos fisiológicos como la liberación de factores neurotróficos, neurogénesis y desarrollo neural (Contestabile, 2000), nocicepción (Haley *et al.*, 1992a), fenómenos de plasticidad sináptica en hipocampo (Haley *et al.*, 1992b) y cerebelo (Shibuki y Okada, 1991), transmisión sináptica (Schmidt y Walter, 1994; Schuman y Madison, 1994) y consolidación de la memoria y el aprendizaje (Lev-Ram *et al.*, 1997a; Lev-Ram *et al.*, 1997b; Monfort *et al.*, 2002). Sin embargo, el NO· producido en grandes cantidades principalmente por

astrocitos reactivos y microglía (los dos tipos celulares gliales involucrados en la regulación inmune intracerebral) contribuye significativamente a la patogénesis de las enfermedades desmielinizantes inflamatorias como la esclerosis múltiple y su modelo animal, la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (Jana *et al.*, 2005), la neurodegeneración en patologías como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, ELA y Huntington, y las patologías asociadas a infecciones bacterianas y víricas (Bhat *et al.*, 2003), mediante los efectos deletéreos nombrados en la figura 4.

Los astrocitos en el cerebro sano no son capaces de generar  $\text{NO}\cdot$  inflamatorio pero tras un daño isquémico, traumático, neurotóxico o inflamatorio, los astrocitos reactivos de ratón, rata, y humanos desarrollan la capacidad de generar  $\text{NO}\cdot$  en niveles inflamatorios deletéreos (Bhat *et al.*, 2002).



**Figura 4. Efectos reguladores, protectores y deletéreos del  $\text{NO}\cdot$ .**

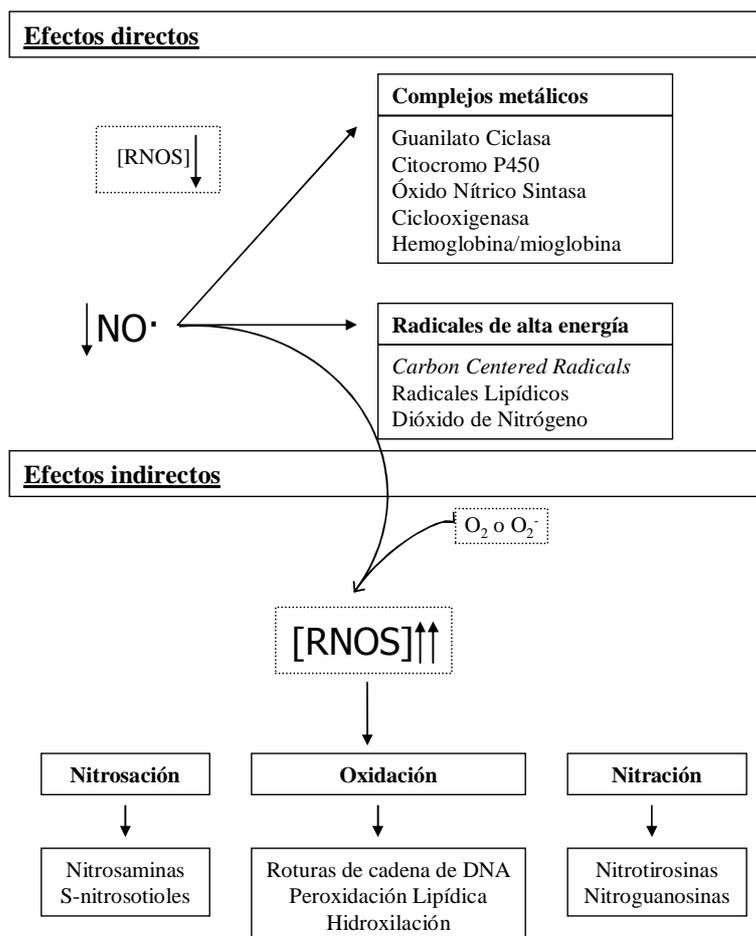
Podemos describir al  $\text{NO}\cdot$  como una molécula muy inestable en ambientes aeróbicos, generando intermediarios tóxicos y que, al mismo tiempo, desempeña funciones esenciales en la fisiología normal de los organismos. Adaptado de Wink *et al.* (1998).

***Propiedades fisico-químicas del óxido nítrico.***

El NO· es una sencilla molécula gaseosa biológicamente activa, de bajo peso molecular (30 Da) y con una solubilidad moderada en medio acuoso y muy alta en solventes hidrófobos (70 veces más soluble), en los cuales puede alcanzar, en condiciones normales, una concentración de 1.9 mM (Fukuto, 1995). Estas características, junto con su carga nula, le permiten difundir fácilmente a través de las membranas biológicas y las paredes celulares de hongos y bacterias (Welch y Loscalzo, 1994). Su difusión transcelular es más rápida que la velocidad a la que tienen lugar las reacciones intracelulares, por lo que la concentración de NO· en el interior de una célula está determinada por el número de células productoras de NO· que la rodean (Murphy, 2000), de forma que es un mensajero paracrino más que autocrino. Sin embargo, su vida media de 5-15 segundos limita su difusión a un radio de aproximadamente 1 mm desde el lugar de síntesis (Ignarro, 1990).

Puesto que el NO· atraviesa libremente las bicapas lipídicas, no puede ser almacenado en vesículas. Debe ser sintetizado bajo demanda en el momento y eliminado mediante reacciones químicas (Beckman y Koppenol, 1996). Su concentración en una localización dada dependerá del balance de síntesis y degradación, así como su difusión. Por ello, la determinación del tiempo, la localización y los ritmos de producción de NO· y las especies derivadas del mismo ayudan a identificar qué efectos predominarán en cada situación

Para facilitar el estudio de las posibles reacciones, es conveniente separar la química del NO· en reacciones directas e indirectas (Fig. 5). Las reacciones directas son aquellas en las que el NO· interactúa directamente con su diana biológica y, se considera que tienen lugar bajo condiciones fisiológicas normales en las que el ritmo de producción de NO· suele ser bajo. Por lo general, este tipo de reacciones forman parte de las funciones reguladoras o antiinflamatorias del NO·, a diferencia de las reacciones indirectas, mediadas por derivados del NO· como las especies reactivas de nitrógeno (RNOS) generadas por la reacción del NO· con oxígeno (O<sub>2</sub>) o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). En general, este tipo de reacciones predominan durante el proceso de inflamación activa, durante el que tiene lugar una gran producción de NO· (Grisham *et al.*, 1999).



**Figura 5. Química fisiológica del NO·.**

La concentración es el principal determinante del tipo de efecto que el NO· ejerce en los sistemas biológicos, su estudio proporciona las bases para distinguir sus propiedades reguladoras/antiinflamatorias de sus efectos deletéreos/proinflamatorios, permitiendo identificar cuales de las muchas reacciones dependientes de NO· son importantes para la modulación de la respuesta inflamatoria, y puede ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del daño tisular por inflamación. El NO· reacciona preferentemente con los complejos metálicos y con los radicales reactivos (reacciones directas), las reacciones indirectas tienen lugar cuando la producción de NO· excede la de complejos metálicos y radicales ricos en energía, y queda NO· disponible para reaccionar con otras moléculas como  $O_2$  u  $O_2^-$  y formar RNOS (efectores directos de las reacciones indirectas del NO·). RNOS, especies reactivas de óxido de nitrógeno. Adaptado de Wink *et al.* (1998).

***Acciones directas del NO·.***

La interacción del NO· con metaloproteínas o con radicales orgánicos libres representa dos de sus efectos directos mejor caracterizados en los sistemas biológicos.

Complejos metal-nitrosilo.

La reacción más evidente del NO· para formar aductos estables de nitrosilo es con el grupo hemo de proteínas (Wink *et al.*, 1998a), la más notable de las cuales es la interacción con la GC que media la relajación del músculo liso de la pared vascular.

*NO·, complejos metálicos, y estrés oxidativo.*

Muchos estudios sugieren que el NO· puede modular las reacciones de oxidación catalizadas por hierro tales como la reacción de Fenton dirigida por O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Grisham *et al.*, 1999), que produce oxidantes muy fuertes como el radical hidroxilo (HO·), lo que explica la efectividad de la catalasa y los quelantes de hierro en la atenuación del daño tisular durante la inflamación (Granger y Kubes, 1996).

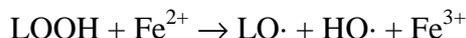
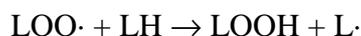
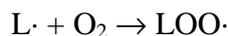
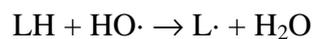


Otra reacción moduladora del NO· es su interacción con los complejos metaloxo (Kanner *et al.*, 1991) y estados de oxidación mayores de hemoproteínas (Jour'dheuil *et al.*, 1998), previniendo la acumulación de potentes oxidantes proinflamatorios y potencialmente deletéreos.

El NO· y los radicales libres.

El NO· puede modular la peroxidación lipídica catalizada por metales o enzimas (Rubbo *et al.*, 1994) reaccionando con radicales libres de gran energía como los alquil-oxo (RO·) e-hidroperoxo (ROO·) (Grisham *et al.*, 1999).

La peroxidación lipídica se inicia con la formación de potentes oxidantes como HO· o ferril-hemoproteínas que producen radicales alquilo lipídicos (L·) a partir de ácidos grasos poli-insaturados (LH). Estos radicales L· son entonces convertidos en radicales hidroperóxilos (LOO·) mediante su interacción con O<sub>2</sub>. Un LOO· puede atraer a un hidrógeno alílico de otro LH, propagando así la reacción de radicales libres.



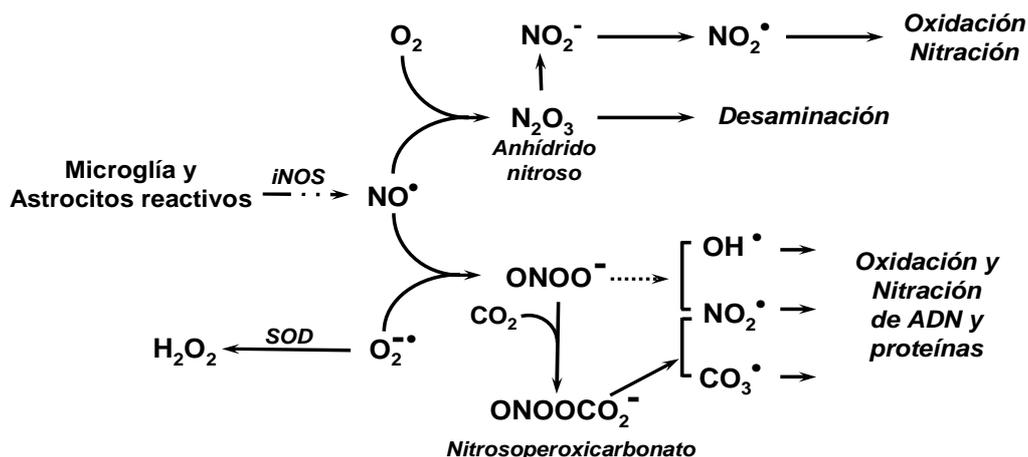
El NO· reacciona rápidamente con estos radicales lipídicos alquil-oxo (LO·) y alquil-peroxo (LOO·), formando LONO y LONOO respectivamente, los cuales, a su vez, conducen a la terminación de la cadena de reacciones (Rubbo *et al.*, 1994).



Esta terminación de la cadena de reacciones limita la extensión de la peroxidación lipídica y atenúa la formación de mediadores lipídicos proinflamatorios. No obstante, aún no se conocen los efectos que puede tener la formación de LONO y LOONO en condiciones fisiológicas. Ambas moléculas pueden ser degradadas hasta NO<sub>2</sub> y L· o LO·, respectivamente, con reordenamiento de L· o LO· a un radical ácido epoxialílico L(O)· seguido de recombinación con NO· (O'Donnell *et al.*, 1999). En principio se puede decir que las acciones directas del NO· están implicadas, aunque no exclusivamente, en procesos reguladores, protectores y anti-inflamatorios *in vivo*.

#### ***Acciones indirectas: Metabolitos de NO·.***

Estas acciones están mediadas por las especies derivadas de la interacción del NO· con O<sub>2</sub> o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Fig. 6). De hecho, estas especies son importantes mediadores de la fisiopatología asociada a varios modelos de inflamación (Nathan, 1997; Hierholzer *et al.*, 1998; Wink y Mitchell, 1998; Grisham *et al.*, 1999), y procesos de neurotoxicidad (Dawson *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1993). Estas reacciones proporcionan un equilibrio dinámico en los sistemas biológicos y son clave para comprender el papel de los efectos indirectos del NO· en estos.

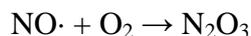


**Figura 6.** ROS y NOS derivados de células microgliales y astrocitos reactivos.

Las especies reactivas de óxido de nitrógeno producidas *in vivo* más prevalentes son el trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), los cuales pueden producir estrés químico nitrosativo y oxidativo, respectivamente, generalmente asociados a ciertas situaciones fisiopatológicas, como la inflamación, donde la NOS-2 está activa (Wink y Mitchell, 1998).

### Interacciones NO·-O<sub>2</sub>.

El óxido nítrico puede reaccionar con el O<sub>2</sub> generando intermediarios reactivos que, a su vez, pueden mediar otras reacciones oxidativas y nitrosativas adicionales. La autoxidación del NO· en medios acuosos conduce a la formación de especies reactivas de óxido de nitrógeno como el N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que es un potente agente nitrosante (Wink *et al.*, 1998a; Wink y Mitchell, 1998; Grisham *et al.*, 1999).



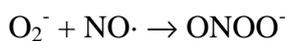
Debido a la rápida reacción del NO· con otras dianas biológicas como las hemoproteínas, el ritmo al que ocurre esta reacción es demasiado lento como para tener consecuencias notables en condiciones fisiológicas *in vivo* a pesar de que en un medio hidrofóbico, como la membrana celular, se puede acelerar más de 1000 veces (Liu *et al.*, 1998). Por otro lado, en las condiciones caracterizadas por una [NO·] superior a la batería celular de dianas biológicas, se produce una gran cantidad de N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, el principal mediador del estrés oxidativo *in vivo*, que puede nitrosar varias dianas biológicas y generar derivados nitrosaminas y nitrosotioles (RNSO) potencialmente carcinogénicos

(Wink y Mitchell, 1998; Grisham *et al.*, 1999). La nitrosación de aminas tiene lugar por la interacción del  $N_2O_3$  con compuestos amino y es el mejor indicador de estrés nitrosativo en los organismos vivos. De hecho, la N-nitrosación *in vivo* puede ser importante en la asociación existente entre inflamación crónica y transformación maligna (Wink *et al.*, 1998a; Wink y Mitchell, 1998; Wink *et al.*, 1998b; Wink *et al.*, 1998c; Grisham *et al.*, 1999).

Los aductos de S-nitrosotioles (RSNO) también se forman fácilmente mediante la interacción entre  $N_2O_3$  y ciertos tioles (Wink y Mitchell, 1998; Grisham *et al.*, 1999) y juegan un importante papel en el transporte de  $NO\cdot$ , rutas de transducción de señal, y regulación de expresión génica (Grisham *et al.*, 1999). Se piensa que el factor relajante derivado del endotelio debe ser, en última instancia, un aducto de RSNO. La S-nitroso-albúmina es una de los nitrosotioles más abundantes en el plasma humano con concentraciones de  $5\ \mu M$  (Stamler, 1994; Grisham *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2002). Además, muchos RSNOs liberan  $NO\cdot$  espontáneamente o a través de su metabolización, alargando temporalmente muchas de las funciones biológicas del  $NO\cdot$  (Ignarro, 1990), y pueden promover o perpetuar la inflamación crónica. La S-nitrosación de un residuo de cisteína específico en la proteína  $p21^{Ras}$  en linfocitos es crítica para el intercambio de guanina y puede resultar en la formación de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) (Lander, 1996).

#### Interacciones $NO\cdot$ - $O_2^-$ .

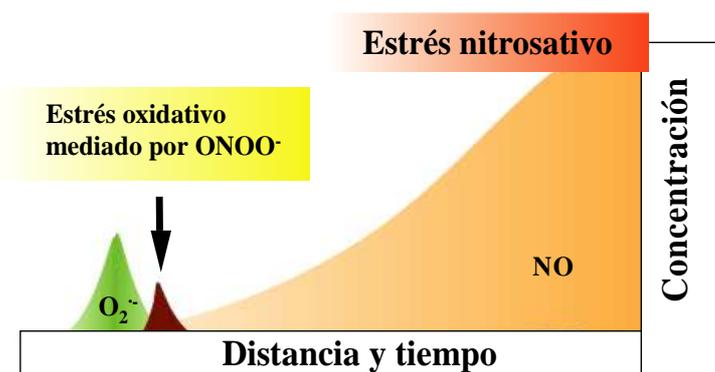
A pesar de que la reacción de  $NO\cdot$  y  $O_2^-$  puede considerarse como una ruta detoxificante y anti-inflamatoria por suponer la retirada de  $O_2^-$  sin formación de  $H_2O_2$  (Granger y Kubes, 1996; Wink y Mitchell, 1998). La mayor parte de los daños tisulares y vasculares observados en diferentes modelos de inflamación son inhibidos por SOD y por inhibidores de NOS, sugiriendo que  $O_2^-$  y  $NO\cdot$  son importantes mediadores del daño tisular y de la disfunción orgánica (Granger y Kubes, 1996; Nathan, 1997; Grisham *et al.*, 1998; Hierholzer *et al.*, 1998). Ni  $O_2^-$  ni  $NO\cdot$  son citotoxinas u oxidantes potentes pero la generación simultánea de cantidades equivalentes de ambos sinergiza, lo que da lugar a otros agentes con gran poder oxidante y citotóxico: el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y su ácido conjugado ( $ONOOH$ ) (Rubbo *et al.*, 1994; Beckman y Koppenol, 1996; Miles *et al.*, 1996). Esto implica que los flujos relativos de  $O_2^-$  y  $NO\cdot$  controlan la concentración estándar de  $ONOO^-$  *in vivo*.



Esta hipótesis proporciona una explicación bioquímica para los importantes, aunque controvertidos, efectos protectores de la administración intravenosa de análogos de la L-arginina en modelos de daño tisular inflamatorio.

Las concentraciones celulares de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{NO}\cdot$  en condiciones normales son 0.1-1 nM y 0.1-1  $\mu\text{M}$  respectivamente (Wink y Mitchell, 1998). Estos valores sugieren que la producción de  $\text{O}_2^-$  es la que determina la localización de la reacción entre estos radicales y la cantidad de  $\text{ONOO}^-$  formada. La concentración y el coeficiente de difusión del  $\text{NO}\cdot$  determinan si la reacción tiene lugar en alguna localización específica.

Para ilustrar este concepto, es útil considerar un modelo de dos puntos fuente de  $\text{NO}\cdot$  y de  $\text{O}_2^-$  (Fig. 7). La producción simultánea de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{NO}\cdot$  produciría un estrés nitrosativo máximo (interacciones  $\text{NO}\cdot\text{-O}_2^-$ ) cerca de la fuente de  $\text{NO}\cdot$ .



**Figura 7. Difusión e interacción de  $\text{NO}\cdot$  con superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).**

Conforme el  $\text{NO}\cdot$  difunde lejos de su punto de formación, se diluye su concentración, entonces predominan los efectos directos sobre los indirectos. Conforme el  $\text{NO}\cdot$  se aproxima a la fuente de  $\text{O}_2^-$  reacciona formando peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ). Cuya producción, y estrés oxidativo derivado, están limitados a las proximidades de la fuente de  $\text{O}_2^-$ .

El peroxinitrito en solución neutra puede oxidar tioles y tioésteres, nitrar y oxidar guanosina, degradar carbohidratos, iniciar la peroxidación lipídica, romper la cadena de DNA, y nitrar ciertos compuestos fenólicos como la tirosina para generar 3-nitro-tirosina (3-NT) (Pryor y Squadrito, 1995), que ejerce efectos dramáticos cuando altera las rutas de señalización relacionadas con las tirosinas quinasas (Jana *et al.*,

2005). Se considera que el principal agente responsable de estas reacciones oxidativas es un isómero excitado electrónicamente del ONOOH (ONOOH·) que presenta las mismas propiedades que HO· y que NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Beckman y Koppenol, 1996).

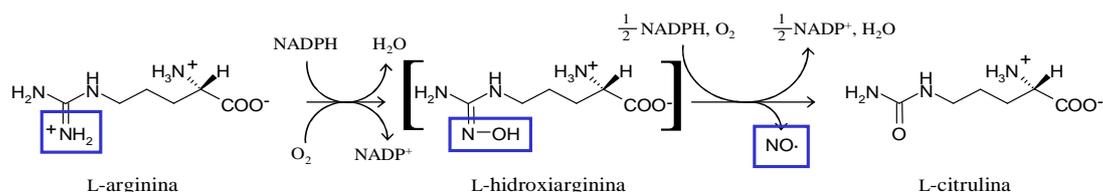
El peroxinitrito existe en equilibrio con el ONOOH, y en ausencia de sustrato esta forma protonada se descompone generando nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mediante la formación intermediaria del isómero excitado (ONOOH·)



En el tejido neural, los tipos celulares que podrían producir las cantidades óptimas de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO· para generar ONOO<sup>-</sup> son la microglía, los astrocitos reactivos y, posiblemente, las células endoteliales (Grisham *et al.*, 1999).

## 2.2. Producción intracelular de NO·.

El NO· se sintetiza en una reacción de oxidación de 5 e<sup>-</sup> del nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina (L-Arg), con la N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina como intermediario y la L-citrulina como subproducto (Michel y Feron, 1997), mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Palmer *et al.*, 1987; Stuehr, 1997).

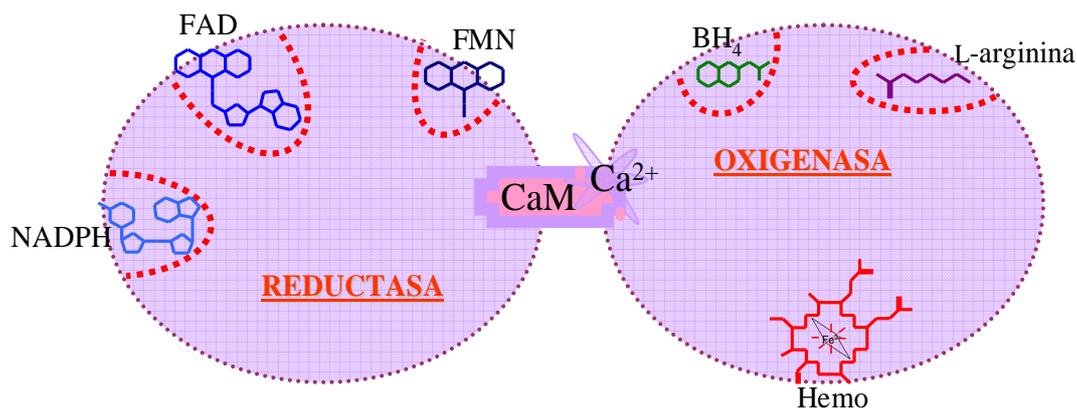


**Figura 8. Biosíntesis del NO·.**

La síntesis enzimática de NO· a partir de L-Arg implica la formación del compuesto intermedio N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina (L-OHArg), y utiliza NADPH como donador de electrones (Marletta, 1989; Moncada y Palmer, 1991; Stuehr, 1997). Esta reacción tiene lugar en presencia de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y tras la interacción de la óxido nítrico sintasa con la enzima Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina (CaM) (Bredt y Snyder, 1990), con la intervención simultánea de cinco cofactores y grupos prostéticos: grupo hemo (Fe<sup>3+</sup>), (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-biopterina (BH<sub>4</sub>), y los cofactores de flavina flavín-adenín-dinucleótido (FAD) y flavín-mononucleótido (FMN) (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991).

### 2.3. La actividad óxido nítrico sintasa (NOS).

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS, EC 1.14.13.39) (Groves y Wang, 2000) es una enzima dimérica de la que se han descrito varias isoformas (NOS-1 o nNOS, NOS-2 o iNOS, NOS-3 o eNOS), cada una de las cuales presenta dominios similares (Mayer y Andrew, 1998) (Fig. 9).



**Figura 9. Estructura general de la NOS.**

La proteína NOS presenta un dominio reductasa C-terminal (homólogo con la citocromo P-450 reductasa) donde se encuentran los sitios de unión para las flavinas (FAD, FMN) y el NADPH, y un dominio oxigenasa N-terminal que incluye los sitios de unión para un grupo hemo Fe<sup>3+</sup>, tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), y L-Arg. Ambos dominios están unidos por un segmento de 30 aminoácidos que contiene una secuencia de reconocimiento para Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina (CaM). Adaptado de Alderton *et al.* (2001).

Todas las células del parénquima del sistema nervioso central (SNC), junto con las del músculo liso y del endotelio de las paredes de los vasos cerebrales y las células que se infiltran en el parénquima tras cambios en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) pueden expresar actividad NOS (Merrill y Murphy, 1997a; Murphy, 2000), es decir, son capaces de sintetizar NO·. El primer indicio de la producción glial de NO· surgió de cultivos astrogiales (Murphy *et al.*, 1993), y hoy día hay suficientes evidencias de que las tres isoformas de NOS pueden ser expresadas en estas células (Caggiano y Kraig, 1998; Colasanti *et al.*, 1998; Loihl *et al.*, 1999a; Wiencken y Casagrande, 1999; Murphy, 2000). Bajo condiciones inflamatorias, la NOS-2 es expresada de manera importante por astrocitos reactivos y microglía, los dos tipos celulares gliales implicados en la regulación inmune intracerebral (Bhat *et al.*, 2002). Las funciones propuestas para este NO· derivado de la glía en la patofisiología

del SNC son muy diversas e incluyen señalización intercelular, muerte necrótica de células y patógenos invasores, apoptosis y remodelación tisular (Murphy, 2000).

### ***Mecanismo de acción de la NOS.***

Todas las isoenzimas de NOS catalizan la reacción entre la L-Arg, O<sub>2</sub> y NADPH para producir L-citrulina, NADP y NO· (Alderton *et al.*, 2001).

La biosíntesis de NO· puede definirse como una reacción redox en la que se van transfiriendo los electrones desde el NADPH a través de una cadena de oxidación en la que participan todos los cofactores mencionados hasta la citrulina y el NO· (Fig. 9), reacción que puede dividirse en dos reacciones sucesivas de monooxigenación claramente diferenciadas (Fig. 10 y 11):

- 1.- En el primer ciclo de oxidación se reclutan dos equivalentes reductores derivados del NADPH, para la oxidación de la L-Arg a L-OHArg (monooxigenasa I) (Leone *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991; Marletta, 1993; Marletta, 1994).
- 2.- En el segundo ciclo de oxidación tiene lugar la ruptura oxidativa del enlace C=N de la L-OHArg (monooxigenasa II), formándose el aminoácido no proteínogénico L-Citrulina y el radical libre de nitrógeno final, el NO· (Korth *et al.*, 1994).

En ambos pasos se consume NADPH y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>).

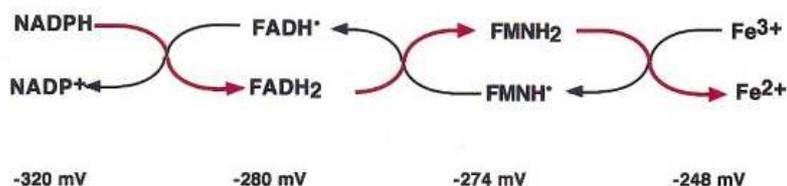
El papel fundamental de los cofactores de flavina es permitir que un donador de electrones (en este caso el NADPH) los transfiera a un aceptor monoelectrónico (grupo hemo), mediante la formación de intermediarios radicalarios semiquinónicos.

Durante la reacción de la NOS, los electrones son transferidos uno a uno, desde NADPH hasta FAD y de este a FMN, ambos en el mismo dominio. Desde el FMN los electrones serán transferidos al grupo hemo, no obstante, dada la conformación estructural de la enzima, el FMN de una subunidad sólo puede transferir los electrones al grupo de hemo de la otra subunidad, no al propio (Siddhanta *et al.*, 1996), esto hace esencial la dimerización y explica la inactividad de las NOS en forma monomérica.

Respecto a la BH<sub>4</sub>, la reacción monooxigenasa I es dependiente mientras que la monooxigenasa II sólo precisa de su actividad como modificadora del grupo hemo (Presta *et al.*, 1998). Entre las funciones de la BH<sub>4</sub> se han descrito el acoplamiento de la oxidación del NADPH a la síntesis de NO· y se le ha responsabilizado de múltiples

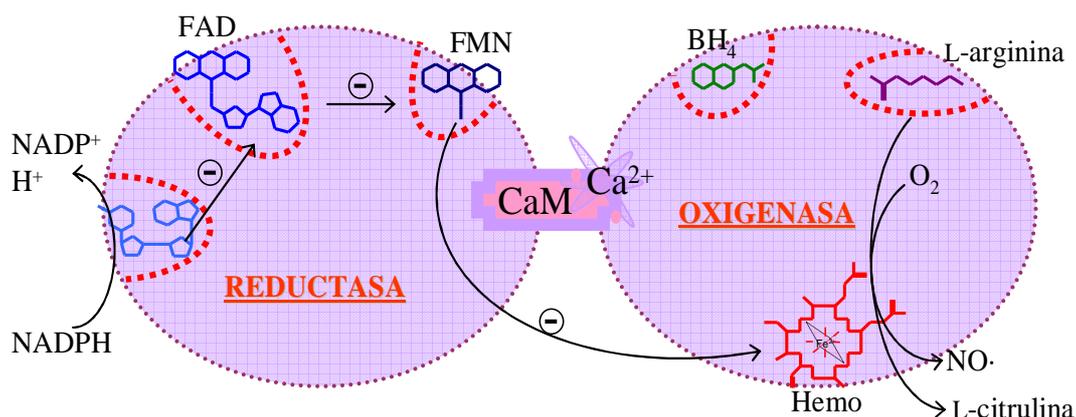
efectos alostéricos sobre la actividad enzimática tales como la formación del dímero y su estabilización (Alderton *et al.*, 2001).

La unión de CaM parece ser el punto de control de la reacción (Matsuda y Iyanagi, 1999), porque aumenta el ritmo de transferencia de electrones desde el NADPH hasta las flavinas del dominio reductasa (Gachhui *et al.*, 1996; Gachhui *et al.*, 1998) y desde éstos hasta el grupo hemo (Abu-Soud *et al.*, 1994).



**Figura 10. Potenciales redox y flujo de electrones en NOS-1.**

El flujo de electrones es  $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN}$  en el dominio reductasa de un monómero hacia el grupo hemo del dominio oxigenasa del otro monómero. Los potenciales redox están ajustados escalonadamente para permitir que esto ocurra termodinámicamente. Los potenciales de las oxidaciones de los 2 electrones del NADPH, del electrón de  $\text{FADH}_2$ , de  $\text{FMNH}_2$  y del grupo hemo están ilustrados en el esquema, las flechas rojas indican la dirección del flujo de electrones. Dada la variedad de parejas redox y la proximidad de los potenciales de  $\text{FADH}_2$  y  $\text{FMNH}_2$ , el esquema real es más complicado que el representado. Adaptado de Alderton *et al.* (2001).



**Figura 11. Formación de  $\text{NO}\cdot$  por NOS.**

El NADPH dona los electrones ( $e^-$ ) al dominio reductasa de una de las dos moléculas de NOS-2, y éstos circulan a través de FAD y FMN hasta el dominio oxigenasa de la otra molécula, donde se encuentra el centro activo de la enzima. Allí interaccionan con el catión del grupo hemo  $\text{Fe}^{3+}$  y con la  $\text{BH}_4$ , catalizando así la reacción del  $\text{O}_2$  con la L-arginina, para producir L-citrulina y  $\text{NO}\cdot$ . El transporte de electrones a través del dominio reductasa requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Adaptado de Alderton *et al.* (2001).

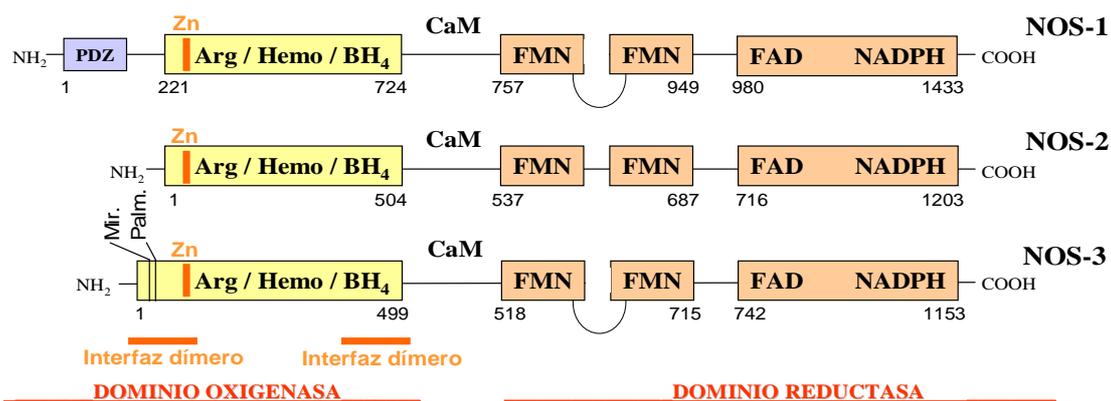
## 2.4. Las óxido nítrico sintasas (NOSs).

Se diferencian dos tipos de producción de NO·: una constitutiva poco intensa y una inducible que puede liberar gran cantidad de NO·.

Se han descrito bien tres isoformas, codificadas por tres genes distintos, aunque con bastante homología (Fig. 12).

Dos de estas isoformas se expresan constitutivamente (cNOS) y fueron descritas en primer lugar en neuronas (nNOS, NOS-I, NOS1 o NOS neuronal) y en las células del endotelio vascular (eNOS, NOS-III, NOS-3 o NOS endotelial), respectivamente (Moncada y Higgs, 2006). Otra forma es inducible, está controlada a nivel transcripcional. Esta isoforma se denomina NOS-2, cuya expresión génica es inducible por LPS y citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) solos o combinados de diferente forma (Jana *et al.*, 2005).

Si bien las tres isoformas requieren CaM para realizar su actividad enzimática (Bredt y Snyder, 1990), la dependencia de  $[Ca^{2+}]_i$  distingue a la NOS inducible de las otras dos, requiriendo estas cNOS mucho más  $Ca^{2+}$  (Alderton *et al.*, 2001). En realidad, las NOS de expresión constitutiva dependen de la activación de la CaM por altas  $[Ca^{2+}]_i$ , condición imprescindible para la interacción entre la NOS y la CaM en estas isoformas. La NOS inducible resulta independiente de la  $[Ca^{2+}]_i$  porque, a diferencia de las isoformas constitutivas, su afinidad por CaM es mucho mayor, de forma que a una  $[Ca^{2+}]_i$  basal la NOS-2 dispone de CaM unida en todo momento, manteniendo a la NOS en un tono activo basal, capaz de producir un flujo continuo de NO·, en presencia de los sustratos y co-factores adecuados (Murphy, 2000). Recordemos que la unión de CaM permite el acoplamiento del flujo electrónico del dominio reductasa al oxigenasa.



**Figura 12. Dominios estructurales de los genes codificantes para NOS-1, NOS-2 y NOS-3 humanas.** En cada isoforma se marca el sitio de unión del residuo de cisteína al grupo hemo y el de la CaM. En el caso de NOS-3 se indican los sitios de palmitoilación y miristoilación, y en el caso de las cNOS se indican unos bucles autoinhibidores de 40-50 aminoácidos insertados en medio del subdominio de unión a FMN de cada uno de los genes. Adaptado de Alderton *et al.* (2001).

### *nNOS, NOS neuronal, NOS-I, o NOS-1.*

La NOS-1 es una proteína homodimérica de 1434 aa con un peso molecular de 161 kDa. La secuencia codificadora está fraccionada en 29 exones y 28 intrones y el gen puede ser transcrito a partir de 5 promotores alternativos (Eliasson *et al.*, 1997; Alderton *et al.*, 2001). Se expresa de forma constitutiva típicamente en células neurales.

En el sistema nervioso central, la NOS-1 está presente en pequeñas poblaciones de interneuronas de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado, suponiendo sólo el 1-2 % de la población neuronal total, en el cerebelo sólo las células granulosas y en esta contienen NOS-1 (Alderton *et al.*, 2001).

En el SN periférico, las fibras NANC son frecuentemente NOS positivas y liberan NO· como neurotransmisor.

En el intestino, la estimulación eléctrica de los plexos nerviosos mesentéricos positivos para NOS-1 promueve el componente relajante del peristaltismo, el cual es bloqueado por inhibidores de la NOS, indicando que el NO· actúa en este caso como un neurotransmisor (Desai *et al.*, 1991a; Desai *et al.*, 1991b).

La NOS-1 también está presente en las fibras nerviosas de las capas adventicias y externas de los vasos largos, donde es almacenada junto con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Bredt y Snyder, 1992). Por ejemplo, los nervios pélvicos, que contienen fibras no-adrenérgicas – no-colinérgicas (NANC) pero NOS positivas, causan la erección del pene cuando son estimulados, la cual es completamente bloqueada por inhibidores de la NOS (Burnett *et al.*, 1992; Rajfer *et al.*, 1992).

Otros tejidos no nerviosos como el músculo esquelético expresan NOS-1 aunque se desconoce su significado fisiológico (Silvagno *et al.*, 1996; Venema *et al.*, 1997), los neutrófilos expresan pequeñas cantidades de la enzima cuya función está relacionada con la defensa oxidativa inespecífica y la apoptosis de este grupo de granulocitos.

Una característica importante de la NOS-1 es su capacidad de generar  $O_2^-$  durante la oxidación desacoplada del NADPH en presencia de bajas concentraciones de L-Arg o  $BH_4$ , o en presencia de algunos inhibidores de la NOS (Pou *et al.*, 1999). El  $NO\cdot$  y el  $O_2^-$ , formados por la misma enzima, pueden combinarse formando radicales más tóxicos, posibles mediadores reales de la citotoxicidad.

Entre los factores que inducen la expresión de NOS-1 se incluyen: daño mecánico, hipoxia y esteroides (Christopherson y Bredt, 1997).

### ***eNOS, NOS endotelial, NOS-III, o NOS-3***

La NOS-3, presente en el endotelio y en las células epiteliales, consta de 1203 aa, con un peso molecular de 133 kDa. El 52 % de la secuencia de aminoácidos es homóloga a la de la NOS-1 (Lamas *et al.*, 1992).

A diferencia de las otras dos isoformas, la NOS-3 se localiza en la fracción subcelular particulada (Forstermann *et al.*, 1991), esta asociación a la membrana puede mitigar los efectos citotóxicos del  $NO\cdot$  sobre las células endoteliales y aumentar la señal en el músculo liso vascular subyacente y en las plaquetas de la luz del vaso, así como ejercer algún efecto sobre receptores de la superficie celular.

Dada la alta concentración de arginina y NADPH en esas células (comparadas con sus respectivas  $K_m$ ), parece ser el  $Ca^{2+}$  el único regulador de la actividad NOS en las células endoteliales (Forstermann *et al.*, 1991; Alderton *et al.*, 2001).

La función principal de la NOS-3 es la regulación del tono vascular. El inhibidor competitivo de esta enzima, L-NMMA es un potente vasoconstrictor dependiente del endotelio (Booke *et al.*, 2000). La vasoconstricción resulta de la inhibición del mecanismo vasodilatador endógeno (Moncada y Higgs, 2006), mediado por la reacción de las células endoteliales a estímulos como el estrechamiento pulsátil de la pared del vaso (Li *et al.*, 2003) y el estrés por rozamiento que ejerce el torrente sanguíneo sobre la superficie del endotelio (Busse *et al.*, 1993).

La síntesis endotelial de NO $\cdot$  puede ser estimulada por sustancias liberadas por las terminaciones nerviosas (acetilcolina, bradiquinina) (Alderton *et al.*, 2001) o por las plaquetas (trombina, ADP, serotonina) (Rejto *et al.*, 2003) a través de la interacción con receptores de membrana (Blair *et al.*, 1999; Fleming y Busse, 1999); por activadores farmacológicos como los ionóforos del calcio (Raddassi *et al.*, 1994), péptidos formilados o ésteres de forbol (Kasina *et al.*, 2006), baja presión parcial de oxígeno arterial (Moncada y Higgs, 2006), esteroides o factores de crecimiento (Harrison, 1997a; Harrison, 1997b).

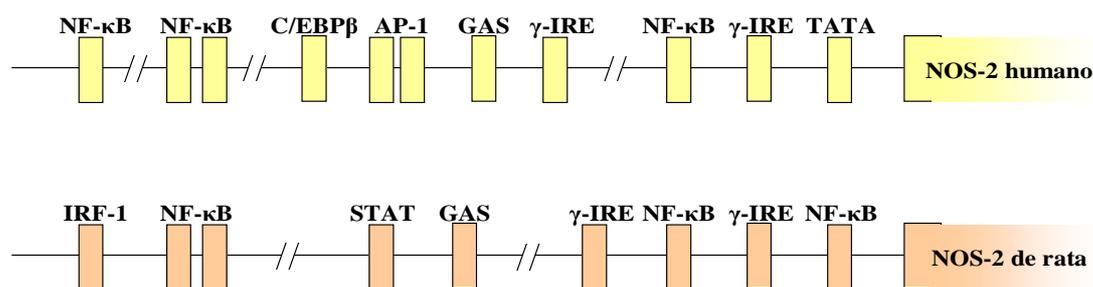
### ***iNOS, NOS inducible, NOS-II, o NOS-2.***

La también conocida como NOS inmunológica o macNOS, se encuentra en el citosol y funciona independientemente de la concentración de calcio intracelular.

La NOS-2 es una proteína homodimérica de 1153 aa y un peso molecular de 131 kDa. La secuencia codificadora está fraccionada en 26 exones y 25 intrones. Los primeros 500 aa incluyen el centro catalítico de la enzima, y la delección de los residuos 66-114 impide la dimerización y, por tanto, la función NOS (Ghosh, 1999; Loihl *et al.*, 1999b).

### **Promotor del gen de NOS-2.**

La región promotora del gen de NOS-2 humano contiene secuencias consenso para la unión de factores de transcripción potencialmente implicados en la señalización por citoquinas y LPS (Bhat *et al.*, 2002), tales como NF- $\kappa$ B/Rel, AP-1, C/EBP $\beta$  y STAT (GAS,  $\gamma$ -IRE) (Jana *et al.*, 2005). En la rata también existen estos controles y además IRF-1 (Lin y Murphy, 1997; Park *et al.*, 1997; Taylor y Geller, 2000; Aktan, 2004) (Fig. 13).



**Figura 13. Secuencias consenso en el promotor del gen de NOS-2 humano y de rata.**

Las células gliales (astrocitos reactivos y microglía) en el SNC producen  $\text{NO}\cdot$  en respuesta a la inducción de NOS-2 por una serie de citoquinas, incluyendo  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , e  $\text{IFN-}\gamma$ . Adaptado de Jana *et al.* (2005).

Se asume que el  $\text{NO}\cdot$  producido en grandes cantidades por los astrocitos reactivos y la microglía contribuye a la degeneración de los oligodendrocitos en las enfermedades desmielinizantes y a la muerte neuronal durante isquemia, trauma, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a la infección por VIH, y esclerosis lateral amiotrófica (Jana *et al.*, 2005), sugiriendo que la inhibición de la expresión de NOS-2 puede resultar beneficiosa en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias (Kroncke *et al.*, 1998; Bogdan, 2001; Aktan, 2004), sin embargo, aún no se conocen plenamente las rutas intracelulares que transducen la señal desde la superficie celular al núcleo para la inducción del gen de esta enzima, y su caracterización es un área activa de investigación.

Los astrocitos son las células mayoritarias del SNC, por lo que la inducción de NOS-2 en estas células constituye una importante fuente de  $\text{NO}\cdot$  (Murphy, 2000).

## 2.5. Expresión astrogliar de NOS-2 en el SNC.

La expresión de NOS-2 en astrocitos ocurre en respuesta a diferentes estímulos fisiopatológicos como las infecciones (especialmente las de origen vírico), enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple, caracterizadas por la producción de citoquinas pro-inflamatorias, o algunos procesos patológicos que afectan de manera especial al entramado celular. En los astrocitos, se estimula la expresión de esta enzima como consecuencia de isquemia local y general, y la activación de estos puede dar lugar a neurodegeneración.

***Infección vírica.***

No está perfectamente conocido el mecanismo por el que los virus lesionan o producen disfunciones en el SNC sin daño directo. Las citoquinas difusibles, junto con las especies de nitrógeno y oxígeno reactivas producidas como componente de la respuesta inmune contribuyen a la patología. Se ha asociado la expresión de NOS-2 con la infección vírica (Lane *et al.*, 1996; Merrill y Benveniste, 1996), aunque en algunos estudios, el NO· resultante parece ser beneficioso (Campbell *et al.*, 1996). Sin embargo, aunque el NO· generado por NOS-2 puede bloquear la replicación vírica *in vitro*, se ha sugerido que no es el factor determinante de la eliminación del virus en el SNC (Lane *et al.*, 1997).

En el caso de la infección por VIH, el NO· puede tener un efecto protector. Aunque la carga viral no se afecta por los inhibidores de NOS, este tratamiento exagera la severidad clínica y disminuye el tiempo de supervivencia. Efectivamente, los macrófagos infectados por VIH-1 activan transcripcionalmente la NOS-2 en astrocitos humanos (Hori *et al.*, 1999) y el NO· resultante bloquea la replicación vírica.

***Enfermedades desmielinizantes.***

La esclerosis múltiple y su modelo animal, la encefalomiелitis autoinmune experimental son enfermedades desmielinizantes que cursan con un daño temprano a la barrera hematoencefálica, favoreciendo la infiltración de linfocitos y monocitos, los cuales contribuyen al daño, directa o indirectamente, mediante secreción de citoquinas pro-inflamatorias o NO· (Merrill y Benveniste, 1996). También se observa astrogliosis alrededor de los focos de desmielinización, y expresión de citoquinas pro-inflamatorias y NOS-2 en los astrocitos de la médula espinal en estas lesiones y alrededor de ellas (Grzybicki *et al.*, 1997).

Mediante inmunocitoquímica, se ha encontrado NOS-2 y nitrotirosinas en el cerebro enfermo (Bagasra *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1997), tanto la proteína como el transcrito de NOS-2 se colocalizan con los marcadores para macrófagos/microglía (Bagasra *et al.*, 1995) y astrocitos (Okuda *et al.*, 1997).

### **Trauma.**

El daño traumático inicia múltiples procesos implicando a células residentes en el SNC e infiltrantes. Los elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias proporcionan un medio propicio para la expresión de NOS-2.

Se encuentran células productoras de NOS-2 esparcidas por las meninges sobre la lesión, en el lugar lesionado y en la corteza cerebral adyacente. Al principio, estas células son polimorfonucleares y células inflamatorias mononucleares infiltrados. Más tarde, los astrocitos que rodean la lesión y en la lámina IV de la corteza contralateral expresan NOS-2. El papel de la inducción de NOS-2 y producción de NO· astroglial bajo estas condiciones debe ser vasorreguladora, disminuyendo el desarrollo o progresión del edema cerebral; sin embargo, se ha descrito que los inhibidores de NOS-2 protegen contra el daño que el fluido puede hacer al cerebro (Wada *et al.*, 1998). Tras una lesión hipotérmica de la corteza cerebral se puede detectar la expresión de NOS-2 poco después del daño y persiste durante dos semanas (Grzybicki *et al.*, 1998).

### **Neurodegeneración.**

Huno y cols. describieron en 1996 una actividad NOS aumentada en la glía de la *substantia nigra* en enfermos de Parkinson (Murphy, 2000). En la enfermedad de Alzheimer, es bien conocido que S100-β y el péptido beta-amiloide característicos de la enfermedad inducen la expresión de NOS-2 en glía (Hu *et al.*, 1998a), y se ha descrito la presencia de NOS-2 y nitrotirosinas en el tejido neural de estos enfermos (Vodovotz *et al.*, 1996). También se encuentra activada la expresión de NOS-2 en regiones gliales (astrocitos y microglía) de la médula espinal asociada con ELA en ratones transgénicos que expresan (Cu,Zn)-SOD mutante (Collard, 1995).

El glaucoma se caracteriza por la pérdida de las células ganglionares de la retina, los astrocitos de las cabezas del nervio óptico de estos enfermos y los de ojos de rata con una elevada presión intraocular expresan NOS-2. Neufeld y cols. (1999) proponen que los peroxinitritos dañan los axones y que un inhibidor de la NOS repararía las neuronas ganglionares sin actuar sobre la presión intraocular (Neufeld, 1999; Neufeld *et al.*, 1999).

### ***Isquemia cerebral.***

La isquemia cerebral induce las características clásicas de inflamación en el SNC, incluyendo gliosis, reclutamiento de leucocitos, pérdida neuronal y edema. En los primeros minutos de isquemia se expresan genes tempranos inmediatos (c-fos, c-jun, Jun-B) en el hemisferio infartado (Feuerstein *et al.*, 1997). Después se inducen los genes que codifican para las proteínas hsp (proteínas del choque térmico), que protegen al cerebro isquémico previniendo la desnaturalización de proteínas y bloqueando la expresión de genes potencialmente citotóxicos como NOS-2 (Feinstein *et al.*, 1996).

Posteriormente, ocurre una tercera onda de expresión de los genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión, entre los que se incluye el TNF- $\alpha$  que aumenta la permeabilidad de la BHE e induce la síntesis de otros genes (MnSOD, NOS-2). Este factor también induce la liberación de mediadores de la inflamación y de factores de crecimiento en astrocitos. De hecho, el TNF- $\alpha$  exógeno exacerba el daño isquémico focal y su inhibición reduce el volumen de la lesión (Nawashiro *et al.*, 1997). La inducción temporal de los genes que codifican para IL-1 $\beta$  e IL-6, y la adición de IL-1 $\beta$  exógena imitan los efectos del TNF- $\alpha$  (Yamasaki *et al.*, 1995; Loddick y Rothwell, 1996).

Tres días después de una isquemia global transitoria en ratas puede detectarse NOS-2 en células que morfológicamente recuerdan a astrocitos del cuerpo calloso, los ganglios basales y del hipocampo (Endoh *et al.*, 1994). Esta inducción es paralela a la reacción glial, espacial y temporalmente, y la expresión está restringida a astrocitos en regiones de daño neuronal (Loihl y Murphy, 1998). Los astrocitos responden rápidamente a los daños físicos y metabólicos y, tras 24 horas de isquemia, aumentan la proteína GFAP en la periferia de las lesiones isquémicas (Wu *et al.*, 1999).

Las funciones fisiológicas atribuidas a los astrocitos son protectoras en isquemia, donde los niveles extracelulares de K<sup>+</sup> y glutamato están elevados (Lo *et al.*, 1998).

La microglía también se activa y prolifera en respuesta al daño isquémico (Iadecola y Ross, 1997), ésta juega un papel en la fagocitosis de restos celulares, pero también puede contribuir a la patogénesis del daño cerebral isquémico liberando agentes citotóxicos (citoquinas, proteasas, glutamato, radicales libres) (Iadecola, 1997).

La generación aumentada de NO· tras isquemia cerebral ha sido suficientemente demostrada y se han detectado aumentos de la actividad NOS en respuesta al daño isquémico (Grandati *et al.*, 1997; Iadecola, 1997; Iadecola y Ross, 1997). Se detectan tanto las proteínas como la actividad catalítica de NOS-1 y NOS-3 de forma temprana tras isquemia en respuesta a los altos niveles intracelulares de calcio, mientras que la expresión de NOS-2 ocurre posteriormente (O'Mahony y Kendall, 1999).

Existen evidencias de la inducción de NOS-2 en astrocitos de tejidos isquémicos, aunque este NO· generado no contribuye a los estadíos iniciales del daño isquémico (Iadecola y Ross, 1997), ya que la activación transcripcional de la enzima en estas células no ocurre hasta un día después de bloqueo permanente (Loihl *et al.*, 1999a), lo que refleja la necesidad del desarrollo de unas condiciones apropiadas para la activación del gen, como la infiltración de células inflamatorias que o bien producen las citoquinas relevantes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) o bien inician su producción en las células residentes. Aunque este retraso en la expresión de NOS-2 podría ser atribuida a factores supresores de la inducción génica. El ATP y el glutamato extracelulares están elevados y persisten durante horas tras la isquemia (Murphy *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1998). A pesar de que la NOS-2 no juegue un papel importante en el daño durante las primeras 24h de isquemia, el NO· sí parece contribuir a la progresión del infarto, causando daño mitocondrial y al DNA, y depleción de NAD (Dawson *et al.*, 1993; Samdani *et al.*, 1997).

El NO· de NOS-2 en astrocitos se produce tras el pico de superóxido, por lo que hay menor potencial de formación de peroxinitritos y las acciones protectoras del NO· prevalecen, entre estas se incluyen la vasodilatación (De Caterina *et al.*, 1995), las propiedades anti-inflamatorias mediante el bloqueo de la expresión de *quimioquinas* y citoquinas pro-inflamatorias (Merrill y Murphy, 1997b), la protección del endotelio de los efectos dañinos del TNF (Polte *et al.*, 1997), y el bloqueo de la apoptosis mediada por p53, que previene el aumento de la caspasa-3 (Kim *et al.*, 1997).

## **2.6. Regulación y modificación de NOS.**

La acción dual del NO· hace que la expresión de NOS-2 esté muy regulada para controlar los efectos citoprotectores y citotóxicos. En neuronas, el dominio PDZ de NOS-1 dirige a la enzima hacia los lugares post-sinápticos, donde se une a las proteínas

de la PSD (densidad post-sináptica) en un complejo con el receptor NMDA. Esta asociación puede desacoplarse si se bloquea la expresión de PSD-95, en este caso se pierde la actividad NOS inducida por glutamato (Alderton *et al.*, 2001).

De forma similar, NOS-3 es dirigida a las caveolas del plasmalema mediante miristoilación (irreversible) y palmitoilación (reversible). Las caveolas son lugares de secuestro de moléculas de señalización que facilitan la activación de NOS, y no están restringidas a las células endoteliales (Masserini *et al.*, 1999). La depalmitoilación causa la translocación de NOS-3 al citoplasma donde la fosforilación termina la actividad enzimática. Además, puede aumentarse la actividad de NOS-3 en respuesta a estrés por rozamiento, a través de la ruta de señalización PI3-K/Akt (PKB) que fosforila a la NOS-3 en un residuo de serina en la posición 1179 (Dimmeler *et al.*, 1999).

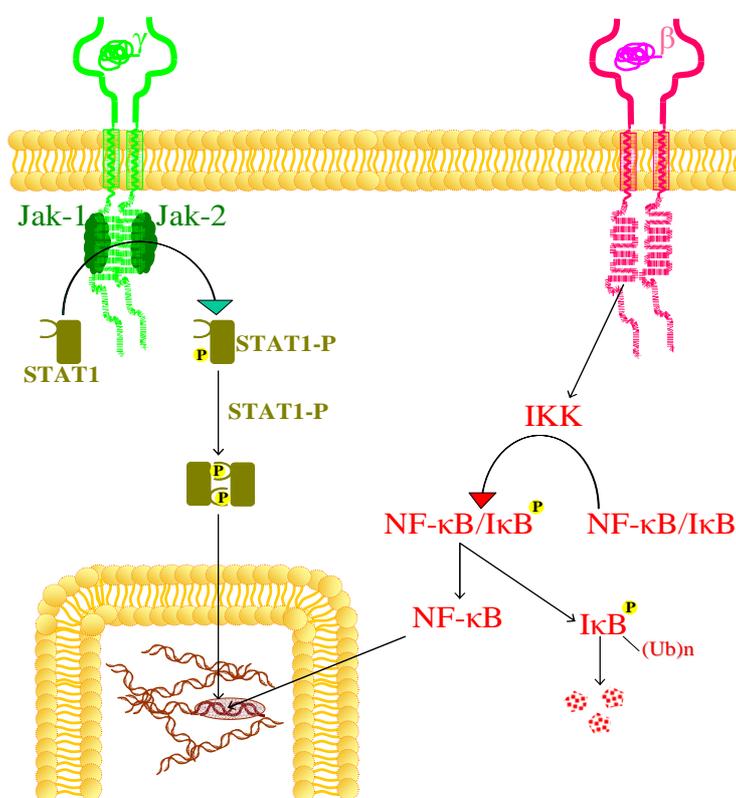
La estabilidad del transcrito es otro punto de regulación de la expresión proteica. Tras la activación del gen NOS-2, el transcrito es muy inestable ( $t_{1/2}$  2-3h). Aun así, este tiempo puede ser disminuido por varios agentes entre los que se incluye el TGF- $\beta$  (Park *et al.*, 1994), aunque debe haber otras proteínas que causen inestabilidad del mRNA ya que el  $t_{1/2}$  de NOS-2 se ve aumentado por inhibidores tanto de la transcripción como de la síntesis proteica (Park y Murphy, 1996; Fotheringham *et al.*, 2004). Otro aspecto de interés es la regulación de la dimerización, esencial para la funcionalidad de la NOS. En células activas, existe NOS-2 como una mezcla de dímeros y monómeros, lo que indica que los dímeros son inestables o que el ensamblaje es limitado. Parece existir una retroalimentación negativa del propio NO $\cdot$ , que limita la dimerización impidiendo la inserción del grupo hemo en la proteína (Stuehr, 1997; Murphy, 2000).

## **2.7. Activación del gen de NOS-2.**

Muchos estudios *in vitro* han documentado la inducción de NOS-2 en células astrogiales estimuladas con una combinación de citoquinas proinflamatorias (Feinstein *et al.*, 1994b; Da Silva *et al.*, 1997; Kopnisky *et al.*, 1997; Nishiya *et al.*, 1997), productos bacterianos como el LPS, y virales como las proteínas de la cubierta del VIH *per se* o mediante la inducción de la expresión de IFN- $\gamma$  (Shapshak *et al.*, 2004), así como con agregados proteicos anormales entre los que se incluyen el péptido  $\beta$ -amiloide y el S100 (Hu *et al.*, 1998b; Hu y Van Eldik, 1999). También algunas proteínas derivadas de la glía activan a los astrocitos y potencian su activación por el

péptido  $\beta$ -amiloide (Hu y Van Eldik, 1999). La principal activación del NOS-2 en glía lo constituye la combinación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Grzybicki *et al.*, 1996).

En astrocitos, la IL-1 $\beta$  es necesaria para la inducción de la expresión de NOS-2 y la mayor expresión se obtiene con la combinación IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$  (Jana *et al.*, 2005), estos agentes causan la activación de los factores de transcripción STAT1 y NF- $\kappa$ B, respectivamente (Aktan, 2004). Los eventos tempranos implicados en la activación de estas dos rutas están suficientemente descritos y se muestran en la figura 14.



**Figura 14. Activación de las rutas de señalización de NF- $\kappa$ B y de STAT1 tras el tratamiento de las células con IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , respectivamente.**

La unión de la IL-1 $\beta$  a su receptor IL-1 $\beta$  R desencadena una vía de señalización en la que se activa la enzima I $\kappa$ B quinasa (IKK). I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B es un complejo inactivo en el citosol. La IKK activa fosforila a I $\kappa$ B, lo que le hace separarse de NF- $\kappa$ B y ser degradado por la vía del proteosoma, dejando libre a NF- $\kappa$ B, que se transfiere al núcleo e induce la expresión de NOS-2. Por otro lado, la unión de IFN- $\gamma$  a su receptor IFN- $\gamma$ R produce la fosforilación/activación de STAT1. El STAT1 dimeriza con otro STAT1 activado y se transloca al núcleo e induce la expresión de NOS-2 y la producción de NO $\cdot$ . Adaptado de Aktan (2004).

Tal y como se representa en la figura 14, la unión del IFN- $\gamma$  a su receptor induce la fosforilación de las tirosinas asociadas al dominio intracelular de las proteínas JAK-1 y JAK-2, las cuales se transfosforilan mutuamente atrayendo a las proteínas citosólicas STAT1 $\alpha$ , que también son fosforiladas por las proteínas JAK en lugares específicos y dimerizan. Estos dímeros de STAT1 $\alpha$  son capaces de translocarse al núcleo y unirse al DNA en las secuencias correspondientes (GAS,  $\gamma$ -IRE) del promotor del gen de NOS-2 (Aktan, 2004). La tirfostina B42, un inhibidor específico de JAK-2 (Cruz *et al.*, 2001), inhibe su fosforilación, la activación de STAT1 $\alpha$ , y la inducción de NOS-2 (Kleinert *et al.*, 2003), sugiriendo que la ruta JAK-2-STAT1 $\alpha$  es un activador importante de la transcripción de NOS-2 en astrocitos (Aktan, 2004).

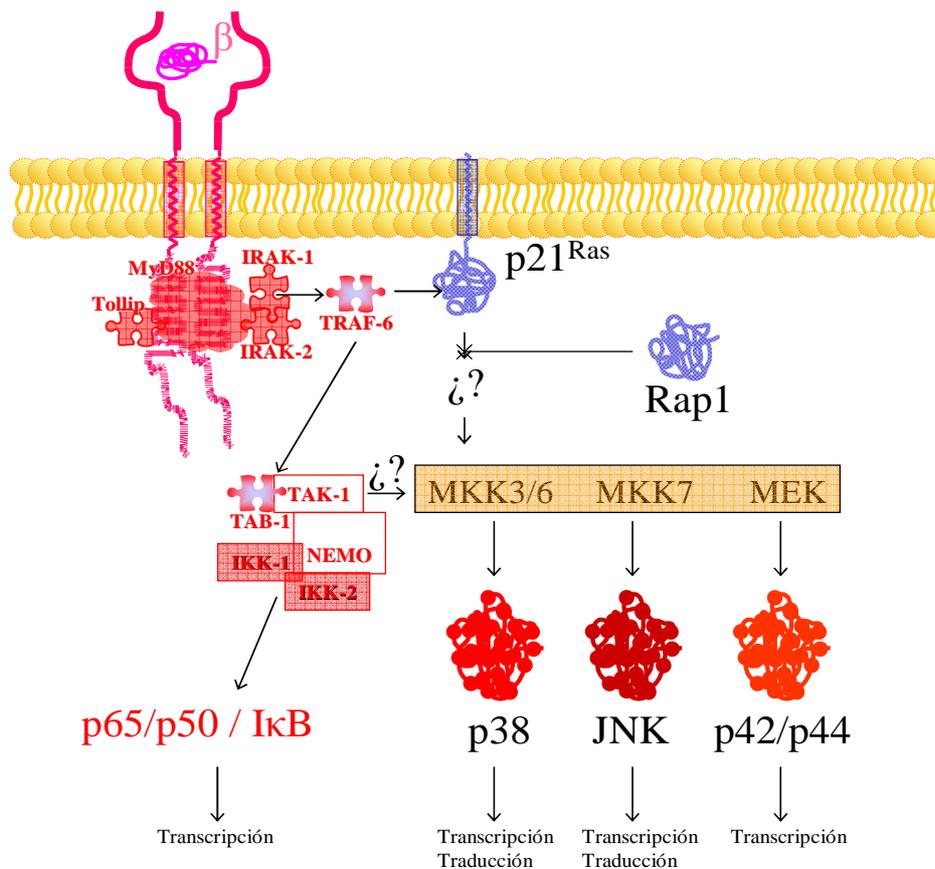
La figura 14 representa el modelo actual propuesto para la transducción de señales de la IL-1 y sus agonistas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que implica a un gran número de proteínas. Su ruta de señalización mejor caracterizada es la que culmina en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (O'Neill y Greene, 1998), un importante regulador de la expresión de la mayoría de los genes relacionados con inflamación e inmunidad. No obstante, esta misma citoquina puede desencadenar otras tres cascadas de señalización conducentes a la activación de las distintas familias de MAPKs, entre las que se incluyen las quinasas clásicas p44/p42<sup>MAPK</sup> o ERKs 1/2, y las quinasas activadas por estrés p38<sup>MAPK</sup> y JNK o p54<sup>JNK</sup> (Raingeaud *et al.*, 1995; Kyriakis y Avruch, 1996; O'Neill, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

### ***Ruta IL-1 $\beta$ $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B.***

Tal y como muestra la figura 15, la unión de la IL-1 al dominio extracelular de su receptor IL-1RI desencadena la formación de un complejo intracelular de éste con IL-1RAcP (proteína accesoria del receptor de IL-1), lo que, a su vez provoca el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, que se asocia con IL-1RI a través del dominio TIR en su extremo carboxilo. Ésta proteína MyD88 interacciona con dos quinasas asociadas al IL-1RI, IRAK e IRAK-2. IRAK es entonces fosforilada, se disocia de MyD88, y se asocia con TRAF6, que está preensamblado en un complejo con TAB-2. La MAPKKK TAK-1, asociada constitutivamente con TAB1, se asocia entonces con el complejo TRAF6-IRAK, gracias a lo cual TRAF6 dispara, de forma dependiente de ubiquitinación, la fosforilación y activación de TAK-1. Ésta puede

entonces activar una cascada de quinasas que conduce a la activación de JNK, y otra que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B (McDermott y O'Neill, 2002).

La activación de IKK por TAK-1 resulta en la fosforilación de I $\kappa$ B y liberación del dímero NF- $\kappa$ B, lo que le permite translocarse al núcleo y unirse a sus secuencias diana en el DNA. En esta ruta canónica de activación se ha descartado la existencia de una quinasa específica activadora de NF- $\kappa$ B (Karin y Ben-Neriah, 2000).



**Figura 15. La IL-1 activa cuatro cascadas de proteínas quinasas en las células.**

Uno de estos culmina en la activación de NF- $\kappa$ B mientras las otras tres implican a las MAP quinasas. Los eventos tempranos en todas las cascadas implican a MyD88, IRAK-1, IRAK-2, TRAF6 y posiblemente las quinasas TAK-1 (quinasa activada por TGF- $\beta$ ) y TAB-1 (proteína de unión a TAK-1 1). También se ha mostrado un papel para p21<sup>Ras</sup> en la activación de p38<sup>MAPK</sup> y para Rap1 como antagonista de esta activación. Adaptado de McDermott *et al.* (2002).

**Ruta IL-1 $\beta$  → proteínas quinasas intracelulares.**

La cadena de transducción previa a la activación de ERK es bien conocida y consiste en p21<sup>Ras</sup>-Raf1-MKK1 o MKK2-ERKs 1/2. Por el contrario, los reguladores de las cascadas de señalización previa a la activación de JNK o p38<sup>MAPK</sup> no están bien definidos. Sus transductores inmediatos son MKK4 y MKK7 para JNK, y MKK3, MKK4 y MKK6 para p38<sup>MAPK</sup> (Palsson *et al.*, 2000), aunque otras MKKs (MKK2-5, MLK1-3, ASK1, TAK1, PAK y otros homólogos de Ste20) pueden participar en las rutas de p38<sup>MAPK</sup> y JNK (Bhat *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2003).

Varios estudios han indicado que MyD88 e IRAK están implicadas en la activación de p54<sup>JNK</sup>, y se han encontrado evidencias de un papel para MyD88, IRAK y TRAF6 en la activación de p38<sup>MAPK</sup> (Kanakaraj *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, 1999) y de p21<sup>Ras</sup> como un importante componente en esta ruta hasta esta quinasa (Palsson *et al.*, 2000) y de la inducción de NOS en astrocitos primarios (Pahan *et al.*, 2000a).

En un estudio se ilustra una nueva ruta de señalización que conduce a la activación de p38<sup>MAPK</sup> por IL-1, y que implica a MyD88, IRAK, IRAK2, TRAF6, p21<sup>Ras</sup>, TAK-1, MKK3 y MKK6, con un papel supresor de Rap1 a nivel de p21<sup>Ras</sup> en la ruta (McDermott y O'Neill, 2002). Esto sugiere que la participación de p21<sup>Ras</sup> en la formación del complejo de señalización multiproteico constituido por IRAK, IRAK2, TRAF6 y TAK-1 conduce la señal de la IL-1 hacia la activación de p38<sup>MAPK</sup> en algún punto de la ruta posterior a TRAF6 pero anterior a MKK3 y MKK6 (McDermott y O'Neill, 2002).

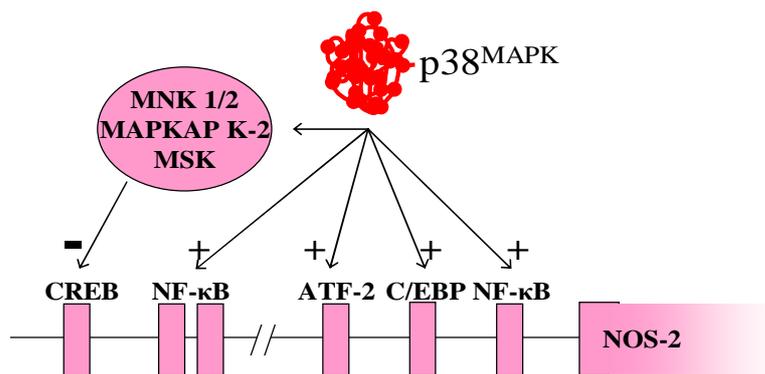
Otro posible efector intracelular de la señalización por IL-1 $\beta$  es la PI3K (Sizemore *et al.*, 1999; Funakoshi *et al.*, 2001), una enzima asociada a membrana relacionada frecuentemente con la actividad de p21<sup>Ras</sup> (Proud, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2006) que puede activar a otras importantes quinasas de señalización intracelular tales como Akt y PKB (Birkenkamp *et al.*, 2004), cuya participación se ha descrito en la ruta de inducción del gen de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias en macrófagos (Diaz-Guerra *et al.*, 1999) y en células C6 de glioma de rata (Pahan *et al.*, 1999).

### **MAPKs y NF-κB en la inducción del gen de NOS-2.**

Varios estudios realizados con astrogliá neonatal humana o de roedores, entre otros, indican que las MAPKs y NF-κB están implicados en la inducción de NOS-2 por citoquinas (Da Silva *et al.*, 1997; Alpert *et al.*, 1999; LaPointe y Isenovic, 1999; Pahan *et al.*, 2000a; Pahan *et al.*, 2000b; Chan y Riches, 2001; Nomura, 2001; Hua *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2003). Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios según la familia de MAPK y el tipo y situación celulares (Piao *et al.*, 2003; Won *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Jana *et al.*, 2005; Sassano *et al.*, 2005). Por ejemplo, algunos estudios indican que p38<sup>MAPK</sup> es importante para la expresión de NOS-2 inducida por citoquinas (Da Silva *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 2002), incluso se ha demostrado que la inducción del gen de NOS-2 en cultivos gliales es dependiente de p38<sup>MAPK</sup> (Bhat *et al.*, 2002), mientras que otros apoyan la implicación de las ERKs 1/2 (Doi *et al.*, 2000; Jiang y Gong, 2000). También la relación de las MAPKs con NF-κB depende del sistema celular. Mientras que algunos estudios evidencian a NF-κB como diana de las MAPKs (Hirano *et al.*, 1999; Kan *et al.*, 1999; Jiang y Gong, 2000) otros sugieren rutas de señalización independientes (Doi *et al.*, 2000; Chan y Riches, 2001).

La región promotora de NOS-2 contiene múltiples secuencias consenso para NF-κB y la inhibición de este factor nuclear impide la expresión de NOS-2, estos datos permiten establecer un papel esencial de NF-κB en la inducción de NOS-2 (Marcus *et al.*, 2003). Sin embargo, TNF-α e IL-1β, cuando se presentan cada una por separado son capaces de inducir la activación de NF-κB, pero no la de NOS-2, en líneas celulares humanas (Jana *et al.*, 2005). El hecho de que se requiera una combinación de citoquinas para inducir la expresión de NOS-2 sugiere la necesidad de la activación de factores de transcripción adicionales a NF-κB.

De hecho, la región promotora de NOS-2 contiene múltiples secuencias de control para elementos distintos de NF-κB. Varias de esas secuencias son dianas moleculares de p38<sup>MAPK</sup> directa (C/EBP, ATF-2, NF-κB) o indirectamente (NF-κB, CREB, AP-1) (Cobb, 1999; Chang y Karin, 2001; Bhat *et al.*, 2002) (Fig. 16). En concreto, las regiones -50 —-250 y -900 —-1030 contienen sitios κB y GAS, y son importantes regiones reguladoras para la inducción de NOS-2 por LPS + IFN-γ (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1994; Nishiya *et al.*, 2000). Incluso la región -50 —-250 está completamente conservada en ratón, rata y humano.



**Figura 16. Secuencias del promotor de NOS-2 relacionadas con la actividad de p38<sup>MAPK</sup>.**

Algunas de estas secuencias son dianas moleculares de p38<sup>MAPK</sup> directa (C/EBP, ATF-2, NF-κB) o indirectamente (NF-κB, CREB, AP-1). Adaptado de Bhat *et al.* (2002).

### **Regulación de NF-κB independientemente de IKK-IκB.**

La actividad transcripcional de NF-κB una vez liberado de su secuestro por IκB puede ser regulada por modificaciones al propio NF-κB o que modulan su translocación al núcleo. En astrocitos se ha observado una serie de modificaciones de NF-κB, tras la estimulación con citoquinas o LPS, entre las que se incluyen fosforilación y acetilación (Chen *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001; Furia *et al.*, 2002). En otros tipos celulares, estudios de mutagénesis demuestran la absoluta necesidad de fosforilación de la subunidad p65 para su unión al DNA y transactivación de los genes diana (Chantome *et al.*, 2004; Zhai *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de bajos niveles nucleares de NF-κB en astrocitos en reposo (Akama *et al.*, 1998; Krushel *et al.*, 1999) y bastante altos en glioblastoma multiforme (Brown y Law, 2006).

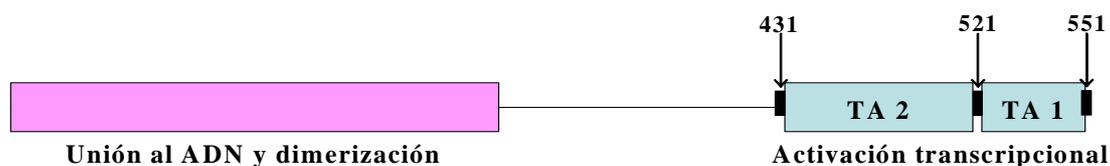
Estas observaciones sugieren que la translocación de NF-κB al núcleo no es el único proceso a considerar cuando se estudia su participación, ya que el factor nuclear puede sufrir distintas modificaciones, lo que supone un nivel más de regulación de su actividad (Zhai *et al.*, 2004). De hecho, varios estudios apoyan la idea de que la fosforilación de p65 regula la competencia transcripcional del NF-κB nuclear (Jiang *et al.*, 2003b) y se ha propuesto que uno de los posibles efectos de la fosforilación de p65 en su dominio TA respecto a su competencia transcripcional es el reclutamiento de

proteínas co-activadoras tales como histona-acetil-transferasas al NF- $\kappa$ B cuando éste se une a la secuencia diana del promotor (Jiang *et al.*, 2003b).

En relación a esta regulación de NF- $\kappa$ B, existen evidencias de que p65 puede ser fosforilado en varios sitios, lo que proporcionaría efectos diferenciales respecto a su actividad, seleccionando incluso la proteína que interactúe con NF- $\kappa$ B una vez translocado al núcleo (Jiang *et al.*, 2003a).

En determinados estudios, la fosforilación de p65 en la serina 529 tras la activación de p38<sup>MAPK</sup> por TNF- $\alpha$  (Beyaert *et al.*, 1996; Wang y Baldwin, 1998) o por caseína quinasa II (Wang D. *et al.*, 2000; Chantome *et al.*, 2004), o en la serina 536 por p38<sup>MAPK</sup> (Song *et al.*, 2006), NIK-IKK $\alpha$  (Jiang *et al.*, 2003b), PI3-K/Akt/IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (Madrid *et al.*, 2001) y por IKK $\epsilon$  (que también fosforila en la posición 468 de esta misma subunidad) son esenciales para la capacidad transactivadora de NF- $\kappa$ B, y ambas posiciones se encuentran en el dominio TA1 del extremo carboxilo de p65 (Wang y Baldwin, 1998) (Fig. 17). Sin embargo, las fosforilaciones por las IKKs parecen más relacionadas con la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  que con la activación propiamente dicha de p65 (Jiang *et al.*, 2003a; Hu *et al.*, 2005; Mattioli *et al.*, 2006).

Otros autores proponen la fosforilación de NF- $\kappa$ B por Akt/PKB como la que subyace a la participación de PI3K en la inducción del gen de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias (Birkenkamp *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2006) y la transactivación de p65/RelA de forma posterior a la de TRAF6 (Funakoshi *et al.*, 2001).



**Figura 17. Diagrama de dominios de la proteína p65.**

Se muestran las regiones de p65 correspondientes al dominio de unión al DNA y las relacionadas con la activación transcripcional. Cabe destacar que se encuentran en la región TA1 de p65 (521-551) las serinas 529 y 536, descritas como susceptibles de fosforilación decisivas para la actividad transactivadora del factor nuclear. Adaptado de Jiang *et al.* (2003a).

## 2.8. Supresores del gen de NOS-2.

Así como la IL-1 y el  $\gamma$ -IFN pueden inducir la expresión del gen de NOS-2, se han identificado agentes que permiten bloquear o suprimir este proceso, es decir, que impiden la activación transcripcional del gen de NOS-2 por mensajeros extracelulares.

### ***Regulación por NO·.***

El bloqueo de la activación transcripcional del gen NOS-2 por el NO· exógeno está suficientemente demostrado aunque existe controversia acerca de si éste tiene lugar a nivel del complejo NF- $\kappa$ B/DNA (Mitomo *et al.*, 1994; DelaTorre *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997) o previo a la unión de NF- $\kappa$ B al DNA (Colasanti *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 1995a; Peng *et al.*, 1995b).

Esta habilidad del NO· para bloquear la activación del gen de NOS-2 podría explicar la transitoriedad de la expresión del transcrito y por qué los inhibidores de la enzima provocan la acumulación de mRNA de NOS-2 (Luss *et al.*, 1994). Esto plantea un problema potencial para el uso terapéutico de estos fármacos que supone el posible efecto rebote de la expresión de NOS-2 y la superproducción de NO· tras la retirada del inhibidor.

En el tejido neural, esta regulación negativa por el NO· podría contribuir a la baja expresión de NOS-2 observada en varias patologías (Loihl y Murphy, 1998) ya que se ha descrito la supresión tónica del gen de NOS-2 por el NO· producido por NOS-1 (Togashi *et al.*, 1997).

### ***Otros reguladores del gen en astrocitos.***

No obstante, la modulación de la expresión de NOS-2 a través de su región promotora puede llevarse a cabo por las acciones de otros reguladores del gen descritos en astrocitos, tales como el pretratamiento con IFN- $\alpha/\beta$  a nivel de la inducción génica por IFN- $\gamma$  (Stewart *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1998), el tratamiento con angiotensina II en el caso de inducción con citoquinas pero no con endotoxinas (Kopnisky *et al.*, 1997), noradrenalina y dopamina mediante la disminución de la actividad del promotor de NOS-2 (Feinstein, 1998), la expresión de la proteína HSP-70 que disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B (Feinstein *et al.*, 1996), así como las interleuquinas 4 y 10 a nivel de la

inducción génica (Grzybicki *et al.*, 1996). Algunos son claramente inhibidores transcripcionales mientras otros, como el TGF- $\beta$  (Vodovotz *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994), desestabilizan el RNA mensajero de la proteína (Park y Murphy, 1994; Fotheringham *et al.*, 2004).

***El ATP altera la unión de NF- $\kappa$ B al DNA.***

La exposición de los astrocitos a ATP y glutamato antes de la inducción con las citoquinas pro-inflamatorias obstaculiza la subsiguiente expresión del mRNA de NOS-2 (Murphy *et al.*, 1995). En astrocitos de rata, los efectos moduladores de estos agentes ocurren a nivel de la activación transcripcional de NOS-2, de forma posterior a la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. De hecho, la activación y translocación de NF- $\kappa$ B se observan íntegras mientras que ATP y glutamato inducen cambios que alteran la unión de NF- $\kappa$ B (igual en el caso de AP-1 (Tabuchi *et al.*, 1994)) a las secuencias consenso del promotor del gen de NOS-2 (Lin y Murphy, 1997). Por el contrario, en astrocitos humanos se ha observado un bloqueo de la activación de NF- $\kappa$ B por ATP (Liu y Neufeld, 2000; Liu *et al.*, 2001). Este mecanismo parece ser relevante en la regulación de NOS-2 en patologías tales como la isquemia, en las que la concentración extracelular de ATP y glutamato están elevadas (Murphy *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1998).

En la mayoría de estudios realizados acerca de la supresión por el pretratamiento con ATP, de la inducción de NOS-2 por IL-1 $\beta$ , en astrocitos de rata y humanos (Murphy *et al.*, 1995; Liu y Neufeld, 2000), no se ha controlado la hidrólisis extracelular del ATP añadido, y estas células astrogliales, como otros tipos celulares, presentan ecto-5'-nucleotidasas en su membrana capaces de actuar sobre los nucleótidos extracelulares (Zimmermann, 2006). De hecho, la hidrólisis extracelular del ATP hasta adenosina es extremadamente rápida en el tejido neural, con vidas medias inferiores a 1 segundo (Dunwiddie *et al.*, 1997). Por ello, con tiempos de estimulación de minutos-horas cabe preguntarse si el agente real de la modulación es el ATP, actuando a través de un receptor P2, o bien la adenosina generada en el medio, a través de un receptor P1 o A, más aún teniendo en cuenta que el nucleósido puede actuar a través de receptores A<sub>2</sub> acoplados a la generación de cAMP (Jimenez *et al.*, 1999).

### ***Quinasas intracelulares.***

Existe una gran controversia en la bibliografía que relaciona la supresión de la inducción del gen de NOS-2 con las enzimas quinasas intracelulares. Por un lado, algunos autores descartan la participación de las proteínas quinasas A y C (Murphy *et al.*, 1995). Por otro lado, sin embargo, hay autores que proponen a la PKA como el agente inhibidor de la producción de NO· inducido por LPS en astrogliá de rata *via* inhibición de NF-κB (Pahan *et al.*, 1997a). Y en relación a esta propuesta, se ha sugerido un papel de CREB o factores tipo CREB en la mediación del efecto supresor del cAMP sobre la expresión de NOS-2 en células gliales, actuando sobre la región-187–160 del promotor. Esta participación de CREB implicaría a la quinasa dependiente de cAMP (Gavrilyuk *et al.*, 2001).

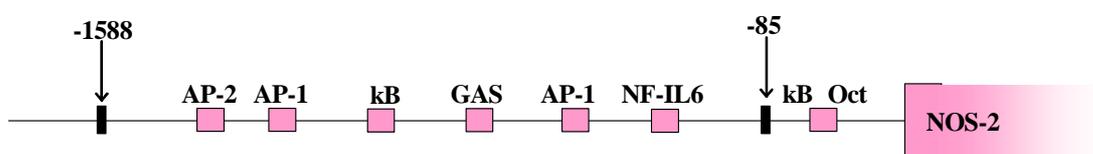
También se ha sugerido que la supresión relacionada con la activación de receptores purinérgicos puede estar mediada por la activación de la ruta ERK1/2 por ATP de forma independiente de Ca<sup>2+</sup> (Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Neary *et al.*, 2003).

### ***Supresión por cAMP.***

Según algunos autores, la liberación de catecolaminas se puede considerar un proceso paliativo del daño nitroxidativo, puesto que estos agentes y la PGE<sub>2</sub> elevan la concentración citosólica de cAMP, lo que podría disminuir el daño por NO· (Feinstein y Rozelman, 1997; Michel, 1997; Booke *et al.*, 2000).

Determinados efectos de la noradrenalina tales como la inhibición de la respuesta inflamatoria microglial ocurren mediante la alteración de la ruta a nivel de NF-κB (efectos sobre la producción de NO· e interleuquina 1β) aunque no parecen deberse a la inducción del gen de IκBα en astrocitos (cuyo máximo de mRNA tiene lugar tras 30-60 minutos y de proteína tras 4 horas). De hecho, se ha identificado la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> como efector intracelular de esta acción de la noradrenalina (Dello Russo *et al.*, 2004). Sin embargo, esta acción no está mediada por PKA sino por las proteínas Epac 1/2 (pequeñas proteínas G monoméricas con actividad Rap-GEF), lo que señala a Rap como responsable de la supresión por la elevación de [cAMP]<sub>i</sub> (Dello Russo *et al.*, 2004).

Por otro lado, la noradrenalina, al igual que la dopamina, desencadena una ruta de señalización que suprime la actividad NOS-2 en cultivos astrogliales de rata como resultado de una disminuida actividad del promotor de NOS-2 (Feinstein, 1998). En concreto, se ha descrito que el tratamiento con noradrenalina permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y su unión al DNA, lo que señala a la integridad de su actividad transcripcional como la responsable de la disminución de actividad del promotor, e identifica la zona de este implicada en la supresión por la catecolamina (Fig. 18) (Feinstein, 1998).



**Figura 18. Secuencias del promotor de NOS-2 relacionadas con la elevación de [cAMP].**

Se ha sugerido que la elevación intracelular de la [cAMP] induce un factor inhibidor que actuaría sobre la región más distal del promotor de NOS-2. Esto provocaría el bloqueo de la actividad de sitios más proximales como el de AP-1, NF-IL6, NF- $\kappa$ B u Oct. Adaptado de Feinstein *et al.* (1998).

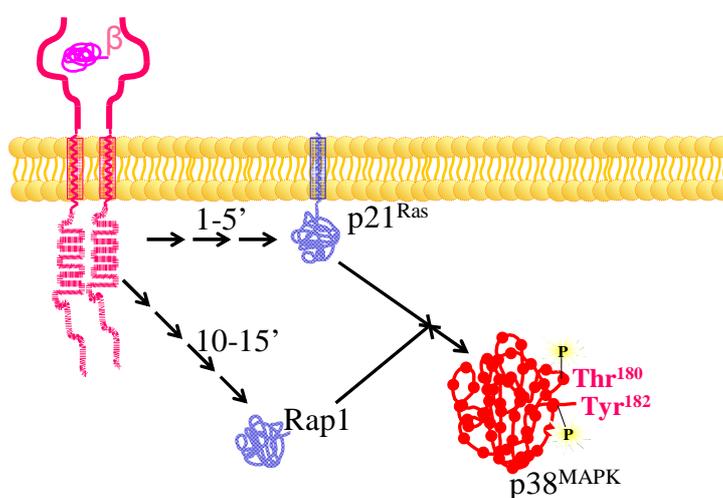
También se ha descrito la disminución del consumo de L-arginina por noradrenalina en células gliales de rata (Feinstein y Rozelman, 1997), sin embargo, este efecto se detecta tras 90 minutos de tratamiento, lo que indica un efecto sobre la síntesis de receptores de L-arginina.

### *Supresión por otros moduladores.*

Un último grupo de moduladores, como el propio NO $\cdot$  o el glutamato suprimen la inducción de NOS-2, lo que interfiere la actividad transactivadora de NF- $\kappa$ B y, consiguientemente, reduce su capacidad de unión a las secuencias diana  $\kappa$ B (Lin y Murphy, 1997; Park *et al.*, 1997), de forma independiente de cAMP. Se ignora si la acción de estos neurotransmisores está mediada por la misma región del promotor implicada en la regulación por cAMP.

**Rap1 y p21<sup>Ras</sup>.**

Rap1 y p21<sup>Ras</sup> son pequeñas proteínas G relacionadas pero con distintas localizaciones subcelulares: mientras p21<sup>Ras</sup> se suele encontrar asociada a la membrana plasmática, Rap1 es preferentemente citoplasmática (Nomura *et al.*, 2004). Y ejercen actividades generalmente antagonistas (Bos, 1998; Zwartkuis y Bos, 1999). Además de la activación de p21<sup>Ras</sup>, también se ha descrito una activación posterior de Rap1 por IL-1 $\beta$  (Palsson *et al.*, 2000) (Fig. 19), al igual que ocurre con otras señales extracelulares como PDGF, EGF o endotelina (Bos, 1998; Zwartkuis y Bos, 1999).



**Figura 19. Cinética de la activación de p21<sup>Ras</sup> y Rap1 por IL-1 $\beta$ .**

La proteína p21<sup>Ras</sup> se identifica como una señal clave en la activación de p38<sup>MAPK</sup>. La posterior activación de Rap1 inducida por IL-1 $\beta$  explica la naturaleza transitoria de la señalización por esta interleuquina y sugiere, a su vez, que en células no estimuladas, Rap1 mantiene la ruta de p38<sup>MAPK</sup> en un estado inactivo. Adaptado de Palsson *et al.* (2000).

### 3. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN PURINÉRGICA.

Es reconocido que las purinas son liberadas por neuronas y otros tipos celulares, y que producen una gran variedad de efectos en múltiples sistemas orgánicos cuando interaccionan con receptores purinérgicos de la superficie celular. Los principales ligandos para estos receptores son adenosina, ATP, UTP y los diadenosina-polifosfatos (dos adenosinas unidas mediante enlaces fosfo-di-éster de 3-6 fosfatos,  $A_p_nA$ ) (Humphrey *et al.*, 1995).

La señalización purinérgica constituye un mecanismo muy generalizado de comunicación intercelular en el sistema nervioso, afectando a la comunicación entre diferentes tipos de neuronas, todos los tipos de glía, y células vasculares (Fields y Burnstock, 2006). Se puede distinguir una señalización purinérgica a corto plazo relacionada con neurotransmisión y neuromodulación, entre otras, y una señalización purinérgica a largo plazo (trófica) implicada en proliferación celular, diferenciación, migración y muerte durante el desarrollo embrionario, regeneración neural, envejecimiento y cáncer, entre otros (Burnstock y Knight, 2004).

#### 3.1. Las purinas en la comunicación neurona-glía.

El ATP liberado en las vesículas presinápticas como neurotransmisor rápido es accesible a la glía perisináptica (fundamentalmente astrocitos), lo que posibilita un sistema de señalización intercelular que podría unir funcionalmente a la glía y las neuronas. Estudios de astrocitos en cultivo (Neary *et al.*, 1988; Pearce *et al.*, 1989) y en cortes de cerebro (Kirischuk *et al.*, 1995) han mostrado respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  tras la aplicación de ATP y de otros agonistas selectivos de receptores purinérgicos específicos, al igual que en respuesta a las purinas liberadas durante la transmisión sináptica (Fields y Burnstock, 2006), lo que indica que tal comunicación es factible.

El ATP también puede actuar como factor trófico y de crecimiento. Así, puede alterar el desarrollo de neuronas y glía mediante la regulación de los dos segundos mensajeros citoplasmáticos más importantes,  $Ca^{2+}$  y cAMP (Neary, 1996; Neary *et al.*, 1996). La liberación de ATP por la actividad neuronal proporciona un nexo de unión entre la actividad funcional de los circuitos neurales y el crecimiento y diferenciación de las células del sistema nervioso. Este nexo se extiende más allá de las sinapsis, puesto que la conducción del potencial de acción a lo largo de los axones libera adenosina y

ATP (Kuperman *et al.*, 1964). Las imágenes de  $[Ca^{2+}]_i$  en la glía revelan que los receptores purinérgicos permiten a las células de Schwann, oligodendrocitos y astrocitos detectar los potenciales de acción neuronales (Fields y Burnstock, 2006).

Otro proceso importante es la comunicación glía-glía *via* ATP, revelado a partir de estudios de imagen de  $[Ca^{2+}]_i$  que muestran la propagación de ondas de  $[Ca^{2+}]_i$  en los astrocitos en cultivo, de forma que salvan la barrera que suponen las zonas libres de células. Esto demuestra que la comunicación glía-glía está mediada en parte por la liberación de moléculas de señalización intercelular (Guthrie *et al.*, 1999), un apoyo a esta afirmación lo constituye la inhibición de la propagación de la onda de  $[Ca^{2+}]_i$  por bloqueadores de receptores purinérgicos o por apirasa (enzima que degrada rápidamente el ATP extracelular) (Wang Z. *et al.*, 2000).

Este descubrimiento indica la capacidad de la glía para detectar la función sináptica y propagar la información a través de cadenas de células gliales, y proporciona un sistema paralelo de comunicación intercelular en el tejido nervioso, operando en concierto con neuronas pero actuando a través de un mecanismo totalmente distinto.

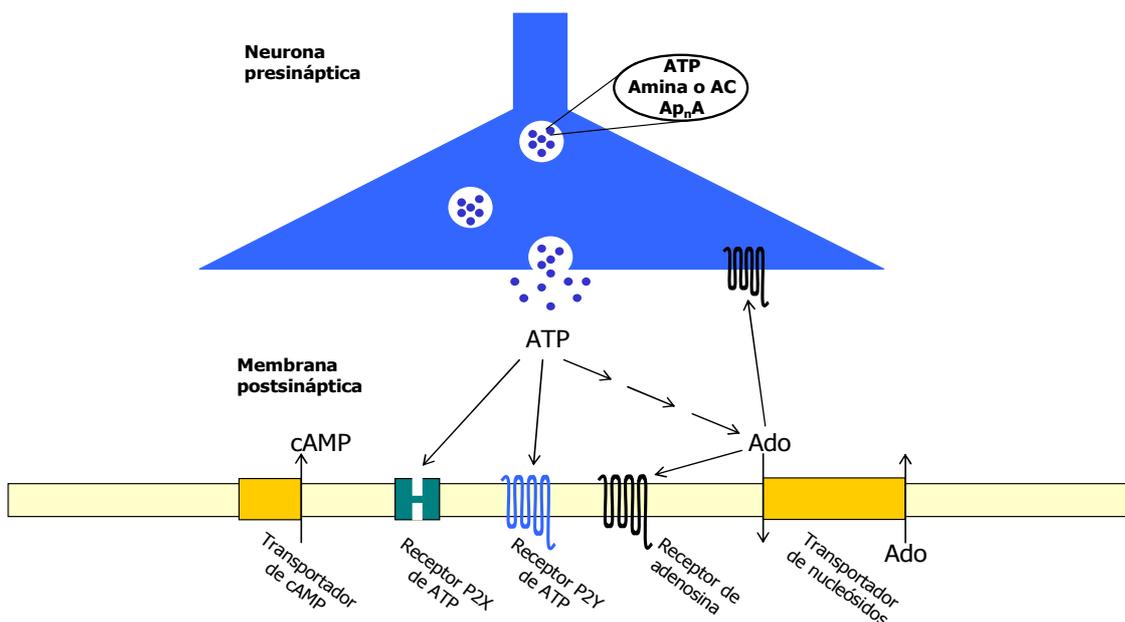
La propagación de las ondas de calcio a través de los astrocitos en el cerebro intacto parece ser particularmente importante en estados patológicos como el daño o trauma cerebral; no obstante, la mayor parte de los estímulos fisiológicos tienden a activar señalizaciones más discretas mediante unos pocos astrocitos (Sul *et al.*, 2004).

### **3.2. Origen del ATP extracelular.**

Fue a principios de la década de los 70 cuando se propuso al ATP como neurotransmisor en los nervios no-adrenérgicos – no-colinérgicos, acuñándose el término purinérgico para referirse a este tipo de nervios (Burnstock, 1972). Pero el ATP no se libera solamente de la terminal presináptica en respuesta a potenciales de acción (Fig. 20), sino que también puede ser liberado de la membrana postsináptica. Hay claras evidencias de la liberación vesicular exocitótica de ATP de células endoteliales y astrocitos, entre otros (Coco *et al.*, 2003). Además, esta liberación no ocurre sólo en respuesta a la estimulación por neurotransmisores, sino que también lo hace en respuesta a otros estados fisiológicos como la hipoxia (Bodin y Burnstock, 2001; Coco *et al.*, 2003). Este repertorio de mecanismos de liberación expande el significado funcional potencial de la señalización purinérgica en el sistema nervioso.

Otras importantes fuentes no excitóticas de ATP extracelular son las células dañadas o muriendo y las células sanas en respuesta al estrés mecánico, hipoxia, inflamación y a algunos agonistas (Bodin y Burnstock, 2001). Por otro lado, el ATP puede ser liberado al medio por otros mecanismos como los transportadores ABC, los hemicanales de conexina y los canales aniónicos dependientes de voltaje de la membrana plasmática (Abraham *et al.*, 1993; Dutta *et al.*, 2004).

En astrocitos, además, se han detectado proteínas de liberación de vesículas sinápticas esenciales para la liberación de ATP. Esta liberación se afecta menos por la toxina tetánica y se induce más tras la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato. Esto sugiere posibles diferencias en las vesículas que almacenan ATP y las que almacenan glutamato. En estas células también se libera ATP durante el hinchamiento osmótico, implicando canales relacionados con la osmorregulación o activados por la tensión mecánica de la membrana (Coco *et al.*, 2003).



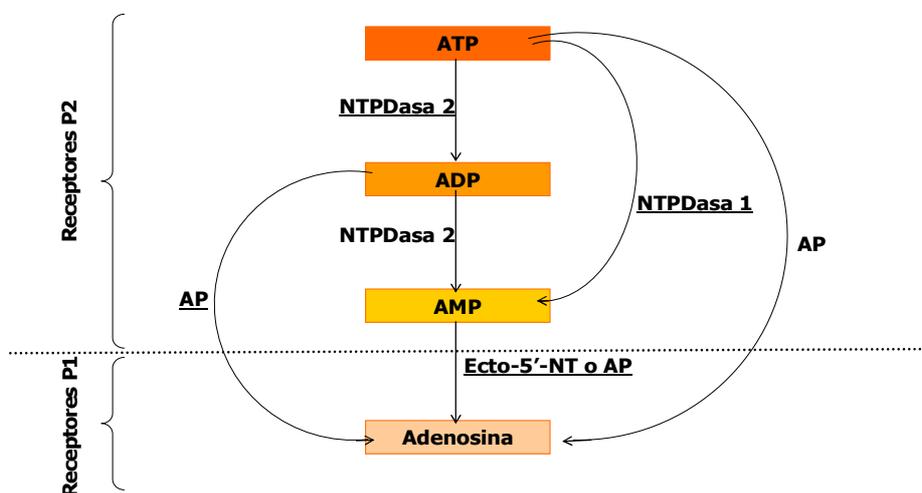
**Figura 20. Liberación de purinas.**

Los nucleótidos de adenina se almacenan como cotransmisores en los gránulos sinápticos. Estas vesículas pueden contener una concentración de ATP de hasta 1000 mM. La adenosina (Ado) y la inosina se acumulan en células hipóxicas, isquémicas o metabólicamente activas. El cAMP se acumula como segundo mensajero en respuesta a varios neurotransmisores. Estas purinas pueden ser transportadas al espacio intersticial por proteínas de transporte asociadas a membrana. Amina, neurotransmisor aminérgico; AC, acetilcolina; Ap<sub>n</sub>A, polifosfato de diadenosina. Adaptado de Siegel (1999).

### 3.3. Degradación extracelular del ATP y formación de adenosina.

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, regulados simplemente por la liberación y retirada del transmisor de la hendidura sináptica, los tres enlaces fosfato del ATP son rápidamente eliminados por hidrólisis enzimática secuencial generando ADP, AMP y adenosina en el medio extracelular (Fig. 21).

Existen varias familias de ectoenzimas implicadas en la metabolización extracelular del ATP y otros nucleótidos (Fig. 21) (Zimmermann, 2000): ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas), como CD39, una ecto-ATP-difosfohidrolasa o ecto-apirasa (Koszalka *et al.*, 2004), de las cuales las NTPDasas 1, 2, 3, y 8 son enzimas extracelulares ancladas a la membrana plasmática; la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), que tiene 3 subtipos; las fosfatasas alcalinas; las ecto-5'-nucleotidasas, como CD73 (Koszalka *et al.*, 2004), y la ectonucleósido difosfoquinasa (E-NDPK) (Zimmermann, 2000). Son enzimas esenciales para la producción dependiente de la actividad nerviosa de adenosina a partir del ATP liberado en condiciones fisiológicas (Dunwiddie *et al.*, 1997; Zimmermann, 2006) y de amplia distribución tisular, frecuentemente solapada.



**Figura 21. Enzimas implicadas en la metabolización de ATP y derivados.**

La NTPDasa 1 hidroliza el ATP directamente a AMP, y el UTP a UDP, mientras que la NTPDasa 2 hidroliza el ATP a ADP, y las 5'-ectonucleotidasas catalizan la conversión de monofosfatos de nucleósidos de purina y pirimidina a sus correspondientes nucleósidos, por ejemplo, el AMP a adenosina. La AP (apirasa) puede degradar ATP y ADP directamente hasta adenosina. Adaptado de Fields y Burnstock (2006).

En el tejido nervioso se expresan todos los miembros de las familias de ectonucleotidasas, que residen principalmente asociadas a la membrana en la glía (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células de Schwann), así como en endotelio y epéndimo, aunque son especialmente abundantes en las terminales sinápticas, donde predominan los astrocitos como glía perisináptica (Zimmermann, 2000; Zimmermann, 2006). Estas enzimas están implicadas en la modulación de la transmisión sináptica, la propagación de las ondas de calcio de la célula glial mediada por ATP, la función microglial (Sanz y Di Virgilio, 2000; Davalos *et al.*, 2005), la neurogénesis en el adulto (Neary *et al.*, 2003) y el control del tono vascular (Dutta *et al.*, 2004).

El ATP aplicado sobre secciones de hipocampo de rata es convertido en adenosina en menos de un segundo (Dunwiddie *et al.*, 1997), de hecho, la ruta catalítica total en el tejido neural es completada en unos pocos cientos de milisegundos. El paso limitante parece ser la desfosforilación del AMP hasta adenosina por la ecto-5'-nucleotidasa (Fields y Burnstock, 2006).

La desfosforilación del AMP extracelular hasta adenosina, mediada por ecto-5'-nucleotidasas, es el último paso de la cadena enzimática que cataliza la degradación de los nucleótidos de adenina extracelulares hasta adenosina. A esta enzima pueden atribuírsele importantes funciones en el sistema nervioso como la diferenciación de las células neurales (Todorov *et al.*, 1997; Neary *et al.*, 2003; Zimmermann, 2006), sugiriendo que la formación de adenosina a partir de nucleótidos liberados continuamente es esencial para la supervivencia neuronal. Por otro lado, en cerebro de rata, la isquemia resulta en una activación de la 5'-nucleotidasa en astrocitos activos. Esto aumenta la capacidad del tejido dañado de formar adenosina, de propiedades neuroprotectoras (Linden, 2001; Linden, 2005).

Datos recientes muestran evidencias de la presencia de 5'-nucleotidasas solubles de estructura desconocida que son liberadas junto al ATP de terminaciones nerviosas simpáticas y que participan en la hidrólisis del ATP hasta adenosina (Todorov *et al.*, 1997; Zimmermann, 2000; Burnstock, 2004).

Por otro lado, la formación intracelular de adenosina es, al menos, tan importante como su formación por la degradación del ATP extracelular (Lloyd *et al.*, 1993; Lloyd y Fredholm, 1995), especialmente en tejidos isquémicos o estresados (Fig. 20).

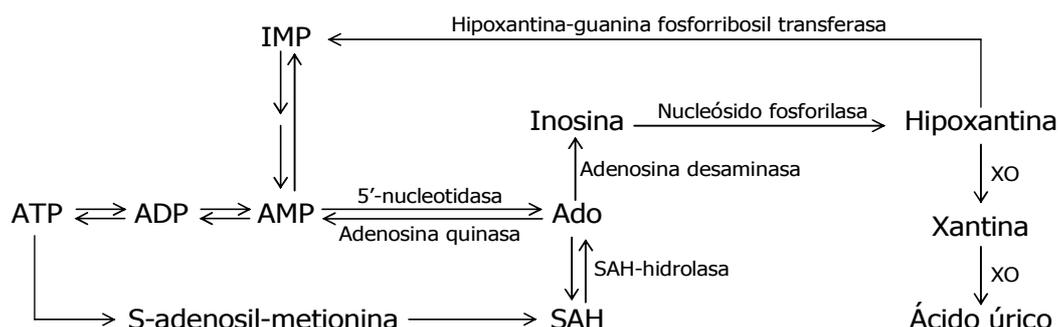
### 3.4. Liberación de adenosina.

Se ha descrito la liberación de adenosina mediada por aminoácidos excitadores *in vivo* e *in vitro*, sensible a la tetrodotoxina (TTX), y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Delaney y Geiger, 1998; Delaney *et al.*, 1998; Fredholm *et al.*, 2001; Linden, 2001). Sin embargo, es más importante el hecho de que los niveles intracelulares de adenosina aumenten cuando los niveles intracelulares de nucleótidos de adenina caen como resultado de un gasto energético excesivo o por hipoxia/isquemia. En esta situación, la adenosina es transportada al espacio extracelular principalmente mediante difusión facilitada por transportadores bi-direccionales, o incluso, si la concentración es suficientemente alta, simplemente difunde fuera de la célula (Rudolphi *et al.*, 1992; Linden, 2005). Esta liberación de adenosina en respuesta a anoxia es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  e insensible a la TTX (Delaney y Geiger, 1998; Delaney *et al.*, 1998; Wang Z. *et al.*, 2000).

Otra fuente de adenosina extracelular es el cAMP, que puede ser liberado de neuronas y convertido por las cAMP-fosfodiesterasas extracelulares (ecto-cAMP-fosfodiesterasas) en AMP y, entonces, por acción de la ecto-5'-nucleotidasa en adenosina. Se han obtenido evidencias funcionales de un papel relevante de esta vía en el área tegmental ventral y en el hipocampo (Dunwiddie *et al.*, 1997). Sin embargo, para que esta liberación de adenosina sea fisiológicamente importante, es necesario que muchas células liberen cAMP durante un periodo prolongado de tiempo (Brundege *et al.*, 1997).

### 3.5. Metabolización de la adenosina.

Cuando los niveles extracelulares de adenosina son altos, ésta es rápidamente transportada a las células *via* los mismos transportadores bi-direccionales, los cuales igualan eficientemente los niveles intra- y extracelulares de adenosina (Linden, 2005). Entonces es fosforilada a AMP por la adenosina quinasa o degradada hasta inosina por la adenosina desaminasa (Fig. 22), enzima que también está presente en el espacio extracelular (Lloyd y Fredholm, 1995). En el tejido nervioso *in vivo*, la principal degradación de adenosina es intracelular, como evidencia el hecho de que los inhibidores del transporte de adenosina como el dipiridamol (100 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) aumenten las concentraciones intersticiales del nucleósido (Lloyd *et al.*, 1993; Lloyd y Fredholm, 1995).



**Figura 22. Metabolización intracelular de la adenosina.**

Se muestran las principales rutas del metabolismo intracelular de la adenosina. IMP, monofosfato de inosina; SAH, S-adenosilhomocisteína; XO, xantina oxidasa. Adaptado de Siegel (1999).

### 3.6. Funciones de la adenosina en el sistema nervioso.

La adenosina ha sido descrita clásicamente como un depresor central (Huston *et al.*, 1996), de hecho, una primera función de esta es la inhibición, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , de la liberación de neurotransmisores excitadores. La mayoría de estos efectos parecen ser presinápticos y estar mediados por proteínas G acopladas a la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N o a la estimulación de canales de  $\text{K}^+$  (Linden, 2001). La adenosina controla la hiperexcitabilidad y la epileptogénesis, este último proceso se relaciona con la liberación de glutamato de los astrocitos (Tian *et al.*, 2005).

De hecho, en cortes de cerebro, la adenosina reduce la actividad eléctrica espontánea e inhibe significativamente las corrientes sinápticas inducidas (Mennerick y Zorumski, 1995; Arrigoni *et al.*, 2001), lo que se manifiesta en una menor actividad neuronal y la consecuente reducción en la utilización de energía celular y en la demanda de oxígeno (Linden, 2005). Este aspecto de la adenosina está relacionado con su aumento en el espacio intersticial cuando la demanda tisular de oxígeno excede a su suministro, ya que la adenosina dilata los lechos vasculares.

Esto hace que la adenosina sea neuroprotectora; por ejemplo, cuando la depresión de la transmisión sináptica en el hipocampo durante hipoxia es paliada por los agonistas del receptor  $\text{A}_1$  de adenosina (Linden, 2001; Linden, 2005).

Los opiáceos inducen la liberación de adenosina en preparaciones de cerebro, sinaptosomas y medula espinal, y algunos de sus efectos son bloqueados por los

antagonistas de los receptores de adenosina (Linden, 2001). También algunos de los comportamientos de los alcohólicos pueden estar mediados por la adenosina, ya que concentraciones intoxicantes de etanol bloquean el transporte de adenosina (Linden, 2001), aumentando, al igual que el tratamiento con dipiridamol, su concentración extracelular. Por otro lado, en algunos casos la adenosina produce efectos excitadores en el SNC, tales como el aumento de la liberación de glutamato en el núcleo del tracto solitario, lo que aumenta los efectos excitadores cardiovasculares (Mosqueda-García *et al.*, 1991) y la potenciación de la acción antinociceptiva de la noradrenalina en la médula espinal (Sawynok *et al.*, 1990).

### 3.7. Receptores purinérgicos en neuronas y glía.

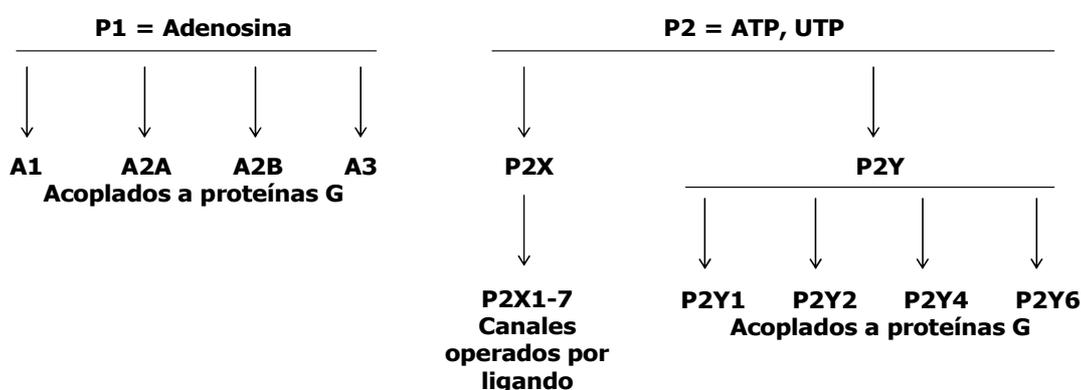
A diferencia de otros sistemas de neurotransmisores, la señalización purinérgica presenta una gran promiscuidad, ya que los distintos productos de la hidrólisis del ATP pueden activar diferentes tipos de receptores (Fig. 21). De ahí que la liberación o adición del nucleótido pueda provocar tanto la excitación como la inhibición de la neurotransmisión (Burnstock, 2004).

El ATP y la adenosina, en general, tienen efectos antagónicos, lo que proporciona un elegante mecanismo de regulación homeostática (Illes y Ribeiro, 2004; Jacobson *et al.*, 2006; Jacobson y Gao, 2006), esta complejidad de la familia de receptores purinérgicos equilibra la promiscuidad de la liberación de ATP proporcionando especificidad funcional y universalidad. Además, la activación de los receptores purinérgicos puede implicar a un gran repertorio de sistemas de segundos mensajeros y otras moléculas de señalización célula-célula, incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP,  $\text{IP}_3$ , fosfolipasa C, ácido araquidónico y  $\text{NO}\cdot$  (Fields y Burnstock, 2006).

Tal y como se muestra en la tabla 4, los receptores purinérgicos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso (Burnstock y Knight, 2004). Dentro del grupo de los receptores de purinas o purinoceptores existen dos subgrupos bien definidos respecto a las respuestas de varios tejidos a las purinas propuestos por Burnstock en 1978, los receptores P1 o A de adenosina y los receptores P2 o de ATP y ADP (Fig. 23). Si bien esta clasificación es más teórica que práctica puesto que algunos de los subtipos de uno y otro subgrupo pueden interactuar con otros nucleósidos/nucleótidos distintos (Jacobson *et al.*, 2006; Jacobson y Gao, 2006).

Posteriormente se propuso que los receptores P2 podían pertenecer a dos familias principales: una familia P2X de receptores canales iónicos abiertos por ligando, y una familia P2Y de receptores metabotrópicos acoplados, al igual que los receptores P1, a proteínas G (Fig. 23). Actualmente hay descritos siete subtipos de receptores P2X y 8 subtipos de receptores P2Y, incluyendo receptores sensibles a pirimidinas y a azúcar-nucleótidos como UDP-glucosa y UDP-galactosa (Fields y Burnstock, 2006).

**RECEPTORES PURINÉRGICOS**



**Figura 23. La familia de receptores purinérgicos.**

Los receptores purinérgicos se dividen en dos grandes familias: los receptores P<sub>1</sub> o de adenosina, y los receptores P<sub>2</sub>, que se unen a TP o UTP. Los receptores P<sub>1</sub> y P<sub>2Y</sub> están acoplados a proteínas de unión a GTP. La familia de receptores P<sub>2X</sub> son canales operados por ligando. Se han descrito otros subtipos de receptores P<sub>2Y</sub>, pero su identidad como receptores purinérgicos es controvertida.

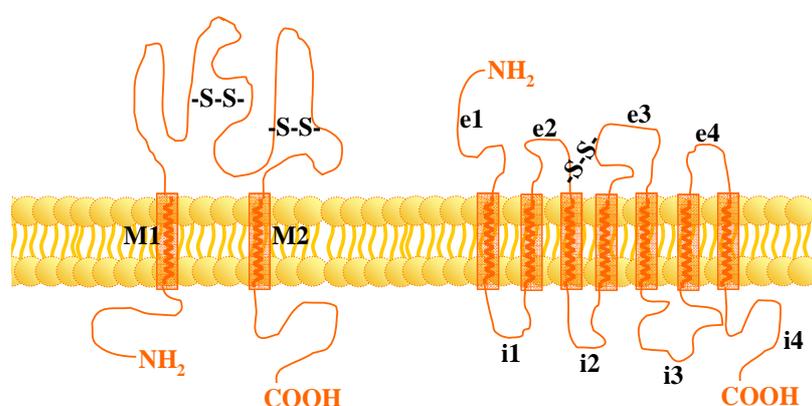
Tipo celular	Astrocitos	Células de Schwann	Oligodendrocitos	Microglía
<b>Receptores Adenosina</b>	Todos los subtipos	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	Todos los subtipos	Todos los subtipos
<b>ATP P2X (ionotrópicos)</b>	Todos los subtipos	P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>7</sub>	P2X <sub>4, 5, 6, 7</sub>
<b>ATP P2Y (metabotrópicos)</b>	P2Y <sub>1, 2, 4, 6, 12, 14</sub>	P2Y <sub>1, 2</sub>	P2Y <sub>1, 2, 4, 6, 11, 13</sub>	P2Y <sub>1, 2, 4, 6, 12, 13</sub>

**Tabla 4. Receptores purinérgicos en las células gliales.**

Los estudios farmacológicos y de expresión de receptores revelan una amplia variedad de receptores purinérgicos en todas las clases mayoritarias de glía, incluyendo las células de Schwann en el SNP y oligodendrocitos, astrocitos y microglía en el SNC. Adaptado de Fields y Burnstock (2006).

## Receptores P<sub>2</sub>.

Como se comentó anteriormente (tabla 4), los astrocitos expresan todos los subtipos de receptores de purinérgicos excepto P<sub>2Y</sub><sub>11</sub> y P<sub>2Y</sub><sub>13</sub>. Aunque puede haber una considerable heterogeneidad en los patrones de expresión en las distintas células individuales según el estado fisiológico y de desarrollo: las purinas y pirimidinas pueden inducir acciones marcadamente diferentes en la función glial, tales como la mitogénesis y la apoptosis, dependiendo del estado funcional de estas células, la expresión de los subtipos selectivos de receptores y la presencia de diferentes receptores en una misma célula (Fields y Burnstock, 2006).



**Figura 24. Receptores de membrana para ATP extracelular.**

La familia de receptores P<sub>2</sub> ligan ATP o ADP extracelular, y esta constituida por dos tipos de receptores (P<sub>2X</sub> y P<sub>2Y</sub>). La subfamilia de receptores P<sub>2X</sub> son canales abiertos por ligando y la subfamilia de receptores P<sub>2Y</sub> son receptores acoplados a proteínas G. (S-S, puente disulfuro; e1-e4, bucles extracelulares 1-4; i1-i4, bucles intracelulares 1-4). Adaptado de Fields y Burnstock (2006).

## Receptores P<sub>2X</sub>.

Los miembros de la familia de los receptores P<sub>2X</sub><sub>1-7</sub> son receptores ionotrópicos. Muestran una topología con dos segmentos transmembrana y ambos extremos amino y carboxilo terminales intracelulares. Ambos tienen secuencias consenso de unión a proteínas quinasas. El primer segmento TM1 está implicado en la apertura del canal y el segundo (TM2) forma el poro iónico. La porción extracelular está constituida por un gran bucle entre ambos segmentos TM con diez residuos de cisteína conservados formando una serie de puentes disulfuro, una región H5 cercana al vestíbulo del poro y

un sitio de unión al ATP que puede abarcar regiones del bucle extracelular adyacente a TM1 y TM2 (Fig. 24).

Estos receptores se distribuyen ampliamente en el tejido neural (tabla 5), la mayoría de subtipos se expresan en neuronas en el cerebro. También algunos receptores P2X se encuentran en regiones como el cerebelo (P2X<sub>1</sub>) y el tallo cerebral (P2X<sub>3</sub>). Los receptores P2X<sub>7</sub> son principalmente presinápticos. El hipocampo expresa todos los subtipos de receptores P2X y la corteza expresa los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>2</sub> (Fields y Burnstock, 2006).

Estos receptores se relacionan con efectos excitatorios. Las respuestas mediadas por los receptores P2X en las neuronas centrales y periféricas indican que el ATP es un neurotransmisor rápido que actúa abriendo canales activados por ligando (Edwards y Gibb, 1993). Los efectos de los antagonistas de P2X sobre las corrientes postsinápticas excitatorias en las neuronas piramidales CA1 y CA3 sugieren que tienen un papel en la facilitación de la liberación de glutamato.

Los receptores P2X son generalmente activados por ATP y 2-metil-tio-ATP. El  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP es un potente agonista no hidrolizable de los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> pero es mucho menos potente para los otros subtipos de receptores P2X. El ADP es un agonista selectivo de los receptores P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub>, mientras que el benzoil-ATP es un agonista selectivo del receptor P2X<sub>7</sub>, un receptor inusual, previamente llamado P2Z, que puede causar la lisis celular promoviendo la formación de grandes poros en la membrana plasmática (tabla 5).

Un problema en el estudio de los receptores P2 es la ausencia de antagonistas selectivos del subtipo de receptor. Los compuestos usados como antagonistas de receptores P2X son compuestos de baja afinidad no selectivos. Estos incluyen el NF023, el azul reactivo 2 (RB2) y el PPADS.

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas
<b>P2X<sub>1</sub></b>	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, neuronas del asta dorsal de la médula espinal.	<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	TNP-ATP
		<b>ATP</b>	IP5I
		2-MeSATP (desensibilización rápida)	NF023
		L- $\beta,\gamma$ -meATP	NF449
<b>P2X<sub>2</sub></b>	Músculo liso, SNC, retina, células cromafines, ganglios sensoriales y autónomos.	<b>ATP</b>	<b>Suramina</b>
		ATP $\gamma$ S	isoPPADS
		2-MeATP	<b>RB2</b>
		<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP (sensible a pH y Zn)</b>	NF770
<b>P2X<sub>3</sub></b>	Neuronas sensoriales, NTS, algunas neuronas del simpático.	2-MeATP	TNP-ATP
		<b>ATP</b>	<b>PPADS</b>
		<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	A317491
		ApnA (desensibilización rápida)	NF110
<b>P2X<sub>4</sub></b>	SNC, motoneuronas de la médula espinal.	<b>ATP</b>	
		<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	TNP-ATP
		CTP	BBG
		Ivermectina.	
<b>P2X<sub>5</sub></b>	Células proliferativas de la piel, intestino, vejiga, timo, médula espinal.	<b>ATP</b>	<b>Suramina</b>
		<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	<b>PPADS</b>
		ATP $\gamma$ S	BBG
<b>P2X<sub>6</sub></b>	SNC, motoneuronas de la médula espinal.	N/A (no homomultimérico)	N/A
<b>P2X<sub>7</sub></b>	Células apoptóticas en, por ejemplo, sistema inmune, páncreas, piel.	BzATP	KN62
		<b>ATP</b>	KN04
		2-MeATP	MRS2427
		<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	BBG Coomassie

**Tabla 5. Características de los receptores purinérgicos P<sub>2X</sub>.**

Los agonistas y antagonistas destacados en negrita son los utilizados en este trabajo. NTS: núcleo del tracto solitario. SNC: sistema nervioso central. Adaptado de Fredholm *et al.* (2001).

### Receptores P2Y.

Los subtipos de receptores P2Y metabotrópicos (Fig. 23) tienen una topología característica de receptores acoplados a proteínas G con siete segmentos transmembrana (TM), un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular. Los segmentos TM colaboran en la formación de un bolsillo de acoplamiento a ligando. Estos receptores presentan una gran homología en la secuencia

de las regiones TM, en particular TM3, TM6 y TM7. Los bucles intracelulares y el extremo carboxilo muestran gran diversidad estructural en los diferentes subtipos de P2Y, influenciando así el grado de acoplamiento con las proteínas  $G_{q/11}$ ,  $G_s$  y  $G_i$ . Muchos tejidos expresan varios subtipos P2Y y bajo ciertas condiciones, los receptores P2Y pueden formar ensamblajes homo- y hetero-multiméricos (Fields y Burnstock, 2006).

Los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> son activados principalmente por nucleósido difosfatos, mientras que los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> son activados por nucleótidos tanto de purinas como de pirimidinas (tabla 6). En respuesta a la activación por nucleótido, los receptores P2Y recombinantes (mediante el acoplamiento a una proteína  $G_q$ ) activan una fosfolipasa C específica de fosfoinositoles y producen una movilización del  $Ca^{2+}$  de las reservas intracelulares dependiente de inositol-1,4,5-trisfosfato. Este es el sistema de transducción que se encuentra más frecuentemente acoplado a los receptores P2Y. En otros casos, los P2Y están acoplados a la adenilil ciclasa (AC) regulando los niveles de cAMP. Actualmente no hay evidencias suficientes para indicar si P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>9</sub> y P2Y<sub>10</sub> son receptores de nucleótidos, o si afectan las cascadas de señalización intracelular. Respecto a P2Y<sub>7</sub>, es un receptor de leucotrienos, y P2Y<sub>8</sub> es un receptor clonado de embriones de rana en un estadio de desarrollo en el que todos los nucleótidos son equipotentes, y al que no se le ha descrito un homólogo en humanos, salvo en células HL60 indiferenciadas (Fields y Burnstock, 2006).

La señalización por P2Y<sub>11</sub> es inusual en que puede activar dos rutas de transducción: AC e IP<sub>3</sub>, simultáneamente.

En la tabla 6 se muestran los agonistas y antagonistas selectivos y no selectivos de los subtipos de receptores P2Y. Cabe destacar que el azul reactivo 2 (RB2) puede interactuar con todos los subtipos de receptores P2Y, la suramina es más específica de los subtipos P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> que P2Y<sub>4</sub>, y el PPADS es más específico de los receptores P2X que de los P2Y.

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	Células endoteliales y epiteliales, plaquetas, células del sistema inmune, osteoclastos.	2-MeSADP	
		ADPβS	MRS2179
		2-MeSATP	MRS2500
		ADP	MRS2279
		<b>ATP</b> MRS2365	PIT
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	Células del sistema inmune, células epiteliales y endoteliales, túbulos renales, osteoblastos.	UTP	<b>Suramina</b>
		<b>ATP</b>	<b>RB2</b>
		UTPγS	AR-C126313
		INS37217	
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	Células endoteliales.	UTP	<b>RB2</b>
		<b>ATP</b>	<b>Suramina</b>
		UTPγS	
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	Algunas células epiteliales, placenta, células T, timo.	UDP	
		UTP	MRS2578
		<b>ATP</b>	
		UDPβS	
<b>P2Y<sub>11</sub></b>	Bazo, intestino, granulocitos.	AR-C67085MX	<b>Suramina</b>
		BzATP	<b>RB2</b>
		ATPγS	NF157
		<b>ATP</b>	
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	Plaquetas, células gliales.		CT50547
			AR-C69931MX
		2-MeSADP	INS49266
		ADP	AZD6140
		<b>ATP</b>	PSB0413
			ARL66096
<b>P2Y<sub>13</sub></b>	Bazo, cerebro, nódulos linfáticos, médula ósea.	ADP	
		2-MeSADP	MRS2211
		<b>ATP</b> 2-MeSATP	
<b>P2Y<sub>14</sub></b>	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestino, regiones concretas cerebrales.	UDP glucosa UDP galactosa	N/A

**Tabla 6. Características de los receptores mediados por purinas. P<sub>2Y</sub>.**

Los agonistas y antagonistas destacados en negrita son los utilizados en este trabajo. Adaptado de Fredholm *et al.* (2001).

### ***Receptores de adenosina.***

La adenosina, cuando se encuentra en una alta concentración puede suponer una fuente de energía metabolizable, pero sus efectos principales se deben a la activación extracelular de sus receptores. Entre estos efectos se incluyen sedación, actividad anticonvulsiva, analgesia, neuroprotección y depresión locomotora (Linden, 2005).

A pesar de las sugerencias previas sobre la presencia de receptores específicos de adenosina en cerebro y corazón por los grupos de Degubareff (1965) Sattin y Rall (1970) y de Cobbin (1974), su existencia se probó cuando se clonó el primer receptor de adenosina en 1990 (Fredholm *et al.*, 2001; Fields y Burnstock, 2006).

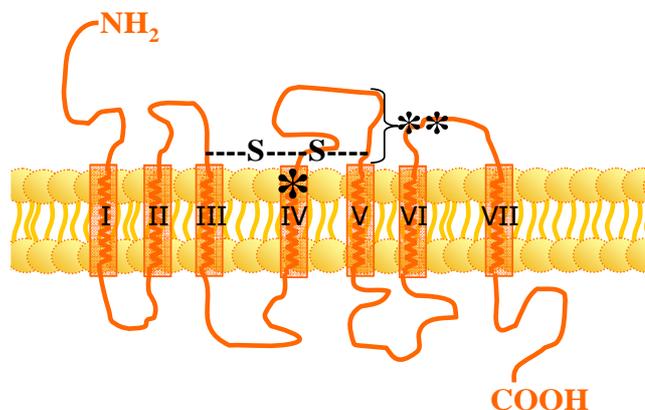
Los receptores de adenosina fueron inicialmente subdivididos en A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> en base a su capacidad de inhibir o estimular, respectivamente, a la adenilil ciclasa (van Calker *et al.*, 1979; Londos *et al.*, 1980). De hecho, los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> están acoplados a proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>s</sub>, respectivamente, que inhiben (G<sub>i</sub>) o estimulan (G<sub>s</sub>) a la AC (tabla 8). Posteriores estudios farmacológicos revelaron que los receptores A<sub>2</sub> eran heterogéneos en su afinidad de unión a la adenosina, necesitando una subdivisión en A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub>. Más tarde, se identificó un cuarto receptor de adenosina denominado A<sub>3</sub>, insensible a las metil-xantinas en rata, sensible a las xantinas en oveja y parcialmente sensible a las xantinas en humanos. Este subtipo está acoplado a G<sub>i</sub>.

### Estructura.

Todos los receptores de adenosina están acoplados a proteínas G y presentan la estructura de siete segmentos transmembrana hidrofóbicos (típica de este tipo de receptores) con el extremo amino terminal extracelular y el carboxilo intracelular (Fig. 25). Los dominios transmembrana están, en general, altamente conservados y se observa que la estructura de los clonados en rata, humano y ratón varía poco entre las distintas especies, existiendo, de hecho, mayor variabilidad entre los distintos subtipos dentro de una misma especie que entre los receptores del mismo subtipo de distintas especies (Fredholm *et al.*, 2001).

Los cuatro subtipos de estos receptores son N-glicoproteínas y todos, excepto los A<sub>2A</sub>, tienen sitios de palmitoilación en el extremo carboxilo. La despalmitoilación del receptor A<sub>3</sub> lo hace susceptible de ser fosforilado por quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), lo que resulta en una desensibilización (Fredholm *et al.*, 2001).

En general, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  interactúan preferentemente con  $G_s$ , mientras que los receptores  $A_1$  y  $A_3$  lo hacen con proteínas de la familia  $G_{i/o}$ . No obstante, se han descrito otras interacciones con proteínas G para ambos subtipos.



**Figura 25. Receptores de membrana para adenosina extracelular.**

La familia de receptores  $P_1$  incluye los acopados a proteínas G que median sus acciones a través de la estimulación o inhibición de adenilil ciclasa (S-S, puente disulfuro. \*, Sitio de unión de agonistas sustituidos en 5'. \*\*, Sitio de reconocimiento de agonistas y antagonistas). Adaptado de Fields y Burnstock (2006).

### Distribución tisular.

Los receptores de adenosina  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , y  $A_3$  presentan distribuciones tisulares distintas aunque pueden estar solapadas (tabla 7) y una misma célula puede expresar más de un subtipo, es decir, la concentración extracelular de adenosina puede determinar la activación diferencial de los subtipos coexistentes (por ejemplo, bajas concentraciones de adenosina activan el receptor  $A_1$  en neutrófilos, mientras que altas concentraciones actúan sobre los receptores  $A_2$  e inhiben el efecto producido por la ocupación de los  $A_1$ ).

Los receptores  $A_1$  de adenosina han sido ampliamente caracterizados en el cerebro porque son expresados en gran densidad, especialmente en corteza, hipocampo, cerebelo, tálamo, tallo cerebral, y médula espinal.

Los receptores  $A_{2A}$  tienen una distribución muy amplia que incluye los tejidos inmunes, plaquetas, el endotelio y músculo liso vascular, y el SNC (tabla 7), donde la mayor densidad está en el estriado, el *nucleus accumbens* y el tubérculo olfatorio

(regiones ricas en dopamina y en receptores D<sub>2</sub> de dopamina, expresados por las neuronas GABAérgicas del estriado-pálido).

Farmacología general.

Uno de los primeros criterios utilizados para distinguir entre los receptores de adenosina y los de ATP fue el bloqueo selectivo de los primeros por las xantinas cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) y teobromina (3,7-dimetilxantina), encontradas de forma natural en el café, el té y el chocolate, respectivamente. Su actividad estimulante se atribuye al bloqueo de los receptores de adenosina en el SNC (Jacobson *et al.*, 2006; Jacobson y Gao, 2006), de hecho, el compuesto psicoactivo mas ampliamente usado es la cafeína, un antagonista relativamente selectivo de los receptores A<sub>2A</sub> (Ledent *et al.*, 1997). Actualmente se sintetizan 8-fenilxantinas, 8-cicloalquilxantinas y otros compuestos no xantinas como antagonistas más potentes y selectivos para los distintos subtipos de receptores de adenosina individuales que la cafeína o la teofilina (Kim *et al.*, 2000; Fredholm *et al.*, 2001). En la tabla 7 se muestran los agonistas y antagonistas selectivos para cada uno de los cuatro subtipos de receptores P<sub>1</sub> o A de adenosina.

Receptor	Distribución principal	Agonistas	Antagonistas
A <sub>1</sub>	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón, terminales nerviosas del autónomo.	<b>CPA</b> CCPA CHA	<b>DPCPX</b> N-0840 WRC0571
A <sub>2A</sub>	Cerebro, corazón, pulmones, bazo.	<b>CGS21680</b> HENECA.	SCH58261 <b>ZM241385</b> KF17837
A <sub>2B</sub>	Intestino grueso, vejiga.	<b>NECA</b> (no selectivo).	<b>MRS1754</b> Emprofilina Aloxacine
A <sub>3</sub>	Pulmones, hígado, cerebro, testículos, corazón.	2-Cl-IB-MECA <b>IB-MECA</b>	MRS1220 MRE308-F20 MRS1191 <b>MRS1523</b>

**Tabla 7. Distribución y farmacología de los receptores mediados por purinas. P<sub>1</sub>.**

Los agonistas y antagonistas destacados en negrita son los utilizados en este trabajo como herramientas farmacológicas. Adaptado de Fredholm *et al.* (2001).

*Clasificación mediante herramientas farmacológicas del subtipo A<sub>1</sub>.*

En el caso de los receptores A<sub>1</sub>, el agonista CPA y los antagonistas DPCPX y 8-CPT son bastante útiles, aunque el DPCPX muestra una apreciable afinidad por los receptores A<sub>2A</sub> y cierta afinidad con los A<sub>2B</sub>. De hecho, el DPCPX, a partir de cierta concentración (aproximadamente 1-5 μM) puede actuar como antagonista de todos los subtipos de receptores de adenosina *in vitro* (Fredholm *et al.*, 2001).

*Clasificación mediante herramientas farmacológicas del subtipo A<sub>2A</sub>.*

NECA ha sido utilizado durante mucho tiempo como agonista selectivo de los receptores A<sub>2</sub> de adenosina (siendo 18 veces más afín por el subtipo A<sub>2B</sub>) pero actualmente existe un derivado suyo de mayor selectividad para los receptores A<sub>2A</sub> (el CGS-21680, obtenido mediante una sustitución en posición 2), aunque en humanos es menos potente y menos selectivo que en ratas. Un problema adicional del CGS-21680 como herramienta es que también puede unirse a sitios no relacionados con los receptores A<sub>2A</sub>, lo que significa que en órganos o células que expresan pocos receptores A<sub>2A</sub>, los efectos de este fármaco pueden verse con escepticismo (Ongini *et al.*, 1999; Arslan y Fredholm, 2000; Kull *et al.*, 2000).

Hay varios antagonistas útiles del receptor A<sub>2A</sub>, el más selectivo de los cuales es el SCH-58261 (IC<sub>50</sub> = 2.3 nM), sin embargo, otro fármaco relacionado estructuralmente con él, el ZM-241385 (IC<sub>50</sub> < 1nM), es más fácilmente asequible, aunque muestra cierta afinidad (IC<sub>50</sub> = 50nM) por los receptores A<sub>2B</sub> de adenosina (Fredholm *et al.*, 2001).

*Clasificación mediante herramientas farmacológica del subtipo A<sub>2B</sub>.*

A diferencia de los otros subtipos, para los que se dispone de agonistas en el rango del nanomolar bajo, el subtipo A<sub>2B</sub> muestra poca afinidad por la mayoría de agonistas. Entre ellos destaca NECA (IC<sub>50</sub> = 10nM) aunque no es altamente selectivo, puesto que muestra afinidad por el subtipo A<sub>2A</sub> (IC<sub>50</sub> = 22nM) (Fredholm *et al.*, 2001).

La situación respecto a los antagonistas es más favorable, ya que se han descrito algunos antagonistas selectivos potentes y relativamente selectivos tales como el antagonista tipo xantina MRS-1754, el cual sólo se une a los subtipos A<sub>2</sub> de adenosina de rata, con valores de K<sub>D</sub> mayores de 50 nM para A<sub>2A</sub> y de 1.13 nM para el subtipo A<sub>2B</sub> (en humanos muestra una IC<sub>50</sub> de 2 nM para A<sub>2B</sub>, 200-250 veces más potente que para los otros subtipos) (Kim *et al.*, 2000).

*Clasificación mediante herramientas farmacológicas del subtipo A<sub>3</sub>.*

Este subtipo es insensible a muchas xantinas, por lo que sus antagonistas tienen estructuras tipo no-xantina, tales como las dihidropiridinas, piridinas y los flavonoides. En general, la afinidad por los receptores A<sub>3</sub> depende de la especie. Mientras MRS-1523 es un antagonista de A<sub>3</sub> de gran aplicabilidad para muchas especies, MRS-1220 es extremadamente potente en la unión al receptor A<sub>3</sub> humano pero no al de rata, donde es altamente selectivo para el receptor A<sub>2A</sub>. Por el contrario, la afinidad del agonista específico del receptor A<sub>3</sub>, IB-MECA, no varía en más de un orden de magnitud entre las distintas especies estudiadas en la bibliografía (Fredholm *et al.*, 2001).

Efectores intracelulares de los receptores de adenosina.

Además de la inhibición de la AC se han descrito otros efectores mediados por proteínas G (tabla 8) entre los que se incluyen la activación de los canales de K<sup>+</sup> en neuronas del estriado (Trussell y Jackson, 1985) y la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> en las células el ganglio dorsal del bulbo (Dolphin *et al.*, 1986).

Subtipo	Proteína G	Efectos intracelulares	Sistema celular
A <sub>1</sub>	G <sub>i1/2/3</sub>	↓cAMP ↑IP <sub>3</sub> /DAG (PLC) ↑Araquidónico (PLA <sub>2</sub> ) ↑PEtOH (PLD)	General, células CHO   DDT <sub>1</sub> MF-2
	G <sub>o</sub>		
A <sub>2A</sub>	G <sub>s</sub>	↑cAMP	General
	G <sub>olf</sub>	↑cAMP	COS-7
	G <sub>15/16</sub>	↑IP <sub>3</sub>	
A <sub>2B</sub>	G <sub>s</sub>	↑cAMP	General
	G <sub>q/11</sub>	↑IP <sub>3</sub> /DAG (PLC)	HMC-1, HEK 293
A <sub>3</sub>	G <sub>i2/3</sub>	↓cAMP	General, células CHO
	G <sub>q/11</sub>	↑IP <sub>3</sub> /DAG (PLC)	Células CHO

**Tabla 8. Efectores intracelulares de los receptores de adenosina.**

Aparte de inhibir a la AC, el subtipo A<sub>1</sub> media la activación de distintos canales de K<sup>+</sup> (probablemente *via* subunidades β,γ), la inactivación de canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo Q, P, y N, la activación de fosfolipasa Cβ, etc. Lo mismo parece ocurrir para el subtipo A<sub>3</sub>. Por otro lado, ambos receptores A<sub>2</sub> principalmente estimulan la formación de cAMP, pero se han descrito otras acciones como la movilización de calcio intracelular en células COS-7 (A<sub>2A</sub>) o HMC-1 (A<sub>2B</sub>). Adaptado de Fredholm *et al.* (2001).

*Señalización intracelular asociada al subtipo A<sub>1</sub>.*

La activación de los receptores A<sub>1</sub> inhibe la liberación de glutamato y aspartato de las terminales nerviosas en la región CA1 del hipocampo, muy sensible a la inhibición por adenosina, y reduce los cambios a largo plazo en la eficiencia sináptica, como la potenciación a largo plazo de los picos generados tras la estimulación de las fibras de Schaffer en la misma región (Wieraszko y Ehrlich, 1994).

Los receptores A<sub>1</sub> de adenosina expresados transitoriamente en células COS-7 pueden activar, de forma dosis-dependiente, a ERK 1/2 *via* las subunidades  $\beta,\gamma$  liberadas de las proteínas G sensibles a la toxina pertúsica, G<sub>i/o</sub> (Schulte y Fredholm, 2003) mediante una ruta de señalización sensible a los inhibidores de la PI3-K, wortmanina y LY-294002 (Fredholm *et al.*, 2001).

*Señalización intracelular asociada al subtipo A<sub>2A</sub>.*

Aparte del mecanismo de activación de la AC, pueden actuar a través de otras proteínas G (tabla 8) (Kull *et al.*, 2000), por ejemplo, en la mayoría de tejidos periféricos, A<sub>2A</sub> está acoplado a G<sub>s</sub>, pero en el estriado, enriquecido en receptores A<sub>2A</sub>, escasean las proteínas G<sub>s</sub> y predominan las G<sub>oif</sub> (Fredholm *et al.*, 2001).

Se han mostrado interacciones antagónicas de la activación de los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina respecto a la [cAMP]<sub>i</sub> (Jacobson y Gao, 2006).

Los receptores A<sub>2A</sub> en el SN, en general, facilitan la liberación de neurotransmisores. También la activación de los receptores A<sub>2</sub> aumenta la liberación del factor de crecimiento nervioso (NGF) y de la proteína S100- $\beta$  en astrocitos en cultivo (Fields y Burnstock, 2006), y la estimulación de este subtipo de receptor de adenosina potencia la liberación de óxido nítrico por la microglía activada (Saura *et al.*, 2005).

La activación de los receptores A<sub>2A</sub> también aumenta la actividad MAPK y el bloqueo de éstos previene la astrogliosis reactiva inducida por bFGF en astrocitos primarios de estriado de rata (Brambilla *et al.*, 2003).

Los agonistas de adenosina que ejercen efectos mitogénicos en células endoteliales humanas *via* este subtipo activan a ERK 1/2 utilizando la ruta cAMP-ras-MEK1 (Fredholm *et al.*, 2001). Sin embargo, las rutas de señalización utilizadas por el receptor A<sub>2A</sub> parecen variar con la situación celular y con la maquinaria de señalización de la que la célula dispone. De hecho, la activación de ERK 1/2

mediada por el receptor A<sub>2A</sub> en células CHO depende de G<sub>s</sub>-cAMP-PKA-Rap1-p68 B-raf-MEK1, mientras que en células HEK 293 implica a PKC, p21<sup>Ras</sup>, y Sos, pero no a G<sub>s</sub>, cAMP, ni PKA, incluso cuando los niveles de cAMP aumentan de forma dependiente de G<sub>s</sub> (Fredholm *et al.*, 2001; Schulte y Fredholm, 2003).

El receptor A<sub>2A</sub> ha sido también propuesto como una diana prometedora para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Jacobson y Gao, 2006).

#### *Señalización intracelular asociada al subtipo A<sub>2B</sub>.*

Se han descrito receptores A<sub>2B</sub> acoplados a diferentes cascadas de señalización, incluyendo la activación de la AC, el acoplamiento a PLC mediado por G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, y el aumento de la concentración de calcio intracelular dependiente de IP<sub>3</sub> (en mastocitos) (Fields y Burnstock, 2006). Un ejemplo de esto lo constituyen los receptores A<sub>2B</sub> endógenos de células HEK 293, mastocitos HMC-1 humanos, y mastocitos BR caninos que están dualmente acoplados a G<sub>s</sub> y G<sub>q</sub> (Linden, 2001).

El receptor A<sub>2B</sub> de adenosina es el único subtipo que, por el momento, activa no sólo ERK 1/2 sino también a JNK y p38<sup>MAPK</sup>, sugiriendo una función inflamatoria como la que se observa en las células de astroglioma, en las que la activación de los receptores A<sub>2B</sub> aumenta la [mRNA] y la síntesis de la interleuquina-6 (IL-6). En mastocitos humanos (HMC), la activación del receptor de adenosina conduce a una activación dependiente de tiempo y dosis de ERK 1/2 con un máximo grado de fosforilación a los 5 minutos, mientras que p38<sup>MAPK</sup> y JNK muestran diferentes perfiles cinéticos con fosforilaciones máximas a los 1 y 10-15 minutos, respectivamente (Fredholm *et al.*, 2001). Por otro lado, en unos estudios utilizando NECA y adenosina, se observó en células HEK 293 que la activación del receptor A<sub>2B</sub> induce la fosforilación de ERK 1/2 y la producción de cAMP en la misma célula mostrando una potencia similar (Fredholm *et al.*, 2001), mientras que en células transfectadas se mostró una potencia 100 veces superior de NECA y adenosina en la inducción de la fosforilación de ERK 1/2 que en la inducción de la producción de cAMP (Schulte y Fredholm, 2003). Demostrando así que un receptor acoplado a proteína G puede tener distinta potencia según las diferentes rutas de señalización que desencadena en un mismo tipo celular.

Los efectos de la activación del receptor A<sub>2B</sub> pueden no ser exclusivamente estimuladores, en las células del músculo liso vascular, disminuye considerablemente

los efectos mitogénicos de diferentes factores de crecimiento (Jonzon *et al.*, 1985), probablemente de forma secundaria al bloqueo de las MAPKs estimuladas por estos factores de crecimiento (Dubey *et al.*, 2000).

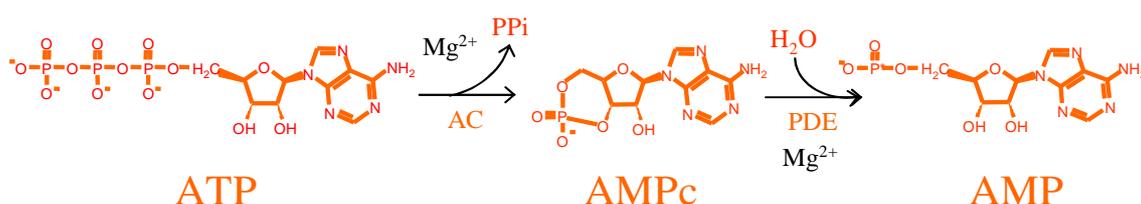
#### *Señalización intracelular asociada al subtipo A<sub>3</sub>.*

El receptor A<sub>3</sub> está ligado a proteína G, acoplándose a proteínas G<sub>iα2</sub>, G<sub>1α3</sub> y, en menor grado, a G<sub>q/11</sub>. El receptor A<sub>3</sub>, en general, inhibe la actividad de la AC, pero en el cerebro de rata, el receptor A<sub>3</sub> estimula la PLC y eleva los niveles de IP<sub>3</sub> y la concentración de calcio intracelular.

El receptor A<sub>3</sub> de adenosina ha sido sugerido como activador de ERK 1/2 en astrocitos fetales humanos, y sus agonistas CI-IB-MECA e IB-MECA inhiben la apoptosis en otros tipos celulares (Fredholm *et al.*, 2001).

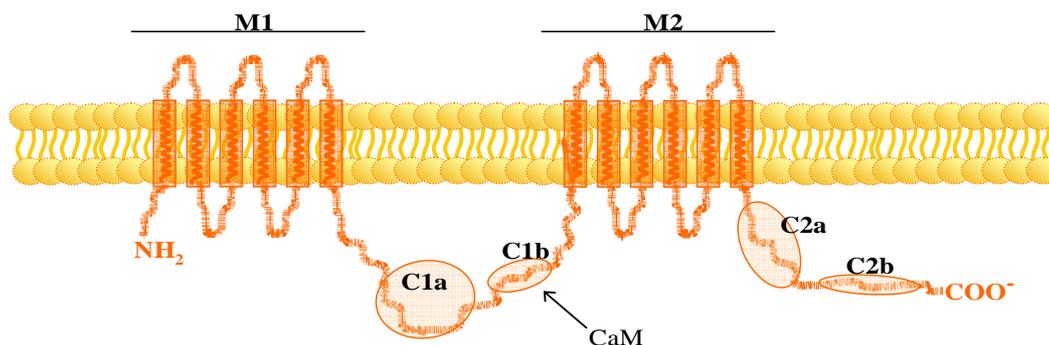
#### Segundos mensajeros y señales: Adenilil Ciclasa.

Los diferentes tipos de receptores de adenosina, A<sub>1</sub> – A<sub>3</sub>, están acoplados de una u otra manera a la adenilil ciclasa (AC), cuya estructura asociada a membrana se muestra en la figura 27. Ésta es la enzima que cataliza la síntesis de cAMP a partir de ATP (Fig. 26), por lo que las variaciones de la [cAMP]<sub>i</sub> constituyen un sistema de segundo mensajero intracelular común a todos los subtipos de receptores de adenosina.



**Figura 26. Síntesis y degradación de cAMP.**

El cAMP es sintetizado por la enzima AC mediante la creación de un enlace fosfodiéster cíclico con el fosfato α del ATP, liberando pirofosfato que proporciona la energía para la reacción. El cAMP es hidrolizado hasta 5'-AMP por las fosfodiesterasas. Ambas reacciones requieren Mg<sup>2+</sup>.



**Figura 27. Estructura común de las diferentes formas de AC.**

Las ACs contienen dos dominios hidrofóbicos (M1 y M2), cada uno de los cuales contienen seis segmentos transmembrana y dos regiones catalíticas (C1 y C2) localizadas en el citoplasma. El extremo carboxilo de las regiones C1 y C2 es el que determina si los complejos de las subunidades  $\beta\gamma$  inhiben (tipo I) o estimulan (tipos II y IV) a las ACs. El sitio C1b contiene un sitio de unión a calmodulina (CaM), propuesto como mediador de la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina de ciertas formas de la enzima. (Krupinski *et al.*, 1989; Gao y Gilman, 1991).

Los estudios bioquímicos y de clonación molecular indican la existencia de nueve formas de AC asociadas a la membrana y estimuladas por proteínas  $G_{\text{os}}$ , denominadas como tipo I-IX, con distintos patrones de expresión en los diferentes tejidos (Cooper *et al.*, 1995; Sunahara *et al.*, 1996).

#### *Propiedades reguladoras.*

Todos los tipos de AC son estimulados por  $G_{\text{os}}$  activas, mientras que muchas formas de  $G_{\text{oi}}$  pueden inhibir la actividad catalítica de la AC activada por  $G_{\text{os}}$  o forskolina. Esto incluye los subtipos  $G_{\text{oi1}}$ ,  $G_{\text{oi2}}$ ,  $G_{\text{oi3}}$  y  $G_{\text{oz}}$ . La inhibición de AC mediada por  $G_{\text{oi}}$  es más intensa para los tipos V y VI de la enzima. El tipo I también puede ser inhibido por estos subtipos de  $G_{\text{oi}}$ , así como por  $G_{\text{ao}}$ , pero esta inhibición es mayor cuando ha sido activado por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina que por  $G_{\text{os}}$ . La AC tipo VIII parece ser inhibida de forma apreciable por  $G_{\text{oi}}$  (Nielsen *et al.*, 1996).

En función de sus propiedades reguladoras se distinguen tres categorías de ACs: Tipos I, III y VIII, activadas sinérgicamente por  $G_{\text{os}}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, e inhibidas en, al menos, algunos casos, por las subunidades  $\beta\gamma$ . Tipos II, IV y VII, activadas sinérgicamente por  $G_{\text{os}}$  y  $\beta\gamma$ . Tipos V y VI, inhibidas por  $G_{\text{oi}}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Cooper *et al.*, 1995; Sunahara *et al.*, 1996).

Al margen de esta clasificación, todos los tipos de AC comparten la activación directa por forskolina, un diterpeno vegetal muy utilizado para la elevación de los niveles intracelulares de cAMP en estudios de regulación y purificación enzimática ya que es un potente activador de la AC ( $EC_{50} = 5-10 \mu\text{M}$ ), especialmente potenciando la activación hormonal de la enzima en células intactas y la inhibición por el agente farmacológico MDL-12,330A, un inhibidor irreversible y permeable de la AC ( $IC_{50} = 250 \mu\text{M}$ ) (Cooper *et al.*, 1995; Sunahara *et al.*, 1996).

#### Cambios mediados por la adenosina en la proliferación celular y sobre la activación de MAPKs.

La adenosina induce la proliferación de la célula astrogliar y la formación de astrocitos reactivos (Hindley *et al.*, 1994), tal y como demuestra la expresión aumentada de GFAP y la elongación de los procesos positivos para este marcador específico astrogliar (Fields y Burnstock, 2006).

La liberación de citoquinas en respuesta a factores de crecimiento puede afectarse por los receptores purinérgicos, influenciando la proliferación celular. Esta interacción puede ser sinérgica, como en astrocitos, o antagónica, como en las células de Schwann. Se ha sugerido que las cascadas de señalización de ambos receptores se superponen a nivel de la cascada de las MAPKs (Fields y Burnstock, 2006). Es un hecho común a los receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , y  $A_3$ ) el acoplamiento positivo a ERK 1/2 tanto si la ruta clásica cAMP/PKA es activada ( $A_2$ ) o inhibida ( $A_{1/3}$ ). Dependiendo del contexto celular, los elementos de señalización requeridos varían ampliamente aunque la activación de una proteína G pequeña de las familias de  $p21^{\text{Ras}}$  o Rap1 es esencial (Fredholm *et al.*, 2001).



## **PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.**



## ANTECEDENTES Y EVIDENCIAS PREVIAS

En el sistema nervioso central (SNC) los astrocitos tienen un papel relevante en los mecanismos que conducen a la lesión neuronal, entre otros mecanismos por generación de óxido nítrico (NO·). Este es un importante mediador implicado en múltiples procesos fisio-patológicos: En el cerebro el NO· participa en los mecanismos de respuesta/daño a la hipoxia/isquemia, a la infección viral y al trauma (Murphy, 2000). También está implicado en enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas (esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer) (Dawson *et al.*, 1993; Nathan, 1997; Hierholzer *et al.*, 1998; Wink *et al.*, 1998a; Grisham *et al.*, 1999; Barbeito *et al.*, 2004).

La producción sostenida de NO· en estos procesos es debida a la activación de la enzima óxido nítrico sintasa tipo II (NOS-2 o iNOS), la isoforma independiente de la elevación de Ca<sup>2+</sup> intracelular presente en astrocitos (Tolias *et al.*, 1999) y que se localiza en las lesiones provocadas por estos procesos. La inducción de la expresión de NOS-2 en astrocitos es estimulada por agentes inflamatorios como LPS, IL-1β, TNFα o IFNγ (Feinstein *et al.*, 1994a; Grzybicki *et al.*, 1996; Da Silva *et al.*, 1997; Kopnisky *et al.*, 1997; Nishiya *et al.*, 1997; Jana *et al.*, 2005), por estrés oxidativo y por acción de algunas proteínas como la proteína de cubierta de HIV (Adamson *et al.*, 1996; Hori *et al.*, 1999; Shapshak *et al.*, 2004), S100 o el péptido β-amiloide, implicado en la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Rossi y Bianchini, 1996; Akama *et al.*, 1998; Wink y Mitchell, 1998; Hu y Van Eldik, 1999; Bhat *et al.*, 2002).

La supresión de la expresión de NOS-2 puede disminuir el daño neuronal subsecuente a la activación glial por citoquinas en diversos procesos de tipo inflamatorio. Y su regulación negativa es un proceso clave para la comprensión de los mecanismos del balance daño-protección ejercidos por el NO· y que determina el efecto neto del mismo y de las posibles manipulaciones farmacológicas. Por ello parece esencial investigar más a fondo la regulación ejercida por el ATP, un neurotransmisor nuevo, de especial relevancia para los astrocitos y acoplado a señales de Ca<sup>2+</sup>. Algunos agentes actúan sobre la estabilidad de mRNA de esta proteína, como en el caso de TGF-β (Vodovotz *et al.*, 1993).

### Objetivos concretos del proyecto de Tesis Doctoral

- Identificar el agonista responsable de los efectos supresores de la inducción de NOS-2.

Como ya se ha comentado, el pretratamiento con ATP suprime la inducción de NOS-2 en astrocitos de rata y humanos inducida por IL-1 $\beta$  (Murphy *et al.*, 1995; Liu y Neufeld, 2000). No obstante, en dichos estudios no se ha controlado la hidrólisis extracelular del ATP añadido como agente modulador. En relación a esto, los astrocitos, como otros tipos celulares, presentan ecto-5'-nucleotidasas en su membrana capaces de actuar sobre los nucleótidos extracelulares (Zimmermann, 2006). De hecho la hidrólisis extracelular de ATP a adenosina es extremadamente rápida en el tejido neural, con vidas medias inferiores a 1 segundo (Dunwiddie *et al.*, 1997). Por ello, con tiempos de estimulación de minutos-horas, cabe preguntarse si el agente real de la modulación es el ATP, actuando a través de un receptor P2, o bien la adenosina generada en el medio, a través de un receptor A. Más aún si se tiene en cuenta que la adenosina puede actuar a través de receptores A<sub>2</sub> acoplados a la generación de cAMP (Jimenez *et al.*, 1999).

- Determinar si el bloqueo de la inducción de NOS-2 está mediado a través de un receptor de adenosina o de ATP e identificar el subtipo implicado.

La identificación del receptor implicado, P2X/P2Y en el caso de ser el ATP el agente activo, o el subtipo de receptor de adenosina, en el caso de ser ésta el efector real de la supresión observada, es esencial para posibilitar la intervención farmacológica en este proceso.

- Determinar si la regulación de la expresión de NOS-2 por ATP es dependiente de los efectos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

ATP y glutamato elevan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en astrocitos, por ello se ha sugerido que el efecto inhibitor observado podría estar mediado por otro segundo mensajero como el Ca<sup>2+</sup> (Lin y Murphy, 1997), ya que los ionóforos de Ca<sup>2+</sup> también inhiben la inducción de NOS-2 en macrófagos (Jordan *et al.*, 1995) y los receptores P2Y de ATP están acoplados a la vía G<sub>q</sub>/PLC $\beta$ <sub>1</sub> (Lin y Murphy, 1997; Fields y Burnstock, 2006).

- Estudiar el efecto de los compuestos purinérgicos en los niveles de cAMP intracelular y determinar la participación de la PKA en el efecto supresor mediado por ATP.

De la misma manera, la contribución de la vía del cAMP al efecto observado debe considerarse seriamente, a pesar de la pobre generación de cAMP por ATP en astrocitos (Jimenez *et al.*, 1999) y la falta de respuesta a los antagonistas de PKA (Lin y Murphy, 1997) ya que la activación de proteínas  $G_s$  acopladas a la adenilil ciclasa también pone en marcha otros procesos colaterales independientes de la elevación de cAMP (Jimenez *et al.*, 1999), y la elevación de la  $[cAMP]_i$  puede activar otras proteínas distintas a la PKA (de Rooij *et al.*, 2000; Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2003).

Por ello, la contribución de esta vía debe re-investigarse, sobre todo si la adenosina se revela como el mediador real del efecto.

El efecto supresor de la activación de receptores purinérgicos puede ser mediado por la activación, independiente de  $Ca^{2+}$ , de la ruta ERK1/2 por ATP (Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Neary *et al.*, 2003)

- Estudiar el mecanismo de transducción de la señal inductora al complejo promotor de NOS-2.

Por otra parte, el mecanismo a través del cual se ejerce el bloqueo de la inducción de NOS-2 por acción del ATP permanece sin resolver. En astrocitos humanos se ha observado un bloqueo de la activación de NF- $\kappa$ B (Liu y Neufeld, 2000; Liu *et al.*, 2001), por el contrario en astrocitos de rata la activación y translocación de NF- $\kappa$ B parecen estar íntegras, pero el ATP parece reducir la capacidad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA (Lin y Murphy, 1997).



## **MATERIAL Y MÉTODOS.**



## 1. MATERIAL.

Todos los estudios han sido realizados con cultivos purificados de astrocitos tipo 1 cerebelares obtenidos de ratas Wistar de 6-7 días de vida post-natal. La utilización de cultivos cerebelares permitió aplicar la experiencia acumulada, y el hecho de utilizar una fuente celular definida, en región y tiempo de desarrollo, facilita la asignación de un papel funcional a la conducta observada y reduce la variabilidad celular, aspecto importante porque los astrocitos son notoriamente heterogéneos en sus capacidades, dependiendo de la región de procedencia.

El animal seleccionado es el apropiado para este proyecto de investigación puesto que las instalaciones de cría y sacrificio están perfectamente adaptadas para ello, ya que es una fuente celular de uso rutinario en este laboratorio. Los animales fueron suministrados por el bioterio del Edificio de CC de la Salud de la ULPGC. El sacrificio se realizó por decapitación rápida siguiendo los protocolos *ad hoc*.

### *Material general de laboratorio.*

El instrumental y aparataje utilizado en la preparación de tampones, disoluciones y medios incluyó una balanza de precisión modelo AG104 de METTLER y un granatario CB-600PJ de COBOS Precision. También agitadores magnético MS01 y de membrana Shaker S-4, SkyLine de ELMI, vórtex de Labnet Biotécnica S.L., y pH-metro GLP 2 de CRISON. Las disoluciones se prepararon usando agua de alta calidad suministrada por un equipo de filtración de agua MilliQ® Gradient A10 de Millipore. El material de laboratorio era de vidrio PYREX o polipropileno, lavados con agua destilada.

Para el procesado de muestras para Western-Blot, descomplementación de sueros, inactivación de apirasa, etc. se dispuso de una centrífuga de mesa G-5 15R de Beckman, y de un sistema de baños y de un baño termostático Tecton Bio, ambos de SELECTA.

Para la conservación de reactivos y productos se dispuso de neveras a 4 °C, y congeladores a -20 °C de Liebherr. Para la conservación a largo plazo se dispuso de congeladores a -70 °C verticales modelo ULT 1386-5-VBA de REVCO y ULTFreezer de ThermoForma, y a -152 °C horizontal ultra low *CFC free* de SANYO.

### ***Cultivos celulares.***

La obtención de las células para cultivo se realizó con material de acero quirúrgico de REDA. La disección y limpieza de cerebelos se llevó a cabo bajo un estereoscopio Type 102 de NIKON, con una fuente de luz de fibra óptica Fiber-Lite® MI-150 de Doner-Jennsen industries. Para el recuento celular se usó una cámara de recuento de Neubauer y un microscopio modelo Alphaphot-2 YS2 de NIKON.

La preparación de suspensiones celulares y el manejo de los cultivos en condiciones estériles se realizó en unas campanas de flujo de aire laminar modelos ASB 11 Cultair (n° serie 336) y BHA 48 M (n° serie 1182) de Cultek S.L..

Los medios de cultivo y suero se esterilizaron mediante filtración a través de membranas de Millipore de tamaño de poro de 0.22 y 0.45  $\mu\text{m}$ , respectivamente, autoclavadas, y se conservaron a 4 °C o a -20 °C en nevera. Para soluciones de pequeño volumen se utilizaron filtros estériles para jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  de Millex. Los cultivos se realizaron en placas de Petri de 35, 60 y 100 mm de diámetro Easy Grip™, botellas de 75 cm<sup>2</sup>, placas de 6, 24 y 96 pocillos, todos estériles para cultivo tisular de BD Falcon. La manipulación de medios y tratamientos se realizó con tubos de fondo cónico estériles de 15 y 50 ml de BD Falcon. Los cultivos se mantuvieron en incubadores (con 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire como condiciones de cultivo) Heraeus y SANYO / B. Braun Biotech S.A., y su seguimiento y control se realizó con un microscopio Axiovert 135 de ZEISS acoplado a un sistema de captación de imágenes CCD-IRIS de SONY.

### ***RT-PCR.***

Los ensayos de biología molecular se realizaron en un área reservada específicamente para ello, y dotada de materiales (incluido un juego complejo de pipetas automáticas y puntas de pipeta), libres de RNasas y DNasas.

Para la cuantificación de RNA y la medida de la absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  en las muestras se utilizó un espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro UV/visible de Amersham pharmacia biotech.

Para las reacciones de síntesis de cDNA se empleó un termociclador modelo MyiQ de BIO-RAD. Y para la amplificación se dispuso de un termociclador modelo Mastercycler Gradient de la casa Eppendorf para PCR. Los productos de PCR se

separaron en una cubeta de electroforesis submarina horizontal para geles de agarosa de Hybaid conectada a una fuente de alimentación para electroforesis modelo 500 de atom.

La visualización de los geles se realizó con un transiluminador UV y un sistema de adquisición directa de imágenes con una cámara de fotos digital modelo DC290 de KODAK y un software asociado Quantity One de BIO-RAD.

### Reactivos y productos químicos.

**Tabla 9. Técnicas de inmunofluorescencia.**

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Anticuerpos secundarios	Casa comercial
Anti-GFAP (conejo). Anti-vimentina, (ratón).	SIGMA	Anti-IgG de ratón (H+L)- Alexa Fluor® 488, (cabra). Anti-IgG de conejo (H+L)- Alexa Fluor® 546, (cabra).	Invitrogen.
Anti-p38 MAPK, (conejo). Anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), policlonal, (conejo). Anti-fosfo-NF-κB p65 (Ser536), policlonal, (conejo).	Cell Signaling.	Anti-IgG de ratón (H+L)- Cy™2, (cabra). Anti-IgG de conejo (H+L) – Cy™3, (cabra).	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Anti-NF-κB / p65 (Rel A) Ab-1, policlonal, (conejo). Anti-NF-κB / p50 Ab-2, policlonal, (conejo).	NeoMarkers.	Anti-IgG de conejo F(ab')- HRP, (burro). Anti-IgG de ratón – HRP, (burro).	Amersham Biosciences
Anti-adenosina A1-R (C-19), policlonal, (cabra). Anti-adenosina A2A-R (R-18), policlonal, (cabra). Anti-adenosina A2B-R (R-20), policlonal, (cabra). Anti-adenosina A3-R (H-80), policlonal, (conejo). Anti-epac (H-70), policlonal, (conejo). Anti-epac2 (H-220), policlonal, (conejo). Anti-IκB-α (H-4), monoclonal, (ratón). Anti-NFκB p65 (F-6), monoclonal, (ratón). Anti-NOS2 (N-20), policlonal, (conejo).	Santa Cruz Biotechnology, Inc.		
		Otros productos relacionados	Casa comercial
		Medio de montaje para fluorescencia, con DAPI, VECTASHIELD®.	Vector Laboratories, Inc.
		Glicerol.	Anala®, BDH Laboratories.
		Tritón X-100.	Scintron®, BDH Laboratories.
		Bisbenzimid H33258. Paraformaldéhidido. Suero normal de cabra (NGS). Light Antifade Kit, SlowFade®.	SIGMA. Molecular Probes.
		Acetona.	Probus S.A.
		Metanol PA-ACS-ISO.	Panreac.
		Aceite de inmersión para microscopía de fluorescencia Immersol 518 F.	ZEISS.
		SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate.	PIERCE.
		Esmalte de uñas transparente.	Esther®.
		Papel de impresión instantánea en blanco y negro, tipo 667.	ALDRICH.

**Tabla 10. Cultivos celulares.**

Medio de aislamiento	Casa comercial
Cloruro sódico (NaCl). Cloruro potásico (KCl). Sulfato magnésico (MgSO <sub>4</sub> ). HEPES. α-D(+)-Glucosa anhidra. BSA.	SIGMA.
Hidrogenofosfato disódico dihidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O).	Anala <sup>®</sup> , BDH Laboratories.

Otros productos	Casa comercial
Medio de cultivo DMEM.	SIGMA-ALDRICH.
Suero Bovino Fetal (FCS).	GIBCO.
Dnasa I grado II de páncreas bovino.	Roche.

Otros productos (cont.)	Casa comercial
Tripan Blue, solución 0.4%, filtrado estéril, testado para cultivo celular. Poli-L-lisina en solución. PBS de Dulbecco. PBS W/O de Dulbecco. EDTA. Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> ), testado para endotoxina e hidridoma, HYBRY-MAX <sup>®</sup> Penicilina G, sal sódica, testada para cultivo celular. Estreptomina, sulfato. Sulfato de gentamicina, en solución, testada para cultivo celular. Tripsina (EC 3. 4. 21. 4) tipo IX de páncreas porcino. SBTI.	SIGMA.

**Tabla 11. Agentes farmacológicos utilizados.**

Ruta inductora	Casa comercial
IL-1β, humana recombinante ( <i>E. coli</i> ), filtrada estéril. IFN-γ, humano recombinante ( <i>E. coli</i> ), filtrado estéril.	Roche
IFN- γ, murino recombinante ( <i>E. coli</i> ), filtrado estéril SB-203580. SP-600125. PD-98059. FTI-277.	Calbiochem
LPS. Anisomicina de <i>S. griseolus</i> .	SIGMA.
TNF-α, humano.	PreProTech.
L-Sepiapterina. L-NAME. LY-294002, hidrocloreuro. Suramina, sal sódica.	SIGMA-ALDRICH.

Ruta supresora	Casa comercial
KT-5720. H-89. GGTI-286. MDL-12330A, hidrocloreuro. Forskolina de <i>Coleus forskohlii</i> .	Calbiochem.

Ruta supresora (cont.)	Casa comercial
Adenosina. Apirasa de patata <i>Reactive Blue 2</i> . Dibutiril-AMP cíclico MRS-1523. DMSO, filtrado estéril.	SIGMA.
N <sup>6</sup> -fenil-AMP cíclico. 8-pCPT-2'-O-metil-AMP cíclico.	BIOLOG LSI.
CGS-21680 hidrocloreuro. IB-MECA. ZM-241385. PSB-1115.	TOCRIS.
ATP.	Roche.
Adenosina-desaminasa (ADA). α,β-metilén-ATP, sal de litio. PPADS. DPCPX. 8-CPT. BAPTA-AM. N <sup>6</sup> -ciclopentil-adenosina (CPA). MRS-1754. NECA.	SIGMA-ALDRICH.

Tabla 12. Productos relacionados con determinaciones funcionales.

Electroforesis de Western-Blot	Casa comercial	Biología molecular (RT-PCR).	Casa comercial
$\beta$ -mercapto-etanol, reactivo para electroforesis. Trizma <sup>®</sup> base, SigmaUltra. Persulfato sódico (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ). Glicina Tween <sup>®</sup> -20	SIGMA.	Oligo dT. Buffer 5X para reverasa, dNTP mix. (10 mM <i>each one</i> )	BIO-RON.
Membrana de transferencia Immobilon-P de filtro de PVDF.	Millipore.	Thermophilic DNA poly. 10X Buffer. Inhibidor de RNasa Rnasin <sup>®</sup> . Enzima RT (transcriptasa inversa). MgCl <sub>2</sub> 25 mM DNA polimerasa <i>Taq</i> .	Promega
Ácido acético glacial.	Anala <sup>®</sup> , BDH Laboratories.	Cebadores L-19.	ClonTech
Leche desnatada en polvo.	Central Lechera Asturiana, S.A.	Cebadores NOS-2.	DNA International
Rojo Ponceau.	GURR.	Agarosa (D-1 LOW EEO)	Pronadisa
SDS, reactivo para electroforesis. Solución al 40% de Acrilamida:bisacrilamida 29:1 (3.3% C). TEMED Marcadores de pesos moleculares patrones <i>Precision Plus</i> <i>Protein<sup>™</sup> Dual Color</i> <i>Standards</i> . Papel de filtro.	BIO-RAD.	Marcadores de pesos moleculares de DNA, <i>100bp DNA Ladder</i> .	GibcoBRL.
		Bromuro de etidio. DEPC.	SIGMA.
		<b>Determinación de nitritos</b>	<b>Casa comercial</b>
		Nitrito sódico (NaNO). N-(1-naftil)etilendiamina. Sulfanilamida. 2,3-diamino-naftaleno (DAN).	SIGMA.
		Hidróxido sódico (NaOH).	SIGMA-ALDRICH.
		Ácido ortofosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).	Fluka.
		Ácido clorhídrico (HCl).	MERCK.

Otras determinaciones (kits)	Casa comercial
Kit de cuantificación directa de ATP mediante luminiscencia.	Thermo-Labsystems.
Kit de cuantificación directa de AMP cíclico. Kit de cuantificación de proteínas. Tris	SIGMA.

La noradrenalina de Laboratorios Andalucía Farmaceutica S.A. fue generosamente cedida por D. Félix Cabrera (Dpto. de Ciencias Clínicas de la ULPGC).

## 2. MÉTODOS.

### 2.1. Obtención de astrocitos primarios cerebelosos de rata.

Todos los estudios se realizaron en cultivos purificados de astrocitos tipo 1 cerebelares obtenidos de ratas de 6-7 días de vida post-natal, según el método descrito por Jiménez y cols. (Jimenez *et al.*, 1999).

Los animales se sacrificaron por decapitación. Los cerebelos, tras su localización se separaron del cerebro con la ayuda de material quirúrgico estéril, y se introdujeron inmediatamente en un vial con medio de aislamiento estéril (tabla 13) suplementado con antibióticos (100 UI/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomicina) y frío.

**Tabla 13. Composición del medio de aislamiento.**

Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
NaCl	130 mM	HEPES	10 mM
KCl	4 mM	α-D(+)-glucosa anhidra	15 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mM	BSA	50 µM
MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM		
		pH 7.4	

Brevemente, tras la retirada de las meninges bajo estereoscopio, se trasladaron al interior de una campana de flujo laminar y se trocearon con tijeras y escalpelo en fragmentos menores de 1mm. Posteriormente, se procedió a la disgregación tisular por incubación en medio de tripsinización (medio de aislamiento suplementado con tripsina, EC 3.4.21.4, 250 µg/ml), en presencia de DNasa I 20 UI/ml (para reducir la formación de fibras y la consecuente pérdida de rendimiento). Esta preparación se incubó durante 30 min en un baño termostático a 37 °C. La digestión con tripsina se detuvo con la adición de SBTI (inhibidor de tripsina de soja) para alcanzar una concentración final de 250 µg/ml preparado en medio de aislamiento, y seguidamente se centrifugó a 65 xg durante 10 min.

El sedimento obtenido a partir de la centrifugación se resuspendió en 2 ml de medio de trituración (medio de aislamiento estéril suplementado con 20 UI/ml de DNasa I y 1.5 µM de MgSO<sub>4</sub>) y se dispersó haciéndolo pasar a través de pipetas Pasteur de vidrio (las puntas fueron pulidas y estrechadas al fuego hasta diámetros aproximados

de 0.5-0.7 mm y 0.1-0.2 mm). Esta trituración se prolongó hasta dejar de observar material sin triturar en suspensión.

A continuación se procedió a la purificación de la preparación en medio de aislamiento estéril, mediante centrifugación durante 15 min a 70 xg, y tras la resuspensión del sedimento en medio de cultivo DMEM (tabla 14) suplementado con antibióticos (100 UI/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomycin), se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

**Tabla 14. Composición del medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).**

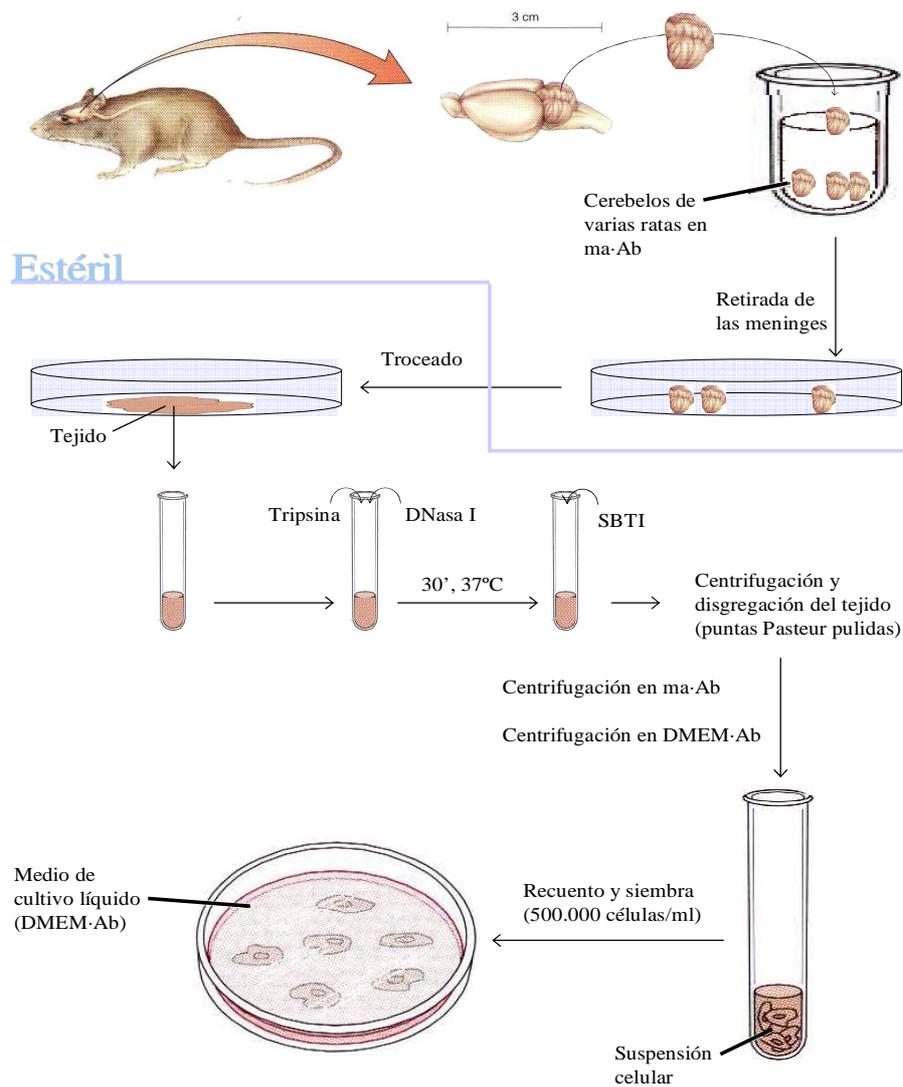
Sales inorgánicas	Concentración	Aminoácidos	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	116.6 mg/L	L-Alanina	4.45 mg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0013 mg/L	L-Arginina·HCl	147.5 mg/L
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.05 mg/L	L-Asparagina·H <sub>2</sub> O	7.5 mg/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.42 mg/L	L-Aspartato	6.65 mg/L
MgCl <sub>2</sub>	28.66 mg/L	L-Cisteína·HCl·H <sub>2</sub> O	17.56 mg/L
MgSO <sub>4</sub>	48.84 mg/L	L-Cisteína·2HCl	31.29 mg/L
KCl	311.8 mg/L	L-Fenilalanina	35.48 mg/L
NaCl	6.996 g/L	L-Glutamato	7.35 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	71.02 mg/L	L-Glutamina	365 mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	54.3 mg/L	Glicina	18.75 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.432 mg/L	L-Histidina·HCl·H <sub>2</sub> O	31.48 mg/L
Vitaminas	Concentración	L-Isoleucina	54.47 mg/L
Niacinamida	2.02 mg/L	L-Leucina	59.05 mg/L
Piridoxal·HCl	2 mg/L	L-Lisina·HCl	91.25 mg/L
Piridoxina·HCl	0.031 mg/L	L-Metionina	17.24 mg/L
Riboflavina	0.219 mg/L	L-Prolina	17.25 mg/L
Tiamina·HCl	2.17 mg/L	L-Serina	26.25 mg/L
Vitamina B <sub>12</sub>	0.68 mg/L	L-Treonina	53.45 mg/L
D-Biotina	0.0035 mg/L	L-Triptófano	9.02 mg/L
Cloruro de Colina	8.98 mg/L	L-Tirosina·2Na·2H <sub>2</sub> O	55.79 mg/L
Folato	2.66 mg/L	L-Valina	52.85 mg/L
Mio-inositol	12.6 mg/L	Otros componentes	Concentración
D-Pantotenato·Ca <sup>2+</sup>	2.24 mg/L	Ácido Linoleico	0.042 mg/L
		Ácido Pirúvico·Na	55 mg/L
		Ácido Tióctico	0.11 mg/L
		D-Glucosa	3.15 g/L
		HEPES	3.57 g/L
		Hipoxantina	2.1 mg/L
		Putrescina·2HCl	0.08 mg/L
		Rojo de Fenol·Na	8.63 mg/L
		Timidina	0.37 mg/L

Tras resuspender el sedimento en 10 ml de medio DMEM. La cuantificación del número de células se realizó en una cámara de Neubauer. Para ello se diluyeron 100  $\mu$ l de la suspensión celular (en DMEM) en 1 ml del mismo medio (dilución 1:10). Un alícuota de 100  $\mu$ l de esta dilución se mezcló con el mismo volumen de azul tripán (dilución 1:2), se mezcló bien y se hizo el recuento bajo el microscopio óptico, únicamente se consideraron células viables aquellas capaces de excluir el colorante, contándose por tanto sólo las células no azules.

La conversión del número de células/campo en células/ml se llevó a cabo empleando el siguiente factor, que tiene en cuenta el volumen de la cámara (0.1 mm<sup>3</sup>/cuadro):

$$\text{Células/ml} = \text{Células viables} \times 10^4 \times \text{dilución (x10 x2)}$$

El porcentaje medio de células viables que excluían el colorante azul tripán era superior al 90 %, y el rendimiento celular medio neto era de 12-15 $\cdot$ 10<sup>6</sup> células/cerebelo. La cantidad óptima de células en la siembra, para la proliferación de este tipo celular en las condiciones experimentales elegidas para este trabajo, fue de 500.000 células/ml y 20 ml/botella de 75 cm<sup>2</sup> (10<sup>7</sup> células/botella). El medio de cultivo empleado fue DMEM suplementado con antibióticos, 10 % FCS (suero bovino fetal) y gentamicina 50  $\mu$ g/ml.



**Figura 28. Obtención de astrocitos primarios cerebelosos de rata.**

Adaptación del método descrito por el grupo de G.R. Dutton (Dutton *et al.*, 1981).

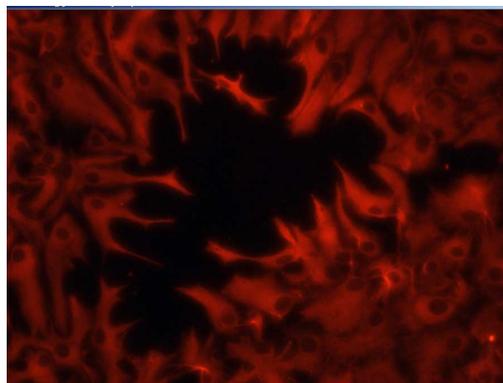
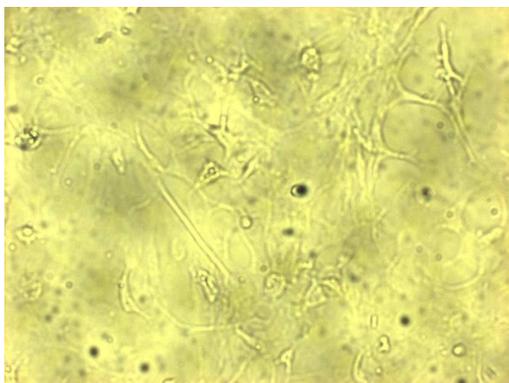
## 2.2. Agitación de las botellas para purificación del cultivo.

Cuando los cultivos primarios de astrocitos cerebelosos están próximos a la confluencia son purificados para seleccionar astrocitos tipo-1 por agitación (McCarthy y de Vellis, 1980), lo que evita la contribución de la microglía, que puede ser muy significativa en términos de actividad NOS, así como de células del linaje O-2A.

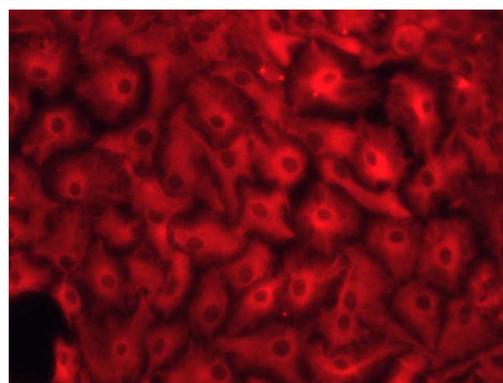
Para la agitación se sustituyó el medio de cultivo por 20 ml/botella de medio de cultivo suplementado con HEPES 20 mM y ajustado a pH 7.3. La agitación tuvo lugar a temperatura ambiente durante 18 horas a 280 rpm en un agitador orbital. Después se retiró el medio, se hizo un lavado con 20 ml de PBS, se añadió medio de cultivo y se dejó incubando otra vez hasta la confluencia.

En la figura 29 se muestran fotografías representativas de microscopía óptica de fluorescencia tras inmunocitoquímica con anticuerpos anti-GFAP, observándose la eficacia de la agitación en la pureza astrogliar del cultivo:

Antes de la agitación



Tras agitación



Fluorescencia (GFAP)

**Figura 29. Fotografías de inmunocitoquímica de fluorescencia en cultivos agitados y no agitados.**

En estas últimas se observan células que no emiten fluorescencia roja correspondiente a la unión del anticuerpo anti-GFAP, demostrando que no son astrocitos. Tras la agitación y vuelta a la confluencia, todo el campo está ocupado por células GFAP<sup>+</sup>.

### 2.3. Pasaje de células subcultivo.

Una vez que las células del cultivo en botella (proliferando en monocapa) han alcanzado la confluencia, se subcultivan por pasaje a otros recipientes.

Tras unos lavados con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  para eliminar todos los restos de FCS del cultivo que pueden inhibir la actividad tripsina y de los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  necesarios para la estabilidad de los anclajes proteicos, se añaden 3 ml/botella de medio de tripsinización (solución de tripsina 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y EDTA 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) y se agita la botella observando el proceso al microscopio óptico durante un tiempo inferior a 1 minuto.

Cuando la mayoría de las células están redondeadas y en suspensión se añaden 3 ml/botella de FCS para detener la tripsinización, a continuación se recoge el medio de la botella y se pasa a un tubo para centrifugarlo a 70 xg durante 15 min.

Finalmente, se resuspende el pellet en 10 ml de DMEM·Ab y se hace un recuento de células viables tal y como se describió anteriormente (ver recuento-siembra en la obtención de astrocitos primarios cerebelosos de rata) y se realiza la siembra en los recipientes estériles apropiados para los distintos tratamientos y estudios, según se describe en la tabla 15.

**Tabla 15. Soportes de cultivo adecuados a cada determinación.**

Determinación	Soporte
Nitritos.	Placas de cultivo tisular de 24 pocillos
Western-Blot.	Placas de Petri para cultivo tisular de 60 mm
Inmunocitoquímica.	Placas de Petri de 35 mm (cubreobjetos de vidrio tratados)
RT-PCR.	Placas de Petri de 100 mm Placas de cultivo tisular de 6 pocillos

## 2.4. Tratamiento de cubreobjetos de vidrio estériles

Es necesaria la optimización del vidrio como sustrato de adhesión y crecimiento celular. Aunque se ha utilizado poli-L-ornitina en algunas ocasiones en este estudio, principalmente se trataron los cubreobjetos de vidrio con FCS o con poli-L-lisina. Se dejaron los cubreobjetos flotando sobre FCS o poli-L-lisina (solución comercial 0.01 %) en una placa de Petri durante, al menos, 1 hora a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos en PBS o en agua destilada estériles y se dejan secar en placas de Petri de 35 mm estériles (3 cubreobjetos/placa) a temperatura ambiente.

## 2.5. Tratamientos.

Los agentes farmacológicos utilizados en este trabajo y sus concentraciones de uso se muestran en cada una de las figuras correspondientes. Cabe mencionar la composición del tratamiento de inducción, *citomix* (IL-1 $\beta$  500°ng/ml + IFN- $\gamma$  50°UI/ml).

### *Protocolos de tratamiento y de recogida de muestras.*

Los agentes farmacológicos se añadieron según el protocolo de tratamiento correspondiente mostrado en las tablas 16 y 17.

Respecto al protocolo de recogida de muestras, tomamos como tiempo cero el momento en el que se añade el tratamiento de inducción de la NOS-2 (*citomix* (IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  o LPS) o el activador permeable de JNK y p38<sup>MAPK</sup>, anisomicina. A partir de este momento, se recogieron el medio de cultivo por aspiración o las muestras celulares por raspado de la monocapa de células (tabla 18).

**Tabla 16. Protocolo de tratamiento: fármacos añadidos 60' antes que *citomix*.**

Purinérgicos	Agonistas de purinérgicos	Moduladores de NOS-2	Análogos del cAMP	Antagonistas de MAPKs	Otros antagonistas
ATP	CPA	L-NAME	Dibutiril-cAMP	SB-203580	MDL-12330A
Adenosina	CGS-21680	L-Sepiapterina	6-fenil-cAMP	SP-600125	FTI-277
$\alpha,\beta$ -metilén-ATP	NECA		8-CPT-2'-O-Me-cAMP	PD-98059	GGTI-286
	IB-MECA				LY-294002
Fármacos de la tabla 17 si no se han añadido purinérgicos					

Tabla 17. Protocolo de tratamiento: fármacos añadidos 90' antes que *citomix*.

Antagonistas de receptores purinérgicos		Otros, relacionados con purinérgicos
ATP	Adenosina	Adenosina-desaminasa (ADA)
PPADS	DPCPX	Apirasa
Azul reactivo 2 (RB-2)	8-CPT	Apirasa inactivada (1 h, 95 °C)
Suramina	ZM-241385	Dipiridamol
	MRS-1754	BAPTA-AM
	PSB-1115	H-89
	MRS-1523	KT-5720

Tabla 18. Protocolo de recogida de muestras.

Medio de cultivo	Muestras celulares			
Tras 24 horas	Tras 10 minutos	Tras 60 minutos	Tras 3 horas	Tras 6 horas
Determinación de nitritos.	Determinación de p38 <sup>MAPK</sup> fosforilada mediante <i>Western-Blot</i> . Determinación de [cAMP] intracelular mediante ELISA.	Determinación de p65 fosforilada mediante <i>Western-Blot</i> . Estudio de localización de p65 y fosfo-p65 mediante inmunocitoquímica. Estudio de degradación de IκB-α mediante <i>Western-Blot</i> .	Determinación de mRNA de NOS-2 mediante RT-PCR.	Estudio de síntesis de NOS-2 mediante <i>Western-Blot</i> .

## 2.6. Determinaciones funcionales.

### *Medición de ATP: Método de luciferina/luciferasa.*

Esta medición se basa en la siguiente reacción, catalizada por la luciferasa:



La luz generada es detectada mediante un luminómetro. Se utiliza el método en su forma cinética en la que la velocidad de la reacción y el ritmo de producción de fotones son constantes. De esta forma la intensidad de la señal luminosa es proporcional a la concentración de ATP de la muestra. La alta sensibilidad de este método permite recoger múltiples muestras de un mismo cultivo. La hidrólisis extracelular de ATP se midió mediante cuantificación del ATP extracelular por luminiscencia con un sistema comercial (ThermoLabsystems) y en un luminómetro modelo 1253 de la casa comercial BioOrbit, utilizando patrones de ATP exógeno (ver protocolo en la tabla 19).

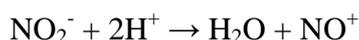
**Tabla 19. Protocolo de determinación de ATP mediante luminometría.**

130 µl buffer		
+ 50 µl muestra/patrón	1° valor (blanco)	
+ 20 µl ATPmr	2° valor (muestra/patrón)	Valor real = 2°-1°

Todos los reactivos se mezclan en una misma cubeta de luminómetro. La concentración de ATP en las muestras se determinó por interpolación de la señal luminosa determinada en la muestra en una curva patrón obtenida al medir estándares de concentración conocida (0.2 – 5 µM) de ATP. La señal de patrones y muestras fué obtenida usando la misma mezcla reactiva.

### ***Determinación de nitritos en el medio extracelular.***

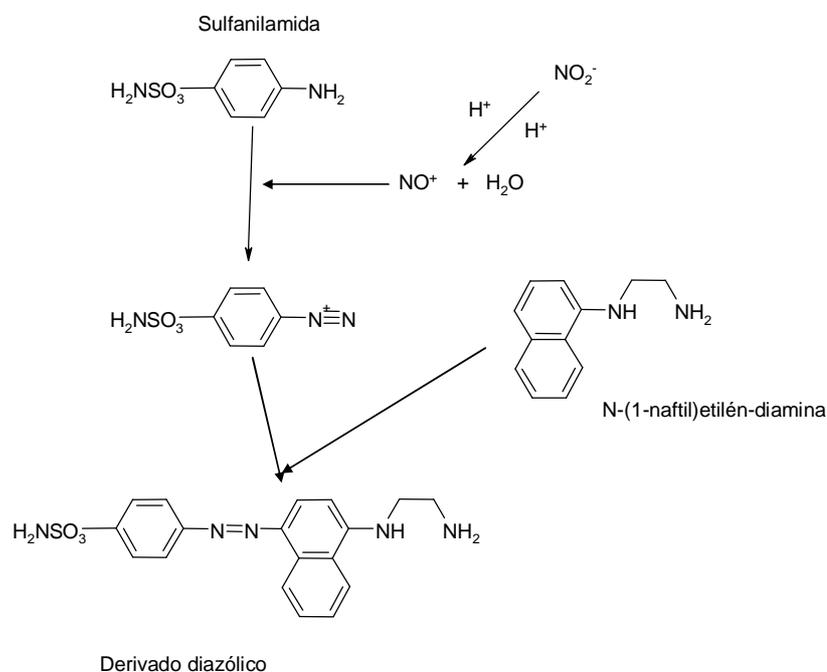
Todos los efectos que, sobre la actividad NOS, tienen estos tratamientos han sido determinados cuantificando los nitritos acumulados en el medio tras 24 horas de incubación con el *citomix* (IL-1β 500°ng/ml + IFN-γ 50°UI/ml). Los soportes de cultivo han sido placas de 24 pocillos conteniendo 1 ml de medio de cultivo, y la lectura colorimétrica de este medio recogido se realizó en placas de 96 pocillos en un lector de placas y su *software* asociado.



Para ello se ha usado fundamentalmente la reacción de Griess (Fig. 30). Alternativamente, la acumulación de nitritos en el medio extracelular puede determinarse fluorimétricamente, mediante la reacción de DAN/NAT. Como muestra la figura 31, los nitritos/NO· pueden reaccionar con el diamino-naftaleno (DAN) para originar un compuesto fluorescente, el nafto-triazol (NAT). Esta reacción presenta mayor sensibilidad que la reacción de Griess. No obstante, dada la elevada producción de NO· en los cultivos utilizados se empleó rutinariamente la determinación por Griess en todo este trabajo.

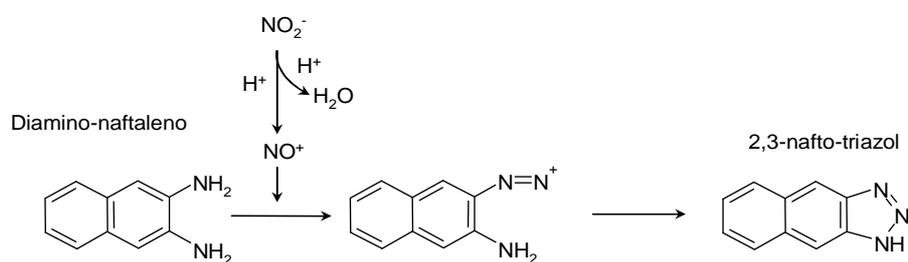
Ambos métodos requieren la preparación de una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito sódico (Fenoglio *et al.*, 1997). Para la

determinación por la reacción de Griess, el rango fue de 0 a 80  $\mu\text{M}$ . La concentración de nitritos de la muestra se obtiene interpolando su correspondiente valor de DO en la gráfica de la curva patrón de  $\text{NaNO}$ .



**Figura 30. Reacción de Griess para cuantificación de nitritos.**

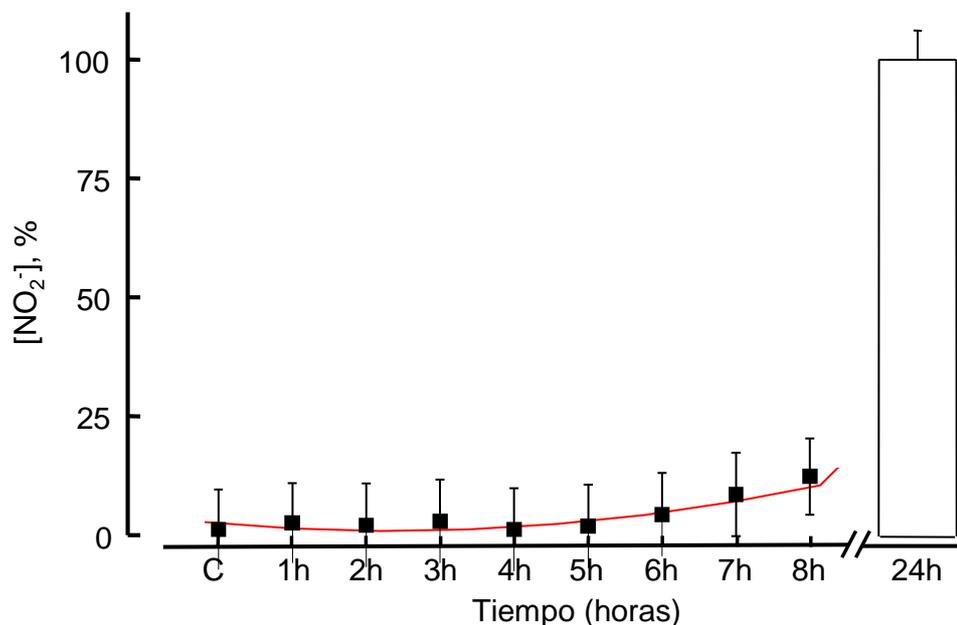
La inducción de NOS-2 se determinó por la acumulación de nitritos durante 24 horas, medidos por la reacción colorimétrica de Griess (Privat *et al.*, 1997). Cada pocillo contenía 100  $\mu\text{l}$  de medio de muestra o patrón y 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess. La lectura se realizó a 562 nm.



**Figura 31. Reacción de DAN/NAT para cuantificación de nitritos.**

La inducción de NOS-2 (en presencia de arginina) se determinó tras 24 horas de tratamiento mediante la cuantificación de NAT, un derivado fluorescente de la N-nitrosilación de DAN (Marzinzig *et al.*, 1997).

Tras la realización de un estudio comparativo de los experimentos (recogiendo y midiendo la cantidad de nitritos tras la adición de citoquinas a distintos tiempos) obtuvimos la curva de la cinética de acumulación de nitritos mostrada en la Fig. 32.



**Figura 32. Cinética de producción de nitritos inducida por citoquinas proinflamatorias.**

El tratamiento de inducción fue un *citomix* por una mezcla de IFN- $\gamma$  (50UI/ml) e IL-1 $\beta$  (500ng/ml). Los resultados mostrados corresponden a la determinación mediante la reacción de Griess de los nitritos acumulados en el medio de cultivo tras la inducción con *citomix*. El resultado de la reacción se cuantificó por colorimetría con un lector de placas a 562nm.

Se observa en la figura 32 el comienzo de la acumulación de nitritos en torno a las 4 ó 5 horas tras la estimulación con *citomix*, por lo que la producción de NO $\cdot$  por la NOS-2 debe comenzar en torno a las cuatro horas tras la inducción. La gran acumulación de nitritos tras 24 horas de tratamiento con *citomix* permitió marcar las directrices experimentales que se seguirían en el resto del trabajo: tratamiento durante 24 horas sin suero bovino fetal (FCS 10%).

***Determinación semicuantitativa de la expresión de NOS-2 (RT-PCR).*****Aislamiento de RNA total.**

El RNA total se extrajo a partir de placas de Petri de 100 mm de diámetro ( $1.67 \cdot 10^6$  células/placa) usando 1 ml de TRI<sup>®</sup> REAGENT y siguiendo las instrucciones del fabricante (SIGMA). Después se suplementaron los extractos con cloroformo (200 µl), se agitaron vigorosamente (15 seg) y centrifugaron en frío (12000 xg, 20 min, 4 °C) para separar las fases (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se añadió a la fase acuosa un volumen igual de isopropanol (2-propanol), y después de 24 horas en reposo (-20 °C), el precipitado de RNA se aisló mediante centrifugación (12000 xg, 20 min, 4 °C), se lavó con etanol al 75 % a -20 °C para eliminar todo el isopropanol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta eliminar todo el etanol, posteriormente se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC.

La absorbancia se determinó en alícuotas (5 µl) de cada muestra, obteniéndose de forma consistente una relación  $A_{260}/A_{280}$  siempre igual o superior a 1.8 y un rendimiento de  $40 \pm 10$  µg RNA total por tratamiento y placa.

**Síntesis de cDNA.**

La síntesis de cDNA a partir de 1 µg de RNA total (75 min a 42 °C) se realizó en un volumen final de 20 µl de tampón de PCR suplementado con 500 ng de poli-dT 12-18, 1 mM dNTPs, 5 UI de AMV-RT y 20 UI de RNasin, ambas obtenidas de Promega (Madison, WI, USA). Las muestras se procesaron de acuerdo al protocolo T<sup>o</sup>-T<sup>a</sup> mostrado en la tabla 22, después del cual, se guardaron (-20 °C) hasta su posterior utilización.

**Tabla 20. Protocolo de transcripción inversa y composición del tampón de PCR.****Transcripción inversa (síntesis de cDNA).**

Temperatura	Tiempo
70 °C	15 min.
4 °C	10 min.
48 °C	60 min.
75 °C	5 min.
4 °C	∞

**Composición del tampón de PCR.**

Reactivo	Concentración
KCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM
Tritón X-100	0.1 %
pH 9.0	

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se incubaron 10 µl del producto de síntesis de cDNA (equivalentes a 125 ng de RNA) resuspendidos en tampón de PCR (volumen final de 25 µl) suplementado con 15 pmol (~ 125 ng) de cada cebador, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.625 UI de DNA polimerasa *Taq* (Pharmacia, Barcelona, España).

La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Con los perfiles térmicos y número de ciclos que se describen en la tabla 21. Como control interno de amplificación se usó la proteína ribosomal L-19 (de expresión constitutiva) y una pareja de oligonucleótidos específicos comerciales (ClonTech, PA, USA).

En estos experimentos usamos oligonucleótidos complementarios de las secuencias conocidas de NOS-2 de ratón, que generan fragmentos de amplificación de tamaño característico ya descrito y que reconocen secuencias del gen de NOS-2 de rata (Santana *et al.*, 1996; Tabraue *et al.*, 1997). Los cebadores y fragmentos esperados se indican en la tabla 21.

El procedimiento comenzó con una fase común de desnaturalización (3 min, 94 °C), seguido de una fase de hibridación (90 seg., 59 °C) y una de elongación (90 seg., 72 °C). Posteriormente se realizaron 25 ciclos de desnaturalización (1 min, 94 °C), hibridación (90 seg., 59 °C) y elongación (90 seg., 72 °C), finalmente se llevó a cabo una última fase de elongación de 7 min a 72 °C.

**Tabla 21. Protocolo de PCR.**

Genes	Secuencia de bases de la pareja de cebadores	Fragmento amplificado	T <sup>a</sup> hibridación	Nº ciclos
NOS-2	S 5'-CTGCAGGTCTTTGACGCTCGG-3' A 5'-GTGGAACACAGGGGTGATGCT-3'	807 pb	58 °C	25
L-19	S 5'-TGAAGGTCGGTCTGAACGGATTTGGC-3' A 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	197 pb	58 °C	25

Las condiciones de amplificación en todos los casos se basaron en estudios previos que demuestran la linealidad de la señal respecto al número de ciclos.

Separación y detección de los productos amplificados.

Los productos de amplificación se suplementaron con 5  $\mu$ l de tampón de electroforesis, se extrajeron con cloroformo y almacenaron en frío (-20 °C) hasta su posterior análisis. Alícuotas (5-10  $\mu$ l) de las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (1.8 %), conteniendo bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml) en tampón TAE. Las bandas se visualizaron con luz ultravioleta.

**Tabla 22. Composición de los tampones.**

**De carga (en tampón TAE)**

Reactivo	Concentración
Glicerol	50 %
Azul de bromofenol	0.1 %

**TAE**

Reactivo	Concentración
Tris-acético	40 mM
EDTA	1 mM
pH 8.0	

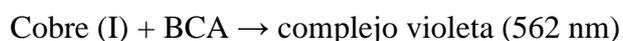
**2.7. Técnicas inmunológicas.*****Western-Blot***Procesado de muestras.

El tratamiento se realizó en placas de Petri de 60 mm con células confluentes. Tras el tiempo de estimulación con los tratamientos se añadió tampón de carga (LB) (para la determinación de cinéticas de fosforilación) a la placa y se despegaron las células utilizando un rascador estéril, se pasó a un tubo Eppendorf y se calentó el tubo Eppendorf (bien cerrado) en el baño a 100 °C durante más de 20 min. Este proceso fue realizado con una sola placa al mismo tiempo, garantizando la realización del proceso lo más rápidamente posible. Para determinaciones que precisaran de una determinación de proteínas se añadió tampón de lisis, PBS-TDS, y se procedió al contaje de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico.

***Método del ácido bicinonínico (BCA).***

Se basa en la propiedad de las proteínas de reducir el cobre II a cobre I, y en la reacción cromogénica altamente específica del cobre I con el ácido bicinonínico, gracias a la que se forma un complejo violeta (con un máximo de absorción a 562 nm).

De esta forma, al añadir a la muestra sulfato de cobre II y ácido bicinconínico ambos en exceso, la DO resultante es directamente proporcional a la concentración de proteínas.



Éste metodo requiere la preparación de una curva patrón con concentraciones conocidas de una proteína estándar, habitualmente albúmina de suero bovino (BSA). La concentración de proteínas de la muestra se obtiene interpolando los valores de sus respectivos valores de DO en la gráfica de la curva patrón de BSA.

**Tabla 23. Composición del tampón de carga (LB).**

Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
Tris	6.2 mM	$\beta$ -mercapto-etanol	5 mM
SDS	2 %	Azul de bromofenol	1 %
Glicerol	20 %	pH 6.8	

#### Separación de proteínas mediante electroforesis.

Para la separación se utilizaron cubetas de electroforesis vertical modelo SE 600 Series de Hoefer Scientific Instruments conectadas a una fuente de alimentación modelo EPS 600 de Pharmacia Biotech. Se utilizaron geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) con un porcentaje de reticulación adecuado al tamaño de la proteína de estudio (Maizel *et al.*, 1970), y se incluyeron patrones de proteínas de pesos moleculares preteñidos (BIO-RAD, Madrid, España) como referencia.

Las muestras de los distintos tratamientos se distribuyeron en los pocillos, poniendo la misma cantidad de proteínas (100  $\mu$ g) o un volumen en relación 2:3 de proteína total : proteína fosforilada.

Posteriormente se sometieron las proteínas a separación electroforética con el amperaje constante y el voltaje suficiente para permitir tal amperaje, a 4 °C y durante el tiempo necesario para cada proteína, variando entre 1 y 3 horas.

#### Transferencia e Inmunodetección.

Tras transferir las proteínas del gel a membranas de transferencia modelo Immobilon-P (Millipore) mediante un sistema de transferencia en húmedo (modelo Mini PROTEAN® de BIO-RAD) conectado a la fuente de alimentación con un amperaje de 150 mA, un voltaje de 20 V, y una potencia de 1 W, a 4 °C durante 18 – 24 horas. Tras la transferencia se incubaron las membranas en solución de bloqueo (TBS-T) durante, al menos, una hora a temperatura ambiente. Y, posteriormente, se incubaron con el primer anticuerpo a la dilución final recomendada por el fabricante, en TBS-T. Posteriormente se lavan las membranas exhaustivamente (5 lavados durante 10 minutos) con tampón TBS-T y se incuban durante 1 h en una dilución 1:2500 de anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a la proteína HRP (peroxidasa de rábano) (Amersham Biosciences, Madrid, España) en una misma solución y se visualizaron las proteínas usando reactivos de quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate) y siguiendo las instrucciones del fabricante . Estas membranas se analizaron mediante una cámara de sistema Polaroid de Amersham Life Science y una máquina de revelado CURIX 60 de AGFA.

**Tabla 24. Composición de TBS-T**

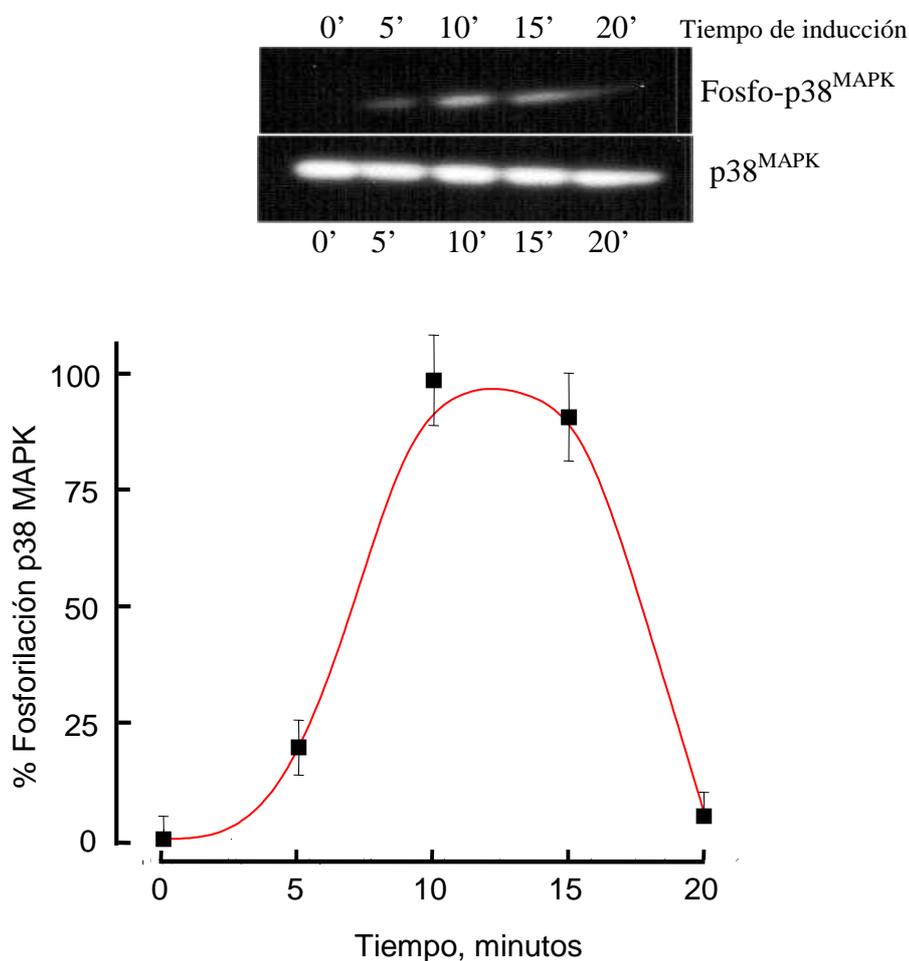
Reactivo	Concentración
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0.05 %

Reactivo	Concentración
Leche desnatada en polvo (bloqueo)	5 %
Leche desnatada en polvo (incubación)	3 %

#### Cinéticas de fosforilación: p38<sup>MAPK</sup> y p65.

Tras comprobar que los astrocitos primarios tipo I expresan p38<sup>MAPK</sup>, se realizaron diferentes experimentos de inducción de astrocitos primarios con *citomix* (IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$ ) y posterior análisis mediante *Western Blot* para estudiar la cinética de

fosforilación de  $p38^{\text{MAPK}}$  tras esta inducción. Para ello se utilizaron anticuerpos específicos de  $p38^{\text{MAPK}}$  y de  $p38^{\text{MAPK}}$  fosforilada en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (lugar de activación de esta quinasa por citoquinas pro-inflamatorias (Raingeaud *et al.*, 1995; Palsson *et al.*, 2000)) (Fig. 33).

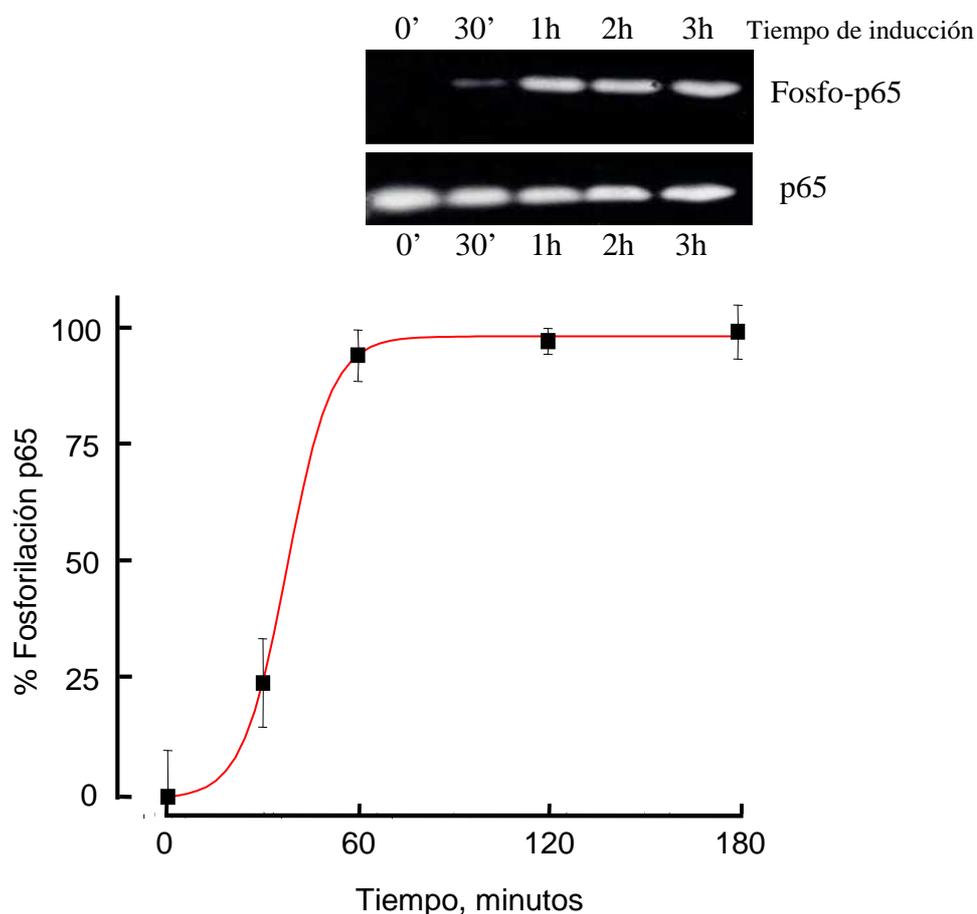


**Figura 33. Cinética de fosforilación de  $p38^{\text{MAPK}}$ .**

El tiempo 0' representa el momento de adición del *citomix*. Las fotografías de la parte superior de la figura corresponden a un resultado significativo de análisis de las muestras mediante *Western Blot*, para el que se utilizaron anticuerpos específicos de p38 (control) y de p38 fosforilado en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>. La gráfica ha sido obtenida mediante densitometría de, al menos, tres experimentos en los que se estudió la cinética de fosforilación de p38 en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>.

La figura 33 muestra la fosforilación de  $p38^{\text{MAPK}}$  a partir de los cinco minutos (de estimulación con *citomix*), con un máximo a los 10 minutos, a partir del cual comienza a descender la cantidad de proteína fosforilada. Así pues, en todos los experimentos posteriores se midió la fosforilación de  $p38^{\text{MAPK}}$  10 minutos tras la inducción.

Para determinar la cinética de fosforilación de la serina 536 de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B realizamos diferentes experimentos induciendo astrocitos primarios con *citomix* y deteniendo el proceso a distintos tiempos, los resultados de este estudio se muestran en la figura 34.



**Figura 34. Cinética de fosforilación de p65.**

El tiempo 0' representa el momento de adición del *citomix*. Las fotografías de la parte superior de la figura corresponden a un experimento significativo de análisis de las muestras mediante *Western Blot*, para el que se utilizaron anticuerpos específicos de p65 (control) y de p65 fosforilado en la serina 536. La gráfica de la parte inferior ha sido obtenida mediante densitometría de, al menos, tres experimentos revelados en los que se estudió la cinética de fosforilación de p65 en la serina 536.

Se observa en la figura 34 un aumento de p65 fosforilada a partir de los 30 minutos, con un máximo a los 60 minutos que se mantendrá a partir de este tiempo. Así pues, en todos los experimentos posteriores se midió la fosforilación de p65 en la serina 536 tras una hora de inducción.

### ***Inmunocitoquímica – microscopía de fluorescencia.***

Los ensayos inmunocitoquímicos se realizaron sobre cubreobjetos redondos estériles de 10 mm de diámetro (ver “Tratamiento de cubreobjetos de vidrio estériles”).

#### Procesado de muestras (Fijación).

Los tratamientos se añadieron al medio de las placas de Petri de 35 mm que contenían los cubreobjetos tratados sobre los que crecían las células a tratar. Este método ofrece la posibilidad de realizar estudios por triplicado (3 cubreobjetos:placa).

Tras el tiempo adecuado a cada tratamiento se fijan las células sumergiendo los cubreobjetos, bien en acetona:metanol en relación 1:1 a-20 °C durante 10-20 min (proteínas no solubles y de gran estabilidad tales como la proteína GFAP del citoesqueleto de astrocitos), bien en paraformaldehído al 4 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad (proteínas solubles o compartimentalizadas tales como p38<sup>MAPK</sup> o p65).

Aunque, una vez que las células de los cubreobjetos están fijadas pueden conservarse a-20 °C hasta el momento de uso, siempre se continuó la inmunocitoquímica inmediatamente después de la fijación.

#### Técnica.

Todos los pasos sucesivos se realizaron a temperatura ambiente. La preparación se rehidrató en PBS/BSA (3 %) y bloqueó con BSA (3 %)/Tritón X-100 (0.1 %) en PBS durante 1-2 h.

Tras dos lavados con PBS, los cubreobjetos fueron incubados durante 18-24 horas a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes según la tabla 25.

**Tabla 25. Dilución de los anticuerpos primarios utilizados.**

Anticuerpo (animal productor)	Dilución	Anticuerpo (animal productor)	Dilución
Anti-GFAP (conejo)	1:400	Anti-p65 (ratón)	1:200
Anti-vimentina (ratón)	1:100	Anti-fosfo-p65 (conejo)	1:600
Anti-p65 (conejo)	1:200	Anti-p50 (ratón)	1:200

El medio de dilución de los anticuerpos fue PBS suplementado con BSA (3%) y NGS (2%).

A continuación los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos primarios y se mantuvieron en solución de bloqueo durante un periodo de 10 min, tras el que se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron durante, al menos, una hora a 37 °C con anticuerpos secundarios producidos en cabra, anti-IgG de ratón conjugados con FITC (para revelar vimentina) o con Cy2™ 1:40 (para revelar p65 o p50), anti-IgG de conejo conjugados con TRITC (para revelar GFAP) o con Cy3™ 1:20 (para revelar p65y fosfo-p65).

El exceso de anticuerpos secundarios se eliminó de los cubreobjetos mediante varios lavados durante una hora con PBS estéril a temperatura ambiente.

Para el montaje de las preparaciones se utilizó indistintamente medio de montaje formado por SlowFade® *Light Antifade Kit* (Molecular Probes) suplementado con bisbenzimidida 1 µg/ml, o bien el medio ya preparado con DAPI, Vectashield® (Vector Laboratories, Inc.). Finalmente, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos y se sellaron con esmalte de uñas para retrasar la desecación de las muestras.

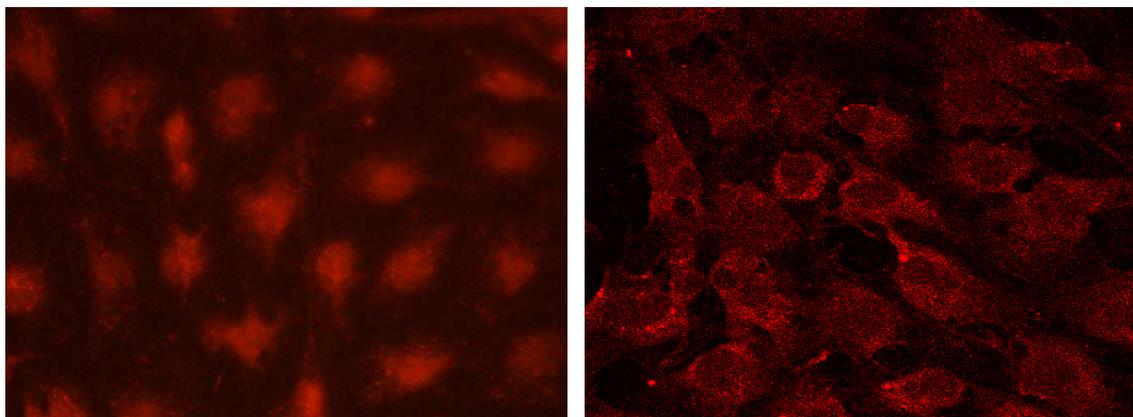
#### Microscopía confocal.

Las muestras procesadas por inmunocitoquímica se estudiaron con un microscopio específico Axiovert 1M-200 de dos láseres (Helio/Neón y Argón) con un módulo de microscopía confocal LSM-510 “Pascal”, ambos de ZEISS, y su *software* asociado. Todos estos aparatos y sistemas informáticos se encuentran instalados en el Área de Bioquímica y Biología Molecular del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, del Edificio de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Para el estudio de la localización de NF-κB en las células, recurrimos a la microscopía confocal porque el NF-κB inactivo se encuentra en el citoplasma pero preferentemente dispuesto en la zona perinuclear en astrocitos (Akama *et al.*, 1998; Krushel *et al.*, 1999), esto hace que la microscopía óptica no pueda proporcionar su localización exacta debido al espesor de las células en la región perinuclear.

La microscopía confocal permite obviar el problema de la luz procedente de las regiones superiores e inferiores, es decir, del espesor de la célula. Realizamos capturas de imágenes de una zona focal con un espesor estándar de una micra centrado en la zona

media de la región nuclear de la célula. En estas condiciones es posible distinguir claramente núcleo y citoplasma (ver Fig. 35).



**Figura 35. Ejemplo de la utilidad y necesidad de la microscopía confocal.**

Ambas fotografías corresponden al mismo cultivo y se observa como en la fotografía digital parece localizarse p65 principalmente en el núcleo, aunque la microscopía confocal confirma que realmente se encuentra en el citoplasma. En ambos casos, la proteína p65 esta marcada con un anticuerpo ligado al flurocromo Cy3.

### ***Ensayos de producción de cAMP.***

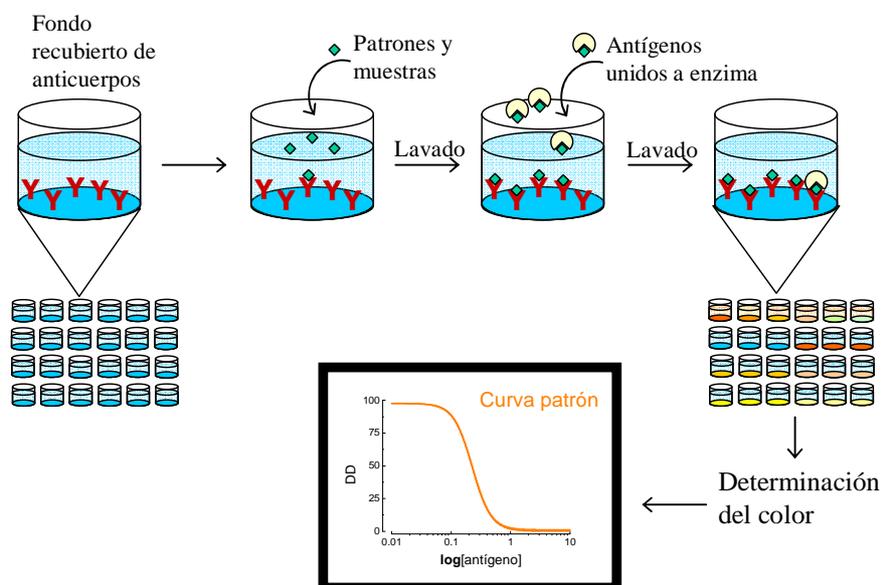
#### Procesado de muestras.

Las placas multipocillo (24 pocillos) se dispusieron con su base sumergida en un baño termostático de agua a 37 °C. El medio de cultivo tamponado con CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue retirado y se adicionó medio tamponado con HEPES. De esta forma se garantiza la máxima funcionalidad fisiológica de las células y se facilita la adición y retirada de agentes al medio de cultivo.

Los cultivos se estimularon durante 10 min. con distintos agentes farmacológicos (véase más adelante). Después de retirar el medio se detuvieron los procesos celulares con 200 µl/pocillo de HCl 0.1 M, y se homogenizó la muestra por pipeteo repetido. Finalmente, se centrifugaron los extractos celulares a 13000 xg durante 10 min. y a 4 °C para eliminar los restos celulares particulados que quedan en el precipitado. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de uso.

Cuantificación del cAMP por ELISA.

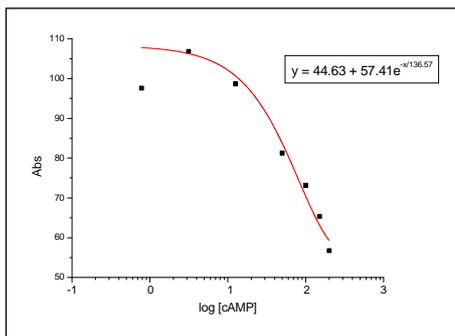
Para este estudio se ha utilizado un kit comercial (SIGMA), el cual es un inmunoensayo competitivo para la determinación de cAMP en muestras biológicas. La figura 36 describe gráficamente la técnica.



**Figura 36. Técnica de ELISA competitivo.**

El kit utiliza un anticuerpo policlonal anti-cAMP que se une de forma competitiva al cAMP de la muestra o al cAMP proporcionado por el kit y que tiene una molécula de fosfatasa alcalina (AP) unida covalentemente. Tras esta reacción tendremos los anticuerpos anti-cAMP unidos a cAMP de la muestra y a cAMP-enzima del kit, entonces se incuban las muestras en una placa de 96 pocillos cubiertos con anticuerpo secundario. Tras un lavado, se añade el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenil-fosfato) y se deja incubar, generando un color amarillo que es leído posteriormente a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro lector de placas. La  $A_{405}$  medida resulta así menor cuanto mayor sea la [cAMP] de la muestra, al desplazar al cAMP-unido a AP. Para la cuantificación se emplea una curva patrón construida a partir de estándares de cAMP de concentración conocida (suministrado con el kit) en escala logarítmica frente al porcentaje de unión obtenido.

Para el estudio de la [cAMP] se utilizaron valores cuyos  $\log[\text{cAMP}]$  se situaban sólo en la parte lineal de la curva (entre los valores 1 y 2.1), en la que el valor de  $A_{405}$  era inversamente proporcional al logaritmo decimal de la [cAMP]. Se obtuvo una curva patrón similar a la mostrada en la figura 38 entre los valores de [cAMP] 10 y 125 nM.



**Figura 37. Valores de [cAMP] utilizados en el estudio.**

Se observa la linealidad de la curva entre los valores de log[cAMP] 1 y 2.1, equivalentes a 10 y 125 nM respectivamente.

## **RESULTADOS.**



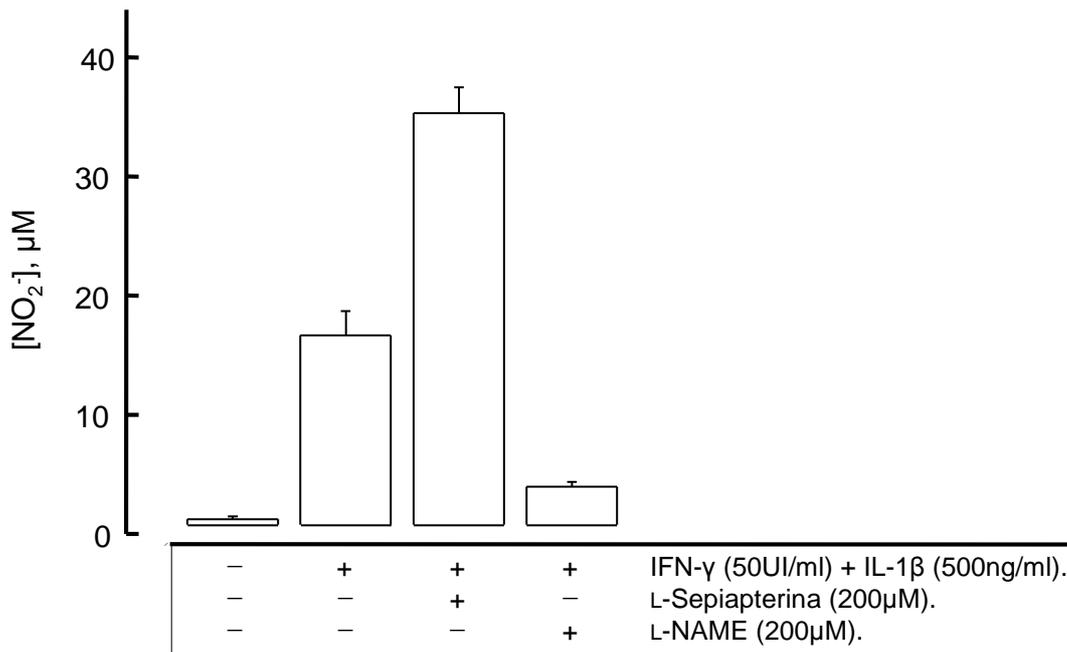
## 1. INDUCCIÓN DE NOS-2 Y SU SUPRESIÓN POR ATP.

Con la intención de comprobar que en las condiciones experimentales bajo las que se desarrollaba este trabajo tienen lugar las premisas descritas en la bibliografía y sobre las que se basa este proyecto de investigación “Modulación por ATP y derivados purinérgicos de mecanismos pro-inflamatorios (NOS-2) en el sistema nervioso central”, se realizaron previamente los experimentos siguientes:

### 1.1. La inducción de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias.

Una primera premisa para nuestro estudio es que la NOS-2 es inducida en astrocitos por citoquinas pro-inflamatorias (Aktan, 2004). Como se ha descrito antes, el  $\text{NO}\cdot$  se convierte en  $\text{NO}_2^-$ , cuya acumulación en el medio es una medida de la actividad de NOS-2. Para determinar la actividad inducción de NOS-2, determinamos la acumulación de nitritos a distintos tiempos, nitritos correspondientes a la producción de  $\text{NO}\cdot$  por la enzima NOS-2 tras la inducción de la expresión del gen por un tratamiento con citoquinas.

El tratamiento estándar de inducción consistió en una mezcla de  $\text{IFN-}\gamma$  (50 UI/ml) e  $\text{IL-1}\beta$  (500 ng/ml) (*citomix*) presentado durante diferentes tiempos hasta 24 horas (ver “Protocolo de tratamiento” en “Material y Métodos”). Para confirmar que los nitritos acumulados en el medio de cultivo provienen del  $\text{NO}\cdot$  generado por la actividad de NOS y no por otros mecanismos, se utilizaron dos agentes farmacológicos permeables, la L-sepiapterina, precursor de la  $\text{BH}_4$ , cofactor de la NOS y el L-NAME, un análogo de la L-arginina que actúa como inhibidor específico de NOS (Abu-Soud *et al.*, 1994; Korth *et al.*, 1994; Tabraue *et al.*, 1997)



**Figura 38. Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$  sobre la actividad de NOS-2.**

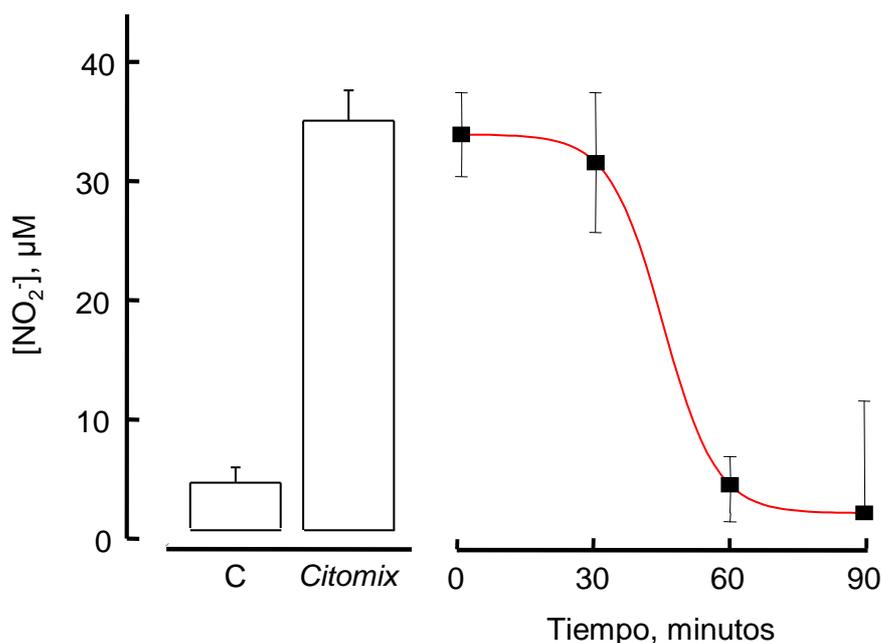
Los astrocitos en cultivo fueron tratados con la combinación IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) + IL-1 $\beta$  (500 ng/ml) (*citomix*) durante 24 horas, de forma aislada y en combinación con L-sepiapterina (200  $\mu$ M) o con L-NAME (200  $\mu$ M). Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La gráfica de la figura 38 muestra claramente una respuesta celular a la inducción con el *citomix* que supone un aumento de aproximadamente  $35 \pm 1$  veces la producción basal de nitritos. Esta inducción es revertida por acción del L-NAME y potenciada por la L-sepiapterina. Estos datos confirman que los aumentos de nitritos por acción del *citomix* se deben al aumento en la actividad de NOS.

La acumulación de nitritos por acción del *citomix* es muy superior a lo que cabría esperar en el caso de tratarse de una de las isoformas constitutivas de NOS, lo que nos lleva a concluir que la responsable del aumento en la concentración de nitritos en cultivos de astrocitos primarios por acción del *citomix* es la isoforma NOS-2 o iNOS, la única isoforma capaz de producir suficiente NO $\cdot$  para dar cuenta de tal [NO $_2^-$ ]. Además sólo ella responde a la inducción por citoquinas pro-inflamatorias.

## 1.2. El ATP inhibe la inducción de NOS-2 por acción de las citoquinas.

Una segunda premisa para este estudio consiste en que el ATP suprime la inducción del gen de NOS-2 producida por las citoquinas pro-inflamatorias (Murphy *et al.*, 1995; Lin y Murphy, 1997). Para confirmar este hecho, se coadministraron *citomix* y ATP al mismo tiempo y se trató con *citomix* a células preincubadas durante una hora con ATP.



**Figura 39. El pretratamiento con ATP inhibe la inducción de NOS-2 por el citomix.**

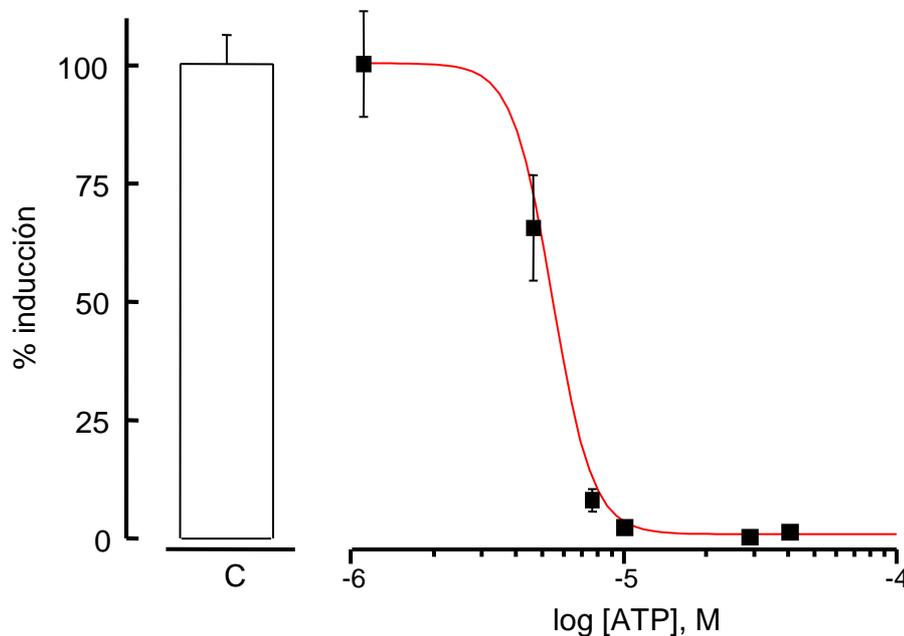
Astroцитos en cultivo fueron pretratados con ATP (10 μM) durante distintos tiempos (0 – 90 minutos). Tras este tiempo, las células fueron tratadas con *citomix* (IFN-γ (50 UI/ml) + IL-1β (500 ng/ml)) durante 24 horas. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media ± SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Se observa en la figura 39 una clara supresión de la inducción de NOS-2 por las citoquinas cuando las células fueron preincubadas con ATP durante una hora previa a la inducción. Por el contrario, el ATP añadido al mismo tiempo que el *citomix* y la preincubación durante 30 minutos no ejercieron ningún efecto significativo, indicando que el agente purinérgico precisa de un tiempo previo a la inducción para suprimir ésta.

### 1.3. Estudio dosis-respuesta a ATP.

Para completar el estudio de los efectos del nucleótido de adenina sobre la inducción de la expresión de NOS-2 se realizaron varios experimentos dosis-respuesta cuyos resultados se muestran en las figuras siguientes.

En primer lugar, se determinó la concentración mínima de ATP capaz de producir una supresión completa de la inducción de NOS-2 por las citoquinas pro-inflamatorias, de los resultados obtenidos se muestra la gráfica siguiente, en la que se observa que en las condiciones experimentales de este trabajo, esta concentración mínima capaz prevenir totalmente la acumulación de nitritos ronda 8  $\mu$ M.



**Figura 40. Efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la acumulación de nitritos inducida por citoquinas pro-inflamatorias.**

Astrocitos en cultivo fueron pretratados durante una hora con distintas concentraciones de ATP. Tras este tiempo, las células fueron tratadas con *citomix* (IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) + IL-1 $\beta$  (500 ng/ml)) durante 24 horas. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La figura 40 muestra una curva concentración-respuesta representativa de los correspondientes experimentos sobre la supresión por ATP de la inducción de NOS-2 por el *citomix*. Tras el análisis estadístico de los datos mediante el programa Microcal

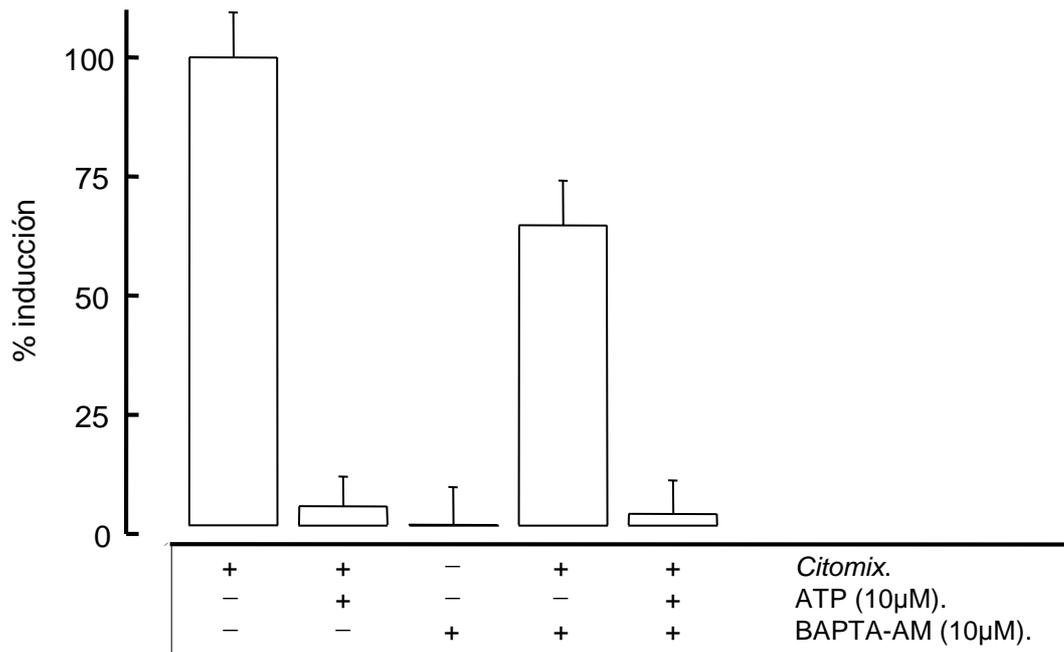
Origin Graph se obtuvo una  $IC_{50} = 6.36 \pm 0.03 \mu M$ . Se observó que basta una concentración de ATP de 8-10  $\mu M$  para obtener una supresión completa de la acumulación de nitritos. Por lo tanto, se utilizó una concentración 10  $\mu M$  como tratamiento supresor estándar.

#### **1.4. Mecanismo de acción del ATP. Sistema de segundo mensajero asociado al ATP.**

Los receptores de ATP en astrocitos pueden estar acoplados a varias cascadas de segundos mensajeros, pudiendo estar relacionados con la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  *via* PLC-IP<sub>3</sub> (Neary *et al.*, 1988; Pearce *et al.*, 1989; Kirischuk *et al.*, 1995; Guthrie *et al.*, 1999; Wang Z. *et al.*, 2000) o acoplado a una proteína G<sub>s</sub> que estimula a la AC, aumentando los niveles intracelulares de cAMP (Neary, 1996; Neary *et al.*, 1996; Jimenez *et al.*, 1999; Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Neary *et al.*, 2003). Por ello determinamos si el pretratamiento con ATP resulta en algún cambio en estos segundos mensajeros.

##### ***Las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ .***

Se realizaron experimentos para determinar si las variaciones de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular participan en la supresión por ATP de la inducción de NOS-2 por las citoquinas. Para ello bloqueamos las posibles señales de  $[Ca^{2+}]_i$  durante una hora con 10  $\mu M$  de BAPTA-AM, la forma permeable del quelante de  $Ca^{2+}$ . Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 41. En otros estudios, este tratamiento ha mostrado una anulación de las señales de  $Ca^{2+}$  inducidas por ATP en astrocitos de rata (Dieter *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1995; Urbano y Buno, 1998; Garcia-Lecea *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004; Mongin y Kimelberg, 2005).



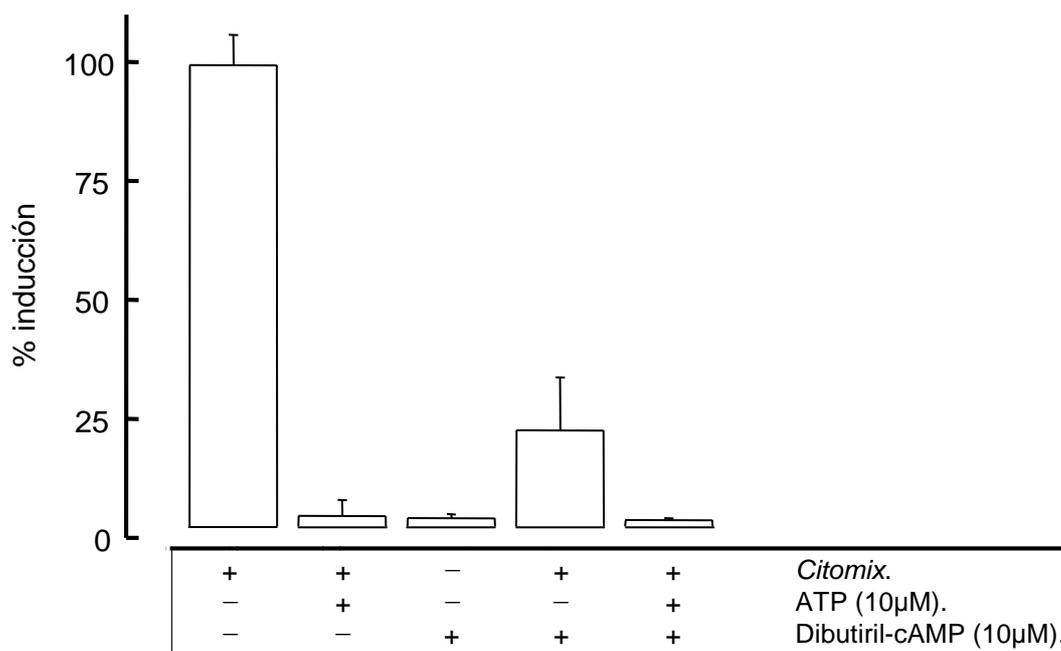
**Figura 41. Participación de las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  (BAPTA-AM).**

*Citomix* estándar. ATP y BAPTA-AM fueron añadidos una hora y dos horas antes de la inducción, respectivamente. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

En la figura 41 se observa claramente como el pretratamiento con el quelante de  $Ca^{2+}$ , BAPTA-AM, no muestra un efecto significativo sobre la ruta inductora ya que no previene la inducción de NOS-2 por el *citomix*, ni tampoco interfiere en la supresión por ATP, que continúa siendo prácticamente total. Estos resultados permiten concluir que, bajo nuestras condiciones experimentales, la modificación de las señales de  $[Ca^{2+}]_i$  no participa en la ruta de inducción de NOS-2 por citoquinas ni en la ruta supresora desencadenada por el ATP exógeno.

***Las variaciones en la  $[cAMP]_i$ .***

Tras haber descartado la participación de las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular en la supresión por ATP, nos propusimos realizar un estudio sobre los efectos de la elevación de la  $[cAMP]_i$  intracelular con el fin de comprobar si esta vía de señalización está implicada en el mecanismo supresor del agente purinérgico.



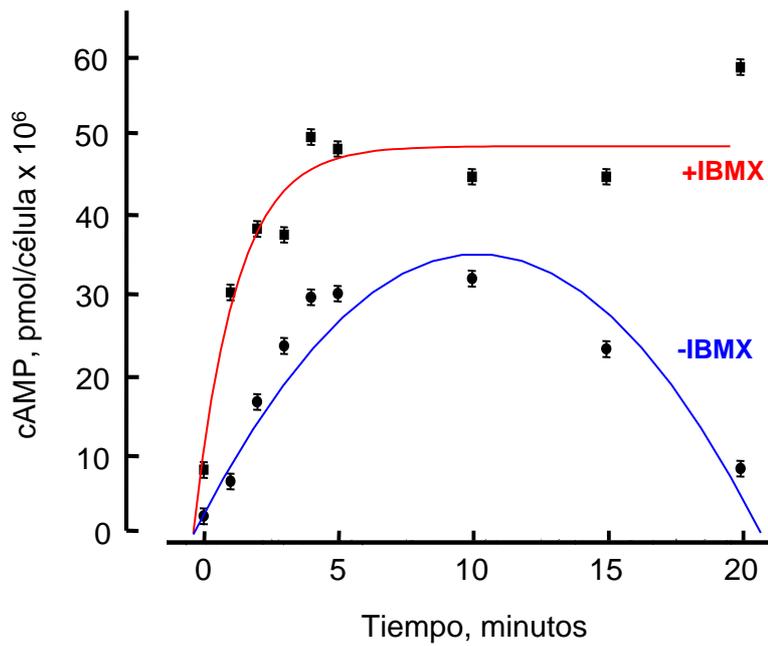
**Figura 42. El dibutiril-cAMP reproduce los efectos de ATP.**

ATP y dibutiril-cAMP fueron añadidos una hora antes de la inducción con *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Con este objeto empleamos el dibutiril-cAMP, un análogo permeable del cAMP no hidrolizable por las fosfodiesterasas intracelulares. En la figura 42 se observa que este análogo reproduce por sí mismo el efecto supresor del tratamiento con ATP, lo que sugiere una implicación de la elevación de los niveles intracelulares de cAMP en la supresión por ATP de la inducción de NOS-2 por el *citomix*. Esto nos llevó a diseñar varios experimentos para conocer la variación de la [cAMP] intracelular y su posible participación en la supresión por el agente purinérgico.

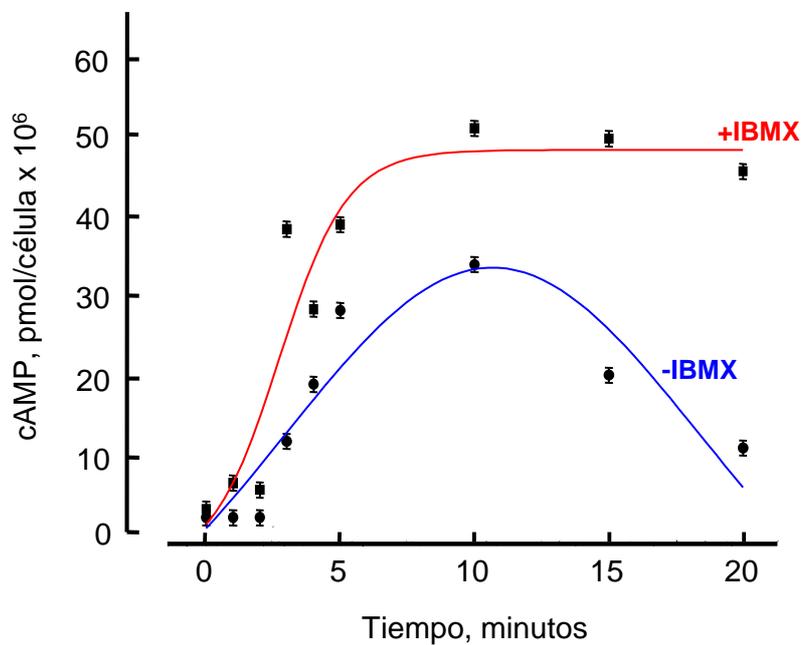
#### ***Estudio de la variación de [cAMP]<sub>i</sub> por ATP.***

Para confirmar que los efectos supresores del ATP están mediados por el aumento en la [cAMP]<sub>i</sub>, se determinó la cinética de producción de cAMP tras el tratamiento con forskolina (activador permeable de la AC) o con ATP, ambos en presencia y en ausencia de IBMX (inhibidor permeable de la PDE, la enzima que degrada el cAMP). Tras el tiempo indicado en las figuras 43 y 44, la adenilil-ciclase fue inactivada, las células lisadas y el contenido celular recogido para la determinación de cAMP como se describe en "Material y Métodos".



**Figura 43. Producción de cAMP por estimulación de AC por forskolina.**

El tiempo 0 corresponde a la adición de forskolina (10  $\mu$ M). El IBMX (50  $\mu$ M) se añadió 30 minutos antes que la forskolina. La cantidad de cAMP corresponde a un pocillo con aprox. 225000 células. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en, al menos, tres experimentos diferentes.



**Figura 44. Producción de cAMP por estimulación de AC por ATP.**

El tiempo 0 corresponde a la adición de ATP (10  $\mu$ M). El IBMX (50  $\mu$ M) se añadió 30 minutos antes de la estimulación con ATP. La cantidad de cAMP corresponde a un pocillo con aprox. 225000 células. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en, al menos, tres experimentos diferentes.

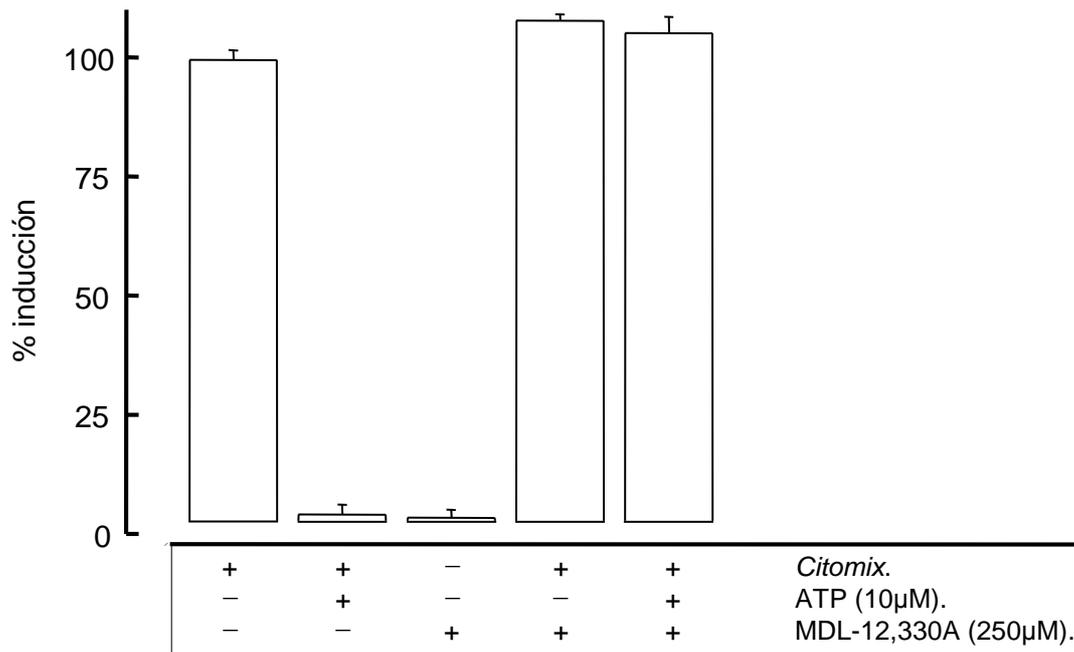
Cuando comparamos las figuras 43 y 44 se aprecia una clara similitud en el perfil de acumulaciones de cAMP en respuesta a ATP y a forskolina, tanto en presencia como en ausencia de IBMX. El ATP, por lo tanto, estimula la AC en los astrocitos en la misma medida que la forskolina. Ello indica que no existen subpoblaciones o compartimentos subcelulares de AC no sensibles al ATP extracelular, lo que parece apoyar la idea de que el efecto supresor del purinérgico está mediado por la activación de AC.

También en ambas figuras se observa el efecto de la PDE de cAMP. En presencia de IBMX, con la PDE bloqueada, el cAMP generado por la estimulación de la AC se acumula en el medio, describiendo una curva de  $[cAMP]_i$  creciente hasta aproximadamente 10 minutos de tratamiento, a partir de la cual se mantiene estable. Por el contrario, en ausencia del mismo, la actividad de la PDE degradando cAMP se manifiesta en el carácter transitorio de la elevación del cAMP, que cae a niveles basales tras un máximo en torno a los 10 minutos de tratamiento. Este pico máximo es un 30-40% menor que el máximo valor alcanzado con los mismos tratamientos en presencia del inhibidor de la PDE de cAMP.

A la luz de la cinética descrita en las figuras 43 y 44, en posteriores experimentos se utilizó un tiempo de 10 minutos de incubación para la recogida de muestra para la determinación de la  $[cAMP]$  en otros tratamientos.

#### ***Estudio de la participación de la AC (Adenilil Ciclasa).***

Para confirmar la hipótesis de que la participación de AC en la supresión por ATP de la inducción de NOS-2 por las citoquinas pro-inflamatorias llevamos a cabo un estudio de determinación de la producción de nitritos tras distintos estímulos en presencia de un inhibidor de la adenilil ciclasa (MDL-12330A).



**Figura 45. Participación de la Adenilil Ciclasa.**

El ATP fue añadido una hora antes de la inducción con *citomix*. El MDL-12330A fue añadido dos horas antes de la inducción. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Los resultados mostrados en la figura 45 indican que la inhibición de la AC no altera los niveles basales de producción de  $\text{NO}_2^-$  ni la inducción de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias, que permanece intacta. Sin embargo, la preincubación con MDL-12330A bloqueó completamente la capacidad del ATP de suprimir la inducción, lo que muestra claramente que la activación de la AC es esencial para el efecto supresor del ATP sobre la inducción de NOS-2.

## 2. NATURALEZA DEL AGENTE PURINÉRGICO.

La elevación de la concentración intracelular de cAMP se correlaciona con la adición de ATP y con el efecto supresor de este sobre la inducción de NOS-2 por citoquinas, sin embargo, se ha descrito una rápida degradación extracelular del ATP, por ello diseñamos experimentos para determinar la permanencia del purinérgico en el medio extracelular.

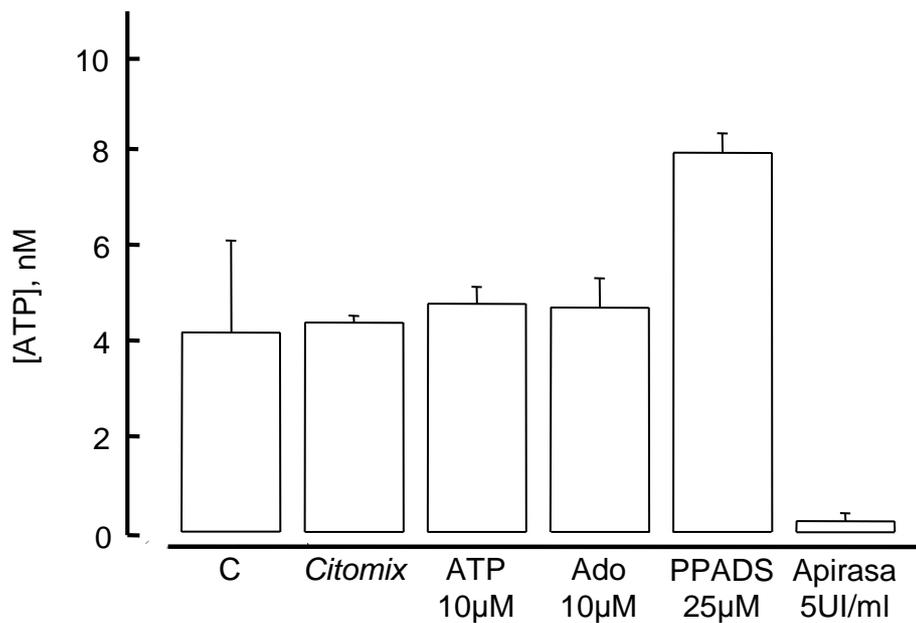
### 2.1. ATP o adenosina.

Por otro lado, otros agentes pueden aumentar la elevación de la concentración de cAMP intracelular. Entre estos agentes se encuentra la adenosina, generada por la degradación extracelular del ATP descrita en la bibliografía. Por esta razón, decidimos estudiar la posible participación de la adenosina como agente supresor de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.

#### *El ATP extracelular es rápidamente degradado.*

Otro aspecto descrito en la bibliografía es la rápida degradación del ATP en el medio extracelular, especialmente en el tejido neural, donde se han descrito tiempos de vida media inferiores a un segundo (Dunwiddie *et al.*, 1997). En estudios *in vitro*, el ATP puede ser degradado por las ecto-nucleotidasas celulares que se encuentran ancladas a la membrana celular, y por las esterasas del suero, hasta adenosina, de forma muy eficiente.

Este es un aspecto importante, puesto que el ATP añadido en el mismo momento de la inducción no ejerce el efecto supresor observado previamente, lo que podría sugerir la conversión del nucleótido en otro compuesto que fuera el agonista real. Por lo tanto, resulta interesante determinar el tiempo de supervivencia del ATP como tal en el medio extracelular. Para ello se cuantificó la concentración de ATP extracelular tras haber tratado las células con diferentes agentes farmacológicos como el antagonista de los receptores de ATP, PPADS, y la apirasa, una enzima que degrada el ATP directamente hasta AMP (Ver “Medición de ATP: Método de luciferina/luciferasa” en “Material y Métodos”). Los resultados de este estudio se muestran en la figura 46.



**Figura 46. El ATP exógeno está completamente degradado tras 24h en el medio.**

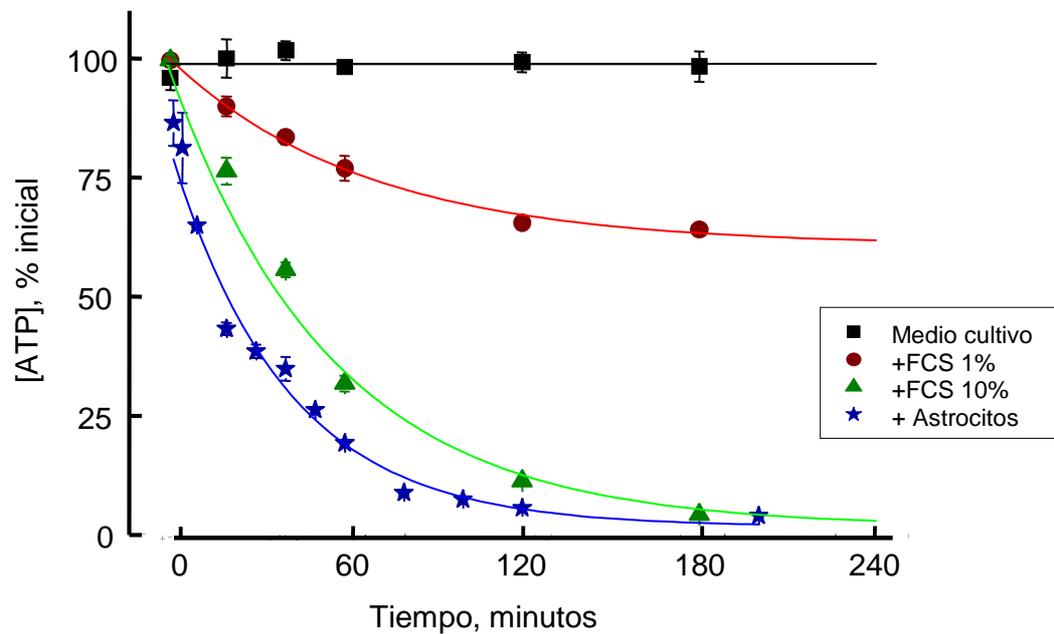
Las barras corresponden a la cuantificación luminométrica de ATP en el medio de cultivo tras 24 horas de tratamiento. C: Cultivo control sin tratar. *Citomix*: IFN- $\gamma$  (50 UI/ml) + IL-1 $\beta$  (500 ng/ml). Ado: adenosina.

Tomamos el periodo de 24 horas porque es el tiempo mínimo para la determinación de nitritos (ver figura 32 en “Material y Métodos”), periodo durante el cual estaban en contacto el ATP extracelular y las células. Tras 24 horas de incubación en las condiciones del cultivo (presencia de un 10 % de suero fetal bovino (FCS)), la [ATP] es de 4-10 nM, concentración incapaz de activar a los receptores P2, los cuales reconocen concentraciones mínimas de 100-500 nM (Fields y Burnstock, 2006).

Destacan en la figura 46 las concentraciones de ATP en los casos del tratamiento con apirasa, que degrada el ATP hasta AMP, y con PPADS, que puede actuar como inhibidor de las ecto-nucleotidasas celulares y, por tanto, impedir la degradación del ATP (Hoffmann *et al.*, 2000).

Tras haber observado que la concentración de ATP después de 24 horas en las condiciones de cultivo es insuficiente para activar efectivamente sus receptores celulares, es necesario determinar la velocidad de degradación del ATP exógeno adicionado para estimar la supervivencia del nucleótido durante el tiempo de

preincubación anterior a la adición de citoquinas en el protocolo de inducción de NOS-2.



**Figura 47. Cinética de degradación extracelular del ATP exógeno.**

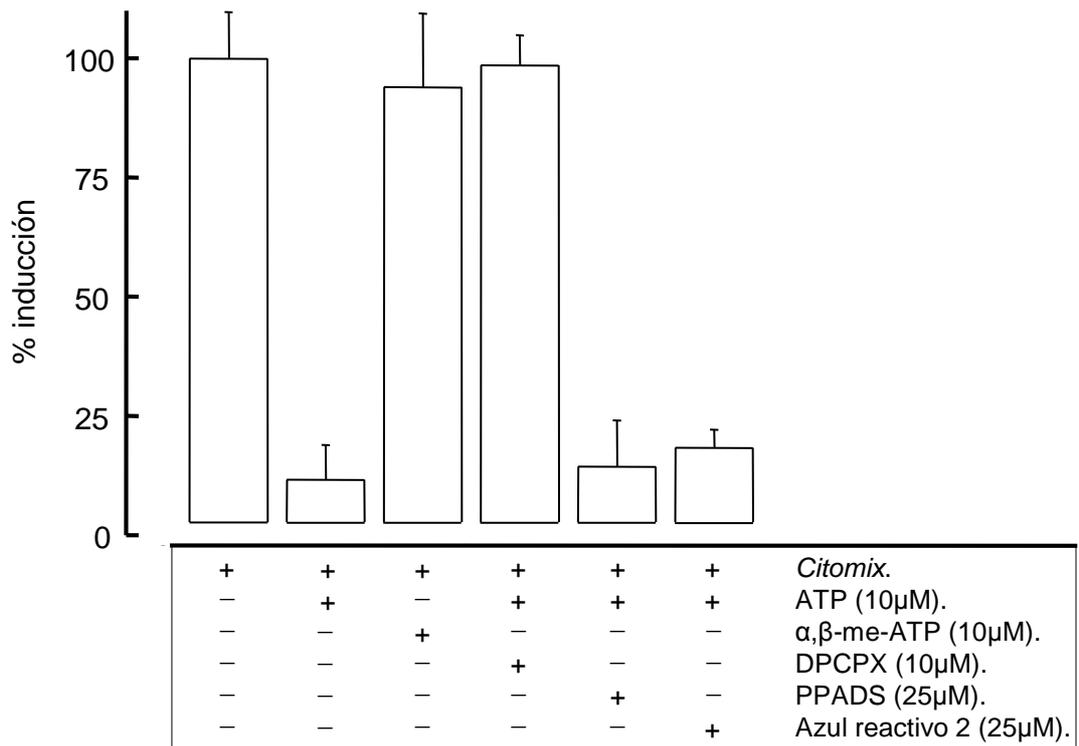
En las tres primeras condiciones se analizó la supervivencia del ATP en medio de cultivo en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de suero pero en ausencia de células. En la última condición (+Astrocitos) se midió la concentración de ATP en el medio de pocillos de cultivo de astrocitos en ausencia de suero añadido. El medio de cultivo fue DMEM suplementado con antibióticos, 37 °C).

La figura 47 muestra la rápida degradación del ATP extracelular por las enzimas del suero (FCS) del medio de cultivo y por las ecto-nucleotidasas celulares. La alta velocidad de degradación hace que la persistencia del ATP en el medio sea fugaz, por lo que este resulta incapaz, dada su baja concentración, de modular la inducción a largo plazo de NOS-2 por citoquinas, proceso que requiere varias horas. Incluso en medio sin suero, el ATP es degradado completamente en menos de 2 horas. La degradación de ATP genera adenosina, otro posible efector de la supresión observada tras la adición de ATP al medio.

**Los receptores P2 de ATP y A de adenosina.**

Con el propósito de investigar la hipótesis de la conversión del ATP exógeno en adenosina, siendo entonces la adenosina la responsable de la acción supresora, estudiamos el efecto de un análogo no hidrolizable del ATP, así como de varios antagonistas P2 (receptores de ATP) y P1 (receptores de adenosina).

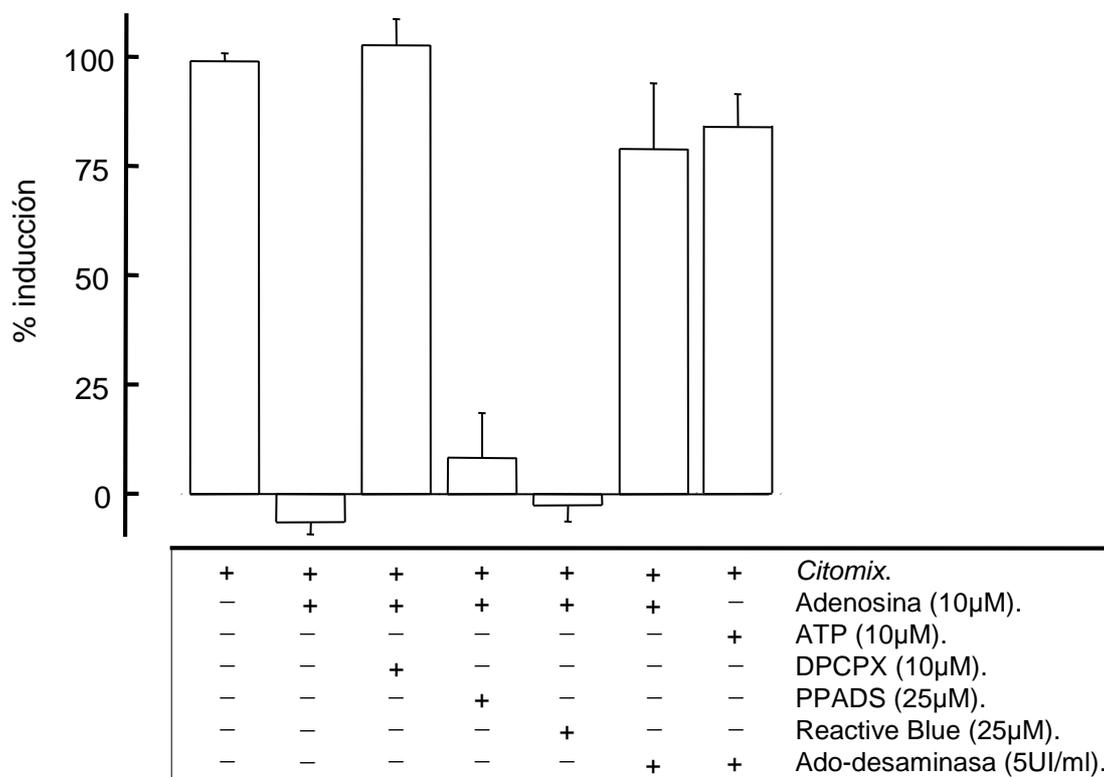
La figura 48 muestra el efecto de dichos agentes sobre la supresión de la inducción ejercida por ATP. El análogo no hidrolizable  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP ( $\alpha,\beta$ -me-ATP), que no puede ser convertido en adenosina, no muestra efecto supresor alguno. Al mismo tiempo, los antagonistas P2 PPADS y azul reactivo no bloquearon el efecto supresor del ATP exógeno. Por el contrario el antagonista de adenosina DPCPX si anuló por completo el efecto supresor. Ello sugiere que la supresión está mediada por receptores de adenosina y no por receptores P2 de nucleótidos.



**Figura 48. Participación de los receptores P2 en la acción supresora del ATP.**

Las barras corresponden a la acumulación de nitritos durante 24 horas tras la inducción con el *citomix*. ATP y  $\alpha,\beta$ -me-ATP fueron añadidos una hora antes de la inducción. DPCPX, PPADS y Azul Reactivo 2 se añadieron 30 minutos antes que el ATP. Al final de los experimentos (tras 24 h) se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Solo DPCPX reduce el efecto supresor del ATP mientras que PPADS y RB2 no hacen, por lo que se diseñó un estudio para analizar el efecto de la adenosina exógena por sí misma y en presencia de los antagonistas P2 PPADS y azul reactivo 2, así como del antagonista selectivo de los receptores de adenosina DPCPX. De forma adicional, se estudiaron los efectos de la coadministración de adenosina-desaminasa junto a ATP y a adenosina, esta enzima degrada la adenosina hasta inosina, un subproducto inactivo sobre los receptores de adenosina. estos fármacos junto a la adenosina, los resultados de este estudio se muestran en la figura 49.

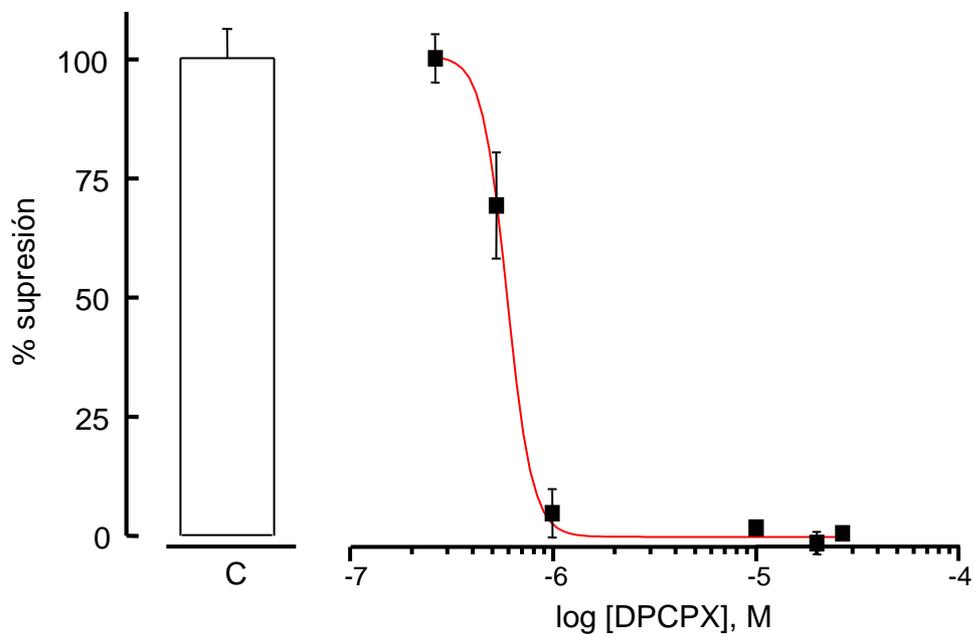


**Figura 49. Estudio de la participación de los receptores de adenosina en la acción supresora de adenosina.**

Las barras corresponden a la acumulación de nitritos 24 horas tras la inducción con el *citomix*. Adenosina y ATP se añadieron una hora antes de la inducción. DPCPX, PPADS, azul reactivo 2 y ADA (adenosina-desaminasa) se añadieron 30 minutos antes que la adenosina. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La figura 49 indica que, efectivamente, la adenosina puede, por sí misma, realizar la misma acción supresora que el ATP. De hecho, la ausencia de supresión en

presencia de adenosina-desaminasa, tanto cuando se usa ATP como cuando se usa adenosina como agonista indica que el agente real que provoca la supresión es el nucleósido. Ambas figuras 48 y 49 demuestran que los receptores P2 de ATP no están implicados en el proceso de supresión puesto que los antagonistas de estos receptores, PPADS y azul reactivo 2, son inactivos. Por otro lado, la supresión inducida tanto por ATP como por adenosina es inhibida completamente por DPCPX. La supresión inducida por ATP es bloqueada de forma concentración-dependiente por DPCPX (como se muestra en la figura 50), cuya  $IC_{50}$  es menor de  $1 \mu M$ , lo que corresponde al bloqueo de receptores de adenosina. Todo ello indica que los efectos supresores observados con ATP y adenosina están mediados, en ambos casos, a través de receptores de adenosina.



**Figura 50. Estudio dosis-respuesta a DPCPX.**

El ATP ( $10 \mu M$ ) se añadió una hora antes de la inducción con el *citomix* y el DPCPX 30 minutos antes que el ATP. La muestra control (C) constituye el 100% de supresión de la inducción e incluye *citomix* + ATP.  $IC_{50} = 0.57 \mu M$ . Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Obtenidos estos resultados cabe preguntarse si el ATP exógeno pudiera actuar uniéndose a receptores de adenosina. Sin embargo, el hecho de que el análogo no hidrolizable  $\alpha, \beta$ -me-ATP, que no puede ser convertido en adenosina, no muestre efecto

supresor alguno indica que la hidrólisis y transformación en adenosina es un paso previo y obligatorio para la acción supresora del ATP.

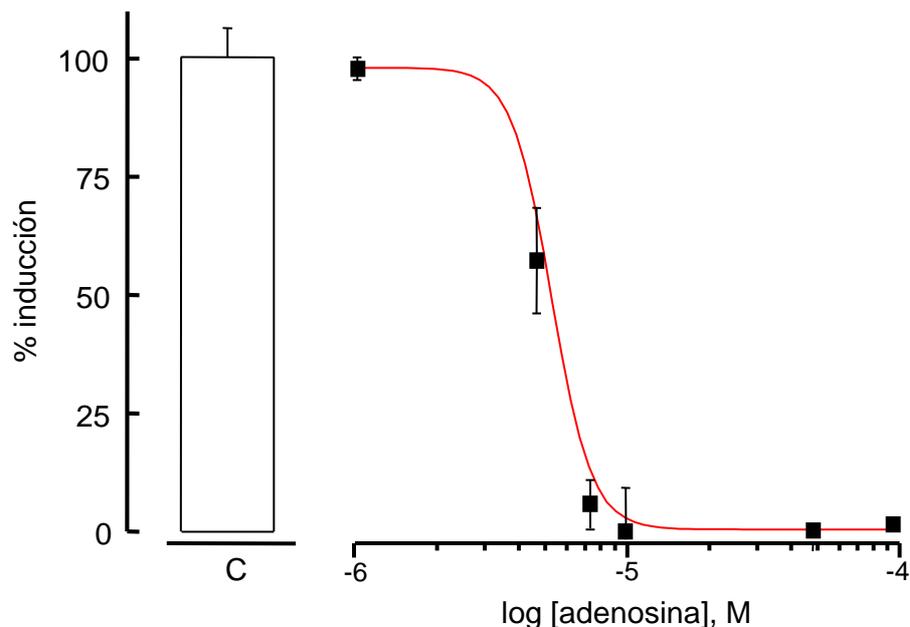
Considerando estas últimas ideas podemos afirmar que la adenosina generada tras la degradación extracelular del ATP es la señal fisiológica que, actuando a través de receptores de adenosina, modula la expresión de NOS-2, reduciendo su inducción por citoquinas pro-inflamatorias. Por lo que decidimos determinar el subtipo de receptor de adenosina implicado en el efecto supresor de esta.

### 3. RECEPTORES DE ADENOSINA.

Tras demostrar que el efecto supresor del ATP sobre la inducción de NOS-2 es debido a la acción de la adenosina, generada por la degradación del ATP, sobre los receptores de adenosina resulta relevante caracterizar cuál o cuales de los cuatro subtipos de estos receptores media el efecto supresor.

#### 3.1. Estudio dosis-respuesta a adenosina.

Primeramente realizamos una curva concentración-respuesta para adenosina a fin de comparar su potencia agonista con la observada con el ATP, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 51.



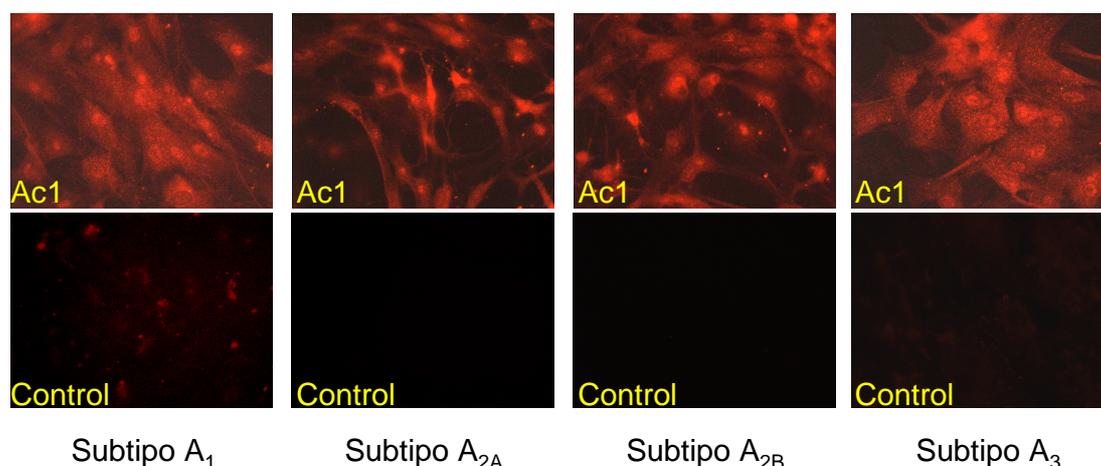
**Figura 51. Estudio dosis-respuesta a adenosina.**

La adenosina se añadió una hora antes de la inducción con *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La curva dosis-respuesta mostrada en la figura 51 muestra una potencia supresora muy similar a la observada para ATP (ver figura 40). Basta una concentración de adenosina de 8-10  $\mu$ M para observar una supresión completa de la producción de

nitritos (inducción de la expresión de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias). La  $IC_{50}$  observada para adenosina ( $IC_{50} = 6.64 \pm 0.81 \mu M$ ) es virtualmente idéntica a la obtenida para ATP (Fig. 40), como cabría esperar si el agonista real es el mismo en ambos casos.

Para determinar cuales de los cuatro subtipos de receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) expresan los astrocitos se realizaron análisis de microscopía de fluorescencia a muestras de cultivos de astrocitos primarios marcados mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para cada uno de los cuatro subtipos distintos de receptores de adenosina.



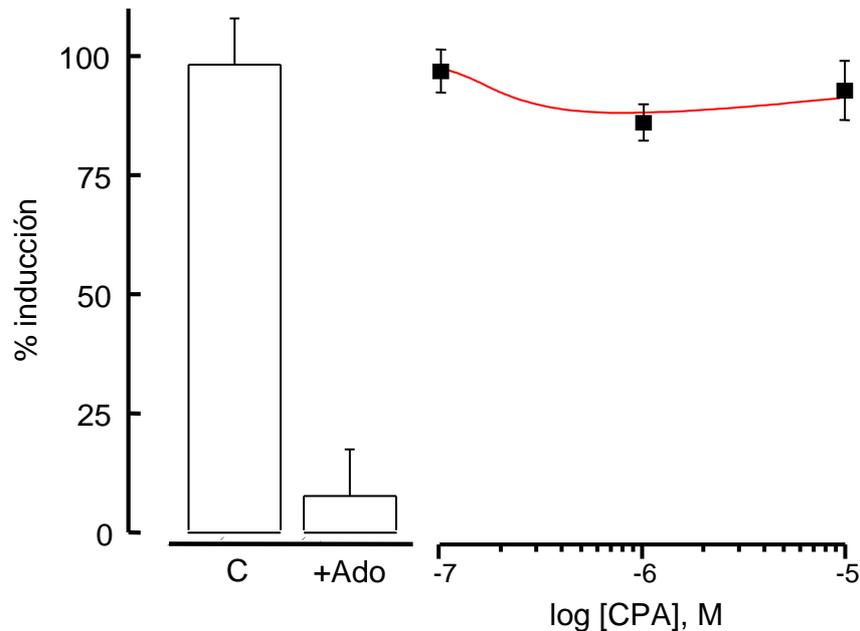
**Figura 52. Los astrocitos expresan los cuatro subtipos de receptores de adenosina.**

Ac1: Anticuerpo primario específico para cada uno de los cuatro subtipos distintos de receptores de adenosina. En la figura se muestran imágenes obtenidas tras el procesamiento de las muestras mediante inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta. Cada una de las fotografías de la fila superior de la figura corresponde a un cultivo incubado con un anticuerpo primario específico mientras que las imágenes de la fila inferior de la figura (controles) corresponden a un cultivo no incubado con anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos primarios fueron policlonales proporcionados por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (ver tabla 9). Todas las muestras fueron incubadas con anticuerpos secundarios específicos. Los resultados mostrados corresponden a campos representativos de cada cultivo.

Como puede observarse en la figura 52, los astrocitos primarios de cerebelo de rata en cultivo expresan todos los subtipos de receptores de adenosina. Por esto, tratamos las células con distintos agonistas y antagonistas farmacológicos específicos de cada uno de los diferentes subtipos de receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ), con el fin de caracterizar de manera precisa el subtipo de receptor que media la supresión de la inducción de NOS-2.

### 3.2. Estudio de la participación del subtipo A<sub>1</sub> de receptor de adenosina.

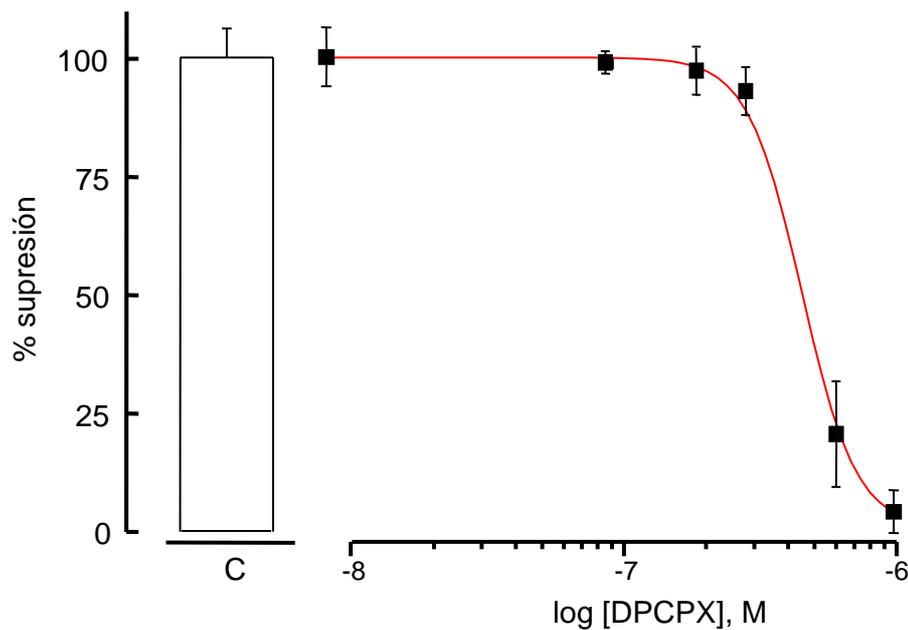
Para este estudio empleamos CPA (agonista específico del subtipo A<sub>1</sub>) y DPCPX (antagonista selectivo del subtipo A<sub>1</sub>).



**Figura 53. Efecto del agonista CPA (A<sub>1</sub>) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante 24 horas tras la adición del *citomix*, cuyo tratamiento corresponde a la barra control (C). Ado: adenosina 10 $\mu$ M. Adenosina y CPA fueron añadidos una hora antes de la inducción con *citomix*. Todos los tratamientos incluyen *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

En la figura 53 puede observarse cómo el tratamiento con CPA, incluso a altas concentraciones (10 $\mu$ M), no reproduce el efecto observado con la adenosina, demostrando que el subtipo A<sub>1</sub> no está implicado en la supresión por adenosina de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.



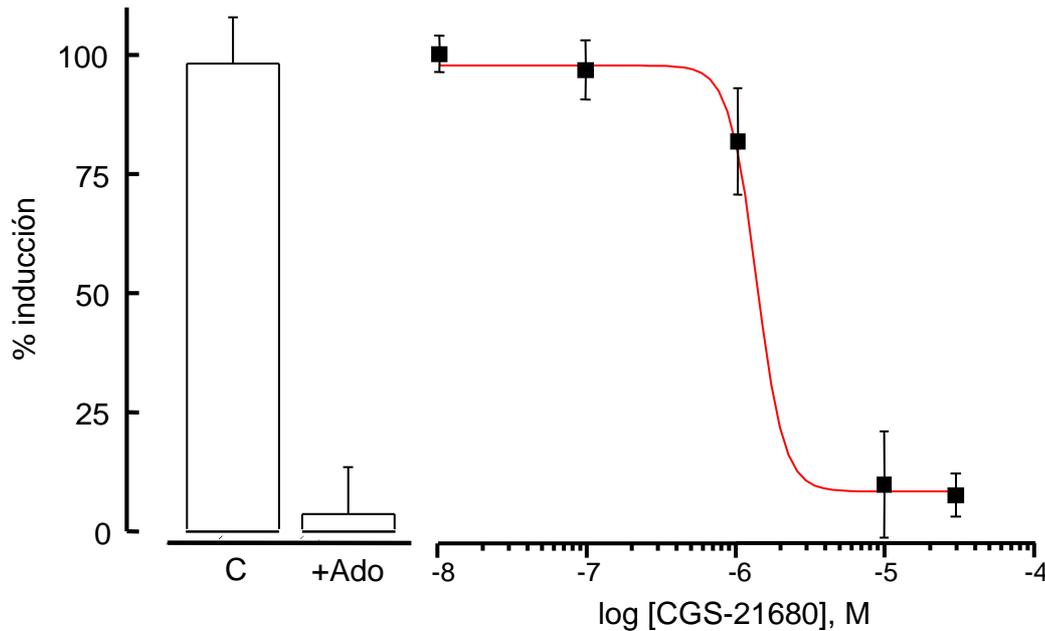
**Figura 54. Efecto del antagonista DPCPX ( $A_1$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante las 24 horas siguientes a la adición del *citomix*. Todos los tratamientos mostrados incluyeron *citomix* y adenosina  $10\mu\text{M}$  adicionada una hora antes de la inducción, la concentración de nitritos correspondiente a este tratamiento es la barra control (C). El DPCPX fue añadido 30 minutos antes que la adenosina. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La figura 54 muestra los resultados tras tratar las células con citoquinas pro-inflamatorias y diferentes concentraciones de DPCPX. La  $IC_{50}$  calculada para DPCPX es del orden de  $500\text{ nM}$  ( $IC_{50} = 0.49 \pm 0.12\ \mu\text{M}$ ). DPCPX es un antagonista selectivo de los receptores  $A_1$  a concentraciones inferiores a  $100\text{ nM}$ , a concentraciones mayores, como aquí, DPCPX puede actuar también sobre otros receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 2001). Por lo tanto este resultado corrobora la conclusión anterior de que los receptores  $A_1$  no participan en el efecto supresor de la adenosina puesto que DPCPX a concentraciones inferiores a  $100\text{ nM}$  no impide la supresión inicial de la inducción de NOS-2.

### 3.3. Estudio de la participación del subtipo A<sub>2A</sub> de receptor de adenosina.

En este caso hemos utilizado los agentes farmacológicos CGS-21680 (agonista específico del subtipo A<sub>2A</sub>) y ZM-241385 (antagonista selectivo del subtipo A<sub>2A</sub>), obteniendo los resultados que se muestran en la figura 55.

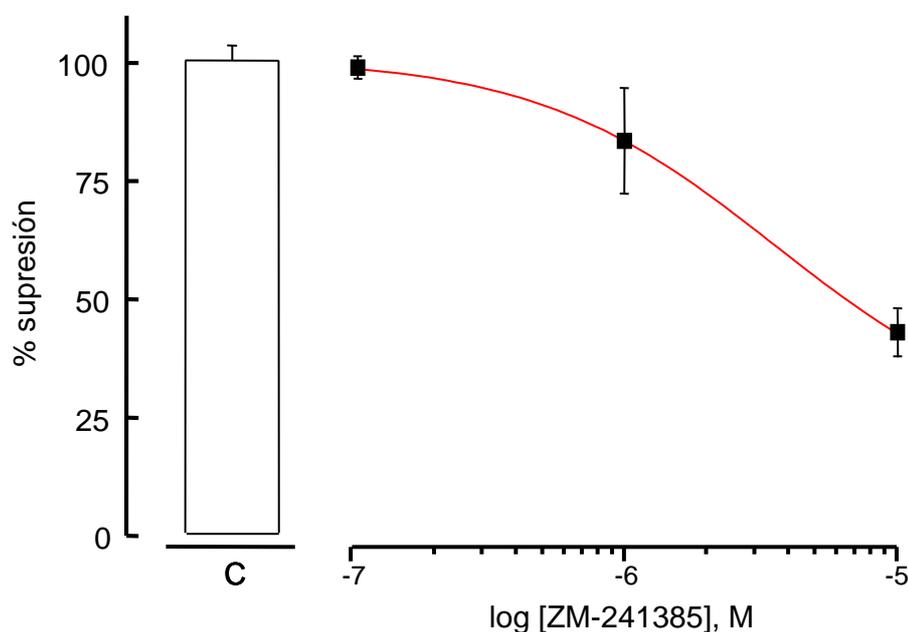


**Figura 55. Efecto del agonista CGS-21680 (A<sub>2A</sub>) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante 24 horas tras la adición del *citomix*, cuyo tratamiento corresponde a la barra control (C). Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. Ado (adenosina 10 $\mu$ M) y CGS-21680 fueron añadidos una hora antes de la inducción. IC<sub>50</sub> = 1.38 $\mu$ M. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

En la figura 55 puede observarse como CGS-21680 es capaz de ejercer el efecto supresor de la inducción de NOS-2 pero el ajuste de los datos a la curva dosis/respuesta es aparentemente complejo, lo que puede indicar que el agonista no está actuando sobre una población homogénea de receptores. De hecho, este agente es capaz de unirse y activar a otros tipos de receptores de adenosina distintos de A<sub>2A</sub> a altas concentraciones (IC<sub>50</sub> para A<sub>2B</sub> = 2.8  $\pm$  0.1  $\mu$ M) (Feoktistov y Biaggioni, 1998; Ongini *et al.*, 1999;

Arslan y Fredholm, 2000; Kull *et al.*, 2000) por lo que podemos atribuir el efecto observado a su unión a otros receptores, no a los A<sub>2A</sub>.



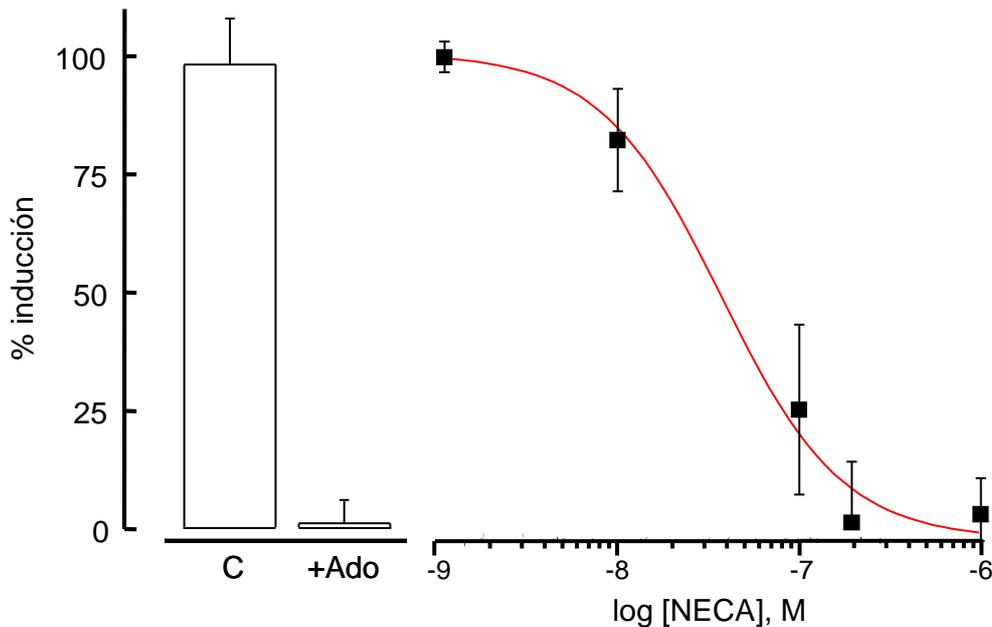
**Figura 56. Efecto del antagonista ZM-241385 (A<sub>2A</sub>) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante las 24 horas siguientes a la adición del *citomix*. Todos los tratamientos mostrados incluyeron *citomix* y adenosina (10  $\mu$ M). La adenosina fue añadida una hora antes de la inducción, la barra control (C) corresponde a este tratamiento. El ZM-241385 fue añadido 30 minutos antes que la adenosina en los tratamientos correspondientes. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Por otra parte, la figura 56 muestra cómo el tratamiento con el antagonista específico del subtipo A<sub>2A</sub>, ZM-241385, previene sólo parcialmente el efecto supresor de la adenosina y sólo a concentraciones superiores a 1  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> = 3.50  $\mu$ M). Puesto que la afinidad de unión del fármaco por los receptores A<sub>2A</sub> de rata es del orden de 300 nM (Fredholm *et al.*, 2001), este resultado indica que el ZM-241385 está ejerciendo una acción inespecífica sobre receptores de adenosina distintos de los A<sub>2A</sub>. De hecho, a este antagonista se le ha descrito cierta afinidad por el subtipo A<sub>2B</sub> de receptores de adenosina (Ongini *et al.*, 1999).

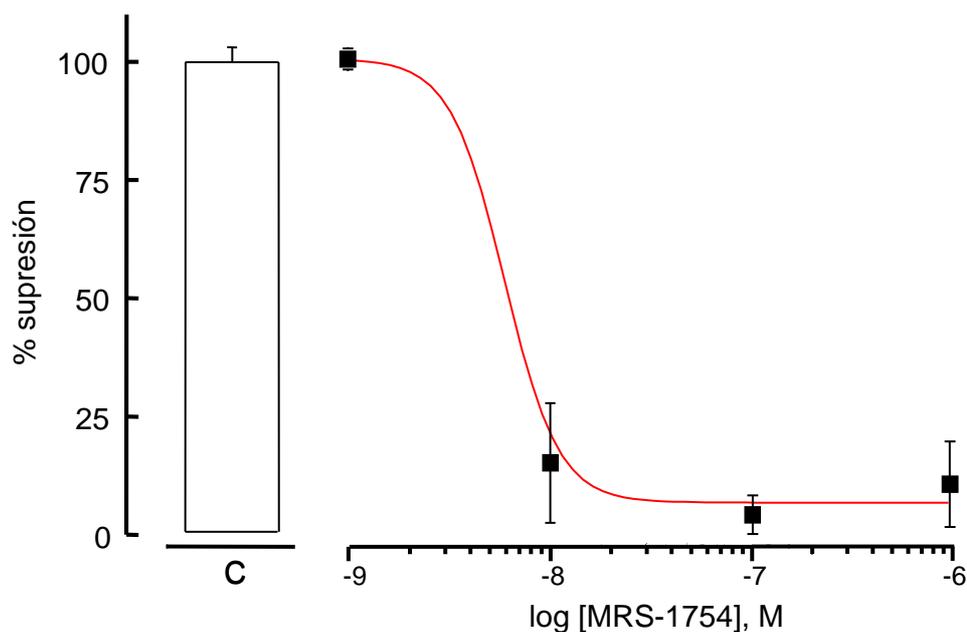
### 3.4. Estudio de la participación del subtipo A<sub>2B</sub> de receptor de adenosina.

En el estudio llevado a cabo para determinar la posible participación del subtipo A<sub>2B</sub> de receptores de adenosina se emplearon los agentes farmacológicos NECA (agonista relativamente específico del subtipo A<sub>2B</sub>) y MRS-1754 (antagonista selectivo del subtipo A<sub>2B</sub> (Linden, 2001)).



**Figura 57. Efecto del agonista NECA (A<sub>2B</sub>) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.** La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante 24 horas tras la adición del *citomix*, cuyo tratamiento corresponde a la barra control (C). Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. Ado (adenosina 10 μM) y NECA fueron añadidos una hora antes de la inducción. IC<sub>50</sub> = 35.80 nM. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media ± SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Puede observarse en la figura 57 como el tratamiento con NECA reproduce, a bajas concentraciones (200 nM), el efecto supresor de la adenosina, apuntando a este subtipo A<sub>2B</sub> como el responsable de la supresión por adenosina de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.



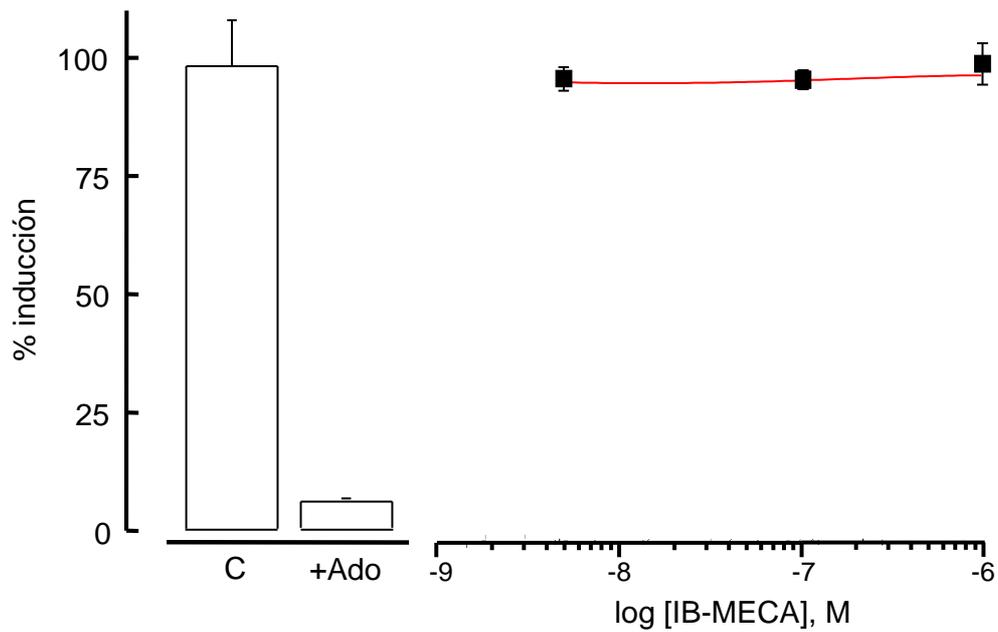
**Figura 58. Efecto del antagonista MRS-1754 ( $A_{2B}$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante las 24 horas siguientes a la adición del *citomix*. Todos los tratamientos mostrados incluyeron *citomix* y adenosina ( $10\mu\text{M}$ ). La adenosina fue añadida una hora antes de la inducción, la barra control (C) corresponde a este tratamiento. El MRS-1754 fue añadido 30 minutos antes que la adenosina en los tratamientos correspondientes.  $IC_{50} = 5.99 \text{ nM}$ . Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Los resultados ilustrados en la figura 58 apoyan la hipótesis de la participación de  $A_{2B}$  sugerida por los resultados mostrados en la figura 57, puesto que el tratamiento con el antagonista del subtipo  $A_{2B}$ , MRS-1754, suprime totalmente incluso a bajas concentraciones ( $10\text{nM}$ ) el efecto de la adenosina, demostrando que este subtipo  $A_{2B}$  sí está implicado en la supresión por adenosina de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.

### 3.5. Estudio de la participación del subtipo $A_3$ de receptor de adenosina.

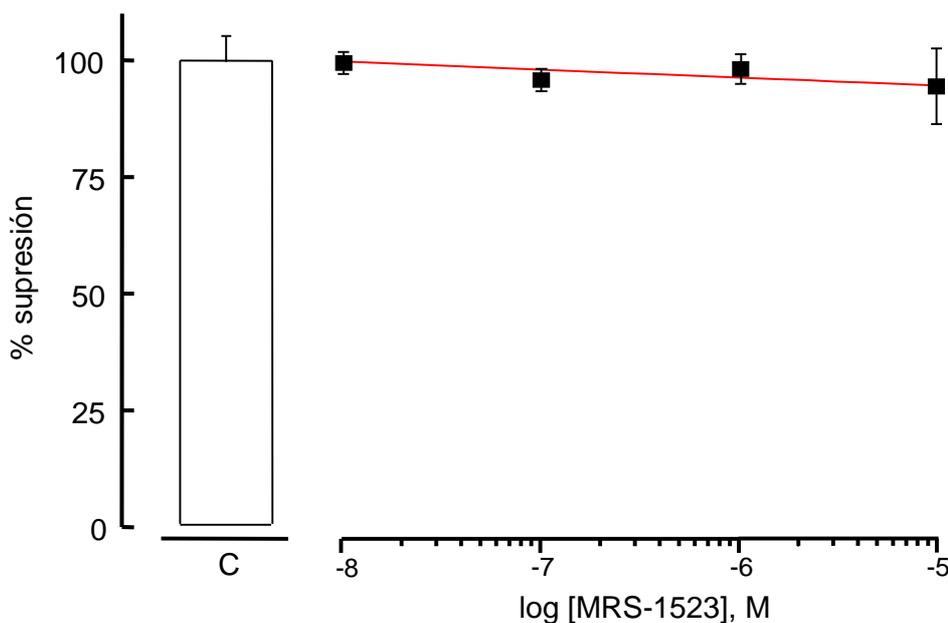
En este estudio cuyos resultados se muestran a continuación he trabajado con los agentes farmacológicos IB-MECA (agonista específico del subtipo  $A_3$ ) y MRS-1523 (antagonista selectivo del subtipo  $A_3$ ).



**Figura 59. Efecto del agonista IB-MECA (A<sub>3</sub>) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo durante 24 horas tras la adición del *citomix*, cuyo tratamiento corresponde a la barra control (C). Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. Ado (adenosina 10 $\mu$ M) e IB-MECA fueron añadidos al medio de tratamiento una hora antes de la inducción. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

En la figura 59 puede observarse como el tratamiento con el agonista específico del subtipo A<sub>3</sub>, IB-MECA, no reproduce el efecto observado con la adenosina, ni a la concentración de 1  $\mu$ M, suficientemente alta teniendo en cuenta la alta afinidad de este fármaco por el subtipo A<sub>3</sub> de rata descrita en la bibliografía (1.1 nM) (Fredholm *et al.*, 2001).



**Figura 60. Efecto del antagonista MRS-1523 ( $A_3$ ) sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

La gráfica muestra la acumulación de nitritos en el medio de cultivo 24 horas después de la adición del *citomix*. Todos los tratamientos mostrados incluyeron *citomix* y adenosina ( $10 \mu\text{M}$ ). La adenosina fue añadida una hora antes de la inducción, la barra control (C) corresponde a este tratamiento. El MRS-1523 fue añadido 30 minutos antes que la adenosina en los tratamientos correspondientes. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

De forma complementaria a los resultados mostrados en la figura 59, la figura 60 muestra como el tratamiento con el antagonista del subtipo  $A_3$ , MRS-1523, no suprime el efecto de la adenosina, demostrando que el subtipo  $A_3$  no está implicado en la supresión por adenosina de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.

Considerando de forma conjunta los resultados mostrados en las figuras 51 – 60, podemos concluir que el subtipo implicado significativamente en nuestro estudio es el receptor  $A_{2B}$  de adenosina, a pesar de la supresión parcial de la inducción de NOS-2 observada con el agonista de  $A_{2A}$  a altas concentraciones (CGS-21680,  $10 \mu\text{M}$ ), probablemente por su ligera afinidad por el subtipo  $A_{2B}$ .

Una vez identificado el receptor implicado en la supresión orientamos la investigación hacia la identificación de la ruta intracelular que subyace a la supresión de la inducción de NOS-2.

#### 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CITOQUINAS Y DE LA SUPRESIÓN.

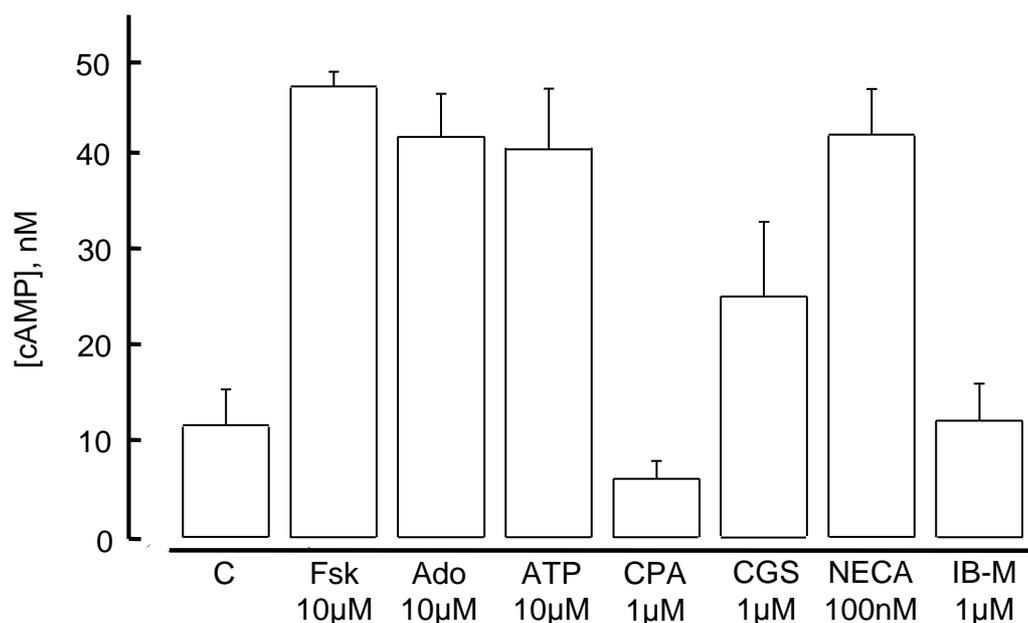
A grandes rasgos, la inducción de NOS-2 por citoquinas implica la activación de, al menos, dos vías de señalización. Una que conduce a la translocación de NF- $\kappa$ B y otra, dependiente de p21<sup>Ras</sup>, necesaria para la fosforilación y activación del factor nuclear. Esta segunda implica a la p38<sup>MAPK</sup>, no obstante, se ha descrito la participación de otros mecanismos en diferentes tipos celulares (Alpert *et al.*, 1999; Sizemore *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001; Nomura, 2001; Marcus *et al.*, 2003; Birkenkamp *et al.*, 2004; Chantome *et al.*, 2004).

##### 4.1. Mecanismo de la supresión.

Como ya se ha descrito anteriormente, la adenosina ejerce un efecto supresor mediante su interacción con el subtipo A<sub>2B</sub>. Para identificar al efector intracelular de esta supresión, y puesto que la adenosina extracelular provoca la elevación de la [cAMP] intracelular, diseñamos varios experimentos centrados en el estudio de la posible participación del cAMP en la supresión por purinérgicos de la inducción de NOS-2 por las citoquinas.

##### *Elevación de la [cAMP]<sub>i</sub>.*

En la figura 61 se muestran los resultados obtenidos tras varios experimentos en los que se han estudiado los efectos respecto a la acumulación de cAMP intracelular de la forskolina (activador permeable de la AC), la adenosina y los agonistas específicos para cada uno de los cuatro subtipos de receptores de adenosina.



**Figura 61. Estudio de la variación de [cAMP]<sub>i</sub>. Forskolina, adenosina y agonistas.**

La gráfica muestra la concentración de cAMP intracelular en distintas muestras de astrocitos primarios de rata tratados con los distintos tratamientos. Todos los tratamientos fueron añadidos al mismo tiempo y recogidos para determinar la [cAMP] tras 10 minutos. La cantidad de cAMP corresponde a un pocillo con aprox. 225000 células. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes. C: Control (no tratamiento). Fsk: Forskolina. Ado: Adenosina. CGS: CGS-21680. IB-M: IB-MECA.

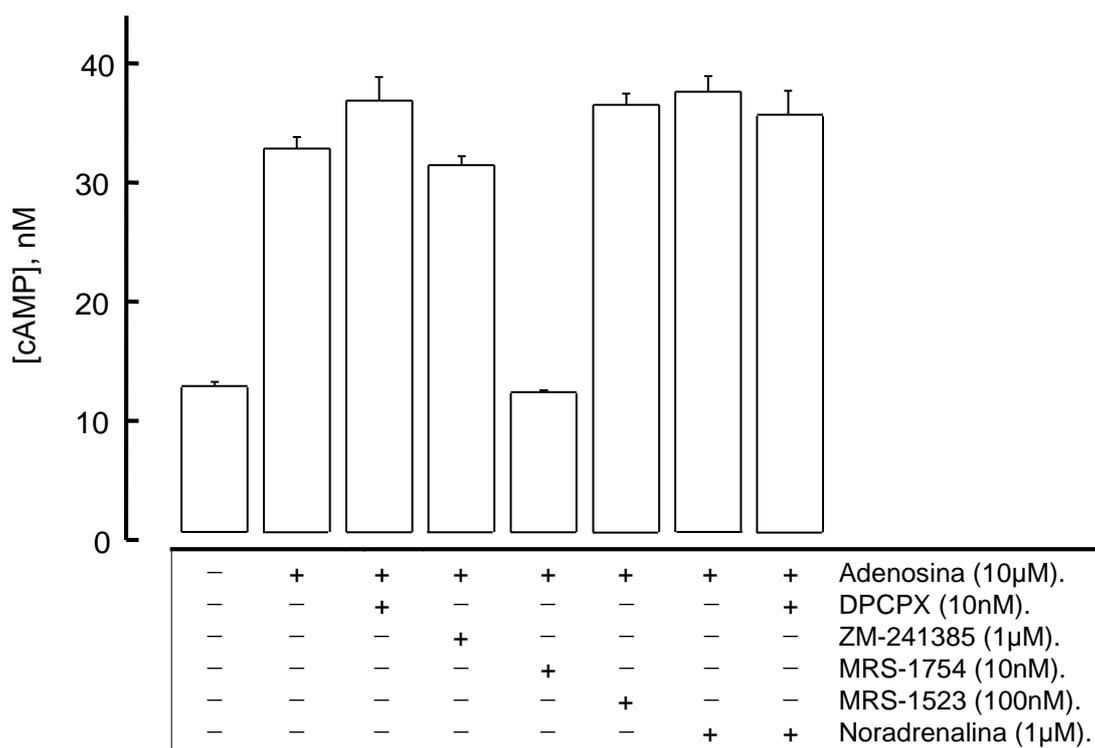
Tal y como se esperaba tras la confirmación de que los astrocitos expresan los cuatro subtipos de receptores de adenosina (Fig. 52), de que la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> se correlaciona con la supresión por ATP o adenosina de la inducción de NOS-2 por las citoquinas (Fig. 42 – 45) y de que, en general, la estimulación de los subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> disminuyen la [cAMP]<sub>i</sub> ya que se han descrito acoplados por lo general negativamente a la AC probablemente *via* una G<sub>i</sub> (ver tabla 8) mientras que la de los subtipos A<sub>2</sub> (frecuentemente acoplados a la estimulación de la AC probablemente *via* una G<sub>s</sub>) la aumentan (Fredholm *et al.*, 2001; Fields y Burnstock, 2006). La figura 61 muestra cómo el tratamiento con los agonistas específicos de los subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> de receptores de adenosina (CPA 1 μM e IB-MECA 1 μM) hace disminuir la [cAMP] intracelular a niveles próximos o incluso por debajo del nivel del tratamiento control, por otro lado, el tratamiento con el agonista específico del subtipo A<sub>2B</sub> la aumenta hasta niveles

próximos a los obtenidos tras el tratamiento con forskolina, adenosina o ATP, lo que apoya la conclusión obtenida previamente según la cual  $A_{2B}$  es el subtipo de receptor de adenosina implicado en la supresión por los purinérgicos de la inducción de NOS-2 por las citoquinas (Fig. 52 – 60).

Respecto a los resultados obtenidos del estudio sobre la participación del subtipo  $A_{2A}$  en la elevación de la [cAMP] intracelular con el agonista específico (CGS-21680 1  $\mu$ M) no son tan decisivos y no nos permiten obtener una conclusión tan clara, nosotros sugerimos la interacción de CGS-21680 1  $\mu$ M con el subtipo  $A_{2B}$  descrita en la bibliografía (Ongini *et al.*, 1999; Arslan y Fredholm, 2000; Kull *et al.*, 2000).

De forma complementaria al estudio con los agonistas específicos de cada uno de los cuatro subtipos de receptores de adenosina se llevó a cabo un estudio con los antagonistas específicos para cada uno de ellos. En la figura 62 se muestran los resultados obtenidos en este estudio sobre los efectos de estos agentes farmacológicos sobre el aumento de [cAMP]<sub>i</sub> producido por el tratamiento con adenosina. Se observa en esta figura cómo el cotratamiento de adenosina con los antagonistas específicos confirma las conclusiones a las que se han llegado en el caso de los tratamientos con los distintos agonistas selectivos (Fig. 61). De hecho, se distinguen dos grupos estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ), los constituídos por el tratamiento control (sin adición de adenosina) y el que incluye MRS-1754 (antagonista selectivo de  $A_{2B}$ ), y el grupo constituído por el resto de tratamientos.

El tratamiento con el antagonista del subtipo  $A_{2A}$  no muestra un efecto supresor de la estimulación de AC promovida por la adenosina, lo que demuestra que este subtipo de receptor de adenosina no participa en el aumento de la [cAMP]<sub>i</sub> promovido por el tratamiento con el derivado purinérgico. Además, el tratamiento con el antagonista del subtipo  $A_{2B}$  (acoplado a la estimulación de la AC) junto a la adenosina suprime el efecto de ésta sobre la [cAMP]<sub>i</sub>, disminuyéndola hasta los valores basales, confirmando la hipótesis de que es este subtipo de receptor de adenosina el implicado en el aumento de la [cAMP]<sub>i</sub> generado por el tratamiento con adenosina.



**Figura 62. Estudio de la variación de [cAMP]<sub>i</sub>. Adenosina y antagonistas.**

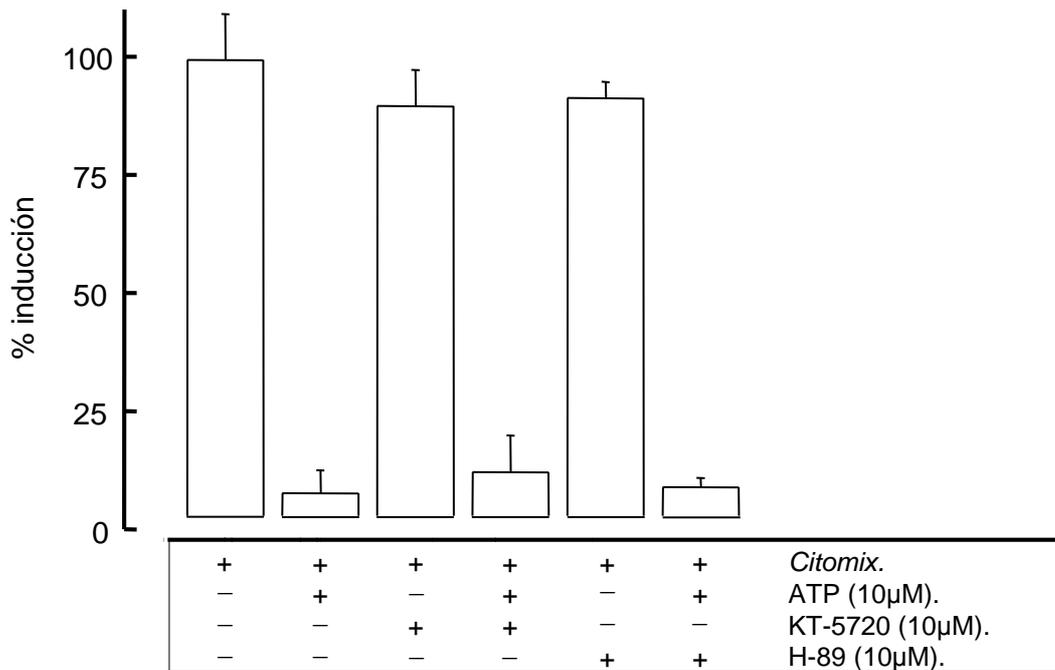
La gráfica muestra la concentración de cAMP intracelular en distintas muestras de astrocitos primarios de rata tratados con los distintos tratamientos. Todos los tratamientos fueron recogidos para determinar la [cAMP] 10 minutos tras la adición de adenosina. La [cAMP] nM es pmol/ml en cada pocillo conteniendo 200µl y obtenido de un pocillo de cultivo/tratamiento conteniendo aprox. 225000 células. DPCPX, ZM-241385, MRS-1754 y MRS-1523 fueron añadidos una hora antes que la adenosina. La noradrenalina se añadió al mismo tiempo que la adenosina. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media ± SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

### ***Efectores del cAMP intracelular: PKA y proteínas Epacs 1/2.***

La proteína intracelular más frecuentemente asociada a la elevación de la [cAMP] intracelular es PKA aunque otras proteínas como las epacs también han sido descritas como efectoras activadas por esta misma elevación de [cAMP] (de Rooij *et al.*, 2000; Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2003). Con el propósito de determinar el agente efector de la elevación intracelular de la [cAMP] se diseñaron los experimentos cuyos resultados se muestran a continuación.

Estudio de la participación de PKA (KT-5720 y H-89).

Se han realizado experimentos para determinar la posible participación de la PKA en el efecto supresor del ATP sobre la inducción de NOS-2 por las citoquinas. Para ello se han utilizado KT-5720 y H-89 (inhibidores permeables selectivos de PKA pero no de PKG, PKC ni MLCK).



**Figura 63. Estudio de la participación de PKA en la supresión de la inducción (KT-5720 y H-89).**

El ATP fue añadido una hora antes de la inducción con *citomix*. KT-5720 y H-89 fueron añadidos 30 minutos antes que el ATP. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

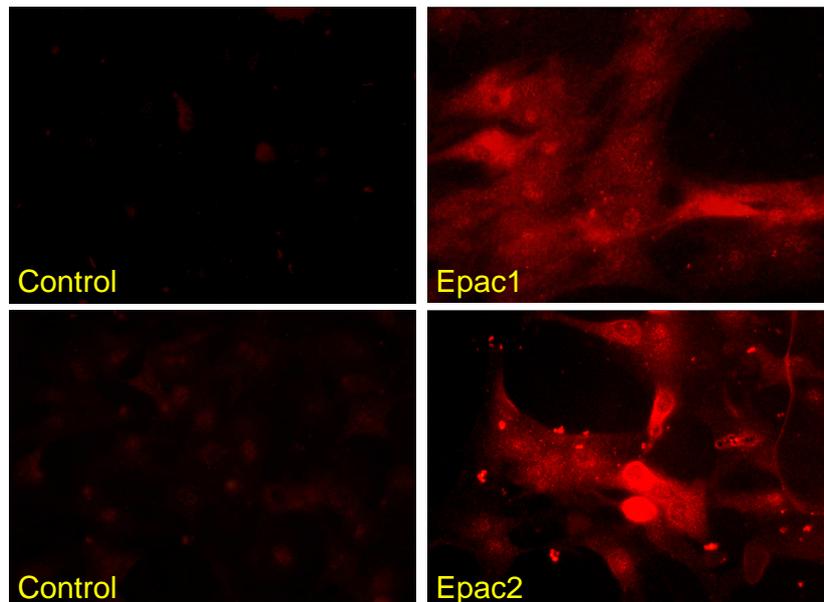
A la luz de la figura 63, la presencia de ambos inhibidores no modifica la inducción de la NOS-2 y la consecuente acumulación de nitritos, y tampoco bloquea el efecto supresor del ATP extracelular sobre esta inducción, esta ausencia de efecto de los inhibidores específicos de PKA indica que en la ruta de la señal supresora no es esencial la participación de esta quinasa, a pesar de que la adición de ATP aumenta los niveles de cAMP intracelulares que la activan.

Tras haber descartado la participación de PKA y teniendo en cuenta que el efecto supresor se acompaña de una elevación de la [cAMP] (Fig. 42 – 45, y 63) consideramos la posible participación de las pequeñas proteínas G monoméricas Epacs

1/2 o Rap-GEFs 1/2, puesto que una elevación de la  $[cAMP]_i$  puede activar a estas proteínas, las cuales a su vez, activan a Rap1, desencadenando una ruta de señalización relacionada, en general, con las proteínas MAPKs.

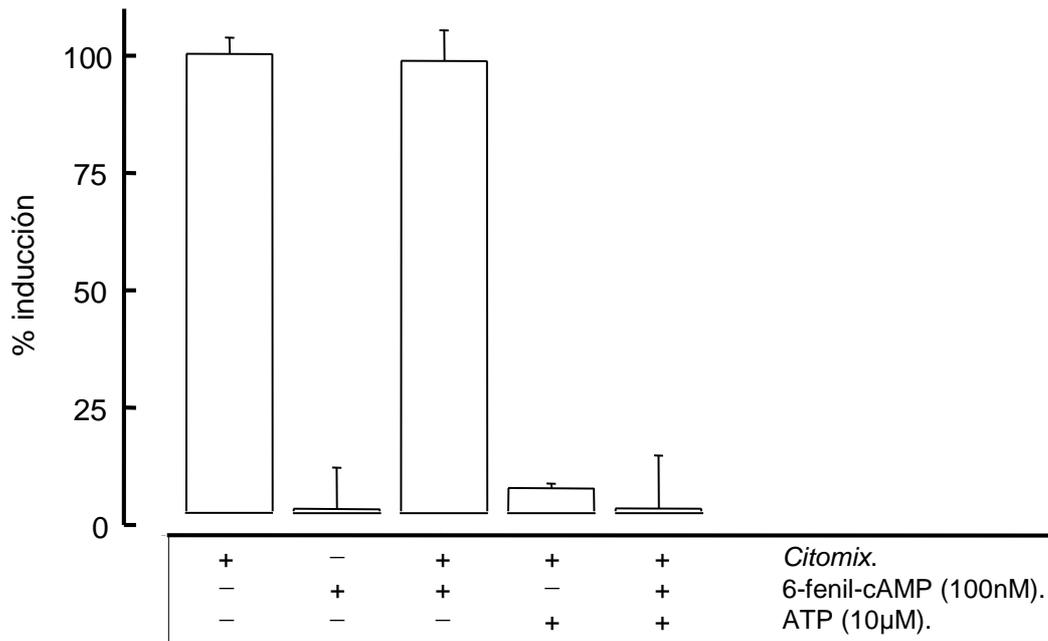
PKA vs Epac (6-fenil-cAMP y 8-CPT-2'-O-Me-cAMP).

Tras comprobar que los astrocitos primarios de cerebelo de rata expresan las proteínas Epac 1 y 2 (ver figura 64), se realizó un estudio farmacológico utilizando dos agonistas permeables del cAMP intracelular, uno de ellos, el 6-fenil-cAMP, es específico de PKA y carece de efectos sobre las proteínas Epac1/2, el otro, el 8-CPT-2'-O-Me-cAMP es un agonista respecto a las proteínas Epac 1/2, capaz de unirse y activar a las mismas, pero no ejerce ningún efecto sobre PKA.



**Figura 64. Los astrocitos primarios de rata expresan las proteínas Epac 1 y 2.**

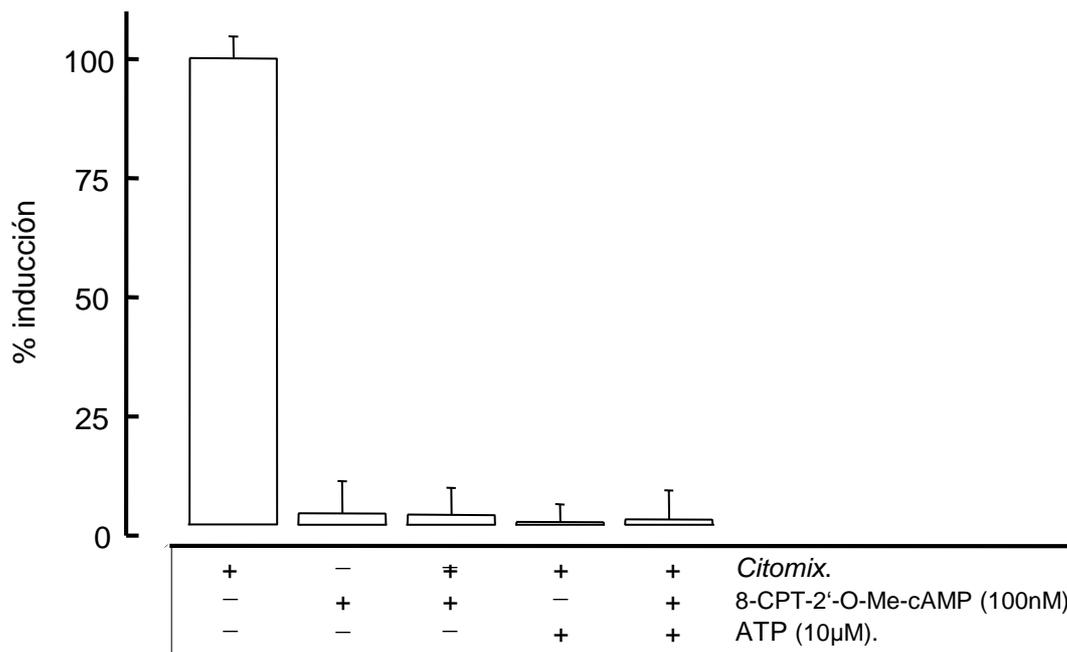
Imágenes obtenidas tras inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta. En la parte superior de la figura, la fotografía de la derecha muestra un cultivo de astrocitos primarios marcados con anticuerpos primarios frente a Epac 1 mientras que la fotografía de la izquierda muestra el mismo cultivo pero no marcado con el anticuerpo primario (control). Las fotografías de la parte inferior de la figura corresponden a un mismo cultivo tras el marcaje con anticuerpos específicos para la proteína Epac 2 (derecha) y sin este marcaje (izquierda, control). Cada fotografía corresponde a un campo representativo del cultivo.



**Figura 65. Efectores de cAMP: PKA y Epacs (6-fenil-cAMP).**

ATP y 6-fenil-cAMP fueron añadidos una hora antes de la inducción con *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Tal y como muestra la figura 65, el tratamiento con 6-fenil-cAMP (agonista específico de PKA sin efecto sobre Epac 1/2) no tiene por sí mismo ningún efecto sobre los niveles basales de producción de  $\text{NO}_2^-$  ni su inducción por citoquinas. Es más, la presencia de 6-fenil-cAMP no interfiere, ni potencia ni bloquea, la supresión de la inducción por ATP extracelular. Estos resultados coinciden con los obtenidos con los antagonistas farmacológicos de PKA, KT-5720 y H-89, demostrando que la ruta desencadenada por el ATP extracelular, aunque se acompaña de la elevación de [cAMP], no requiere la participación de la PKA.



**Figura 66. Efectores de cAMP: PKA y Epacs (8-CPT-2'-O-Me-cAMP).**

ATP y 8-CPT-2'-O-Me-cAMP fueron añadidos una hora antes de la inducción con *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 66, el 8-CPT-2'-O-Me-cAMP, agonista permeable específico de las proteínas Epac 1/2, reproduce *per se*, a la concentración de 100nM, el efecto supresor observado en los tratamientos con ATP. Adicionalmente, cabe destacar que en ambos casos la supresión es total. No hay un mayor efecto en el tratamiento simultáneo con ATP y 8-CPT-2'-O-Me-cAMP.

A la luz de ambas figuras 65 y 66, se puede concluir que la activación de las proteínas Epac 1/2 es esencial para la supresión observada con ATP, lo que sugiere que la ruta de supresión desencadenada por el agente purinérgico es dependiente de la activación de las proteínas Epacs 1/2 por la elevación de la concentración del cAMP intracelular. El hecho de que estas proteínas sean esenciales en la ruta de supresión por ATP induce a pensar en la posible participación de la proteína Rap1, una proteína que es directamente activada por éstas (véase más adelante)

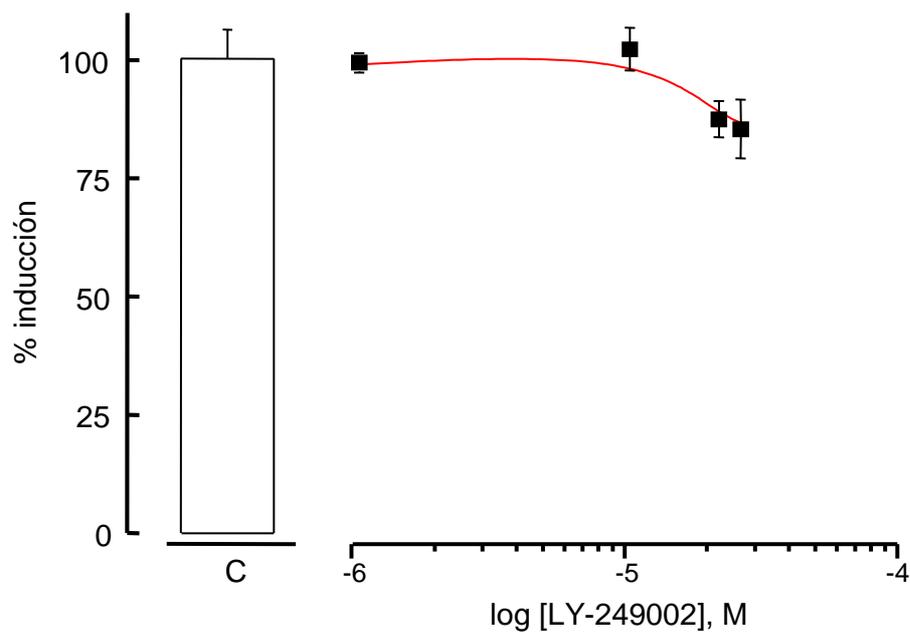
#### 4.2. Vía de la inducción.

La ruta de inducción de NOS-2 por el *citomix* que parte de la interacción de la IL-1 $\beta$  con su receptor está asociada a varias proteínas en su dominio citoplasmático y puede implicar a distintas proteínas intracelulares tales como PI3-quinasa y las tres subfamilias de MAPKs. Convergiendo las diferentes rutas en la translocación y activación de NF- $\kappa$ B. Para delimitar la ruta de inducción desencadenada por esta interleuquina (IL-1 $\beta$ ) en astrocitos primarios de rata se realizaron varios experimentos con antagonistas específicos para cada una de estas quinasas celulares, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

##### *Estudio de la participación de PI3-quinasa.*

La PI3-quinasa es una enzima que ha sido descrita por algunos autores como asociada al receptor de la interleuquina 1 $\beta$  (Reddy *et al.*, 1997; Marmioli *et al.*, 1998; Sizemore *et al.*, 1999; Funakoshi *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2004).

Para determinar si esta quinasa participa, al igual que en otros tipos celulares (Diaz-Guerra *et al.*, 1999; Pahan *et al.*, 1999), en la inducción de NOS-2 por las citoquinas pro-inflamatorias en astrocitos de rata, se realizó un estudio de determinación de nitritos tras tratamiento de inducción con *citomix* en cultivos celulares preincubados durante una hora con el inhibidor farmacológico específico de la enzima (LY-294002, IC<sub>50</sub> = 1.4  $\mu$ M) que actúa sobre el sitio de unión a ATP de ésta (Vlahos *et al.*, 1994).



**Figura 67. Efecto del inhibidor LY-249002 sobre la producción de nitritos inducida por citoquinas.**

Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. LY-294002 fue añadido al medio de tratamiento una hora antes de la inducción. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Tal y como puede observarse en la figura 67, el tratamiento con el inhibidor específico de la PI3-quinasa junto con las citoquinas no afecta de forma significativa a la inducción de NOS-2, por lo que podemos deducir que la PI3-quinasa no participa en la cascada de señalización a través de la cual las citoquinas pro-inflamatorias inducen la expresión de NOS-2 en astrocitos primarios en cultivo.

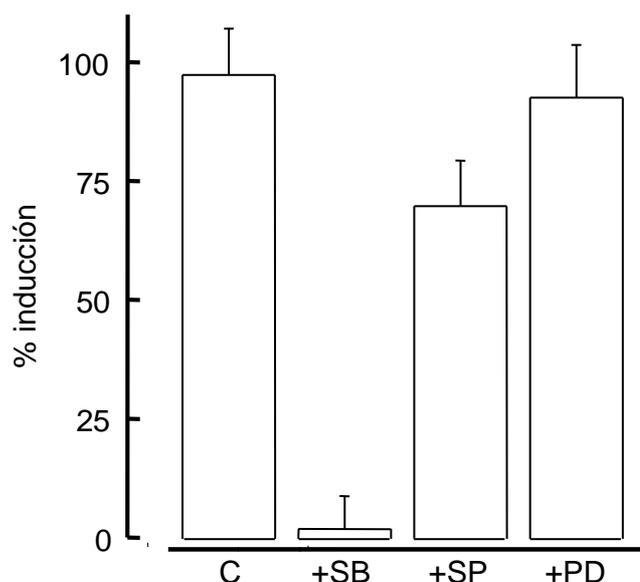
El ligero efecto observado en el tratamiento tras la preincubación con LY-294002 a concentraciones altas como 20  $\mu$ M y 25  $\mu$ M permite descartar que su efecto se deba a la supresión de la inducción de NOS-2 por IFN- $\gamma$ , como ocurre en células microgliales BV2 (Tsai *et al.*, 2004), incluso podría deberse a reacciones celulares inespecíficas, y también se ha descrito que a mayor concentración afecta la actividad de MAPKs y otras quinasas (Ding *et al.*, 1995; Vlahos *et al.*, 1995; Yano *et al.*, 1995). En particular, una inhibición inespecífica parcial de la p38<sup>MAPK</sup> bastaría para explicar este efecto (véase más adelante).

***Estudio de la participación de las diferentes MAPKs.***

La cascada de señalización desencadenada por la interacción entre la IL-1 $\beta$  y su receptor está frecuentemente relacionada con las proteínas quinasas de la superfamilia de las MAPKs, actuando, según el tipo celular, a través de una o varias de las representantes de las tres subfamilias de MAPKs: p38<sup>MAPK</sup> (también conocida como la quinasa de estrés SAPK-2), p54<sup>JNK</sup> (también conocida como la quinasa de respuesta a estrés SAPK-1 o JNK), y p42p44<sup>MAPK</sup> o ERKs 1/2 (McDermott y O'Neill, 2002).

En general, las quinasas de estrés (SAPKs) p38<sup>MAPK</sup> y JNK participan en las respuestas celulares relacionadas con inflamación y apoptosis, entre otras, mediante la actuación sobre NF- $\kappa$ B, y AP-1, respectivamente, mientras que las ERKs 1/2 están más relacionadas con las respuestas proliferativas mediante la actuación sobre otros factores de transcripción, tales como CREB (Cobb, 1999; Herlaar y Brown, 1999; LaPointe y Isenovic, 1999; Chang y Karin, 2001; Dent *et al.*, 2003).

Para dilucidar la posible participación de cada una de las representantes de las tres subfamilias de MAPKs se realizaron experimentos empleando inhibidores específicos de cada una de estas familias. Estos estudios, cuyos resultados se muestran en la figura 68, consistieron en el cotratamiento del *citomix* con los agentes farmacológicos SB-203580, SP-600125 y PD-98059, inhibidores permeables específicos de p38<sup>MAPK</sup>, p54<sup>JNK</sup> y las ERKs 1/2, respectivamente.



**Figura 68. Tratamientos supresores de cada una de las tres familias de MAPKs.**

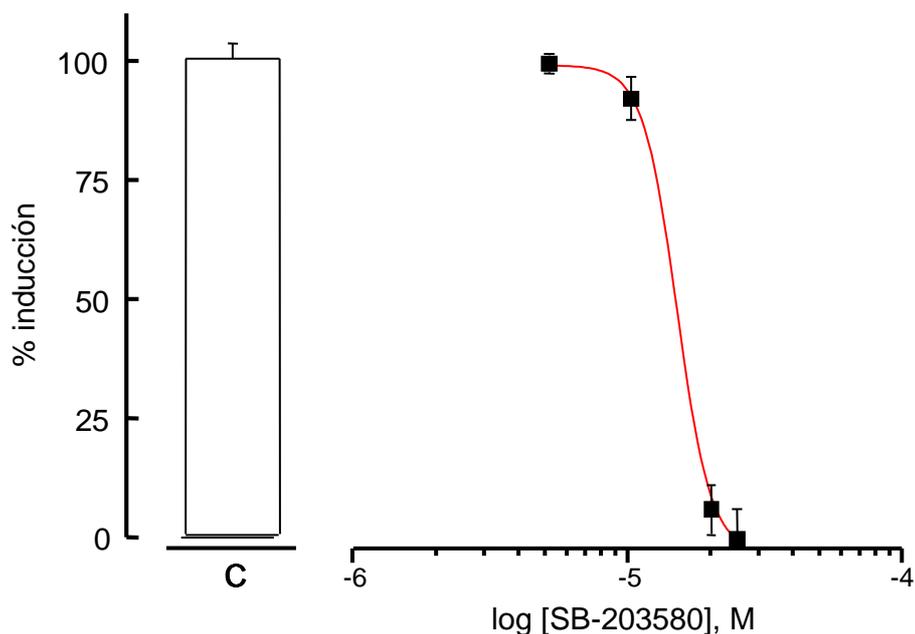
Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. SB: SB-203580; SP: SP-600125; PD: PD-98059. Los tres agentes supresores se añadieron al medio de tratamiento una hora antes de la inducción y a la concentración de 20  $\mu$ M. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Tras observar los resultados ilustrados en la figura 68 pudimos concluir que p38<sup>MAPK</sup> es la única de las subfamilias de MAPKs que participa en la inducción gen de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias y que es necesaria para ella, ya que el SB-203580 fue el único agente capaz de bloquear el efecto inductor de las citoquinas.

La ligera supresión de la inducción de NOS-2 por el inhibidor de la otra quinasa de estrés p54<sup>JNK</sup> (SP-600125) a altas dosis (20  $\mu$ M) puede deberse a una respuesta celular inespecífica al fármaco o a algún efecto específico del mismo ajeno a la ruta de inducción, puesto que se ha descrito a SP-600125 como regulador de la expresión génica y como inductor de apoptosis en células tumorales (Krumenacker *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2006).

Por el contrario, la curva concentración-respuesta para SB-203580 mostrada en la figura 69 indica que el bloqueo provocado por este agente se produce a concentraciones inferiores a 30  $\mu$ M ( $IC_{50} = 14.4 \pm 1.8 \mu$ M). En este intervalo,

SB-203580 es específico de p38<sup>MAPK</sup> y no bloquea significativamente otras MAPKs (Saleshando y O'Connor, 2000; Piao *et al.*, 2003).

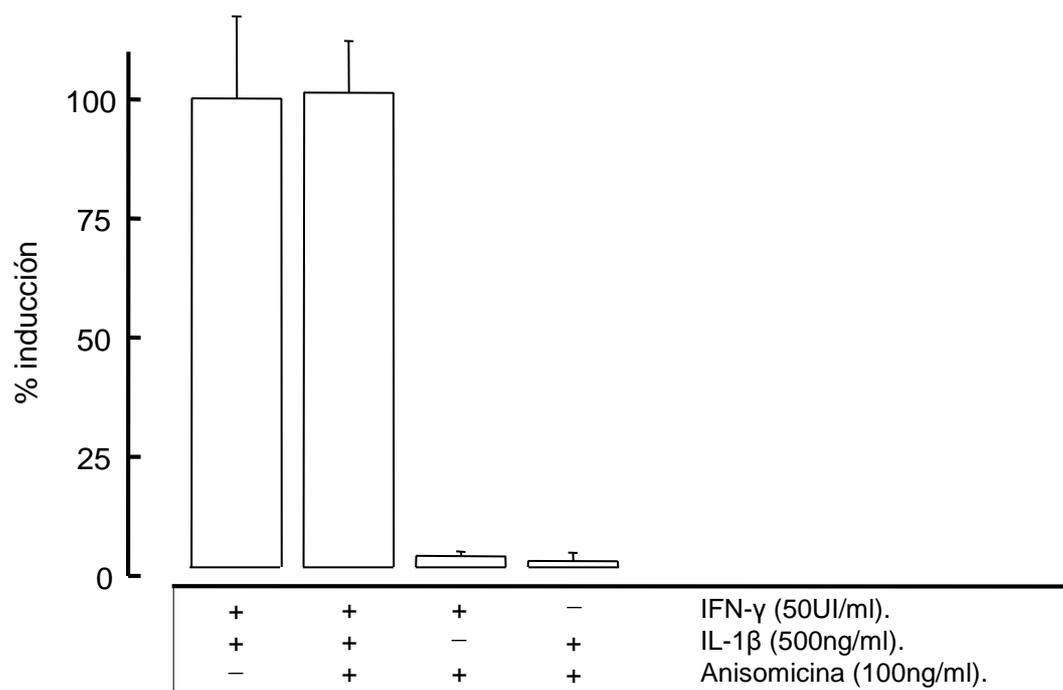


**Figura 69. Estudio de la participación de p38<sup>MAPK</sup> (SB-203580).**

Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. SB-203580 se añadió al medio de tratamiento una hora antes de la inducción.  $IC_{50} = 14.39\mu M$ . Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La supresión de la inducción de NOS-2 por el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> (SB-203580) de forma dosis-dependiente mostrada en la figura 69 demuestra la participación obligada de esta quinasa en la ruta de señalización desencadenada por las citoquinas proinflamatorias.

La anisomicina es un potente activador permeable específico de JNK y p38<sup>MAPK</sup>, por lo que el tratamiento con este agente farmacológico puede dilucidar si la participación de la subfamilia de p38<sup>MAPK</sup> es suficiente para la inducción del gen de NOS-2 por IL-1 $\beta$ . En tal caso, la anisomicina podría sustituir a la IL-1 $\beta$  en el tratamiento de inducción, para ello se realizó un estudio en el que se presentaron al cultivo cada uno de los dos componentes del *citomix* por separado, pero conjuntamente con la anisomicina.



**Figura 70. La anisomicina no puede sustituir a ninguno de los componentes del citomix.**

La anisomicina se añadió en el momento de la inducción con *citomix*. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

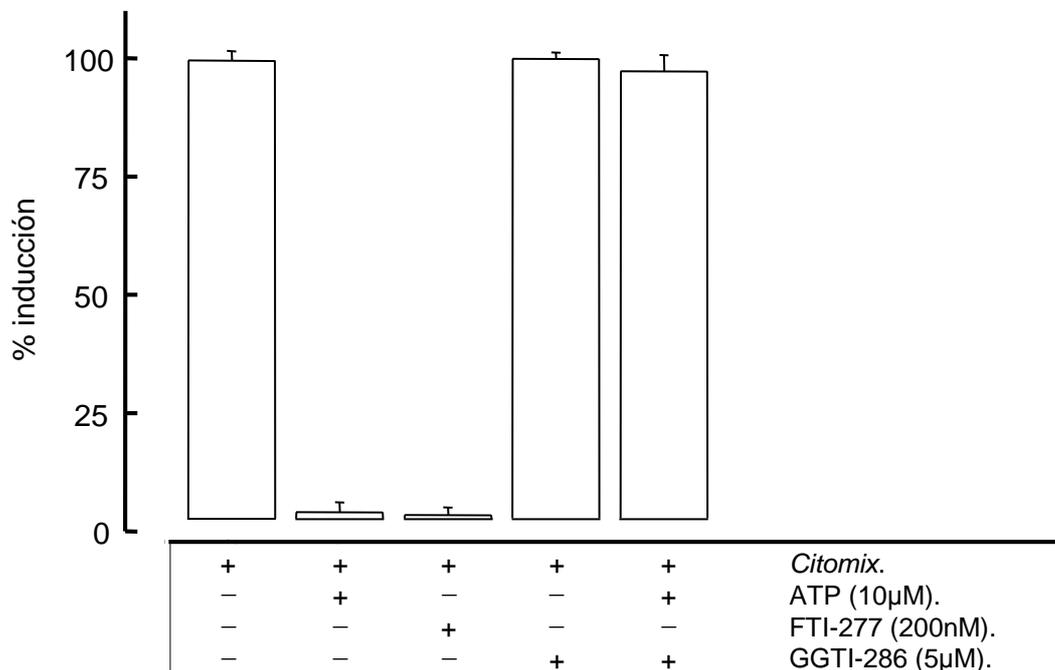
Los resultados mostrados en la figura 70 indican que a pesar de la conclusión anterior, la anisomicina no ofrece una inducción de NOS-2 adicional pero tampoco basta para sustituir a ninguno de los dos constituyentes del *citomix*, siendo necesaria la combinación de ambas citoquinas para la inducción del gen de NOS-2 lo que sugiere que la participación de la p38<sup>MAPK</sup>, si bien es necesaria, no es suficiente.

#### ***Participación de p21<sup>Ras</sup> y de Rap1.***

La participación de p38<sup>MAPK</sup> señala a la proteína p21<sup>Ras</sup> como el posible nexo entre el receptor de interleuquina y la activación de la MAPK, ya que las MAPKs están frecuentemente relacionadas con p21<sup>Ras</sup> (ver figura 15). Rap1, al igual que p21<sup>Ras</sup>, es una pequeña proteína monomérica de unión a GTP. Esta proteína se encuentra dispuesta preferentemente en la región perinuclear, aparato de Golgi y endosomas *inclusive* (Nomura *et al.*, 2004) y es activada directamente por las proteínas Epacs 1/2 activadas.

Ambas, p21<sup>Ras</sup> y Rap1, se encuentran descritas en la bibliografía como homólogas con actividad antagonista (Zwartkruis y Bos, 1999; Palsson *et al.*, 2000;

Nomura *et al.*, 2004). Ras debe estar anclada a la membrana por restos farnesilo para ser activa, no así Rap1. Por ello, para el estudio de la participación de ambas proteínas de la misma familia se han utilizado los agentes farmacológicos FTI-277, un inhibidor selectivo de la farnesil-transferasa ( $IC_{50} = 100 \text{ nM}$ ), enzima indispensable para la síntesis de  $p21^{\text{Ras}}$  (Sun *et al.*, 1995)) que no afecta a Rap1A ( $IC_{50} = 50 \mu\text{M}$ ) (Lerner *et al.*, 1995a; Lerner *et al.*, 1995b) y GGTI-286, un inhibidor específico de la geranil-geranil-transferasa ( $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ ) (Lerner *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 1998) que impide la prenilación de Rap1A pero no la de  $p21^{\text{Ras}}$  (Nomura *et al.*, 2004).



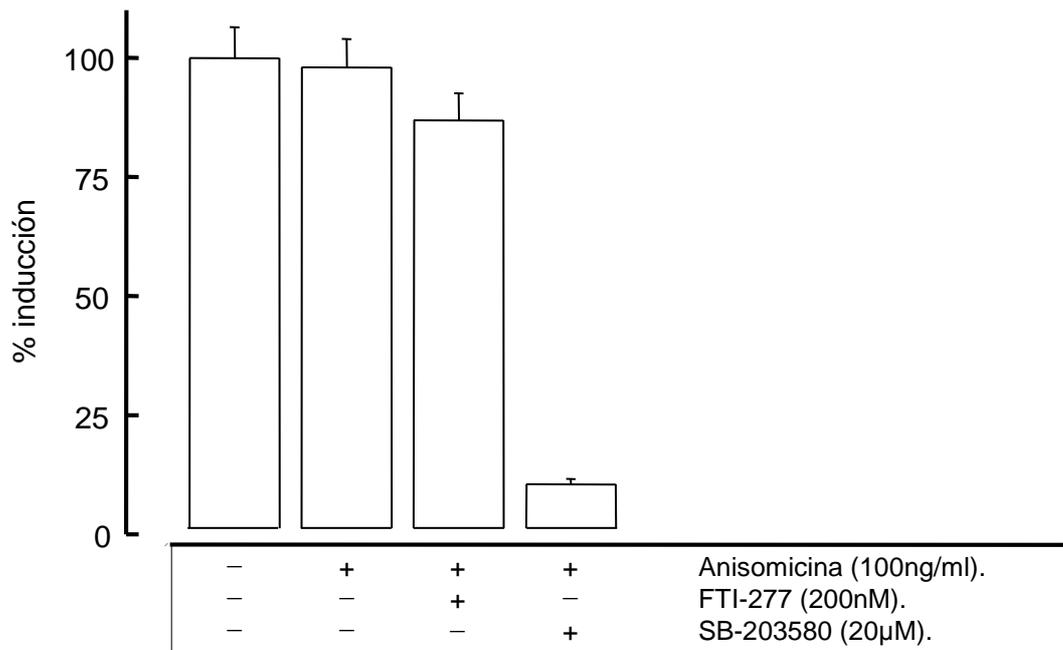
**Figura 71. Esencialidad de Rap1 y  $p21^{\text{Ras}}$  (GGTI-286 y FTI-277, respectivamente).**

Todos los tratamientos incluían *citomix*. ATP se añadió una hora antes de la inducción, GGTI-286 y FTI-277 fueron añadidos dos horas antes de la inducción. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

Se observa en figura 71 cómo el inhibidor específico de  $p21^{\text{Ras}}$  (FTI-277) suprime la inducción de NOS-2 por las citoquinas, mientras que el inhibidor específico de Rap1 (GGTI-286) no ejerce ningún efecto sobre la inducción por citoquinas. Por lo que podemos concluir que  $p21^{\text{Ras}}$  es esencial para la inducción de NOS-2 por las citoquinas pro-inflamatorias, mientras que Rap1 no lo es. Respecto a la ruta de supresión por el ATP, la figura 71 muestra como el pretratamiento con GGTI-286, que

bloquea la acción de Rap1 pero no de p21<sup>Ras</sup>, la anula totalmente mientras que el pretratamiento con este fármaco no afecta a la inducción de NOS-2 por el citomix.

Para verificar la participación de p21<sup>Ras</sup> en la activación de p38<sup>MAPK</sup> realizamos estudios coadministrando la anisomicina junto al *citomix* y a distintos antagonistas utilizados previamente y que habían impedido la producción de NO·.



**Figura 72. Efecto de antagonistas tras la activación directa de p38<sup>MAPK</sup> por anisomicina.**

Todos los tratamientos incluyeron *citomix*. La anisomicina se añadió en el momento de la inducción. FTI-277 y SB-203580 fueron añadidos una hora antes de la inducción. Al final de los experimentos se recogieron los medios de cultivo para la determinación de nitritos mediante la técnica de Griess. Los resultados mostrados (media  $\pm$  SEM) son datos obtenidos en cuatro experimentos diferentes.

La figura 72 muestra cómo la anisomicina revierte el efecto supresor del inhibidor de p21<sup>Ras</sup> (inhibidor de la farnesilación, FTI-277) pero no el del antagonista de p38<sup>MAPK</sup> (SB-203580), lo que apoya la idea anterior (Fig. 68) de que la p38<sup>MAPK</sup> es esencial en la inducción de la expresión de NOS-2 por las citoquinas y que la participación de esta quinasa en la ruta de activación se encuentra después de la activación de p21<sup>Ras</sup>.

Por lo tanto, p21<sup>Ras</sup> y Rap1 parecen, efectivamente, mantener una relación antagonica entre sí en los astrocitos en cultivo. Rap1 es modulada por las proteínas Epac 1/2 (Kawasaki *et al.*, 1998). Por lo tanto, es posible plantear que la activación de las

Epacs estimula a Rap1, lo cual resultaría en la reducción de la estimulación de p21<sup>Ras</sup>. Y esto, a su vez, significa una menor activación de p38<sup>MAPK</sup>. La participación de las proteínas Epacs 1/2 como efectoras de la supresión tras la elevación intracelular de la [cAMP] demostrada anteriormente señala a la proteína Rap1 como posible efectora de la supresión.

Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de Rap1 en la supresión por el agente purinérgico y de p21<sup>Ras</sup> en la ruta inductora, así mismo, y teniendo en cuenta el antagonismo existente entre ambas proteínas, permite reducir la supresión por los agentes purinérgicos de la inducción de NOS-2 por el *citomix* al ámbito de las proteínas G homólogas Rap1 y p21<sup>Ras</sup>.

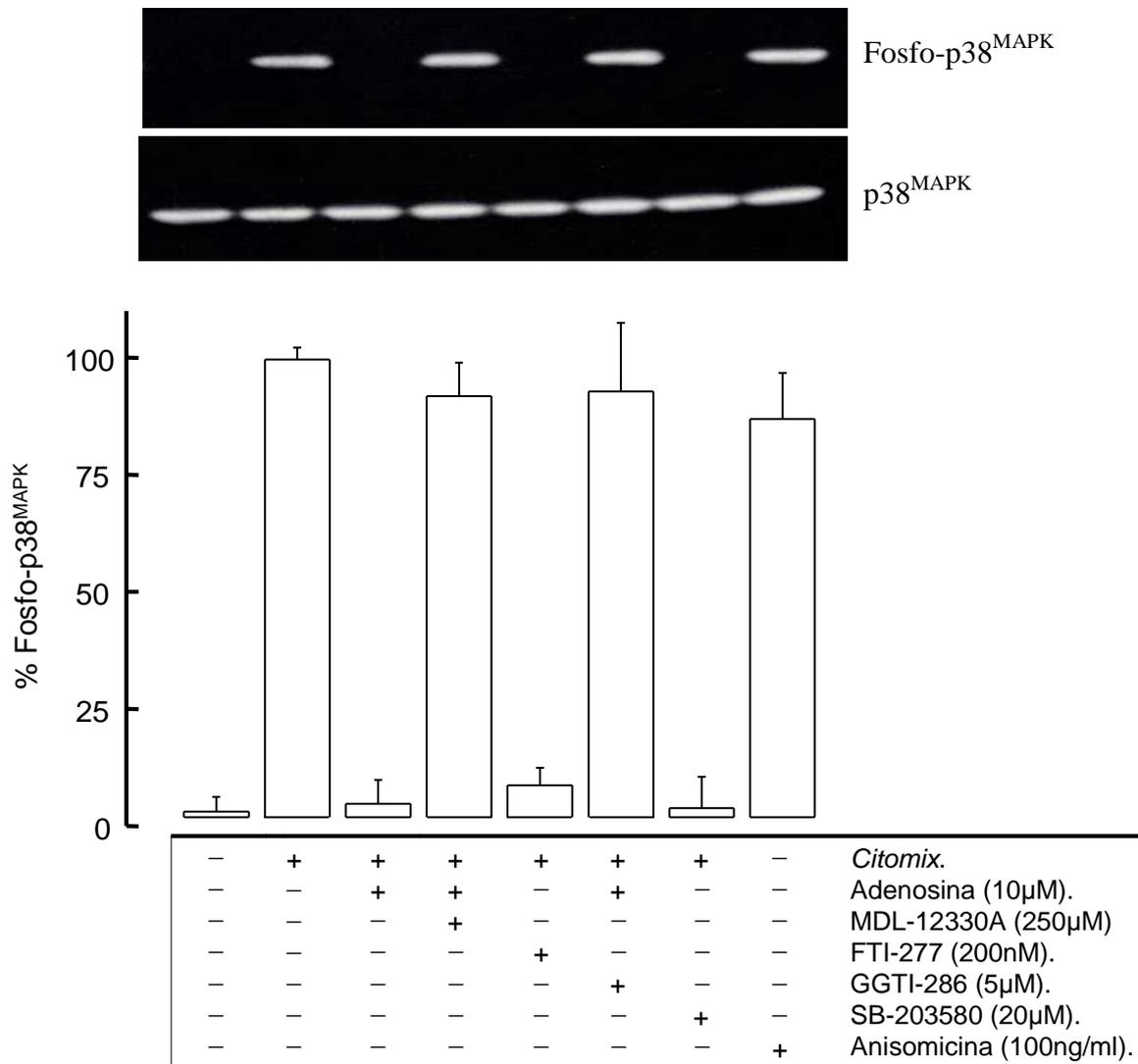
### ***Fosforilación y activación de p38<sup>MAPK</sup>.***

Según los resultados anteriores, la participación de p38<sup>MAPK</sup> parece necesaria para la inducción de NOS-2 por citoquinas. La p38<sup>MAPK</sup> se activa típicamente por doble fosforilación en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>. Por lo tanto, decidimos estudiar la activación de esta quinasa mediante determinación de la fosforilación de estos residuos tras diversos tratamientos de inducción y de supresión.

En la figura 73 puede observarse cómo las citoquinas proinflamatorias provocan la fosforilación en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (y por tanto, la activación) de p38<sup>MAPK</sup>. El pretratamiento con adenosina o ATP 10  $\mu$ M (dato no mostrado), SB-203580 o con el inhibidor de p21<sup>Ras</sup> (FTI-277) impiden esta fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> provocada por la inducción con el *citomix*, lo que coloca a p21<sup>Ras</sup> previamente en la ruta de activación de p38<sup>MAPK</sup> por las citoquinas. De forma adicional, el inhibidor de la adenilil ciclasa (MDL-12330A) impide el efecto supresor de la adenosina, lo que señala a la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> como la mediadora en la supresión por los purinérgicos de la fosforilación de la MAPK desencadenada por el *citomix*.

Esta figura muestra también cómo la preincubación con el inhibidor específico de Rap1 (GGTI-286) suprime totalmente el efecto del purinérgico sobre la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente mediante la determinación de nitritos (Fig. 71). Similares resultados se obtuvieron utilizando ATP o dibutilil-cAMP en lugar de adenosina (todos 10  $\mu$ M) (no mostrado aquí). De esta forma se demuestra que el efecto supresor de los purinérgicos (ATP/adenosina) tiene lugar en

algún punto previo a la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> y que Rap1 es esencial para la supresión por ATP/adenosina de la inducción por el *citomix*.



**Figura 73. Adenosina, FTI-277 y SB-203580 impiden la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.**

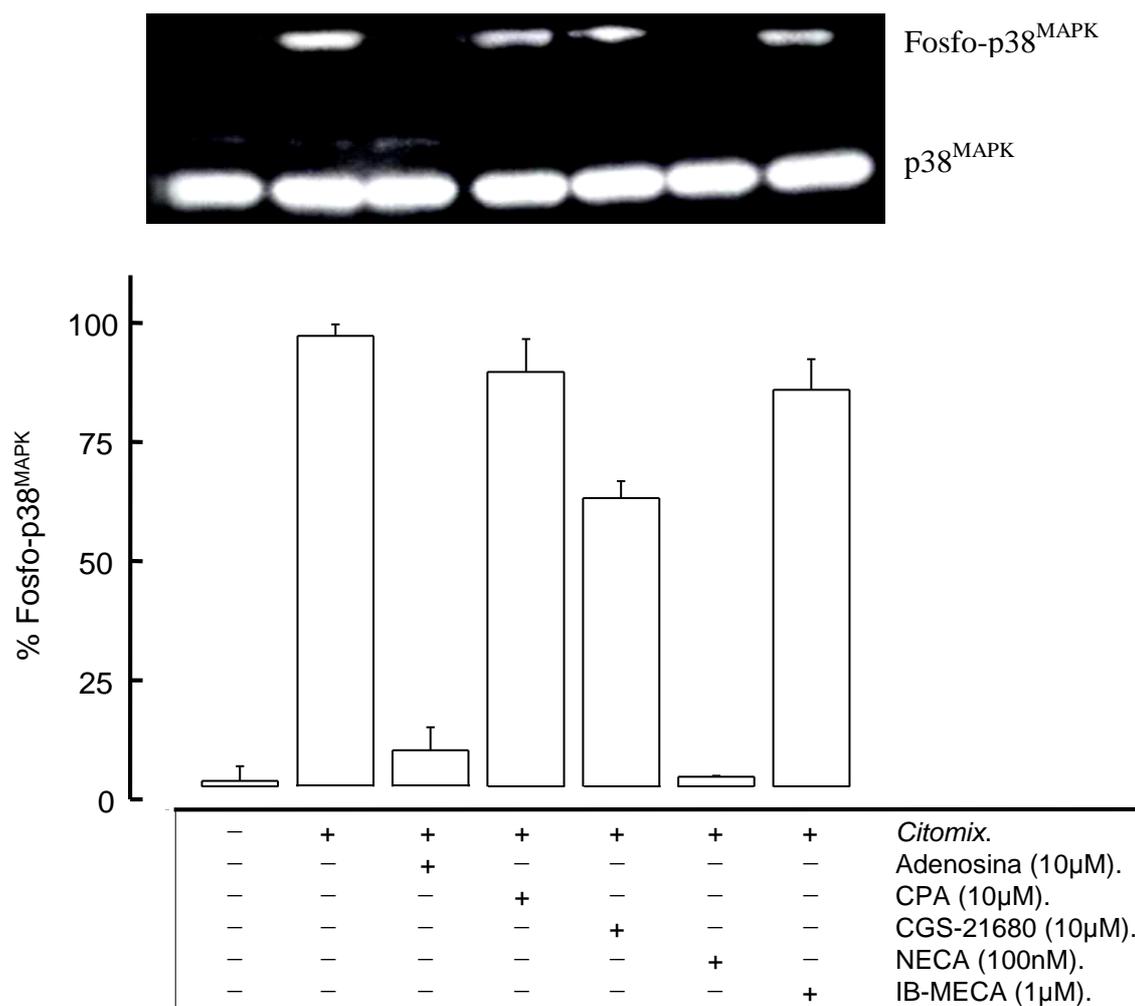
La anisomicina se añadió en el momento de la inducción con *citomix*. Adenosina y SB-203580 se añadieron una hora antes de la inducción. FTI-277 se añadió 120 minutos antes de la inducción. MDL-12330A y GGTI-286 se añadieron 30 minutos y 120 minutos antes que la adenosina, respectivamente. Las fotografías de la parte superior de la figura muestran el resultado del análisis mediante *Western-Blot* de la p38<sup>MAPK</sup> total (control interno, anticuerpo primario para p38<sup>MAPK</sup> independiente de la fosforilación) y de la fosforilación de esta en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (anticuerpo primario específico de fosfo-p38<sup>MAPK</sup>) tras distintos tratamientos. La gráfica de la parte inferior de la figura se obtuvo mediante densitometría de la imagen superior. La fotografía mostrada es representativa de, al menos, tres experimentos en los que se estudió la cinética de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.

La adenosina bloquea la fosforilación y activación de p38<sup>MAPK</sup>, nos planteamos determinar qué subtipo de receptor de adenosina participa en el control de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>. Para ello llevamos a cabo varios experimentos para la determinación de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> tras la estimulación o el bloqueo de cada uno de los cuatro subtipos distintos de receptores de adenosina, mediante el tratamiento con los distintos agonistas (Fig. 74) y antagonistas (Fig. 75) específicos para cada uno de ellos.

En la figura 74 podemos observar cómo sólo el tratamiento con el agonista específico del subtipo A<sub>2B</sub> de receptores de adenosina (NECA, 100 nM) reproduce el efecto supresor de ésta sobre la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> promovida por el *citomix*, apuntando a este subtipo como el mediador de esta supresión por el agente purinérgico.

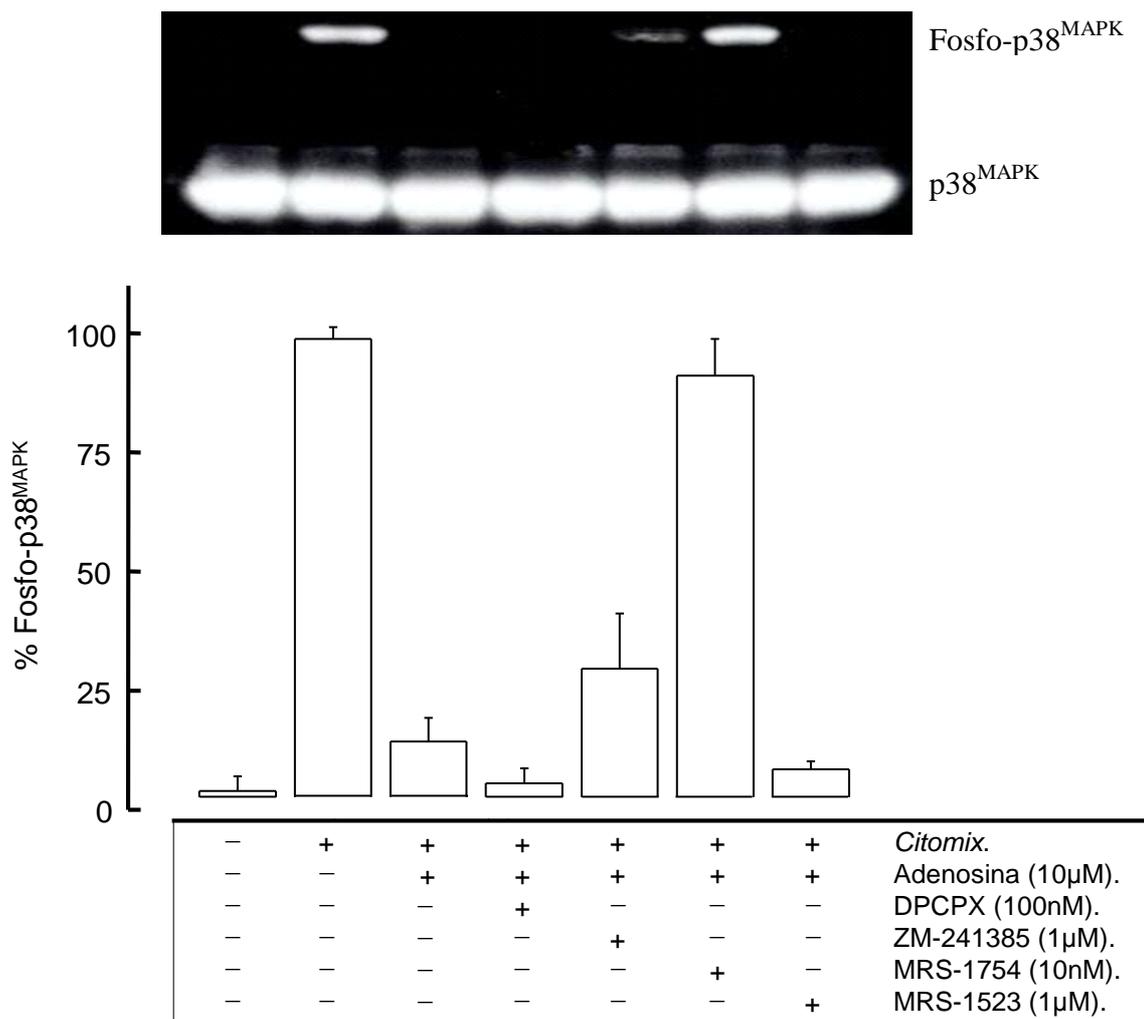
Por otro lado, podemos observar en la figura 75 cómo el tratamiento con el antagonista del subtipo A<sub>2B</sub> (MRS-1754, 10 nM) es el único que evita la supresión por adenosina de la fosforilación por citoquinas de p38<sup>MAPK</sup>, lo que confirma la participación del subtipo A<sub>2B</sub> de receptores de adenosina en la supresión por esta de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> desencadenada por el *citomix*.

Este resultado obtenido al determinar directamente la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> coincide con los obtenidos cuando usamos como indicador la producción de nitritos tras tratamientos con agonistas y antagonistas de adenosina (Fig. 53 – 60). Lo que señala a a la fosforilación de esta MAPK como la diana efectora de la supresión por el agente purinérgico.



**Figura 74. Efecto sobre la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> de los agonistas de receptores de adenosina.**

La adenosina y los agonistas se añadieron una hora antes de la inducción con *citomix*. Los resultados del análisis mediante *Western Blot* mostrados en la parte superior de la figura corresponden al estudio de la fosforilación de la p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (P-p38) tras distintos tratamientos con *citomix*, adenosina, y los distintos agonistas específicos de los cuatro subtipos de receptores de adenosina, en el mismo análisis se estudió la cantidad de p38<sup>MAPK</sup> total (p38) de cada cultivo y tratamiento, cuyos resultados nos sirven como control interno de la técnica. En la parte inferior, se muestra el resultado de la densitometría de las bandas de proteína fosforilada relativa a la proteína total (razón P-p38/p38). Este índice fue normalizado haciendo corresponder el valor de 100% al tratamiento de inducción (*citomix*). La fotografía mostrada es representativa de, al menos, tres experimentos en los que se estudió la cinética de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.



**Figura 75. Efecto sobre la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> de los antagonistas de receptores de adenosina.**

La adenosina se añadió una hora antes de la inducción con *citomix*. Los antagonistas específicos de cada subtipo se añadieron 30 minutos antes que la adenosina. Los resultados del análisis mediante *Western Blot* mostrados en la parte superior de la figura corresponden al estudio de la fosforilación de la p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (P-p38) tras distintos tratamientos con *citomix*, adenosina, y los distintos agonistas específicos de los cuatro subtipos de receptores de adenosina, en el mismo análisis se estudió la cantidad de p38<sup>MAPK</sup> total (p38) de cada cultivo y tratamiento, cuyos resultados nos sirven como control interno de la técnica. En la parte inferior, se muestra el resultado de la densitometría de las bandas de proteína fosforilada relativa a la proteína total (razón P-p38/p38). Este índice fue normalizado haciendo corresponder el valor de 100% al tratamiento de inducción (*citomix*). La fotografía mostrada es representativa de, al menos, tres experimentos en los que se estudió la cinética de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.

### 4.3. Estudio de la participación de NF- $\kappa$ B en la inducción de NOS-2 por las citoquinas.

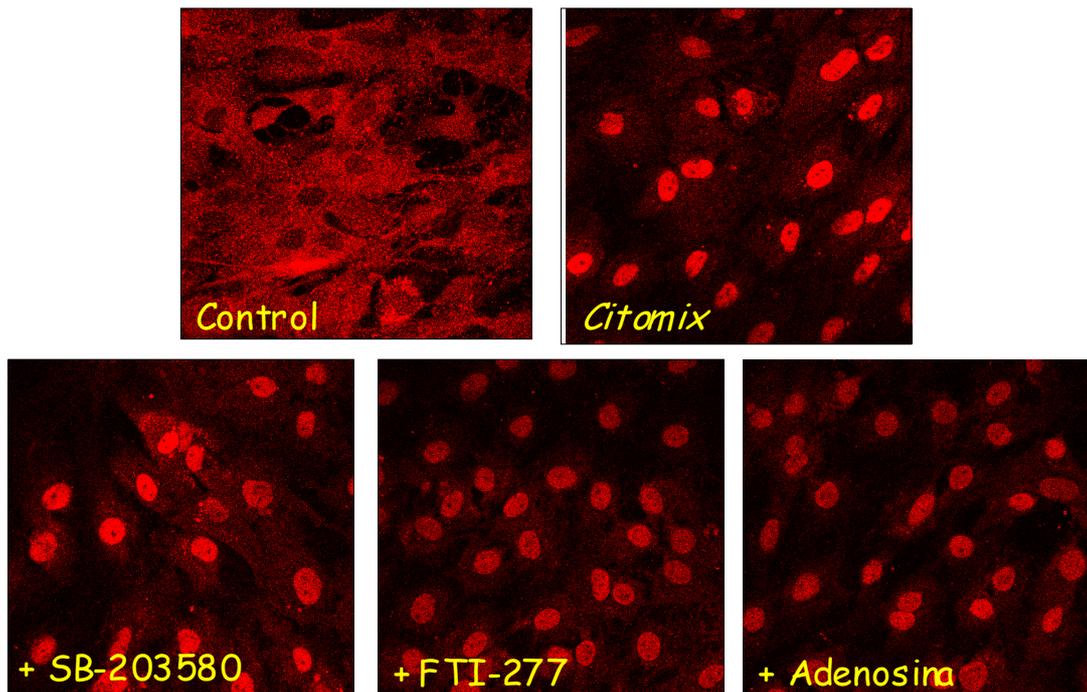
NF- $\kappa$ B es un factor nuclear frecuentemente relacionado con procesos inflamatorios y con la activación de p38<sup>MAPK</sup>. Puesto que esta MAPK se ha mostrado esencial para la inducción de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias, nos propusimos estudiar la posible participación de NF- $\kappa$ B en esta inducción. Para ello diseñamos experimentos para determinar la translocación del factor nuclear al núcleo, y su fosforilación en sus dianas específicas para p38<sup>MAPK</sup>.

#### *Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo.*

El factor nuclear  $\kappa$ B es un dímero formado por las subunidades p65 y p50 que habitualmente se encuentra retenido en el citoplasma por la proteína I- $\kappa$ B $\alpha$ . Cuando ésta es fosforilada y degradada *via* ubiquitina-proteasoma, el dímero p65/p50 se transloca al núcleo donde se une a los promotores correspondientes en sus genes diana, entre los que se encuentra el gen de NOS-2.

Para determinar la localización intracelular de NF- $\kappa$ B, se empleó la técnica de inmunofluorescencia y microscopía confocal. El microscopio confocal permite diferenciar claramente el compartimento citosólico y el nuclear, y por lo tanto, determinar si el NF- $\kappa$ B permanece en el citosol o se ha translocado al núcleo.

Como se muestra en la figura 76, p65 reside en el citoplasma en localización perinuclear en astrocitos sin tratar (campo “control”), mientras que se localiza preferentemente dentro del núcleo en astrocitos tratados con citoquinas (campo “*citomix*”). Es decir, NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma hasta que se induce su translocación por las citoquinas (Baud *et al.*, 1999). En experimentos subsiguientes se determinó la localización de NF- $\kappa$ B tras una serie de tratamientos que ya hemos mostrado que provocan la supresión de la producción de nitritos o que bloquean la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.



**Figura 76. Localización de p65 en cultivos celulares una hora tras la inducción.**

Las fotografías mostradas corresponden a un campo representativo para un cultivo. Mientras que en los cultivos sin tratamiento se encuentra p65/NF- $\kappa$ B (marcado con Cy3™, fluorescencia roja) principalmente en el citoplasma, en todos los demás tratamientos se observa esta subunidad de NF- $\kappa$ B translocada al núcleo. Las fotografías mostradas representan los resultados de, al menos, tres experimentos.

En el campo correspondiente al pretratamiento con SB-203580 se observa que, a pesar de la inhibición de la p38<sup>MAPK</sup>, NF- $\kappa$ B se sigue translocando al núcleo por acción de las citoquinas. Sin embargo no se induce la expresión de NOS-2, como se ha demostrado anteriormente (ver figuras 68, 69 y 72).

Igualmente, observando los campos correspondientes a los tratamientos “*citomix* + FTI-277” (inhibidor de p21<sup>Ras</sup>) y “*citomix* + adenosina” (suprime la inducción de NOS-2 por las citoquinas impidiendo la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>, ver figuras 74 – 76) podemos concluir que ni el inhibidor de p21<sup>Ras</sup> ni la adenosina evitan la translocación de p65 al núcleo celular inducida por las citoquinas, a pesar de que ambos suprimen la inducción de NOS-2 y la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> por citoquinas (ver figuras 71 y 73).

Basándonos en estos resultados, llegamos a la conclusión de que las citoquinas siguen la ruta canónica y liberan a NF- $\kappa$ B de su proteína inhibidora en el citoplasma (I $\kappa$ B $\alpha$ ); esto deja al dímero p65/p50 libre para translocarse al núcleo (ver figura 14). Sin embargo, la mera presencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo no es suficiente para inducir la expresión de NOS-2. Lo que indica que es necesario un segundo proceso para la activación del factor nuclear, probablemente la fosforilación por p38<sup>MAPK</sup>, a su vez activada por las citoquinas en una forma dependiente de p21<sup>Ras</sup> (Fig. 73).

### ***Cinética de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ .***

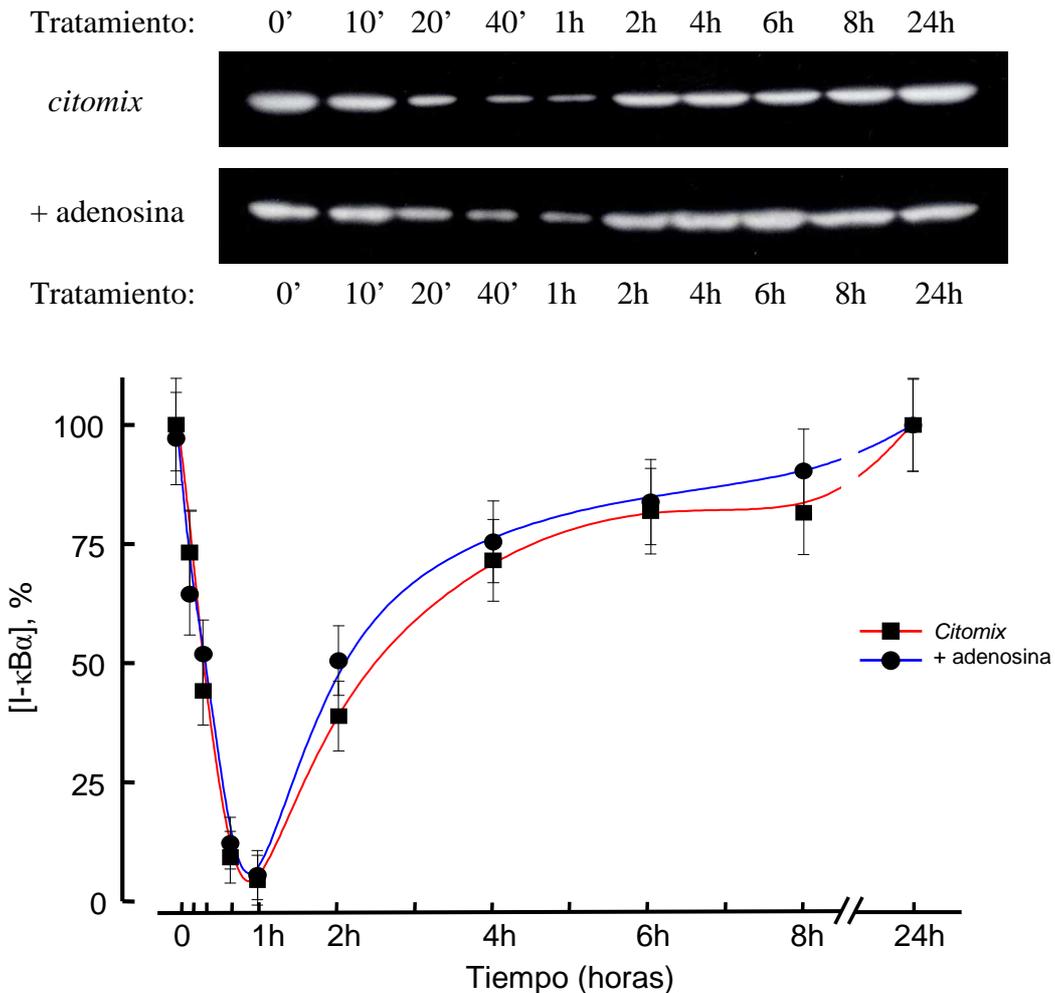
I $\kappa$ B es la proteína que mantiene a NF- $\kappa$ B secuestrado en el citoplasma impidiendo su acción nuclear. Por lo tanto, la translocación de NF- $\kappa$ B implica la separación de este complejo, lo que ocurre normalmente por degradación de I $\kappa$ B. Por lo tanto, decidimos investigar cómo las citoquinas inductoras de NOS-2 daban lugar a la degradación de I $\kappa$ B.

Tal y como puede observarse en la figura 77, en los resultados de ambos experimentos, tras 20 minutos de la adición del *citomix*, la concentración de I $\kappa$ B $\alpha$  empieza a disminuir, teniendo un mínimo a los 60 minutos de tratamiento, tras el cual su concentración se recupera y vuelve a aumentar, dato que casa perfectamente con la localización nuclear de la subunidad p65 (ver figura 76).

La figura 77 muestra cómo la preincubación con adenosina no altera de manera importante la cinética de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  respecto a la descrita por el *citomix*, lo que apoya la conclusión previa de que la supresión de la inducción de NOS-2 por el agente purinérgico no está relacionada con la translocación de p65 al núcleo.

A modo de compendio, la figura 78 muestra las cinéticas obtenidas mediante densitometría de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> y de p65, y de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (ver figuras 33, 34 y 77), así como el momento de translocación de p65 al núcleo tras la inducción descrito en la bibliografía (Baud *et al.*, 1999). Comparando las curvas ilustradas en la figura 78 se observa cómo los diferentes procesos representados tuvieron lugar siguiendo un orden lógico de acuerdo con las afirmaciones comentadas en la introducción y los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, tales como la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de p65 y p50 al núcleo o las fosforilaciones de p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> y de p65 en Ser<sup>536</sup>. En el caso del mismo tratamiento de

inducción a cultivos preincubados durante una hora con adenosina solo tienen lugar la curva de IκBα y la translocación al núcleo de p50 y p65 una hora tras la inducción, no ocurriendo la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> ni la de p65 en Ser<sup>536</sup>, y no acumularse nitritos en el medio (Fig. 51). Merced a estos resultados nos propusimos estudiar la fosforilación de NF-κB.



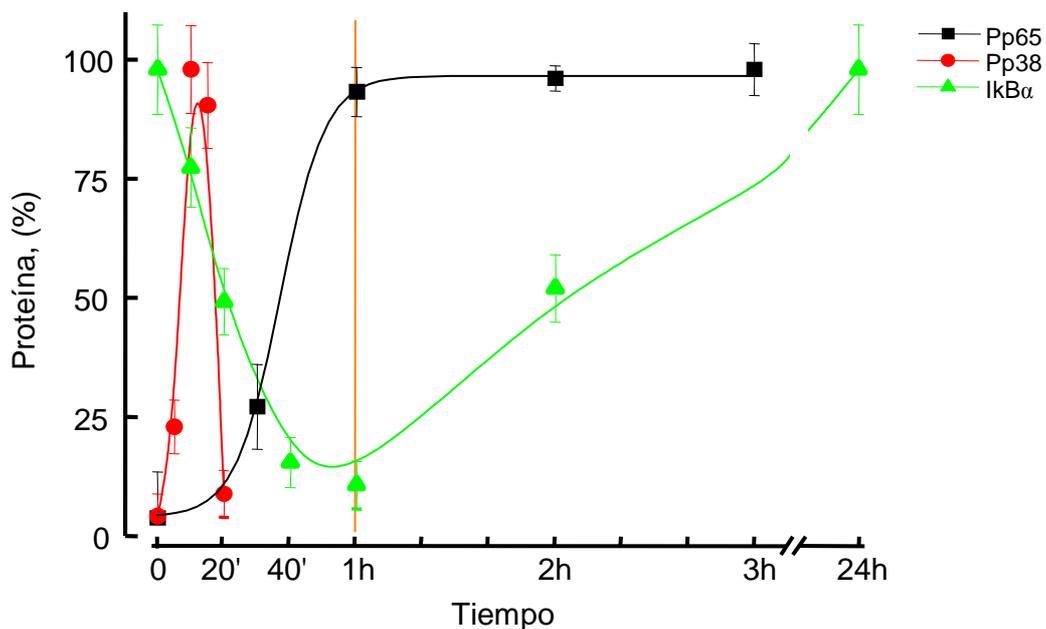
**Figura 77. Cinéticas de degradación de IκBα.**

El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix*. La adenosina fué añadida una hora antes que el *citomix*. La fotografías de la parte superior de la figura muestran el análisis de IκBα mediante *Western-Blot* tras distintos tratamientos de inducción y de supresión. La gráfica muestra el porcentaje de degradación de IκBα tomando el valor 100% al valor inicial de la proteína (tiempo cero) y ha sido obtenida densitometrando las imágenes de *Western-Blot* correspondientes. La fotografía mostrada corresponde a un experimento representativo de varios realizados para determinar la cinética de degradación de IκBα.

### *Fosforilación de NF- $\kappa$ B en la inducción de NOS-2 por las citoquinas.*

Tras haber comprobado que en la inducción de NOS-2 por el *citomix* no basta con la liberación de NF- $\kappa$ B respecto a I $\kappa$ B $\alpha$  y su translocación al núcleo, parece oportuno estudiar la posibilidad de un segundo evento necesario para la actividad de este factor nuclear en la ruta de inducción, en relación a esto se ha descrito en la bibliografía la necesidad de la fosforilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en distintos puntos por diferentes quinasas celulares, siendo la serina 536 un lugar de fosforilación de p65 por p38<sup>MAPK</sup> (Song *et al.*, 2006) (ver “Regulación de NF- $\kappa$ B independientemente de IKK-I $\kappa$ B” en “Introducción”).

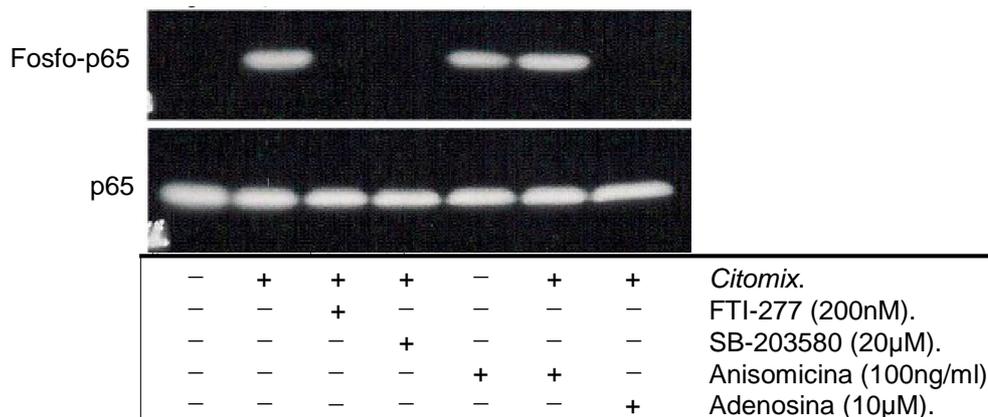
Con el propósito de estudiar la fosforilación de p65 en la serina 536 se llevaron a cabo análisis mediante *Western-Blot* de muestras celulares tomadas 60 minutos tras distintos tratamientos. El tratamiento con las citoquinas resulta en una clara fosforilación de la serina 536 de p65, como se observa en la figura 78.



**Figura 78. Procesos asociados a la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B.**

Las cinéticas han sido recopiladas de figuras mostradas previamente en este trabajo y corresponden a la cinética de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> (rojo, figura 33), la cinética de fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup> (negro, figura 34), la cinética de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (verde, figura 77), y la translocación de p65 al núcleo una hora después de la inducción (naranja, (Baud *et al.*, 1999)). El tiempo 0' es el momento de la inducción con *citomix*.

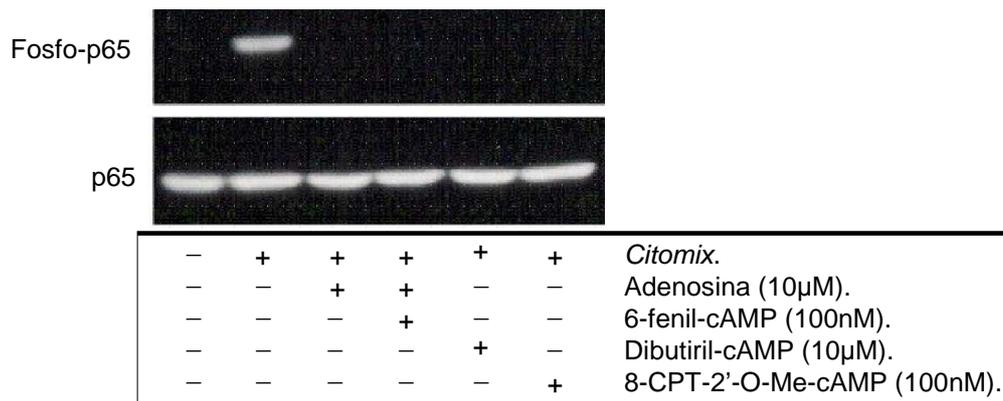
La fosforilación de NF-κB es impedida por los tratamientos que impiden la inducción de NOS-2. El análisis mediante *Western-Blot* mostrado en la figura 79 muestra la ausencia completa de fosforilación en la Ser<sup>536</sup> de p65 cuando las células son pretratadas con los inhibidores de p21<sup>Ras</sup> (FTI-277) y de p38<sup>MAPK</sup> (SB-203580) por separado. Ello indica que ambas proteínas son necesarias para dicha fosforilación y que la supresión de la inducción de NOS-2 es explicable por este bloqueo de la fosforilación de NF-κB. Por otro lado, la anisomicina promueve la fosforilación de p65 en el mismo sitio (por acción de p38<sup>MAPK</sup>), sin embargo, no se observa producción de nitritos (ver figuras 70 y 72), por lo que se puede deducir que no basta la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup> para inducir la expresión de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias en astrocitos primarios de rata. Por su parte, el efecto supresor de la adenosina se acompaña de un bloqueo total de la fosforilación de NF-κB aunque no de su translocación al núcleo (ver figura 76).



**Figura 79.** Los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> y de p21<sup>Ras</sup> impiden la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup>.

Los resultados han sido analizados mediante *Western-Blot* 60 minutos después de la inducción con *citomix* o anisomicina. Adenosina, FTI-277 y SB-203580 se añadieron al medio una hora antes de la inducción con *citomix*.

Experimentos anteriores habían sugerido que la acción de la adenosina estaba mediada por cAMP. Se observa en la figura 80 que el pretratamiento con dibutilil-cAMP reproduce el efecto supresor de la adenosina sobre la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup>, demostrando que la elevación de cAMP es suficiente para explicar completamente la acción supresora de la adenosina.

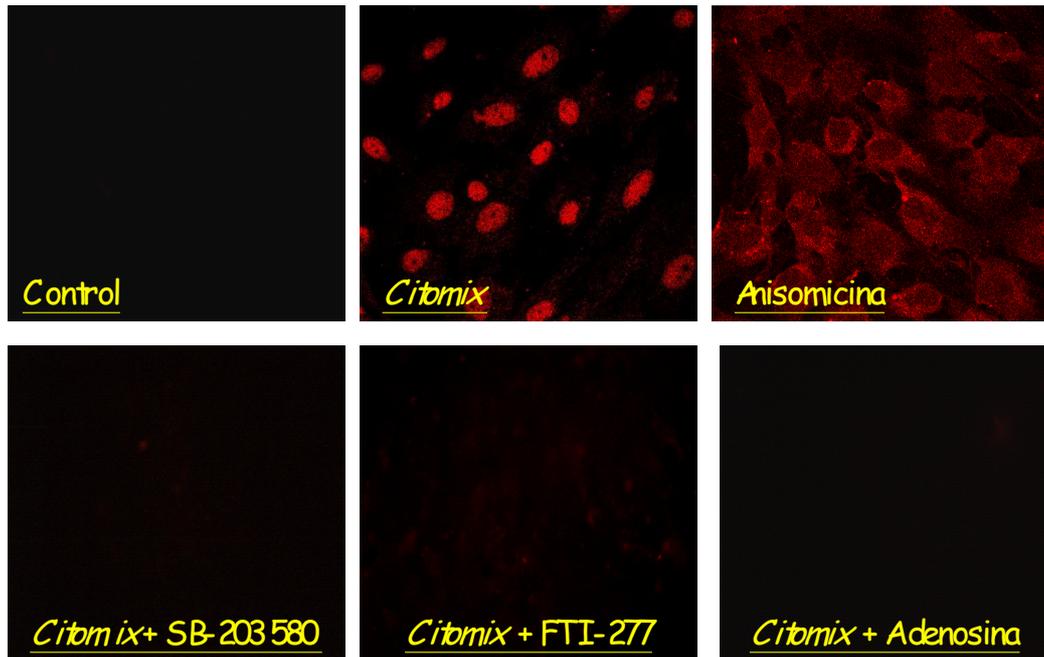


**Figura 80. Agentes purinérgicos y agonista de Epacs suprime la fosforilación de p65.**

Determinación mediante *Western-Blot* de p65 total (utilizada como control) y p65 fosforilada en Ser<sup>536</sup> en muestras de cultivos astrogliales tomadas 60 minutos después de la inducción con *citomix* (IFN- $\gamma$  (50UI/ml) + IL-1 $\beta$  (500ng/ml). Adenosina, dibutilil-cAMP, 6-fenil-cAMP y 8-CPT-2'-O-Me-cAMP se añadieron al medio de tratamiento una hora antes de la inducción.

El pretratamiento con 6-fenil-cAMP (agonista específico de PKA) no reproduce el efecto de la adenosina, lo que corrobora la idea de que PKA no participa en la ruta supresora. Por otro lado, el hecho de que el agonista específico de las proteínas Epacs (8-CPT-2'-O-Me-cAMP, 100 nM) ofrezca un resultado similar al observado con los pretratamientos con adenosina y con dibutilil-cAMP, apunta a estas proteínas como mediadoras de la supresión por el agente purinérgico y por la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub>.

Paralelamente a los estudios mediante *Western-Blot* que nos indican la masa de p65 fosforilado, investigamos la localización subcelular de dicha proteína mediante microscopía confocal. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 81.



**Figura 81. Fotografías confocales de cultivos celulares una hora tras la inducción.**

Las fotografías mostradas corresponden a un campo representativo para un cultivo. Mientras que en los cultivos sin tratamiento se encuentra p65/NF- $\kappa$ B (marcado con Cy3<sup>TM</sup>, fluorescencia roja) principalmente en el citoplasma, en todos los demás tratamientos se observa esta subunidad de NF- $\kappa$ B translocada al núcleo. Las fotografías mostradas representan los resultados de, al menos, tres experimentos.

Los campos correspondientes al tratamiento control y *citomix* en la figura 81 relacionan la cascada de señalización de la inducción de NOS-2 por citoquinas proinflamatorias con la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup> y con su translocación al núcleo. Se observa como en los cultivos tratados con adenosina, FTI-277 o SB-203580 no existe señal para la fosfoserina<sup>536</sup> de p65 (marcado con Cy3<sup>TM</sup>, fluorescencia roja) al igual que en los cultivos controles sin tratar (primer campo). Por el contrario, en los cultivos tratados con *citomix* o anisomicina sí que se observa esta fosforilación de p65, sin embargo, en el primer caso p65 está principalmente en el núcleo mientras que en el caso de la anisomicina se localiza en el citosol. Lo que indica que la activación de p38<sup>MAPK</sup> y fosforilación de NF- $\kappa$ B no son suficientes para su translocación.

A la luz de los resultados mostrados en las figuras 76 – 81 se puede concluir que la translocación de NF- $\kappa$ B promovida por el *citomix* no es suficiente para la inducción de la expresión de NOS-2, sino que precisa de la fosforilación de p65 en, al menos, la

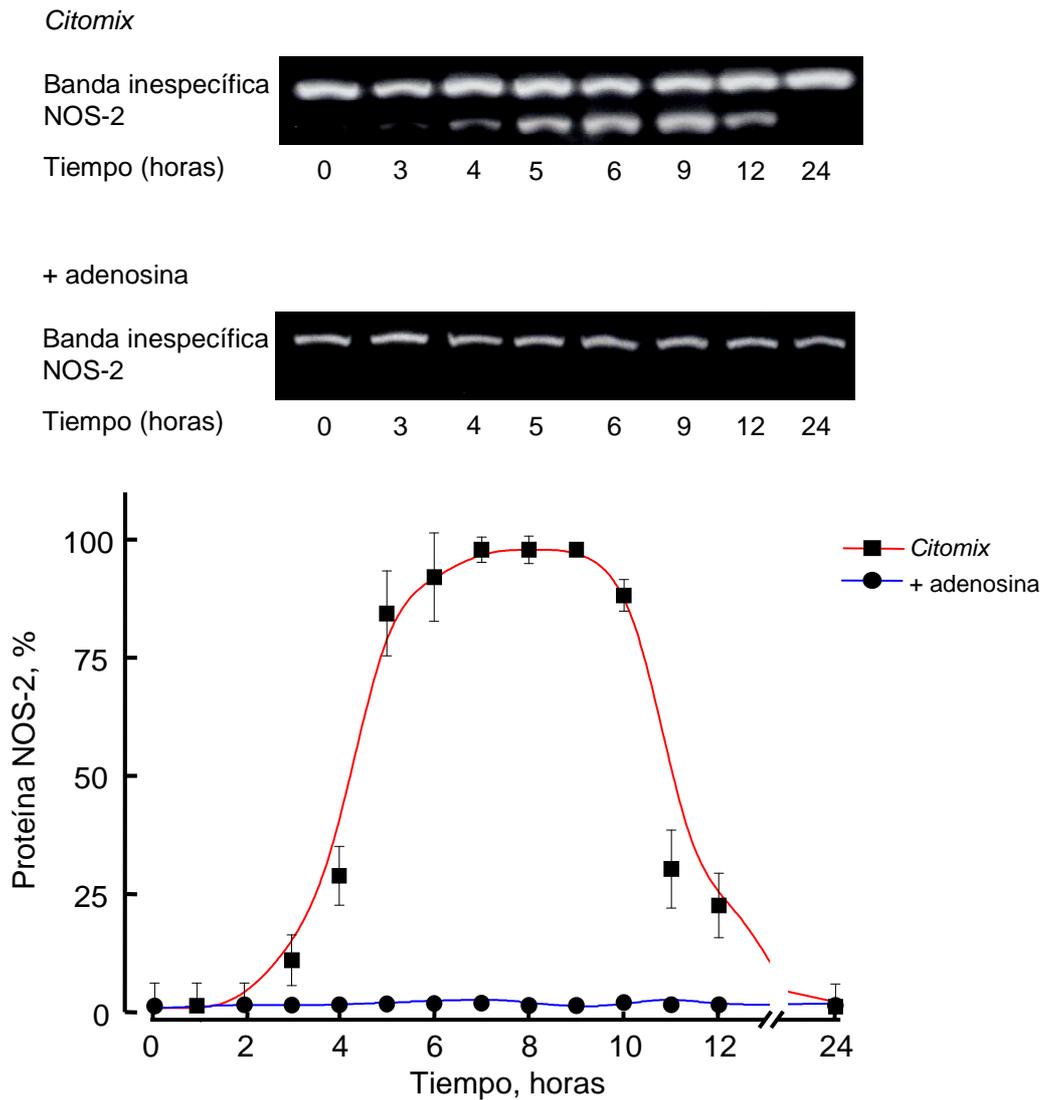
Ser<sup>536</sup> para que NF- $\kappa$ B pueda ejercer plenamente su actividad transactivadora. Así como que ambos procesos de translocación y fosforilación de la serina 536 son independientes. Tras haber demostrado que la adenosina, al igual que los inhibidores de p21<sup>Ras</sup> y de p38<sup>MAPK</sup>, impide la activación de p38<sup>MAPK</sup> por las citoquinas (ver figuras 73 y 74), concluimos que el efecto supresor se debe al impedimento de la activación de p38<sup>MAPK</sup> por las citoquinas y de la subsecuente fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup>, así como que la expresión de NOS-2 en nuestros cultivos y condiciones experimentales es controlada por la activación de NF- $\kappa$ B, la cual requiere la liberación del factor nuclear p65/p50 respecto a I- $\kappa$ B $\alpha$  (dependiente de las citoquinas pero no de p38<sup>MAPK</sup> ni de p21<sup>Ras</sup>) y la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup> (dependiente de p38<sup>MAPK</sup> y de p21<sup>Ras</sup>, a su vez dependientes de las citoquinas).

#### **4.4. Expresión del gen de NOS-2.**

Llegados a este punto nos preguntamos si la actividad de p38<sup>MAPK</sup> y la translocación y fosforilación de p65 son los únicos procesos determinantes de la supresión por adenosina de la inducción de NOS-2 por el *citomix*. Por ello se diseñaron varios experimentos para determinar la cinética de expresión del gen de NOS-2 así como su expresión tras varios tratamientos, los resultados se muestran a continuación.

##### ***Estudios sobre la proteína NOS-2.***

En primer lugar se determinó el patrón de expresión de la proteína NOS-2 tras el tratamiento de inducción con el *citomix* y tras el tratamiento de supresión de ésta por la adenosina, determinación que se llevó a cabo mediante *Western-Blot*. En este caso utilizamos anticuerpos anti-NOS-2 policlonales de Santa Cruz Biotechnology, Inc., los cuales proporcionan, tras el revelado, una banda adicional inespecífica que usamos como control interno para la cuantificación de proteína NOS-2. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 82.



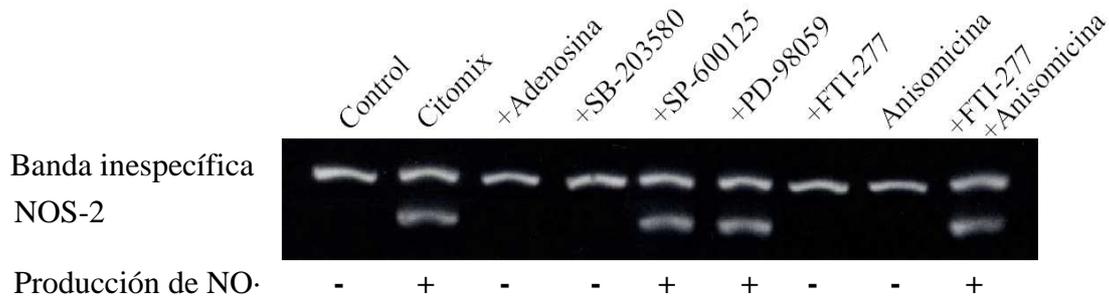
**Figura 82. Cinética de proteína NOS-2 tras tratamientos citomix y citomix+adenosina.**

Las imágenes de la parte superior muestran los resultados obtenidos tras la determinación de proteína NOS-2 mediante *Western-Blot*. El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix*. La adenosina (10  $\mu$ M) se añadió una hora antes de la inducción. La gráfica de la parte inferior de la figura fue obtenida por densitometría de las bandas correspondientes en las fotografías mostradas en la parte superior y representa la concentración de NOS-2 en las muestras. El valor 100 % es el valor más alto obtenido tras dividir cada banda de NOS-2 entre su correspondiente banda inespecífica (ambos valores densitometrados).

Una primera observación destacable en la figura 82 es que en el caso de la adenosina no existe expresión de NOS-2, lo que demuestra que la ausencia de producción de NO $\cdot$  en este tratamiento observada anteriormente (Fig. 51) se debe efectivamente a la ausencia de expresión de la proteína NOS inducible y no a una

posible desestabilización de la proteína ya sintetizada o a la inhibición de la actividad de la enzima.

También se puede concluir de la figura 82 que una incubación de 6 horas tras la inducción es suficiente para obtener una cantidad de proteína significativa por lo que este periodo de tiempo es el que se utilizó en los experimentos posteriores conducentes a verificar la acción de los distintos tratamientos con un efecto ya conocido sobre la acumulación de nitritos sobre la expresión de la proteína NOS-2. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación y se han incluido los resultados obtenidos previamente respecto a la producción de NO $\cdot$  con estos mismos tratamientos.



**Figura 83. Estudio de la supresión de la expresión del gen de NOS-2 (proteína).**

La imagen muestra los resultados obtenidos tras la determinación de proteína NOS-2 mediante *Western-Blot*. Se incluye la banda inespecífica que usamos como control interno y la banda específica de NOS-2, así como los resultados obtenidos previamente respecto a la producción de NO $\cdot$  con estos mismos tratamientos. El tiempo 0' es el momento de inducción con anisomicina (100ng/ml) o *citomix*. Adenosina (10  $\mu$ M), SB-203580 (20  $\mu$ M), SP-600125 (20  $\mu$ M), PD-98059 (20  $\mu$ M) y FTI-277 (200 nM) se añadieron una hora antes de la inducción. Las muestras fueron tomadas 6 horas después de la inducción.

A la luz de los resultados mostrados en la figura 83 se puede concluir que los efectos supresores de los distintos tratamientos sobre la inducción de NOS-2 por las citoquinas se deben, efectivamente, a la supresión de la producción de la enzima, lo que nos permite descartar una inhibición de la actividad de la enzima.

***Estudios sobre el gen de NOS-2 (RT-PCR del mRNA).***

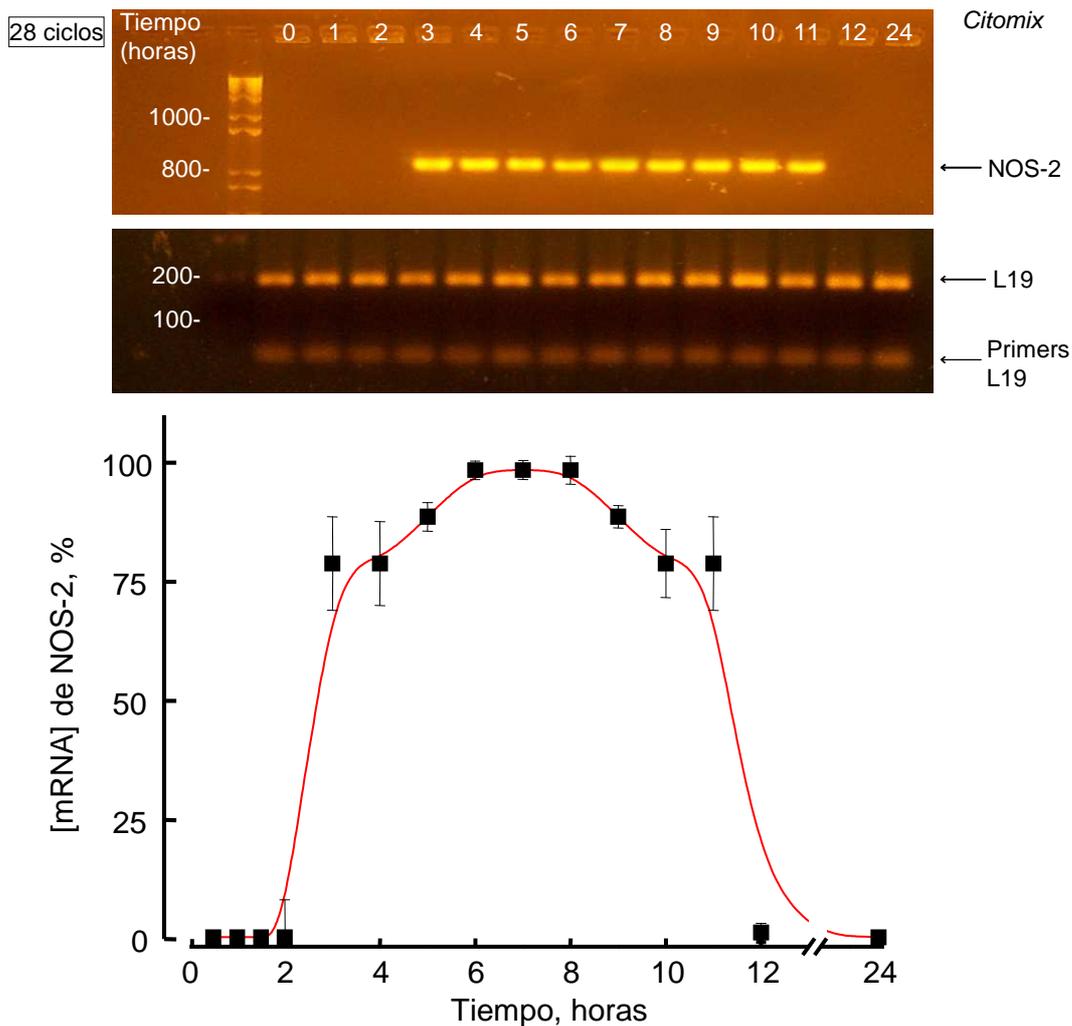
La última conclusión nos lleva a preguntarnos si la supresión tiene lugar a nivel de la inducción génica, de la transcripción, de la estabilidad del mRNA de NOS-2 o de la traducción.

Nuestra hipótesis inicial a este respecto es que la supresión radica en la falta de unión de p65/p50 al promotor del gen de NOS-2 (ver figuras 76 – 81), sugerida también por otros en la bibliografía (Murphy *et al.*, 1995; Lin y Murphy, 1997). No obstante, es necesario estudiar la cinética de producción del RNA mensajero de la proteína para confirmar que los efectos observados se deben, efectivamente, a una ausencia de inducción génica o determinar si existe una acción sobre la traducción del mRNA de NOS-2.

En la figura 84 se muestran los resultados de electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR y la gráfica correspondiente obtenida por densitometría, se observa la variación de RNA mensajero de NOS-2 en relación al tiempo de contacto con el *citomix* mostrando un máximo de mensajero a partir de las 6 horas de tratamiento y hasta las 8 horas, cuando empieza a descender, siendo prácticamente inexistente a partir de las 12 horas.

En posteriores experimentos, la determinación de mRNA de NOS-2 se realizó en muestras extraídas seis horas después de la inducción con el *citomix* ya que, según se observa en la figura 84, tras este periodo de tiempo la cantidad de mRNA proporciona una cantidad de fragmentos suficiente para estudiar la inducción del gen de NOS-2 por el *citomix*.

La cinética de expresión de mRNA de NOS-2 se ajusta a la cinética de proteína NOS-2 determinada anteriormente mediante *Western-Blot* (ver figura 82).

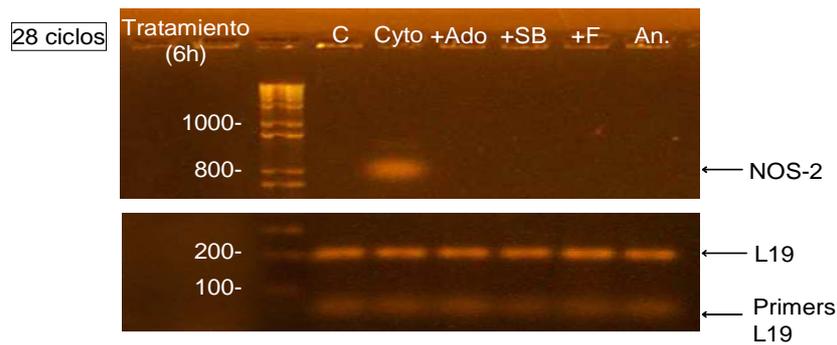


**Figura 84. Cinética de expresión de mRNA de NOS-2 tras tratamiento citomix.**

Las imágenes de la parte superior muestran los resultados de la determinación de mRNA de NOS-2 mediante RT-PCR tras distintos periodos de incubación con el tratamientos de inducción. El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix*. El tamaño de los fragmentos de NOS-2 es de 807 pb, mientras que los fragmentos del RNA control utilizado en este estudio (proteína ribosomal L19) son de 194 pb. El valor 100% es el valor más alto obtenido tras dividir cada banda de mRNA de NOS-2 entre su correspondiente banda de L19 (ambos valores densitometrados).

#### Síntesis del RNA mensajero de NOS-2 en distintos tratamientos.

También se realizó un estudio tomando las muestras tras 6 horas de inducción de células preincubadas durante una hora con distintos agentes farmacológicos que habían mostrado en estudios previos una supresión de la síntesis de NOS-2 y de la acumulación de nitritos, observando en todos los casos una ausencia de RNA mensajero de NOS-2.



**Figura 85. Síntesis del RNA mensajero de NOS-2 en distintos tratamientos.**

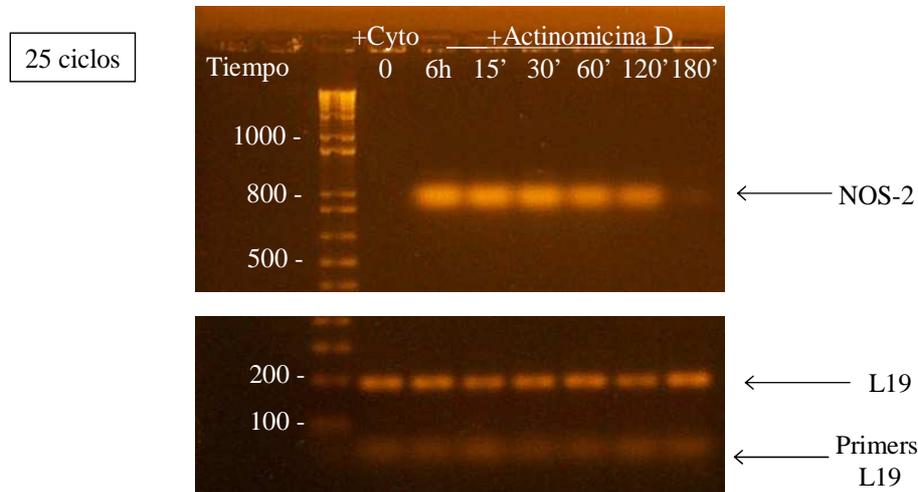
La figura muestra los resultados de la determinación de mRNA de NOS-2 mediante RT-PCR tras distintos tratamientos. El gel de la parte superior de la fotografía corresponde a los resultados obtenidos con los cebadores de NOS-2 y el gel de la parte inferior a los obtenidos con los cebadores de L19, las alícuotas de un mismo tratamiento tomadas para una y otra ampliación corresponden a una misma muestra. El tamaño de los fragmentos de NOS-2 es de 807 pb, mientras que los fragmentos del RNA control utilizado en este estudio (proteína ribosomal L19) son de 194 pb. El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix* (Cyto). Ado (adenosina, 10  $\mu$ M), SB (SB-203580, 20  $\mu$ M) y F (FTI-277, 200 nM) fueron añadidos una hora antes de la inducción. An. (anisomicina, 100 ng/ml) se añadió al mismo tiempo que el *citomix*. Las muestras fueron tomadas 6 horas después de la inducción.

A la luz de la figura 85 se puede concluir que los principales tratamientos realizados caracterizados por la falta de acumulación de nitritos en el medio tras 24 horas y la ausencia destacable de proteína NOS-2, realmente suprimen la inducción génica correspondiente reduciendo así su campo de acción supresora a la falta de capacidad activadora de NF- $\kappa$ B cuando la subunidad p65 no está fosforilada en Ser<sup>536</sup> (adenosina, FTI-277, y SB-203580) o cuando estándolo, no se transloca al núcleo (anisomicina).

#### Estabilidad del transcrito.

De forma adicional a la supresión de la inducción por citoquinas cuando se han preincubado las células con adenosina, se ha sugerido una posible alteración de la estabilidad del RNA mensajero por el nucleósido (Park *et al.*, 1994; Park y Murphy, 1996; Fotheringham *et al.*, 2004), disminuyendo así el tiempo de traducción y la cantidad de NOS-2 sintetizada. Para comprobar esta hipótesis se trataron con actinomicina D (5  $\mu$ g/ml), un inhibidor de la transcripción, células preincubadas durante

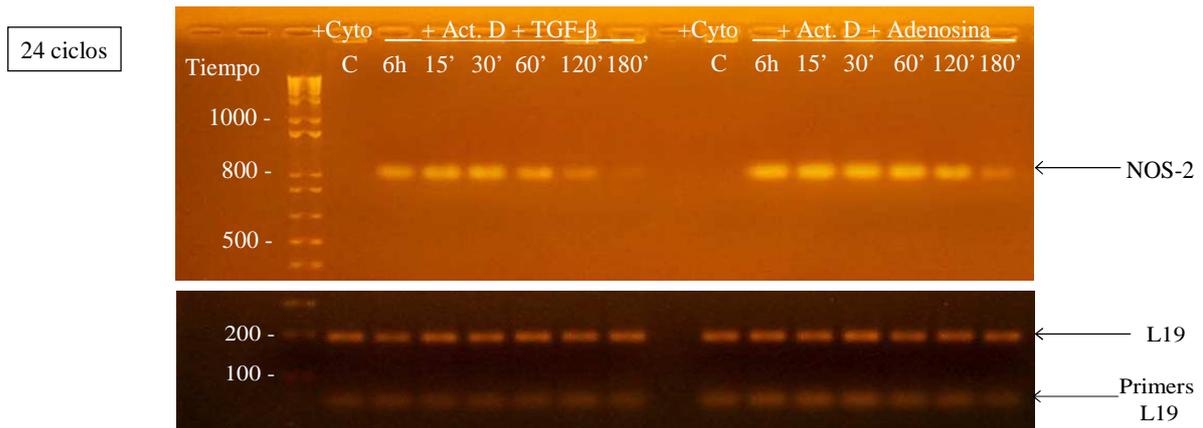
6 horas con el tratamiento inductor *citomix*, y se analizó la cantidad de RNA mensajero en las siguientes 3 horas, mediante RT-PCR, tal y como se muestra a continuación.



**Figura 86. Estabilidad del transcrito: Actinomicina D.**

Imágenes de PCR a punto final marcadas con bromuro de etidio tras electroforesis en el gel de agarosa, en las que se muestra mRNA de NOS-2 y la proteína ribosomal L19 determinados mediante RT-PCR. El tamaño de los fragmentos de mRNA de NOS-2 es de 807 pb, mientras que los fragmentos del RNA control utilizado en este estudio (proteína ribosomal L19) son de 194 pb. El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix* (Cyto). La actinomicina D (5 µg/ml) se añadió 6 horas después de la inducción. Las muestras fueron tomadas en los tiempos indicados en la fotografía a partir de 6 horas tras la inducción.

La figura 86 muestra una permanencia en el medio del mRNA de dos horas, a continuación se repitió el mismo experimento pero adicionando al mismo tiempo que la actinomicina D, adenosina (10 µM) y un factor descrito como desestabilizador del RNA mensajero, el TGF-β (10 ng/ml) (Park *et al.*, 1994), ofreciendo los resultados mostrados en la figura 87.

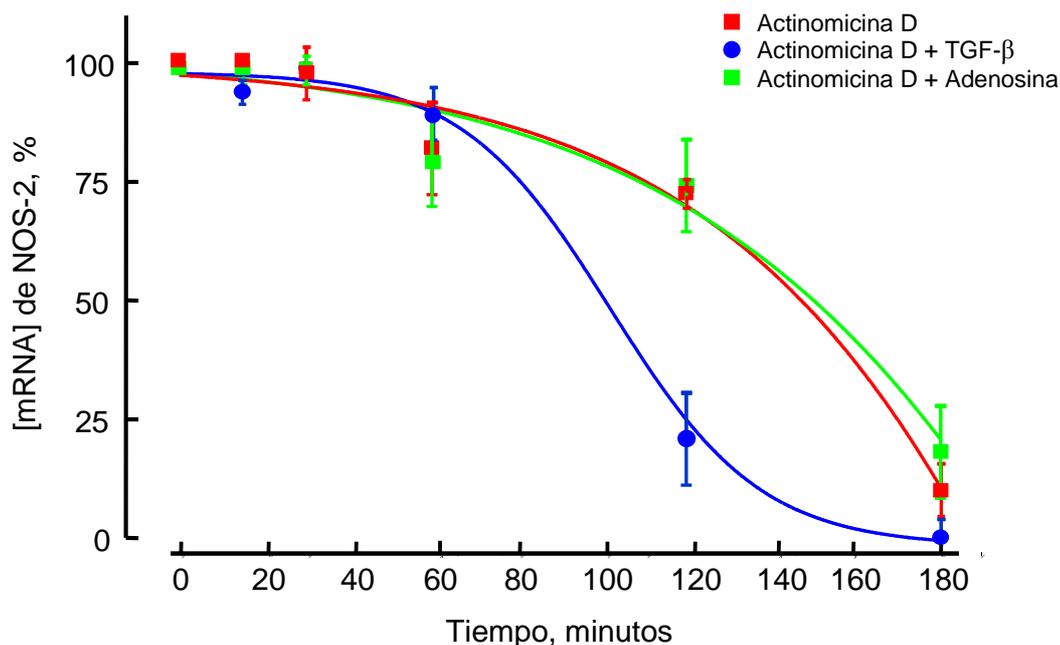


**Figura 87. Estabilidad del transcrito: Actinomicina D + TGF-β y Actinomicina D + Adenosina.**

Imágenes de PCR a punto final marcadas con bromuro de etidio tras electroforesis en el gel de agarosa, en las que se muestra mRNA de NOS-2 y la proteína ribosomal L19 determinados mediante RT-PCR. El tamaño de estos fragmentos de NOS-2 es de 807 pb, mientras que los fragmentos del RNA control utilizado en este estudio (proteína ribosomal L19) son de 194 pb. El tiempo 0' es el momento de adición del *citomix* (Cyto). La actinomicina D (5 µg/ml), TGF-β (10 ng/ml) y adenosina (10 µM) se añadieron 6 horas después de la inducción. Las muestras fueron tomadas en los tiempos indicados a partir de 6 horas tras la inducción.

En la figura 87 se muestran los resultados de los cotratamientos con TGF-β y adenosina junto a citomix + actinomicina D y se puede observar una cantidad de mRNA de NOS-2 marcadamente menor 120 minutos después de la adición de actinomicina D y TGF-β mientras que en el caso del tratamiento que incluye adenosina, una cantidad similar se observa 180 minutos después de la adición de ésta junto a la actinomicina D, un dato muy parecido al observado en la figura 86 cuando tratamos los cultivos con actinomicina D solamente.

Para ilustrar gráficamente los resultados mostrados en las figuras 86 y 87 se densitometraron las bandas correspondientes a los distintos tiempos y tratamientos y se obtuvieron las cinéticas de degradación de mRNA de NOS-2 que se muestran en la figura 88.



**Figura 88. Estabilidad del transcrito: figuras 89 y 90.**

Los datos se obtuvieron mediante densitometría de las bandas de mRNA de NOS-2 de los resultados mostrados en las figuras 89 y 90, realizando una normalización con sus respectivas bandas de la proteína ribosomal L19 usada como control. El valor 100% corresponde a la [mRNA] de NOS-2 inicial de cada uno. El valor 0% corresponde a la mínima [mRNA] de NOS-2. El tiempo 0' es el momento de máxima cantidad de mRNA (6 horas tras la adición del *citomix*). Las cinéticas de degradación corresponden a los tratamientos con actinomicina D sólo (rojo), junto a TGF-β (azul) y junto a adenosina (verde).

En la figura 88 se muestran las cinéticas de degradación del mRNA de NOS-2 tras distintos tratamientos y se observa claramente cómo en cultivos primarios de astrocitos, el TGF-β, que favorece la degradación del mRNA, genera una cinética de [mRNA] que comienza a disminuir tras la primera hora de cotratamiento junto a actinomicina D y alcanza un mínimo tres horas después, mientras que en el caso del tratamiento con actinomicina D únicamente y junto a adenosina, la disminución comienza a partir de la segunda hora y describen curvas similares.

Comparando ambos cotratamientos (TGF-β y adenosina) entre sí y con el tratamiento con actinomicina D sola se puede afirmar que la adenosina no altera la estabilidad del transcrito ya que la concentración de éste comienza a disminuir a partir de la tercera hora de cotratamiento, al igual que en el caso de tratamiento con actinomicina D, y considerablemente diferente al cotratamiento con TGF-β.



## **DISCUSIÓN.**



La producción de óxido nítrico en gran cantidad esta relacionada con enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas, con excito-toxicidad tras procesos de isquemia-reperfusión, y con estados patológicos de tipo inflamatorio. Los astrocitos en el cerebro sano no son capaces de producir grandes cantidades de NO· pero cuando se activan, desarrollan la capacidad de generar NO· en niveles inflamatorios deletéreos (Bhat *et al.*, 2002). Por esta razón, el control de la inducción de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias constituye una diana terapeutica para paliar los efectos nocivos de ciertos estados patológicos que cursan con inflamación.

Las combinación de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$  induce la expresión de NOS-2 y la consecuente generación de NO· en astrocitos cerebelosos, que se acumula en el medio como nitritos. La inducción es rápida, tanto en la producción de mRNA como en la de proteína se activan en astrocitos primarios de tal forma que en 4-6<sup>o</sup> horas existe una acumulación significativa de nitritos. Estos datos contrastan con los resultados del grupo de Murphy en 2000, que detectaba nitritos producidos por NOS-2 astroglial tras 24 horas de isquemia. Este retraso puede deberse a la necesidad de una activación microglial previa que constituya una fuente de IL-1 $\beta$  (Hu y Van Eldik, 1999), es más, la NOS-2 astrocítica se colocaliza con la IL-1 $\beta$  microglial en el cerebro *post-mortem* de enfermos de encefalomiелitis asociada a infección por VIH (Zhao *et al.*, 2001).

Esta necesidad del gen de NOS-2 en astrocitos de recibir una segunda señal inductora (Bhat *et al.*, 2003) constituye un mecanismo de regulación de la inflamación. Los astrocitos son el tipo celular mayoritario del sistema nervioso central y su reacción inflamatoria, aunque a nivel individual sea muy inferior a la de la microglía, puede llegar a ser importante. La proliferación inflamatoria de astrocitos, la formación de una cicatriz glial, es un proceso que altera la organización topográfica y la función del tejido neural circundante, lo que tiene consecuencias funcionales. Por ello, es importante regular de manera precisa la inducción de la NOS-2 astroglial.

En los estudios de expresión, tanto del mRNA como de la proteína NOS-2, el pretratamiento con adenosina la suprime dramáticamente, lo que apunta a que la ausencia de producción de NO· se debe a la falta de inducción de NOS-2 y no a otras acciones. De hecho, la ausencia total de mRNA de la proteína en los cultivos preincubados con el nucleósido indica que la supresión se debe exclusivamente al

impedimento de la inducción génica por citoquinas pro-inflamatorias, y descarta posibles alteraciones de la traducción o un retraso en la inducción génica. También se ha sugerido que la supresión se debe a una alteración de la estabilidad del mensajero (Park y Murphy, 1996; Fotheringham *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio, el cotratamiento de *citomix* con actinomicina D (un inhibidor de la transcripción), en el que la [mRNA] permanece estable en el medio durante dos horas, tanto al cotratarse las células con actinomicina D como con ésta más adenosina, y a diferencia del cotratamiento de actinomicina D junto a TGF- $\beta$ , un agente desestabilizador del mRNA, en el que la [mRNA] permanece estable durante una hora.

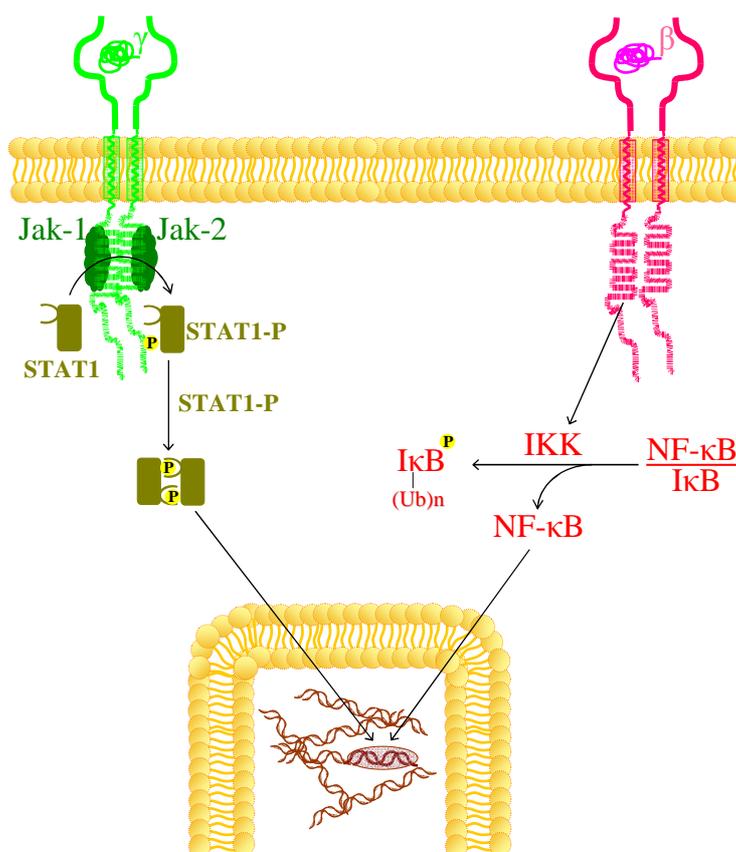
Finalmente, la comparación mediante RT-PCR del mRNA de NOS-2 de los cotratamientos que muestran una supresión de la acumulación de nitritos, de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> en Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> o de p65 en Ser<sup>536</sup> o de la translocación de éste último al núcleo, demuestra que la supresión se debe únicamente a la falta de capacidad activadora de NF- $\kappa$ B cuando la subunidad p65 no está fosforilada por p38<sup>MAPK</sup> en, al menos, la Ser<sup>536</sup> (adenosina, FTI-277, SB-203580) o cuando estando este fosforilado, no se transloca al núcleo (anisomicina) (Fig. 88).

### **Inducción de NOS-2 en astrocitos cerebelosos.**

La producción de nitritos tras la adición de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$  ocurre gracias a varias cascadas de señalización (Jana *et al.*, 2005). Respecto a la ruta desencadenada por el IFN- $\gamma$  en astrocitos, la ruta canónica descrita implica a las proteínas JAK/STAT (Aktan, 2004). Respecto a las cascadas de señalización relacionadas con la IL-1 $\beta$ , en ellas se incluyen varios grupos de proteínas quinasas tales como PKC (Diaz-Guerra *et al.*, 1996), CaMK-2 y las tirosina quinasas solubles, implicadas en la activación de NF- $\kappa$ B, entre otros, en astrocitos (Neary *et al.*, 1999; Abe y Saito, 2000; Choi *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2003).

NF- $\kappa$ B es un dímero formado por las subunidades p65 y p50 que habitualmente se encuentra retenido en el citoplasma por la proteína I $\kappa$ B, cuando esta es fosforilada y degradada *via* ubiquitina-proteasoma, el dímero p65/p50 se transloca al núcleo, donde se une a los promotores correspondientes de sus genes diana (Baud *et al.*, 1999), en nuestro estudio el gen de NOS-2.

También otros trabajos han descrito la participación de NF- $\kappa$ B en la inducción de NOS-2 (Diaz-Guerra *et al.*, 1996; Nishiya *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Nomura, 2001; Jana *et al.*, 2005) y se le ha atribuido un papel clave en la activación transcripcional de la enzima en respuesta a LPS y citoquinas proinflamatorias en la mayoría de tipos celulares gliales (Xie *et al.*, 1994; Eberhardt *et al.*, 1998; Ganster *et al.*, 2001) incluidos los astrocitos (Kristal A. R. *et al.*, 1994; Kristal B. S. *et al.*, 1994; Kristal *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997).



**Figura 89. Las rutas de señalización de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  implican a Jak/STAT y a NF- $\kappa$ B, respectivamente.**

La inducción de NOS-2 en astrocitos cerebelosos por la combinación de citoquinas IFN- $\gamma$  + IL-1 $\beta$  ocurre mediante dos rutas de señalización intracelular distintas e independientes. Por un lado, la ruta canónica descrita en la bibliografía para el IFN- $\gamma$ , que implica a las proteínas Jak/STAT (Aktan, 2004). Y por otro, la ruta desencadenada por la IL-1 $\beta$ , que implica al factor nuclear  $\kappa$ B, y que es el objeto de estudio en este trabajo.

La cascada de señalización desencadenada por la IL-1 $\beta$  en astrocitos implica a la proteína p21<sup>Ras</sup>, la cual puede provocar la activación de distintas quinasas celulares por diferentes vías.

Una quinasa frecuentemente asociada a la actividad de p21<sup>Ras</sup> es la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) (Birkenkamp *et al.*, 2004; Proud, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2006), no obstante, el tratamiento con su inhibidor farmacológico específico (LY-294002) descarta la participación de esta quinasa tanto en la ruta de inducción de NOS-2 por el las citoquinas como en la ruta de supresión por los compuestos purinérgicos en los cultivos primarios de astrocitos cerebelosos de rata.

Otras quinasas intracelulares relacionadas con p21<sup>Ras</sup> son las MAPKs. Estas proteínas pueden regular muchas respuestas celulares mediante cambios en la expresión génica, incluyendo proliferación, la respuesta inflamatoria, e incluso la muerte celular, según el tipo celular y las condiciones fisiológicas (Kyriakis y Avruch, 1996; Ip y Davis, 1998; Cobb, 1999; Chang y Karin, 2001).

La superfamilia de las MAPKs incluye tres subfamilias: p38<sup>MAPK</sup> (también conocida como la quinasa de estrés SAPK-2), p54<sup>JNK</sup> (también conocida como la quinasa de respuesta a estrés SAPK-1, o quinasa del extremo N-terminal de c-jun, JNK), y p42/p44<sup>MAPK</sup> o ERKs 1/2.

En general, las ERKs 1/2 son activadas por receptores tirosina quinasas y receptores acoplados a proteínas G, y están más relacionadas con las respuestas proliferativas mediante la actuación sobre factores de transcripción, tales como CREB, mientras que las quinasas de estrés (SAPKs), JNK y p38<sup>MAPK</sup>, son activadas por señales de estrés ambiental y proinflamatorias, y participan en las respuestas celulares relacionadas con inflamación y apoptosis, entre otras, mediante la actuación sobre NF- $\kappa$ B y AP-1, entre otros.

La supresión de la inducción de NOS-2 tras el tratamiento con el inhibidor de la farnesilación, FTI-277, indica la participación de p21<sup>Ras</sup> y sugiere la del complejo de señalización de IL-1 $\beta$  en la activación de p21<sup>Ras</sup> descrita en la bibliografía (McDermott y O'Neill, 2002). Complejo al que se reclutan las proteínas IL-1RI e IRAK, y donde p21<sup>Ras</sup> puede activar varias MAPKKs, tales como PAK, TAK-1, ASK1 o la quinasa de linaje mixto MLK-3, que podrían conducir a la activación de MKK3 o MKK6

(Bagrodia *et al.*, 1995; Moriguchi *et al.*, 1996; Rana *et al.*, 1996; Ichijo *et al.*, 1997), quinasas relacionadas con p38<sup>MAPK</sup>.

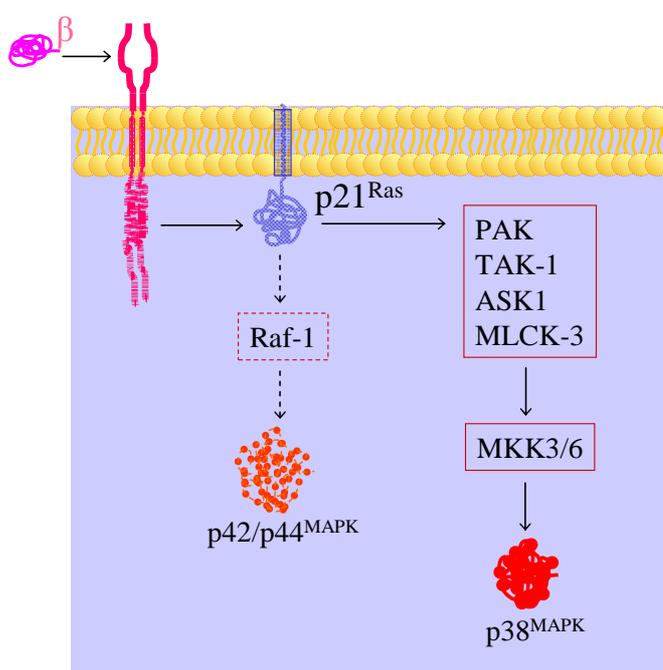
También, en distintos tipos celulares, p21<sup>Ras</sup> es esencial en la ruta clásica de activación de las ERKs 1/2 por factores de crecimiento (Izquierdo Pastor *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1996; Grumbles *et al.*, 1997; Efimova *et al.*, 1998; He y LaPointe, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Rausch y Marshall, 1999; Inouye *et al.*, 2000). De acuerdo con esta ruta, la p21<sup>Ras</sup> activa interacciona con el dominio de unión a p21<sup>Ras</sup> de Raf-1, que dispara la cascada de las MAPKs (Inouye *et al.*, 2000). Estas quinasas están implicadas en la inducción de NOS-2 mediada por citoquinas y LPS en células gliales primarias (Raingeaud *et al.*, 1995; Da Silva *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1998; Bhat *et al.*, 1999), sin embargo, su papel no está claramente definido ya que se han obtenido resultados contradictorios según la familia de MAPK y los diferentes tipos y situaciones celulares (Piao *et al.*, 2003; Won *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Jana *et al.*, 2005; Sassano *et al.*, 2005).

Así pues, en los astrocitos cerebelosos IL-1 $\beta$  activa a p21<sup>Ras</sup>, pero ¿qué quinasas o quinasas son activadas por p21<sup>Ras</sup> en los astrocitos cerebelosos?

La ruta Ras-Raf1-ERKs descrita en otras células (Finder *et al.*, 1997) no tiene lugar en astrocitos porque carecen de la proteína Raf-1 (Dugan *et al.*, 1999). Es más, en nuestras condiciones experimentales, la falta de efecto del tratamiento con PD-98059 descarta la participación de p42/p44<sup>MAPK</sup> (Da Silva *et al.*, 1997; Nishiya *et al.*, 2000). Mientras que los resultados obtenidos con los agentes farmacológicos SB-203580 (inhibidor permeable específico de p38<sup>MAPK</sup>) y SP-600125 (inhibidor permeable específico de p54<sup>JNK</sup>) implican claramente a la p38<sup>MAPK</sup> en la inducción de NOS-2 por el *citomix*, ya que sólo se observa la ligera supresión de la inducción de NOS-2 por SP-600125 a altas dosis (20 $\mu$ M), cuando los efectos inespecíficos predominan.

La participación de p38<sup>MAPK</sup> también se ha descrito en la inducción por TNF- $\alpha$  + IL-1 $\beta$  en astrocitos neonatales murinos (Da Silva *et al.*, 1997), aunque no está exenta de controversia puesto que se ha descrito una influencia inhibidora sobre la expresión de NOS-2 en la astroglia de ratas adultas (Marcus *et al.*, 2003). Según este último estudio, la inducción de la expresión de NOS-2 por la combinación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se atenúa tras la inhibición de tanto NF- $\kappa$ B como MEK, estos resultados proporcionan una importante evidencia de que NF- $\kappa$ B y ERKs 1/2 son componentes de

dos rutas de señalización autónomas por las que IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  estimulan la expresión de NOS-2 (Marcus *et al.*, 2003). Sin embargo, la disminución de la acumulación de nitritos en el tratamiento con PD-98059 no alcanza el 50% del total de inducción. Por otro lado, la necesidad de estimulación con dos o más citoquinas del promotor de NOS-2 puede explicar la necesidad de la participación de las MAPKs p42/p44 en el caso de la inducción del gen de NOS-2 por TNF- $\alpha$ , a diferencia de las condiciones experimentales de este trabajo en las que la estimulación complementaria a la IL-1 $\beta$  es el IFN- $\gamma$ , indiscutiblemente relacionado con la ruta de inducción de JAK/STAT (Fig. 89).



**Figura 90. La ruta de la IL-1 $\beta$  implica a p21<sup>Ras</sup> y a p38<sup>MAPK</sup>.**

La proteína p21<sup>Ras</sup> puede actuar sobre muchos efectores que conducen a las MAPKs, en especial a p38<sup>MAPK</sup>. Los astrocitos no expresan la proteína Raf-1 que conduce la señal desde p21<sup>Ras</sup> a p42/p44<sup>MAPK</sup> en otros tipos celulares. Adaptado de McDermott *et al.* (2002).

El paso siguiente a la activación de p38<sup>MAPK</sup> nos centra en la participación del factor nuclear  $\kappa$ B, ya descrita en la activación transcripcional de NOS-2 astroglial por citoquinas proinflamatorias (Park *et al.*, 1997). Respecto a la relación entre p38<sup>MAPK</sup> y NF- $\kappa$ B, el inhibidor específico de p38<sup>MAPK</sup>, SB-203580, es capaz de inhibir la actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B en una línea celular de macrófagos murinos (Chen y Wang, 1999) y suprime la activación de NF- $\kappa$ B por MKK3 y MKK6 en células C6 de glioma

de rata (Bhat *et al.*, 2002), lo que sugiere la implicación de este factor nuclear en la inducción de NOS-2 por p38<sup>MAPK</sup>.

En otros estudios se ha apuntado la participación de otros factores nucleares: en unos se ha mostrado que las MAPKs, ERKs 1/2 y p38<sup>MAPK</sup> regulan la expresión de NOS-2 a través de la modulación de NF-κB y de AP-1 (Kristof *et al.*, 2001), sin embargo, la ausencia de secuencias consenso para AP-1 en el promotor de la NOS-2 de rata descarta la participación de AP-1 (Jana *et al.*, 2005). También, el tratamiento con JNK-1, un inhibidor específico de JNK que impide la activación de AP-1 inducida por IL-1β, carece de efecto sobre la expresión de NOS-2 inducida por IL-1β e IFN-γ en astrocitos humanos primarios (Aktan, 2004). Por lo que podemos afirmar que AP-1 no juega un papel esencial en la expresión de NOS-2 inducida por esta combinación de citoquinas en astrocitos cerebelosos de rata. En otros estudios se ha indicado la participación de GAS porque su inducción por IFN-γ sinergiza con la activación de NF-κB inducida por IL-1β para una mayor inducción de NOS-2, pero la activación de GAS no es esencial para la expresión de NOS-2 (Jana *et al.*, 2005).

#### ***Translocación de NF-κB al núcleo.***

Si analizamos la participación de NF-κB en la cascada de señalización de la inducción de NOS-2 en astrocitos primarios de cerebelo de rata, se observa que la ruta canónica descrita en la figura 89 para el tratamiento IFN-γ + IL-1β promueve la translocación de NF-κB al núcleo de forma independiente de la activación de p38<sup>MAPK</sup>. Pero en esta situación no se produce expresión de NOS-2, ya que es necesaria la participación de la quinasa, a su vez, activada por las citoquinas de forma dependiente de p21<sup>Ras</sup>.

En las condiciones experimentales de este estudio, ni el inhibidor específico de p38<sup>MAPK</sup> (SB-203580) ni los agentes farmacológicos que impiden su fosforilación/activación por las citoquinas (FTI-277) evitan la liberación de NF-κB y su translocación al núcleo, pero sí la inducción de NOS-2 por las mismas citoquinas, haciendo necesario un estudio con el propósito de confirmar que NF-κB precisa de una activación por p38<sup>MAPK</sup> para poder inducir la expresión del gen de la proteína NOS-2 (Beyaert *et al.*, 1996; Wang y Baldwin, 1998; Song *et al.*, 2006).

### **Fosforilación de NF- $\kappa$ B (Ser<sup>536</sup> de p65).**

La anisomicina (activador permeable de JNK y p38<sup>MAPK</sup>) induce *per se* la fosforilación en Ser<sup>536</sup> de p65, lo que demuestra que ésta es una diana molecular de p38<sup>MAPK</sup> en astrocitos de de cerebelo de rata (Song *et al.*, 2006). Sin embargo, esta fosforilación no es suficiente para inducir la expresión de NOS-2 en los astrocitos puesto que, en esta situación, el factor nuclear permanece en el citoplasma. Por lo que podemos concluir que la participación de NF- $\kappa$ B en esta ruta precisa de dos señales independientes desencadenadas por la IL-1 $\beta$ ; por un lado, su liberación de I $\kappa$ B (independiente de p38<sup>MAPK</sup> y de p21<sup>Ras</sup>) que lo capacita para translocarse al núcleo. Y por otro lado, la fosforilación por la p38<sup>MAPK</sup>, dependiente de p21<sup>Ras</sup>.

La relación entre p38<sup>MAPK</sup> y la fosforilación de p65 ha sido descrita en distintos modelos animales y tipos celulares, tales como la línea L929 de fibrosarcoma murino (Vanden Berghe *et al.*, 1998), corazón de ratón (Zhao *et al.*, 2001), macrófagos RAW 246.7 (Chen y Wang, 1999), microglía humana y de rata (Wilms *et al.*, 2003), y en células epiteliales de pulmón murino y bronquiales de pulmón humano (Schmeck *et al.*, 2004), entre otros. También se ha descrito la fosforilación de p65 por p38<sup>MAPK</sup> en las serinas 529 y 536 (Madrid *et al.*, 2001), entre otras.

### **Acción supresora de los compuestos purinérgicos en la inducción de NOS-2.**

La preexposición al ATP suprime la inducción de NOS-2 por la combinación de citoquinas de forma dosis-dependiente, sin embargo, la rápida degradación del ATP hasta adenosina en el medio lo hace incapaz de modular la inducción a largo plazo de NOS-2 por citoquinas, proceso que requiere varias horas. De forma adicional, la preincubación con adenosina ofrece resultados muy similares a los obtenidos en los estudios con ATP, y el tratamiento con adenosina-desaminasa revierte totalmente la supresión por ambos purinérgicos, señalando al nucleósido como el efector real de la supresión en ambos casos. Además, el hecho de que el análogo no hidrolizable del ATP ( $\alpha,\beta$ -metilén-ATP) no reproduzca el efecto supresor, indica que la degradación extracelular del ATP hasta adenosina es un paso imprescindible para la supresión purinérgica de la inducción por citoquinas. Según esta conclusión, el ATP no es el agente supresor de la inducción de NOS-2 por citoquinas en el estudio realizado por el

grupo de Murphy, puesto que en él sólo se observaba supresión cuando se preincubaba con el agente purinérgico durante un tiempo (Murphy *et al.*, 1995).

De la misma forma, los antagonistas de los receptores P2 de ATP (PPADS y azul reactivo 2) no tienen efecto sobre la supresión. Al contrario, el DPCPX, un clásico antagonista de receptores de adenosina, sí que bloquea el efecto supresor. Esto es, la disminución del efecto supresor de la producción de nitritos de forma dosis-dependiente con la concentración creciente de DPCPX apunta a los receptores de adenosina como mediadores de la supresión. Por lo que podemos concluir que la adenosina generada tras la degradación del ATP es la señal fisiológica que, actuando a través de receptores P1 o A de adenosina, reduce la inducción de NOS-2 por citoquinas pro-inflamatorias.

En los experimentos llevados a cabo para caracterizar el subtipo de receptor de adenosina implicado en el efecto supresor de ésta se utilizaron agonistas y antagonistas farmacológicos específicos de cada uno de los subtipos conocidos.

Los resultados obtenidos en los experimentos con los agonistas apuntan al subtipo A<sub>2B</sub> como el implicado en la supresión por adenosina ya que la preincubación con NECA imita el efecto observado con la adenosina mientras que la preincubación con los agonistas específicos de los subtipos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub> (CPA, CGS-21680 e IB-MECA, respectivamente) no ofrece un efecto similar al de la adenosina. El ligero efecto supresor observado a altas concentraciones de CGS-21680 puede deberse a la afinidad de este fármaco por el subtipo A<sub>2B</sub> (Fredholm *et al.*, 2001).

De forma adicional, los resultados obtenidos tratando las células previamente a la adición de adenosina con los antagonistas específicos de los cuatro subtipos de adenosina también apuntan al receptor A<sub>2B</sub> como implicado en la supresión por adenosina. Puesto que el tratamiento con el antagonista específico de A<sub>2A</sub> (ZM-241385) o de A<sub>3</sub> (MRS-1523) no impide la supresión por adenosina a altas concentraciones y el tratamiento con DPCPX sólo lo hace a una concentración mayor de 10 µM, a la cual ya no es específico del subtipo A<sub>1</sub> sino supresor de todos los subtipos (Fredholm *et al.*, 2001).

Considerando conjuntamente los resultados obtenidos en los experimentos con agonistas y antagonistas específicos se llega a la conclusión de que el único subtipo implicado de forma significativa en nuestro estudio es el receptor A<sub>2B</sub> de adenosina.

Este subtipo se ha relacionado con distintos procesos que afectan a la inducción génica en células astrogiales, tales como la síntesis de glucógeno en astrocitos mediante modulación de la expresión génica (Allaman *et al.*, 2003), un aumento de la liberación de interleuquina 6 *in vivo* en astrocitos del estriado murino (Vazquez *et al.*, 2008), o su regulación por el factor de necrosis tumoral en astroglia humana (Trincavelli *et al.*, 2004; Trincavelli *et al.*, 2008), entre otros. Respecto a sus efectores intracelulares, se ha descrito la acumulación de cAMP en astrocitos primarios de rata (Peakman y Hill, 1994), en cultivos de astrocitos derivados de rata (Klaska *et al.*, 2008) y en astrocitos cerebelares tipo 1 (Jimenez *et al.*, 1999). En este último tipo celular también se ha descrito la potenciación de las señales de  $[Ca^{2+}]_i$  (Jimenez *et al.*, 1999).

### **Mecanismo de la supresión de la inducción de NOS-2 por compuestos purinérgicos.**

El receptor  $A_{2B}$  de adenosina puede estar acoplado a varias cascadas de segundos mensajeros, tales como la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  *via* PLC-IP<sub>3</sub> o el aumento de los niveles intracelulares de cAMP *via* proteína G<sub>s</sub>-AC (Jimenez *et al.*, 1999).

En astrocitos, los resultados obtenidos con el quelante de calcio, BAPTA, demuestran que el efecto supresor mediado por  $A_{2B}$  no está relacionado con las señales de variación de la  $[Ca^{2+}]_i$ . De hecho, la supresión por los purinérgicos de la inducción de NOS-2 por citoquinas implican la elevación de los niveles intracelulares de cAMP.

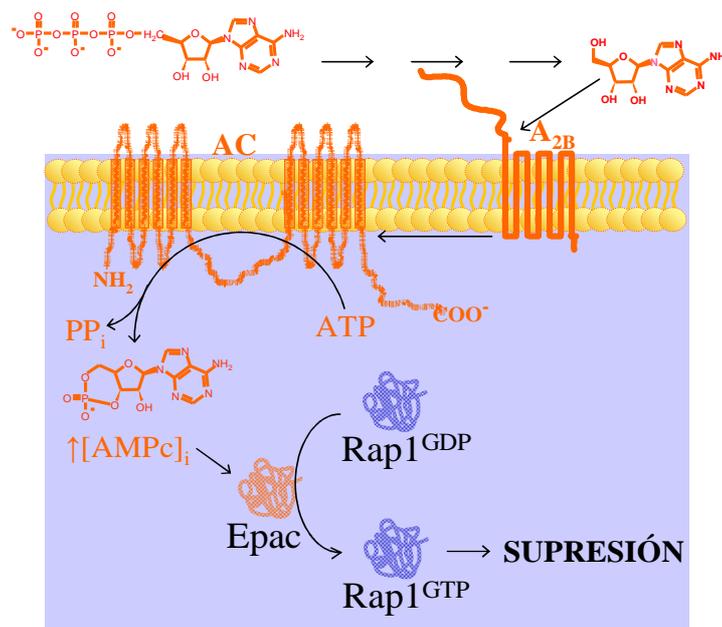
A la luz de estos últimos resultados y el acoplamiento del subtipo  $A_{2B}$  a la enzima Adenilil Ciclasa descrito en la bibliografía (Fredholm *et al.*, 2001; Fields y Burnstock, 2006) parece inevitable señalar a la AC como nexo de unión entre  $A_{2B}$  y la elevación de la  $[cAMP]_i$ , idea que corroboran la supresión del efecto de la adenosina por el tratamiento con el inhibidor permeable de la AC, MDL-12330A, y los estudios de cuantificación de cAMP intracelular mediante ELISA competitiva tras el tratamiento con el activador permeable de la AC, forskolina, en los que destaca la similitud en las curvas de  $[cAMP]$  tras los tratamientos con adenosina y con forskolina, tanto en presencia como en ausencia de IBMX.

El cAMP tiene varias dianas intracelulares, aunque la más importante y utilizada es la PKA, el cAMP también se une a canales iónicos dependientes de cAMP y a otras proteínas (Laroche-Joubert *et al.*, 2002). Entre ellas, las proteínas Epac 1 y 2

(Christensen *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2003). Estas proteínas son factores GEF dependientes de cAMP que regulan varios procesos celulares mediante la modulación de la actividad de algunas proteínas G pequeñas como Rap (de Rooij *et al.*, 2000). Una de estas proteínas G pequeñas reguladas por las Epacs es Rap (de Rooij *et al.*, 2000; Laroche-Joubert *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004; Won *et al.*, 2004). Esta se encuentra normalmente en un estado inactivo, unida a GDP. Cuando este GDP es transformado en GTP por las Epacs 1/2 (Rap-GEFs 1/2), induce un cambio conformacional de Rap hacia un estado activo.

Respecto a los efectores intracelulares de la elevación de la [cAMP] intracelular, la ausencia de efecto significativo de los inhibidores específicos de PKA (KT-5720 y H-89) y del agonista permeable del cAMP, 6-fenil-cAMP (específico de PKA pero carente de efectos sobre las proteínas Epac1 y 2), sobre la producción de nitritos indica que en la ruta de la señal supresora desde el receptor A<sub>2B</sub> de adenosina no es esencial la participación de PKA, idea apoyada por el resultado del tratamiento con el agonista permeable del cAMP, 8-CPT-2'-O-Me-cAMP (potente agonista de cAMP respecto a las proteínas Epac 1 y 2 pero sin efecto sobre la PKA), el cual demuestra que la ruta supresora dependiente de la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> no requiere la participación de la PKA, sino la de las pequeñas proteínas G monoméricas Epac 1/2 o Rap-GEFs 1/2, tal y como se ilustra en la figura 94.

El hecho de que las Epacs 1/2 sean esenciales en la ruta de supresión por adenosina induce a pensar en la posible participación de la proteína Rap1. Descrita en la bibliografía como antagonista de p21<sup>Ras</sup> (Bos, 1998; Zwartkruis y Bos, 1999).



**Figura 91. Participación de las proteínas epac 1 y 2 en la ruta supresora.**

Las proteínas epac 1 y 2 son el nexo de unión entre la elevación de la [cAMP] y la supresión de la inducción por citoquinas.

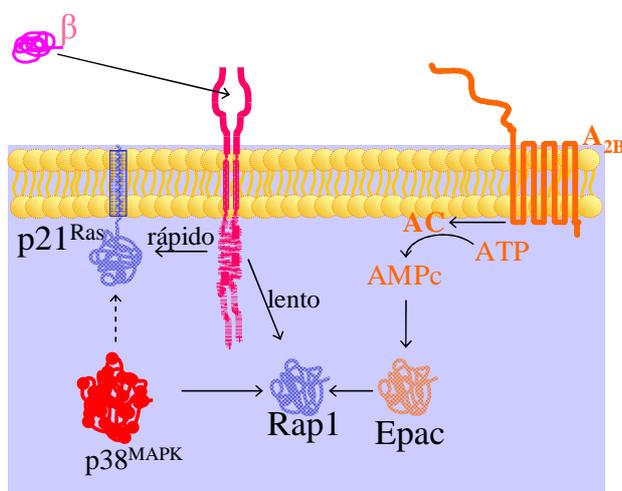
También, el hecho de que la preincubación con adenosina no revierta la degradación de I-κB promovida por citoquinas demuestra que la supresión por el nucleósido no está relacionada con la translocación de p65 al núcleo. Por lo que el efecto supresor debe afectar a la ruta que implica a p21<sup>Ras</sup> y a p38<sup>MAPK</sup>.

Las proteínas Epac, activadoras de Rap1, participan en múltiples procesos fisiológicos y tipos celulares (Holz *et al.*, 2006; Metrich *et al.*, 2008; Roscioni *et al.*, 2008; Borland *et al.*, 2009). En astrocitos cerebelares de rata, la activación de Rap1 por las epacs interfiere la activación de p38<sup>MAPK</sup> por p21<sup>Ras</sup>, lo que indica que las epacs actúan como supresoras de la inducción de la expresión de NOS-2 por citoquinas. Esta conclusión contrasta con algunas de la bibliografía en las que se describe una activación de p38<sup>MAPK</sup> por las epacs en otros tipos celulares como neuronas cerebelares (Ster *et al.*, 2007) o fibroblastos del tejido adiposo (Chen *et al.*, 2007), entre otros. Por otro lado, las epacs son capaces de activar a JNK de forma independiente de su actividad como Rap-GEFs (Hochbaum *et al.*, 2003), sin embargo, los resultados ofrecidos por el inhibidor específico de JNK, SP600125, descartan esta posibilidad.

La ausencia de supresión de la activación de p38<sup>MAPK</sup> en los casos de inducción tras la inhibición de la geranil-geranilación (GGTI-286), así como tras esta inhibición y preincubación con adenosina, indica que Rap1 es esencial para la supresión por la elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> promovida por la adición de ATP o adenosina de la inducción por citomix.

No obstante, no se conoce el mecanismo inhibitor exacto de Rap1 en esta ruta pero el antagonismo entre p21<sup>Ras</sup> y Rap radica en el secuestro de los efectores de p21<sup>Ras</sup> por parte de Rap, que los retiene lejos de la membrana plasmática, zona de influencia de Ras (Nomura *et al.*, 2004). Puesto que p21<sup>Ras</sup> y Rap se localizan en diferentes compartimentos subcelulares, el primero se asocia a la membrana plasmática mientras que el segundo se encuentra en la zona perinuclear, en la que se incluyen el aparato de Golgi y los endosomas (Mochizuki *et al.*, 2001). El dominio que abarca los aminoácidos 85-89 de Rap1A es importante para su localización perinuclear, mientras que la localización en la membrana plasmática de Ras se asocia con el extremo carboxilo terminal, susceptible de modificación lipídica.

El mecanismo que proponemos en función de los resultados obtenidos es que las proteínas Epac 1/2 activan a Rap1 haciendo que ésta se una a los efectores de p21<sup>Ras</sup> (Bos, 1998; Zwartkruis y Bos, 1999), es decir, en nuestro estudio, cuando p21<sup>Ras</sup> es activado por la ruta de señalización desencadenada por la unión de la IL-1 $\beta$  a su receptor no puede actuar sobre sus efectores, retenidos por Rap1 (McGuire *et al.*, 1996), previamente activado por la ruta de señalización desencadenada por estimulación de receptores de adenosina (Pahan *et al.*, 1997a).



**Figura 92. Duelo de homólogos en la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>.**

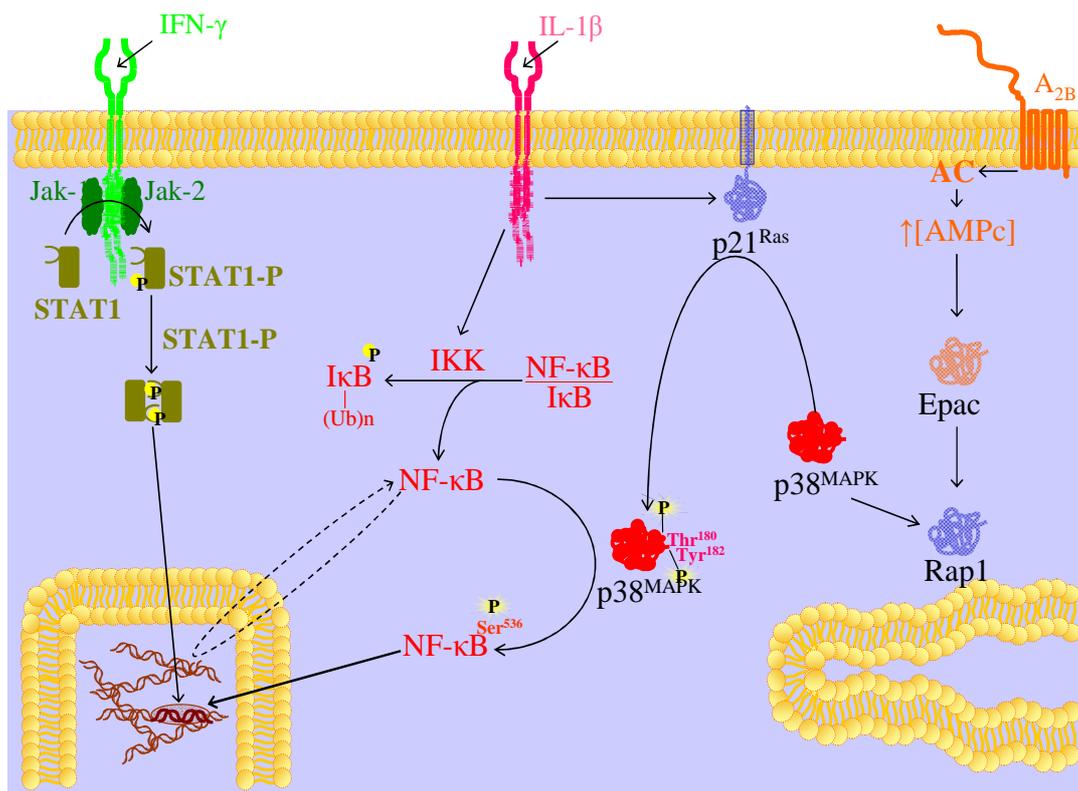
Este estudio ilustra una ruta de señalización nueva conducente a la activación de p38<sup>MAPK</sup> por IL-1 $\beta$  que implica a p21<sup>Ras</sup>, con un papel negativo de Rap1 teniendo lugar al nivel de p21<sup>Ras</sup> en la ruta. Estos resultados coinciden con los descritos por el grupo de Palsson (McDermott y O'Neill, 2002).

La activación de Rap1 es una importante moduladora de la expresión del gen de NOS-2: mientras que la activación de Rap1 posterior a la de p21<sup>Ras</sup> por la misma IL-1 $\beta$  (Palsson *et al.*, 2000; Marcus *et al.*, 2003) explica la transitoriedad de la expresión del transcrito y la cinética de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> descrita en la bibliografía (Piao *et al.*, 2003). Cuando preincubamos las células con ATP o adenosina, la proteína Rap1 estaría activada previamente a la activación de p21<sup>Ras</sup> por las citoquinas, manteniendo a los efectores de p21<sup>Ras</sup> alejados de la membrana (McDermott y O'Neill, 2002).

Esta conclusión está apoyada por un estudio complementario realizado con un activador permeable específico de esta quinasa, la anisomicina (Hazzalin *et al.*, 1998), el cual revierte el efecto supresor de los purinérgicos (adenosina) y del inhibidor de p21<sup>Ras</sup> (inhibidor de la farnesilación, FTI-277) a nivel de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>, lo que indica que la supresión, en ambos casos, tiene lugar antes de la activación de esta MAPK. Sin embargo, la anisomicina no basta para sustituir a ninguna de las citoquinas constituyentes del *citomix*, y es necesaria la combinación de ambas para la inducción del gen de NOS-2. De lo que se puede deducir que la participación de p38<sup>MAPK</sup>, si bien es esencial, no es suficiente, y que la IL-1 $\beta$  inicia una segunda ruta adicional a la activación de esta quinasa.

En relación a estas últimas premisas y a la falta de datos acerca de que NF- $\kappa$ B actúe previamente a p38<sup>MAPK</sup> (Nishiya *et al.*, 2000) podemos afirmar que la esencialidad de p38<sup>MAPK</sup> no radica en la liberación de NF- $\kappa$ B para su translocación al núcleo sino en otro tipo de activación del factor de transcripción, por lo que, confirmando datos previos (Liu *et al.*, 1996; Wesselborg *et al.*, 1997), la activación de p38<sup>MAPK</sup> y la liberación de NF- $\kappa$ B respecto a I $\kappa$ B se produce por diferentes vías, al igual que en astrocitos murinos tratados con IL-1 $\alpha$  + TNF- $\alpha$ , donde la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> bloquea la expresión génica de NOS-2 sin efecto sobre la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Da Silva *et al.*, 1997), y que estos autores interpretaron como la necesidad de una segunda ruta activada por alguna de estas dos citoquinas para generar la señal suficiente para la inducción de NOS-2 (Da Silva *et al.*, 1997), esta conclusión puede corresponderse con los resultados observados en el tratamiento con anisomicina, en el que a pesar de detectarse la fosforilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en Ser<sup>536</sup> por p38<sup>MAPK</sup>, ésta permanece en el citoplasma sin translocarse al núcleo, necesitando su liberación de I- $\kappa$ B, lo que a su vez está provocado por una segunda ruta independiente de p38<sup>MAPK</sup> pero desencadenada por la misma IL-1 $\beta$ .

Considerado conjuntamente con la descripción de varios sitios de fosforilación en NF- $\kappa$ B necesarios para su unión al DNA e inducción de sus genes diana (Beyaert *et al.*, 1996; Wang y Baldwin, 1998; Wang D. *et al.*, 2000; Funakoshi *et al.*, 2001; Madrid *et al.*, 2001; Birkenkamp *et al.*, 2004; Chantome *et al.*, 2004; Zhai *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Mattioli *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006), los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la participación de NF- $\kappa$ B en la inducción de NOS-2 por las citoquinas requiere la confluencia de dos procesos: 1) La liberación respecto a I- $\kappa$ B por parte de las citoquinas de forma independiente de p21<sup>Ras</sup> y p38<sup>MAPK</sup>, y no susceptible de supresión por ATP o adenosina, y 2) La fosforilación en, al menos, la Ser<sup>536</sup> de la subunidad p65 por parte de p38<sup>MAPK</sup>, a su vez activada por las citoquinas de forma dependiente de p21<sup>Ras</sup> y susceptible de supresión por adenosina.



**Figura 93.** La participación de NF-κB en la ruta inductora requiere su liberación de IκB y la fosforilación de la subunidad p65 en Ser<sup>536</sup> por p38<sup>MAPK</sup>.

La supresión por ATP o adenosina consiste en el impedimento de la fosforilación de esta quinasa y de la consecuente plena activación de NF-κB.

Esta compleja regulación del factor nuclear está parcialmente descrita en la bibliografía (Pahan *et al.*, 1997b; Wesselborg *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1998; Baud *et al.*, 1999; John *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Madrid *et al.*, 2001; Tannous *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003; Wilms *et al.*, 2003; Chantome *et al.*, 2004; Jana *et al.*, 2005), incluso otras proteínas podrían participar en este proceso, ya que IKK *per se* es una diana molecular de varias quinasas incluyendo miembros MEKK (Israel, 2000), también se ha descrito una relación independiente de IκB entre Rac, una pequeña proteína de unión a GTP, y la habilidad transactivadora de p65 (Jefferies y O'Neill, 2000) y la activación de la ruta MKK3/6 → p38<sup>MAPK</sup> por Rac cuando es activada por H-Ras (Shin *et al.*, 2005).

Una vez comprobado que la supresión por adenosina ocurre a nivel de la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup>, y tras haber descartado otras posibles acciones del nucleósido.

Los resultados de nuestros experimentos demuestran la supresión de inducción génica por la falta de unión de p65/p50 al promotor del gen de NOS-2 sugerida en la bibliografía (Murphy *et al.*, 1995; Lin y Murphy, 1997).

Las rutas de inducción desencadenadas por la IL-1 $\beta$  estimulan la expresión de NOS-2 *via* activación de NF- $\kappa$ B, y aunque la situación *in vitro* de los astrocitos primarios de rata no imita perfectamente la situación *in vivo* de los astrocitos en el cerebro de pacientes con enfermedades inflamatorias o neurodegenerativas, estos resultados sugieren que la diana específica que supone NF- $\kappa$ B debe ser importante para detener el daño mediado por el NO $\cdot$  en el tejido nervioso inflamado. Especialmente si se tiene en cuenta que la mayoría de genes relacionados con inflamación contienen sitios de unión  $\kappa$ B en sus regiones reguladoras (O'Neill y Greene, 1998).

Por otro lado, el hecho de que NF- $\kappa$ B necesite en este estudio dos pasos de activación hace replantearse muchos de los estudios en los que se considera la plena activación del factor nuclear y su translocación al núcleo como un mismo proceso.

La elevación de la [cAMP]<sub>i</sub> es la señal supresora de la inducción de NOS-2 por IL-1 $\beta$  en astrocitos, y el hecho de que actúe impidiendo la activación de p38<sup>MAPK</sup> y la fosforilación de p65 en Ser<sup>536</sup> (ambas relacionadas con inflamación), por una señal inductora tan generalizada como la interleuquina 1 $\beta$  abre el abanico terapéutico para la regulación de los procesos inflamatorios a otros posibles agentes elevadores de la [cAMP]<sub>i</sub> como las catecolaminas.

La activación de Rap1 por las proteínas Epacs 1 y 2, dependientes de cAMP, puede tenerse en cuenta en el tratamiento de aquellas patologías caracterizadas por una proteína p21<sup>Ras</sup> activa, tales como algunos tipos de tumores.



## **CONCLUSIONES.**



- 1.- La IL-1 $\beta$  induce la expresión de NOS-2 en astrocitos cerebelosos de forma dependiente de la proteína p21<sup>Ras</sup>. De las proteínas normalmente asociadas a la actividad de p21<sup>Ras</sup>, sólo la p38<sup>MAPK</sup> es un efector implicado en la inducción de NOS-2 en los astrocitos. Los resultados de la inhibición de otras enzimas indican la nula participación de PI3K o las ERK y no sugieren una participación destacable de p54<sup>JNK</sup>. En los astrocitos, tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , la p38<sup>MAPK</sup> es la responsable de la fosforilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, un proceso adicional a la liberación de NF- $\kappa$ B de su secuestro por I $\kappa$ B y esencial para su actividad como factor de transcripción nuclear.
- 2.- Los compuestos purinérgicos, ATP o adenosina, inhiben la generación de NO-estimulada por citoquinas en astrocitos cerebelosos. Este efecto transcurre con una reducción de la acumulación de la proteína NOS-2 activa y una disminución de la transcripción del mRNA de NOS-2. Por lo tanto, los compuestos purinérgicos suprimen la inducción de la expresión del gen de NOS-2 inducida por citoquinas.
- 3.- La acción del nucleótido ATP requiere la conversión previa a adenosina, no es reproducido por análogos no hidrolizables y no es bloqueado por antagonistas de receptores de nucleótidos sino por antagonistas de receptores de adenosina. El perfil de activación y bloqueo por agonistas y antagonistas selectivos de receptores de adenosina indica que la acción supresora de la inducción de NOS-2 está mediada por un receptor de tipo A<sub>2B</sub> en los astrocitos.
- 4.- La acción supresora de la adenosina no impide la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B pero sí su actividad inductora. La adenosina previene la activación de p38<sup>MAPK</sup> en los astrocitos, lo que indica que la acción supresora de la inducción de NOS-2 tiene lugar por interferencia con la ruta p21<sup>Ras</sup>-p38<sup>MAPK</sup>, esencial para la fosforilación y activación de NF- $\kappa$ B.
- 5.- La adenosina estimula la acumulación de cAMP en los astrocitos. Los análogos del cAMP reproducen por sí mismos el efecto supresor y la acción de la adenosina puede ser bloqueada por la inhibición de la adenilil-ciclase. Por lo tanto, la supresión de la expresión de NOS-2 por adenosina está mediada por la ruta de señalización del cAMP y no por rutas relacionadas con [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

- 6.- La supresión de la expresión de NOS-2 en astrocitos cerebelosos por cAMP no está mediada por su efector más frecuente, la PKA, sino por las proteínas Epac, reguladoras de proteínas G pequeñas. La supresión de la inducción de NOS-2 es debida a la prevención de la activación de p38<sup>MAPK</sup>, probablemente por secuestro *via* Rap1, y por lo tanto el bloqueo de la activación de NF-κB por fosforilación de su subunidad p65.

## **CONCLUSIONS.**

*CONCLUSIONS.*

---

1. IL-1 $\beta$  induces NOS-2 expression in cerebellar astrocytes in a p21<sup>Ras</sup>-dependent manner. Many proteins have been described as effectors related to p21<sup>Ras</sup> activity. Among these enzymes, just p38<sup>MAPK</sup> is essential for the induction pathway in astrocytes. While PI3K and the other MAPKs, ERKs 1/2 (p42/p44<sup>MAPK</sup>) and p54<sup>JNK</sup>, were not involved. In astrocytes, IL-1 $\beta$  promotes NF- $\kappa$ B release from I $\kappa$ B. Additionally, p38<sup>MAPK</sup> phosphorylates the subunit p65 of NF- $\kappa$ B, which is an essential step for its transactivating capability.
2. Purinergics inhibit NO $\cdot$  accumulation elicited by cytokines in cerebellar astrocytes. This effect includes a decrease in both NOS-2 protein and mRNA. Thus, purinergics suppress the NOS-2 gene induction elicited by cytokines.
3. The suppressive effect of ATP requires its previous conversion into adenosine. The effect it is not reproduced by non-hydrolyzable ATP analogs and it is not blocked by antagonists of nucleotide receptors but by antagonists of adenosine receptors. The experiments related to activation and blockade of adenosine receptors by selective agonists and antagonists demonstrates that the suppressive effect of ATP and adenosine on NOS-2 induction by cytokines is mediated by the A<sub>2B</sub> subtype of adenosine receptors present in astrocytes.
4. The purinergic suppression does not block NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus but prevents its transcription-stimulating activity. Adenosine impedes p38<sup>MAPK</sup> activation in astrocytes, thus interfering with the induction pathway p21<sup>Ras</sup>-p38<sup>MAPK</sup>, which is essential to phosphorylation and activation of NF- $\kappa$ B.
5. Adenosine promotes cAMP accumulation in astrocytes. cAMP analogs reproduce *per se* the suppressive effect, which is blocked by inhibiting adenylyl-cyclase. Thus, the intracellular mediator involved in NOS-2 suppression is [cAMP]<sub>i</sub> and not [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-related signalling.
6. The suppression is not mediated by the cAMP most frequent effector, PKA, but by Epac proteins, regulators of Rap1 small G protein. The suppressive effect is due to a blockade of p38<sup>MAPK</sup> activation, probably by Rap1 keeping p38<sup>MAPK</sup> out of p21<sup>Ras</sup>-induced activation, thus preventing NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation.



## **BIBLIOGRAFÍA.**



- Abe, K. & Saito, H.** (2000). The p44/42 mitogen-activated protein kinase cascade is involved in the induction and maintenance of astrocyte stellation mediated by protein kinase C. *Neurosci Res* **36**: 251-7.
- Abraham, E. H.; Prat, A. G.; Gerweck, L.; Seneveratne, T.; Arceci, R. J.; Kramer, R.; Guidotti, G. & Cantiello, H. F.** (1993). The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 312-6.
- Abu-Soud, H. M.; Feldman, P. L.; Clark, P. & Stuehr, D. J.** (1994). Electron transfer in the nitric-oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem* **269**: 32318-26.
- Adamson, D. C.; Wildemann, B.; Sasaki, M.; Glass, J. D.; McArthur, J. C.; Christov, V. I.; Dawson, T. M. & Dawson, V. L.** (1996). Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* **274**: 1917-21.
- Akama, K. T.; Albanese, C.; Pestell, R. G. & Van Eldik, L. J.** (1998). Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5795-800.
- Aktan, F.** (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**: 639-53.
- Alderton, W. K.; Cooper, C. E. & Knowles, R. G.** (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.
- Alpert, D.; Schwenger, P.; Han, J. & Vilcek, J.** (1999). Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **274**: 22176-83.
- Allaman, I.; Lengacher, S.; Magistretti, P. J. & Pellerin, L.** (2003). A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**: C696-704.
- Anderson, C. M.; Bergher, J. P. & Swanson, R. A.** (2004). ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* **88**: 246-56.
- Arrigoni, E.; Rainnie, D. G.; McCarley, R. W. & Greene, R. W.** (2001). Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum. *J Neurosci* **21**: 1076-85.
- Arslan, G. & Fredholm, B. B.** (2000). Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A(2A) receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci Lett* **292**: 183-6.
- Bagasra, O.; Michaels, F. H.; Zheng, Y. M.; Bobroski, L. E.; Spitsin, S. V.; Fu, Z. F.; Tawadros, R. & Koprowski, H.** (1995). Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12041-5.
- Bagrodia, S.; Derijard, B.; Davis, R. J. & Cerione, R. A.** (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**: 27995-8.
- Barbeito, L. H.; Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M. R.; Peluffo, H.; Viera, L.; Estevez, A. G. & Beckman, J. S.** (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* **47**: 263-74.
- Baud, V.; Liu, Z. G.; Bennett, B.; Suzuki, N.; Xia, Y. & Karin, M.** (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* **13**: 1297-308.
- Beckman, J. S. & Koppenol, W. H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-37.
- Beyaert, R.; Cuenda, A.; Vanden Berghe, W.; Plaisance, S.; Lee, J. C.; Haegeman, G.; Cohen, P. & Fiers, W.** (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *Embo J* **15**: 1914-23.
- Bhat, N. R.; Feinstein, D. L.; Shen, Q. & Bhat, A. N.** (2002). p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-

- oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* **277**: 29584-92.
- Bhat, N. R.; Shen, Q. & Fan, F.** (2003). TAK1-mediated induction of nitric oxide synthase gene expression in glial cells. *J Neurochem* **87**: 238-47.
- Bhat, N. R.; Zhang, P. & Bhat, A. N.** (1999). Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* **72**: 472-8.
- Bhat, N. R.; Zhang, P.; Lee, J. C. & Hogan, E. L.** (1998). Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* **18**: 1633-41.
- Birkenkamp, K. U.; Geugien, M.; Schepers, H.; Westra, J.; Lemmink, H. H. & Vellenga, E.** (2004). Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia* **18**: 103-12.
- Blair, A.; Shaul, P. W.; Yuhanna, I. S.; Conrad, P. A. & Smart, E. J.** (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* **274**: 32512-9.
- Bodin, P. & Burnstock, G.** (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **26**: 959-69.
- Bogdan, C.** (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**: 907-16.
- Booke, M.; Hinder, F.; McGuire, R.; Traber, L. D. & Traber, D. L.** (2000). Noradrenaline and nomega-monomethyl-L-arginine (L-NMMA): effects on haemodynamics and regional blood flow in healthy and septic sheep. *Clin Sci (Lond)* **98**: 193-200.
- Borland, G.; Smith, B. O. & Yarwood, S. J.** (2009). EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br J Pharmacol*.
- Bos, J. L.** (1998). All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J* **17**: 6776-82.
- Brambilla, R.; Cottini, L.; Fumagalli, M.; Ceruti, S. & Abbraccio, M. P.** (2003). Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia* **43**: 190-4.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H.** (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 682-5.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H.** (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**: 3-11.
- Brown, R. E. & Law, A.** (2006). Morphoproteomic demonstration of constitutive nuclear factor-kappaB activation in glioblastoma multiforme with genomic correlates and therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci* **36**: 421-6.
- Brundege, J. M.; Diao, L.; Proctor, W. R. & Dunwiddie, T. V.** (1997). The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* **36**: 1201-10.
- Burnett, A. L.; Lowenstein, C. J.; Bredt, D. S.; Chang, T. S. & Snyder, S. H.** (1992). Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* **257**: 401-3.
- Burnstock, G.** (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**: 509-81.
- Burnstock, G.** (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 47-52.
- Burnstock, G. & Knight, G. E.** (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **240**: 31-304.
- Bush, P. A.; Aronson, W. J.; Buga, G. M.; Rajfer, J. & Ignarro, L. J.** (1992). Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol* **147**: 1650-5.
- Busse, R.; Fleming, I. & Hecker, M.** (1993). Signal transduction in endothelium-

- dependent vasodilatation. *Eur Heart J* **14 Suppl I**: 2-9.
- Caggiano, A. O. & Kraig, R. P.** (1998). Neuronal nitric oxide synthase expression is induced in neocortical astrocytes after spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**: 75-87.
- Campbell, D. L.; Stamler, J. S. & Strauss, H. C.** (1996). Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* **108**: 277-93.
- Cobb, M. H.** (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 479-500.
- Coco, S.; Calegari, F.; Pravettoni, E.; Pozzi, D.; Taverna, E.; Rosa, P.; Matteoli, M. & Verderio, C.** (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* **278**: 1354-62.
- Colasanti, M.; Persichini, T.; Fabrizi, C.; Cavalieri, E.; Venturini, G.; Ascenzi, P.; Lauro, G. M. & Suzuki, H.** (1998). Expression of a NOS-III-like protein in human astroglial cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 552-5.
- Colasanti, M.; Persichini, T.; Menegazzi, M.; Mariotto, S.; Giordano, E.; Caldarera, C. M.; Sogos, V.; Lauro, G. M. & Suzuki, H.** (1995). Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* **270**: 26731-3.
- Collard, K. J.** (1995). On the role of nitric oxide as a cellular messenger in brain. *Mol Cell Biochem* **149-150**: 249-56.
- Contestabile, A.** (2000). Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* **32**: 476-509.
- Cooper, D. M.; Mons, N. & Karpen, J. W.** (1995). Adenyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* **374**: 421-4.
- Cotrina, M. L. & Nedergaard, M.** (2002). Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res* **67**: 1-10.
- Cruz, M. T.; Duarte, C. B.; Goncalo, M.; Carvalho, A. P. & Lopes, M. C.** (2001). LPS induction of I kappa B-alpha degradation and iNOS expression in a skin dendritic cell line is prevented by the janus kinase 2 inhibitor, Tyrphostin b42. *Nitric Oxide* **5**: 53-61.
- Chan, E. D.; Morris, K. R.; Belisle, J. T.; Hill, P.; Remigio, L. K.; Brennan, P. J. & Riches, D. W.** (2001). Induction of inducible nitric oxide synthase-NO\* by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-kappaB signaling pathways. *Infect Immun* **69**: 2001-10.
- Chan, E. D. & Riches, D. W.** (2001). IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C441-50.
- Chang, L. & Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.
- Chantome, A.; Pance, A.; Gauthier, N.; Vandroux, D.; Chenu, J.; Solary, E.; Jeannin, J. F. & Reveneau, S.** (2004). Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF-kappaB p65 subunit enhances inducible nitric-oxide synthase gene transcription in vivo. *J Biol Chem* **279**: 23953-60.
- Chen, C. C. & Wang, J. K.** (1999). p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* **55**: 481-8.
- Chen, D.; Reierstad, S.; Lin, Z.; Lu, M.; Brooks, C.; Li, N.; Innes, J. & Bulun, S. E.** (2007). Prostaglandin E(2) induces breast cancer related aromatase promoters via activation of p38 and c-Jun NH(2)-terminal kinase in adipose fibroblasts. *Cancer Res* **67**: 8914-22.
- Chen, L.; Fischle, W.; Verdin, E. & Greene, W. C.** (2001). Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* **293**: 1653-7.
- Choi, J.; Krushel, L. A. & Crossin, K. L.** (2001). NF-kappaB activation by N-CAM and cytokines in astrocytes is regulated by

- multiple protein kinases and redox modulation. *Glia* **33**: 45-56.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- Christensen, A. E.; Selheim, F.; de Rooij, J.; Dremier, S.; Schwede, F.; Dao, K. K.; Martinez, A.; Maenhaut, C.; Bos, J. L.; Genieser, H. G. & Doskeland, S. O.** (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* **278**: 35394-402.
- Christopherson, K. S. & Bredt, D. S.** (1997). Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* **100**: 2424-9.
- Da Silva, J.; Pierrat, B.; Mary, J. L. & Lesslauer, W.** (1997). Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* **272**: 28373-80.
- Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J. V.; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D. R.; Dustin, M. L. & Gan, W. B.** (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**: 752-8.
- Dawson, T. M.; Dawson, V. L. & Snyder, S. H.** (1993). Nitric oxide as a mediator of neurotoxicity. *NIDA Res Monogr* **136**: 258-71; discussion 271-3.
- Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; London, E. D.; Bredt, D. S. & Snyder, S. H.** (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6368-71.
- De Caterina, R.; Libby, P.; Peng, H. B.; Thannickal, V. J.; Rajavashisth, T. B.; Gimbrone, M. A., Jr.; Shin, W. S. & Liao, J. K.** (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**: 60-8.
- de Rooij, J.; Rehmann, H.; van Triest, M.; Cool, R. H.; Wittinghofer, A. & Bos, J. L.** (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**: 20829-36.
- Delaney, S. M. & Geiger, J. D.** (1998). Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 568-72.
- Delaney, S. M.; Shepel, P. N. & Geiger, J. D.** (1998). Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 561-7.
- DelaTorre, A.; Schroeder, R. A. & Kuo, P. C.** (1997). Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 703-6.
- Dello Russo, C.; Boullerne, A. I.; Gavrilyuk, V. & Feinstein, D. L.** (2004). Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J Neuroinflammation* **1**: 9.
- Dent, P.; Yacoub, A.; Fisher, P. B.; Hagan, M. P. & Grant, S.** (2003). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **22**: 5885-96.
- Desai, K. M.; Sessa, W. C. & Vane, J. R.** (1991a). Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**: 477-9.
- Desai, K. M.; Zembowicz, A.; Sessa, W. C. & Vane, J. R.** (1991b). Nitroxergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11490-4.
- Diaz-Guerra, M. J.; Bodelon, O. G.; Velasco, M.; Whelan, R.; Parker, P. J. & Bosca, L.** (1996). Up-regulation of protein kinase C-epsilon promotes the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem* **271**: 32028-33.
- Diaz-Guerra, M. J.; Castrillo, A.; Martin-Sanz, P. & Bosca, L.** (1999). Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J Immunol* **162**: 6184-90.

- Dieter, P.; Fitzke, E. & Duyster, J.** (1993). BAPTA induces a decrease of intracellular free calcium and a translocation and inactivation of protein kinase C in macrophages. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**: 171-4.
- Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R. & Zeiher, A. M.** (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**: 601-5.
- Ding, J.; Vlahos, C. J.; Liu, R.; Brown, R. F. & Badwey, J. A.** (1995). Antagonists of phosphatidylinositol 3-kinase block activation of several novel protein kinases in neutrophils. *J Biol Chem* **270**: 11684-91.
- Doi, M.; Shichiri, M.; Katsuyama, K.; Marumo, F. & Hirata, Y.** (2000). Cytokine-activated p42/p44 MAP kinase is involved in inducible nitric oxide synthase gene expression independent from NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* **23**: 659-67.
- Dolphin, A. C.; Forda, S. R. & Scott, R. H.** (1986). Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol* **373**: 47-61.
- Dubey, R. K.; Gillespie, D. G.; Shue, H. & Jackson, E. K.** (2000). A(2B) receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **35**: 267-72.
- Dugan, L. L.; Kim, J. S.; Zhang, Y.; Bart, R. D.; Sun, Y.; Holtzman, D. M. & Gutmann, D. H.** (1999). Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J Biol Chem* **274**: 25842-8.
- Dunwiddie, T. V.; Diao, L. & Proctor, W. R.** (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**: 7673-82.
- Dutta, A. K.; Sabirov, R. Z.; Uramoto, H. & Okada, Y.** (2004). Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J Physiol* **559**: 799-812.
- Dutton, G. R.; Currie, D. N. & Tear, K.** (1981). An improved method for the bulk isolation of viable perikarya from postnatal cerebellum. *J Neurosci Methods* **3**: 421-7.
- Eberhardt, W.; Pluss, C.; Hummel, R. & Pfeilschifter, J.** (1998). Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells. *J Immunol* **160**: 4961-9.
- Edwards, F. A. & Gibb, A. J.** (1993). ATP--a fast neurotransmitter. *FEBS Lett* **325**: 86-9.
- Efimova, T.; LaCelle, P.; Welter, J. F. & Eckert, R. L.** (1998). Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem* **273**: 24387-95.
- Eliasson, M. J.; Blackshaw, S.; Schell, M. J. & Snyder, S. H.** (1997). Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3396-401.
- 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.
- Feinstein, D. L.** (1998). Suppression of astroglial nitric oxide synthase expression by norepinephrine results from decreased NOS-2 promoter activity. *J Neurochem* **70**: 1484-96.
- Feinstein, D. L.; Galea, E.; Aquino, D. A.; Li, G. C.; Xu, H. & Reis, D. J.** (1996). Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J Biol Chem* **271**: 17724-32.
- Feinstein, D. L.; Galea, E.; Cermak, J.; Chugh, P.; Lyandvert, L. & Reis, D. J.** (1994a). Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *J Neurochem* **62**: 811-4.
- Feinstein, D. L.; Galea, E.; Roberts, S.; Berquist, H.; Wang, H. & Reis, D. J.** (1994b). Induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* **62**: 315-21.
- Feinstein, D. L. & Rozelman, E.** (1997). Norepinephrine suppresses L-arginine

- uptake in rat glial cells. *Neurosci Lett* **223**: 37-40.
- Fenoglio, C.; Necchi, D.; Civallero, M.; Ceroni, M. & Nano, R.** (1997). Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5' nucleotidase in human glioblastoma. *Anticancer Res* **17**: 2507-11.
- Feoktistov, I. & Biaggioni, I.** (1998). Pharmacological characterization of adenosine A2B receptors: studies in human mast cells co-expressing A2A and A2B adenosine receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **55**: 627-33.
- Feuerstein, G. Z.; Wang, X. & Barone, F. C.** (1997). Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci* **825**: 179-93.
- Fields, R. D. & Burnstock, G.** (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* **7**: 423-36.
- Finder, J. D.; Litz, J. L.; Blaskovich, M. A.; McGuire, T. F.; Qian, Y.; Hamilton, A. D.; Davies, P. & Sebt, S. M.** (1997). Inhibition of protein geranylgeranylation causes a superinduction of nitric-oxide synthase-2 by interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**: 13484-8.
- Fleming, I. & Busse, R.** (1999). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* **43**: 532-41.
- Forstermann, U.; Schmidt, H. H.; Pollock, J. S.; Sheng, H.; Mitchell, J. A.; Warner, T. D.; Nakane, M. & Murad, F.** (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**: 1849-57.
- Fotheringham, J. A.; Mayne, M. B.; Grant, J. A. & Geiger, J. D.** (2004). Activation of adenosine receptors inhibits tumor necrosis factor-alpha release by decreasing TNF-alpha mRNA stability and p38 activity. *Eur J Pharmacol* **497**: 87-95.
- Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N. & Linden, J.** (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**: 527-52.
- Fukuto, J. M.** (1995). Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects. *Adv Pharmacol* **34**: 1-15.
- Funakoshi, M.; Sonoda, Y.; Tago, K.; Tominaga, S. & Kasahara, T.** (2001). Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-1-mediated NF-kappa B and AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* **1**: 595-604.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V.** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-6.
- Furia, B.; Deng, L.; Wu, K.; Baylor, S.; Kehn, K.; Li, H.; Donnelly, R.; Coleman, T. & Kashanchi, F.** (2002). Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem* **277**: 4973-80.
- Gachhui, R.; Abu-Soud, H. M.; Ghosha, D. K.; Presta, A.; Blazing, M. A.; Mayer, B.; George, S. E. & Stuehr, D. J.** (1998). Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* **273**: 5451-4.
- Gachhui, R.; Presta, A.; Bentley, D. F.; Abu-Soud, H. M.; McArthur, R.; Brudvig, G.; Ghosh, D. K. & Stuehr, D. J.** (1996). Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself. *J Biol Chem* **271**: 20594-602.
- Ganster, R. W.; Taylor, B. S.; Shao, L. & Geller, D. A.** (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8638-43.
- Gao, B. N. & Gilman, A. G.** (1991). Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10178-82.
- Garcia-Lecea, M.; Delicado, E. G.; Miras-Portugal, M. T. & Castro, E.** (1999). P2X2 characteristics of the ATP receptor coupled to [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in cultured Purkinje

- neurons from neonatal rat cerebellum. *Neuropharmacology* **38**: 699-706.
- Gavrilyuk, V.; Horvath, P.; Weinberg, G. & Feinstein, D. L.** (2001). A 27-bp region of the inducible nitric oxide synthase promoter regulates expression in glial cells. *J Neurochem* **78**: 129-40.
- Ghosh, S.** (1999). Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res* **19**: 183-9.
- Grandati, M.; Verrecchia, C.; Revaud, M. L.; Allix, M.; Boulu, R. G. & Plotkine, M.** (1997). Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* **122**: 625-30.
- Granger, D. N. & Kubes, P.** (1996). Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods Enzymol* **269**: 434-42.
- Griffiths, H. R.; Moller, L.; Bartosz, G.; Bast, A.; Bertoni-Freddari, C.; Collins, A.; Cooke, M.; Coolen, S.; Haenen, G.; Hoberg, A. M.; Loft, S.; Lunec, J.; Olinski, R.; Parry, J.; Pompella, A.; Poulsen, H.; Verhagen, H. & Astley, S. B.** (2002). Biomarkers. *Mol Aspects Med* **23**: 101-208.
- Grisham, M. B.; Granger, D. N. & Lefler, D. J.** (1998). Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* **25**: 404-33.
- Grisham, M. B.; Jourdain, D. & Wink, D. A.** (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* **276**: G315-21.
- Groves, J. T. & Wang, C. C.** (2000). Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 687-95.
- Grumbles, R. M.; Shao, L.; Jeffrey, J. J. & Howell, D. S.** (1997). Regulation of the rat interstitial collagenase promoter by IL-1 beta, c-Jun, and Ras-dependent signaling in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* **67**: 92-102.
- Grzybicki, D.; Gebhart, G. F. & Murphy, S.** (1996). Expression of nitric oxide synthase type II in the spinal cord under conditions producing thermal hyperalgesia. *J Chem Neuroanat* **10**: 221-9.
- Grzybicki, D.; Moore, S. A.; Schelper, R.; Glabinski, A. R.; Ransohoff, R. M. & Murphy, S.** (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and nitric oxide synthase-2 following cerebral trauma. *Acta Neuropathol (Berl)* **95**: 98-103.
- Grzybicki, D. M.; Kwack, K. B.; Perlman, S. & Murphy, S. P.** (1997). Nitric oxide synthase type 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.
- Guthrie, P. B.; Knappenberger, J.; Segal, M.; Bennett, M. V.; Charles, A. C. & Kater, S. B.** (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* **19**: 520-8.
- Haley, J. E.; Dickenson, A. H. & Schachter, M.** (1992a). Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* **31**: 251-8.
- Haley, J. E.; Wilcox, G. L. & Chapman, P. F.** (1992b). The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* **8**: 211-6.
- Harrison, D. G.** (1997a). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**: 2153-7.
- Harrison, D. G.** (1997b). Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* **20**: II-11-7.
- Hazzalin, C. A.; Le Panse, R.; Cano, E. & Mahadevan, L. C.** (1998). Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol* **18**: 1844-54.
- He, Q. & LaPointe, M. C.** (1999). Interleukin-1beta regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* **33**: 283-9.
- Herlaar, E. & Brown, Z.** (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* **5**: 439-47.

- Hevel, J. M.; White, K. A. & Marletta, M. A.** (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* **266**: 22789-91.
- Hierholzer, C.; Harbrecht, B.; Menezes, J. M.; Kane, J.; MacMicking, J.; Nathan, C. F.; Peitzman, A. B.; Billiar, T. R. & Tweardy, D. J.** (1998). Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* **187**: 917-28.
- Hindley, S.; Herman, M. A. & Rathbone, M. P.** (1994). Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist. *J Neurosci Res* **38**: 399-406.
- Hirano, A.; Yang, Z.; Katayama, Y.; Korte-Sarfaty, J. & Wong, T. C.** (1999). Human CD46 enhances nitric oxide production in mouse macrophages in response to measles virus infection in the presence of gamma interferon: dependence on the CD46 cytoplasmic domains. *J Virol* **73**: 4776-85.
- Hochbaum, D.; Tanos, T.; Ribeiro-Neto, F.; Altschuler, D. & Coso, O. A.** (2003). Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* **278**: 33738-46.
- Hoffmann, C.; Heine, P.; Pradel, G.; Kim, Y.-C.; Jacobson, K. A. & Zimmermann, H.** (2000). Inhibition of ecto-apyrase and ecto-ATPase by pyridoxal phosphate-related compounds. *Drug Develop Research* **51**: 153-8.
- Holz, G. G.; Kang, G.; Harbeck, M.; Roe, M. W. & Chepurny, O. G.** (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* **577**: 5-15.
- Hori, K.; Burd, P. R.; Furuke, K.; Kutza, J.; Weih, K. A. & Clouse, K. A.** (1999). Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **93**: 1843-50.
- Horner, P. J. & Palmer, T. D.** (2003). New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida loca! *Trends Neurosci* **26**: 597-603.
- Hu, J.; Akama, K. T.; Krafft, G. A.; Chromy, B. A. & Van Eldik, L. J.** (1998a). Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* **785**: 195-206.
- Hu, J.; Haseebuddin, M.; Young, M. & Colburn, N. H.** (2005). Suppression of p65 phosphorylation coincides with inhibition of IkappaBalpha polyubiquitination and degradation. *Mol Carcinog* **44**: 274-84.
- Hu, J.; LaDu, M. J. & Van Eldik, L. J.** (1998b). Apolipoprotein E attenuates beta-amyloid-induced astrocyte activation. *J Neurochem* **71**: 1626-34.
- Hu, J. & Van Eldik, L. J.** (1999). Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res* **842**: 46-54.
- Hua, L. L.; Zhao, M. L.; Cosenza, M.; Kim, M. O.; Huang, H.; Tanowitz, H. B.; Brosnan, C. F. & Lee, S. C.** (2002). Role of mitogen-activated protein kinases in inducible nitric oxide synthase and TNFalpha expression in human fetal astrocytes. *J Neuroimmunol* **126**: 180-9.
- Humphrey, P. P.; Buell, G.; Kennedy, I.; Khakh, B. S.; Michel, A. D.; Surprenant, A. & Trezise, D. J.** (1995). New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**: 585-96.
- Huston, J. P.; Haas, H. L.; Boix, F.; Pfister, M.; Decking, U.; Schrader, J. & Schwarting, R. K.** (1996). Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience* **73**: 99-107.
- Iadecola, C.** (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* **20**: 132-9.
- Iadecola, C. & Ross, M. E.** (1997). Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* **835**: 203-17.
- Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; ten Dijke, P.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.;**

- Matsumoto, K.; Miyazono, K. & Gotoh, Y.** (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**: 90-4.
- Ignarro, L. J.** (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 535-60.
- Ignarro, L. J.; Degnan, J. N.; Baricos, W. H.; Kadowitz, P. J. & Wolin, M. S.** (1982). Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* **718**: 49-59.
- Illes, P. & Ribeiro, J. A.** (2004). Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr Top Med Chem* **4**: 831-8.
- Inoue, N.** (2004). [Role of nitric oxide/cGMP system in platelet function]. *Nippon Rinsho* **62 Suppl 9**: 500-4.
- Inouye, K.; Mizutani, S.; Koide, H. & Kaziro, Y.** (2000). Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* **275**: 3737-40.
- Ip, Y. T. & Davis, R. J.** (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 205-19.
- Israel, A.** (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* **10**: 129-33.
- Izquierdo Pastor, M.; Reif, K. & Cantrell, D.** (1995). The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol Today* **16**: 159-64.
- Jacobson, K. A.; Costanzi, S.; Joshi, B. V.; Besada, P.; Shin, D. H.; Ko, H.; Ivanov, A. A. & Mamedova, L.** (2006). Agonists and antagonists for P2 receptors. *Novartis Found Symp* **276**: 58-68; discussion 68-72, 107-12, 275-81.
- Jacobson, K. A. & Gao, Z. G.** (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 247-64.
- Jana, M.; Anderson, J. A.; Saha, R. N.; Liu, X. & Pahan, K.** (2005). Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radic Biol Med* **38**: 655-64.
- Jefferies, C. A. & O'Neill, L. A.** (2000). Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor kappaB activation in an inhibitory protein kappaBalpha-independent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to transactivate gene expression. *J Biol Chem* **275**: 3114-20.
- Jiang, X.; Takahashi, N.; Ando, K.; Otsuka, T.; Tetsuka, T. & Okamoto, T.** (2003a). NF-kappa B p65 transactivation domain is involved in the NF-kappa B-inducing kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 583-90.
- Jiang, X.; Takahashi, N.; Matsui, N.; Tetsuka, T. & Okamoto, T.** (2003b). The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J Biol Chem* **278**: 919-26.
- Jiang, Y. & Gong, X. W.** (2000). [Regulation of inflammatory responses by MAPK signal transduction pathways]. *Sheng Li Xue Bao* **52**: 267-71.
- Jimenez, A. I.; Castro, E.; Mirabet, M.; Franco, R.; Delicado, E. G. & Miras-Portugal, M. T.** (1999). Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes. *Glia* **26**: 119-28.
- John, G. R.; Simpson, J. E.; Woodroffe, M. N.; Lee, S. C. & Brosnan, C. F.** (2001). Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *J Neurosci* **21**: 4134-42.
- Jonzon, B.; Nilsson, J. & Fredholm, B. B.** (1985). Adenosine receptor-mediated changes in cyclic AMP production and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **124**: 451-6.
- Jordan, M. L.; Rominski, B.; Jaquins-Gerstl, A.; Geller, D. & Hoffman, R. A.** (1995). Regulation of inducible nitric oxide

- production by intracellular calcium. *Surgery* **118**: 138-45; discussion 145-6.
- Jourd'heuil, D.; Mills, L.; Miles, A. M. & Grisham, M. B.** (1998). Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. *Nitric Oxide* **2**: 37-44.
- Kan, H.; Xie, Z. & Finkel, M. S.** (1999). Norepinephrine-stimulated MAP kinase activity enhances cytokine-induced NO production by rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* **276**: H47-52.
- Kanakaraj, P.; Ngo, K.; Wu, Y.; Angulo, A.; Ghazal, P.; Harris, C. A.; Siekierka, J. J.; Peterson, P. A. & Fung-Leung, W. P.** (1999). Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. *J Exp Med* **189**: 1129-38.
- Kanner, J.; Harel, S. & Granit, R.** (1991). Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* **289**: 130-6.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Kasina, S.; Wasia, R.; Fasim, A.; Radhika, K. V. & Singh, S. S.** (2006). Phorbol ester mediated activation of inducible nitric oxide synthase results in platelet profilin nitration. *Nitric Oxide* **14**: 65-71.
- Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K. & Akira, S.** (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-22.
- Kawasaki, H.; Springett, G. M.; Mochizuki, N.; Toki, S.; Nakaya, M.; Matsuda, M.; Housman, D. E. & Graybiel, A. M.** (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**: 2275-9.
- Kim, Y. C.; Ji, X.; Melman, N.; Linden, J. & Jacobson, K. A.** (2000). Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A(2B) adenosine receptors. *J Med Chem* **43**: 1165-72.
- Kim, Y. M.; Talanian, R. V. & Billiar, T. R.** (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**: 31138-48.
- Kirschuk, S.; Moller, T.; Voitenko, N.; Kettenmann, H. & Verkhratsky, A.** (1995). ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J Neurosci* **15**: 7861-71.
- Klaska, I.; Bednarek, K. & Nowak, J. Z.** (2008). Effects of PEDF and VEGF on PACAP-/VIP-induced cAMP formation in rat brain derived astrocyte cultures. *Pharmacol Rep* **60**: 1019-24.
- Kleinert, H.; Schwarz, P. M. & Forstermann, U.** (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* **384**: 1343-64.
- Kopnisky, K. L.; Summers, C. & Chandler, L. J.** (1997). Cytokine- and endotoxin-induced nitric oxide synthase in rat astroglial cultures: differential modulation by angiotensin II. *J Neurochem* **68**: 935-44.
- Korth, H. G.; Sustmann, R.; Thater, C.; Butler, A. R. & Ingold, K. U.** (1994). On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J Biol Chem* **269**: 17776-9.
- Koszalka, P.; Ozuyaman, B.; Huo, Y.; Zerneck, A.; Flogel, U.; Braun, N.; Buchheiser, A.; Decking, U. K.; Smith, M. L.; Sevigny, J.; Gear, A.; Weber, A. A.; Molojavyi, A.; Ding, Z.; Weber, C.; Ley, K.; Zimmermann, H.; Godecke, A. & Schrader, J.** (2004). Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* **95**: 814-21.
- Kristal, A. R.; Beresford, S. A. & Lazovich, D.** (1994). Assessing change in diet-intervention research. *Am J Clin Nutr* **59**: 185S-189S.
- Kristal, B. S.; Park, B. J. & Yu, B. P.** (1994). Antioxidants reduce peroxy-mediated inhibition of mitochondrial transcription. *Free Radic Biol Med* **16**: 653-60.
- Kristal, B. S.; Park, B. K. & Yu, B. P.** (1996). 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **271**: 6033-8.

- Kristof, A. S.; Marks-Konczalik, J. & Moss, J.** (2001). Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J Biol Chem* **276**: 8445-52.
- Kroncke, K. D.; Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V.** (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* **113**: 147-56.
- Krumenacker, J. S.; Kots, A. & Murad, F.** (2005). Effects of the JNK inhibitor anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one (SP-600125) on soluble guanylyl cyclase alpha1 gene regulation and cGMP synthesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C778-84.
- Krupinski, J.; Coussen, F.; Bakalyar, H. A.; Tang, W. J.; Feinstein, P. G.; Orth, K.; Slaughter, C.; Reed, R. R. & Gilman, A. G.** (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**: 1558-64.
- Krushel, L. A.; Cunningham, B. A.; Edelman, G. M. & Crossin, K. L.** (1999). NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem* **274**: 2432-9.
- Kull, B.; Svenningsson, P. & Fredholm, B. B.** (2000). Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol* **58**: 771-7.
- Kuperman, A. S.; Volpert, W. A. & Okamoto, M.** (1964). Release of Adenine Nucleotide from Nerve Axons. *Nature* **204**: 1000-1.
- Kyriakis, J. M. & Avruch, J.** (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* **18**: 567-77.
- Lamas, S.; Marsden, P. A.; Li, G. K.; Tempst, P. & Michel, T.** (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6348-52.
- Lander, H. M.** (1996). Cellular Activation Mediated by Nitric Oxide. *Methods* **10**: 15-20.
- Lane, J. H.; Sasseville, V. G.; Smith, M. O.; Vogel, P.; Pauley, D. R.; Heyes, M. P. & Lackner, A. A.** (1996). Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation. *J Neurovirol* **2**: 423-32.
- Lane, T. E.; Paoletti, A. D. & Buchmeier, M. J.** (1997). Disassociation between the in vitro and in vivo effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J Virol* **71**: 2202-10.
- LaPointe, M. C. & Isenovic, E.** (1999). Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* **33**: 276-82.
- Laroche-Joubert, N.; Marsy, S.; Michelet, S.; Imbert-Teboul, M. & Doucet, A.** (2002). Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I. *J Biol Chem* **277**: 18598-604.
- Ledent, C.; Vaugeois, J. M.; Schiffmann, S. N.; Pedrazzini, T.; El Yacoubi, M.; Vanderhaeghen, J. J.; Costentin, J.; Heath, J. K.; Vassart, G. & Parmentier, M.** (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**: 674-8.
- Leone, A. M.; Palmer, R. M.; Knowles, R. G.; Francis, P. L.; Ashton, D. S. & Moncada, S.** (1991). Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* **266**: 23790-5.
- Lerner, E. C.; Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Fossum, R. D.; Vogt, A.; Sun, J.; Cox, A. D.; Der, C. J.; Hamilton, A. D. & Sebt, S. M.** (1995a). Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* **270**: 26802-6.
- Lerner, E. C.; Qian, Y.; Hamilton, A. D. & Sebt, S. M.** (1995b). Disruption of oncogenic K-Ras4B processing and signaling by a potent geranylgeranyltransferase I inhibitor. *J Biol Chem* **270**: 26770-3.

- Lerner, E. C.; Zhang, T. T.; Knowles, D. B.; Qian, Y.; Hamilton, A. D. & Sebt, S. M. (1997). Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene* **15**: 1283-8.
- Lev-Ram, V.; Jiang, T.; Wood, J.; Lawrence, D. S. & Tsien, R. Y. (1997a). Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca<sup>2+</sup> in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* **18**: 1025-38.
- Lev-Ram, V.; Nebyelul, Z.; Ellisman, M. H.; Huang, P. L. & Tsien, R. Y. (1997b). Absence of cerebellar long-term depression in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Learn Mem* **4**: 169-77.
- Li, Y.; Zheng, J.; Bird, I. M. & Magness, R. R. (2003). Effects of pulsatile shear stress on nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase expression by ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod* **69**: 1053-9.
- Lin, H. L. & Murphy, S. (1997). Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA. *J Neurochem* **69**: 612-6.
- Linden, J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 775-87.
- Linden, J. (2005). Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* **67**: 1385-7.
- Liu, B. & Neufeld, A. H. (2000). Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* **30**: 178-86.
- Liu, W.; Kato, M.; Itoigawa, M.; Murakami, H.; Yajima, M.; Wu, J.; Ishikawa, N. & Nakashima, I. (2001). Distinct involvement of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in serum deprivation-mediated stimulation of inducible nitric oxide synthase and its inhibition by 4-hydroxynonenal. *J Cell Biochem* **83**: 271-80.
- Liu, X.; Miller, M. J.; Joshi, M. S.; Thomas, D. D. & Lancaster, J. R., Jr. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2175-9.
- Liu, Z. G.; Hsu, H.; Goeddel, D. V. & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565-76.
- Lo, E. H.; Pierce, A. R.; Matsumoto, K.; Kano, T.; Evans, C. J. & Newcomb, R. (1998). Alterations in K<sup>+</sup> evoked profiles of neurotransmitter and neuromodulator amino acids after focal ischemia-reperfusion. *Neuroscience* **83**: 449-58.
- Loddick, S. A. & Rothwell, N. J. (1996). Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**: 932-40.
- Loihl, A. K.; Asensio, V.; Campbell, I. L. & Murphy, S. (1999a). Expression of nitric oxide synthase (NOS)-2 following permanent focal ischemia and the role of nitric oxide in infarct generation in male, female and NOS-2 gene-deficient mice. *Brain Res* **830**: 155-64.
- Loihl, A. K. & Murphy, S. (1998). Expression of nitric oxide synthase-2 in glia associated with CNS pathology. *Prog Brain Res* **118**: 253-67.
- Loihl, A. K.; Whalen, S.; Campbell, I. L.; Mudgett, J. S. & Murphy, S. (1999b). Transcriptional activation following cerebral ischemia in mice of a promoter-deleted nitric oxide synthase-2 gene. *J Biol Chem* **274**: 8844-9.
- Londos, C.; Cooper, D. M. & Wolff, J. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2551-4.
- Loscalzo, J. & Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* **38**: 87-104.
- Lowenstein, C. J.; Alley, E. W.; Raval, P.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H.; Russell, S. W. & Murphy, W. J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two

- upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9730-4.
- Luss, H.; DiSilvio, M.; Litton, A. L.; Molina y Vedia, L.; Nussler, A. K. & Billiar, T. R.** (1994). Inhibition of nitric oxide synthesis enhances the expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and protein in a model of chronic liver inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 635-40.
- Lloyd, H. G. & Fredholm, B. B.** (1995). Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int* **26**: 387-95.
- Lloyd, H. G.; Lindstrom, K. & Fredholm, B. B.** (1993). Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem Int* **23**: 173-85.
- Madrid, L. V.; Mayo, M. W.; Reuther, J. Y. & Baldwin, A. S., Jr.** (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* **276**: 18934-40.
- Maizel, J. V., Jr.; Summers, D. F. & Scharff, M. D.** (1970). SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells. *J Cell Physiol* **76**: 273-87.
- Marcus, J. S.; Karackattu, S. L.; Fleegal, M. A. & Sumners, C.** (2003). Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia* **41**: 152-60.
- Markiewicz, I. & Lukomska, B.** (2006). The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **66**: 343-58.
- Marletta, M. A.** (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* **14**: 488-92.
- Marletta, M. A.** (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**: 12231-4.
- Marletta, M. A.** (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**: 927-30.
- Marmioli, S.; Bavelloni, A.; Faenza, I.; Sirri, A.; Ognibene, A.; Cenni, V.; Tsukada, J.; Koyama, Y.; Ruzzene, M.; Ferri, A.; Auron, P. E.; Toker, A. & Maraldi, N. M.** (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I. *FEBS Lett* **438**: 49-54.
- Marzinzig, M.; Nussler, A. K.; Stadler, J.; Marzinzig, E.; Barthlen, W.; Nussler, N. C.; Beger, H. G.; Morris, S. M., Jr. & Bruckner, U. B.** (1997). Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* **1**: 177-89.
- Masserini, M.; Palestini, P. & Pitto, M.** (1999). Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J Neurochem* **73**: 1-11.
- Matsuda, H. & Iyanagi, T.** (1999). Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 345-55.
- Matsumoto, T.; Yokote, K.; Tamura, K.; Takemoto, M.; Ueno, H.; Saito, Y. & Mori, S.** (1999). Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* **274**: 13954-60.
- Mattioli, I.; Geng, H.; Sebald, A.; Hodel, M.; Bucher, C.; Kracht, M. & Schmitz, M. L.** (2006). Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem* **281**: 6175-83.
- Mayer, B. & Andrew, P.** (1998). Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**: 127-33.
- McCarthy, K. D. & de Vellis, J.** (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* **85**: 890-902.

- McDermott, E. P. & O'Neill, L. A.** (2002). Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem* **277**: 7808-15.
- McGuire, T. F.; Qian, Y.; Vogt, A.; Hamilton, A. D. & Sebt, S. M.** (1996). Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. *J Biol Chem* **271**: 27402-7.
- Mennerick, S. & Zorumski, C. F.** (1995). Paired-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *J Physiol* **488** ( Pt 1): 85-101.
- Merrill, J. E. & Benveniste, E. N.** (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* **19**: 331-8.
- Merrill, J. E. & Murphy, S. P.** (1997a). Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. *Brain Behav Immun* **11**: 245-63.
- Merrill, J. E. & Murphy, S. P.** (1997b). Regulation of gene expression in the nervous system by reactive oxygen and nitrogen species. *Metab Brain Dis* **12**: 97-112.
- Metrich, M.; Lucas, A.; Gastineau, M.; Samuel, J. L.; Heymes, C.; Morel, E. & Lezoualc'h, F.** (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **102**: 959-65.
- Michel, J. B.** (1997). [Role of endothelial nitric oxide in the regulation of arterial tone]. *Rev Prat* **47**: 2251-6.
- Michel, T. & Feron, O.** (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* **100**: 2146-52.
- Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Wink, D. A. & Grisham, M. B.** (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* **271**: 40-7.
- Mitomo, K.; Nakayama, K.; Fujimoto, K.; Sun, X.; Seki, S. & Yamamoto, K.** (1994). Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro. *Gene* **145**: 197-203.
- Mochizuki, N.; Yamashita, S.; Kurokawa, K.; Ohba, Y.; Nagai, T.; Miyawaki, A. & Matsuda, M.** (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* **411**: 1065-8.
- Moncada, S. & Higgs, E. A.** (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* **147** Suppl 1: S193-201.
- Moncada, S. & Palmer, R. M.** (1991). Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* **15**: 16-9.
- Moncada, S.; Palmer, R. M. & Higgs, E. A.** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-42.
- Monfort, P.; Munoz, M. D.; Kosenko, E. & Felipo, V.** (2002). Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci* **22**: 10116-22.
- Mongin, A. A. & Kimelberg, H. K.** (2005). ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C204-13.
- Moriguchi, T.; Kuroyanagi, N.; Yamaguchi, K.; Gotoh, Y.; Irie, K.; Kano, T.; Shirakabe, K.; Muro, Y.; Shibuya, H.; Matsumoto, K.; Nishida, E. & Hagiwara, M.** (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**: 13675-9.
- Mosqueda-Garcia, R.; Tseng, C. J.; Appalsamy, M.; Beck, C. & Robertson, D.** (1991). Cardiovascular excitatory effects of adenosine in the nucleus of the solitary tract. *Hypertension* **18**: 494-502.
- Murphy, S.** (2000). Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* **29**: 1-13.

- Murphy, S.; Lin, H. L. & Park, S. K.** (1995). Cytokine-induced expression of type II nitric oxide synthase in astrocytes is downregulated by ATP and glutamate. *Glia* **15**: 77-82.
- Murphy, S.; Simmons, M. L.; Agullo, L.; Garcia, A.; Feinstein, D. L.; Galea, E.; Reis, D. J.; Minc-Golomb, D. & Schwartz, J. P.** (1993). Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* **16**: 323-8.
- Nathan, C.** (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* **100**: 2417-23.
- Nawashiro, H.; Martin, D. & Hallenbeck, J. M.** (1997). Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 229-32.
- Neary, J. T.** (1996). Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms. *Ciba Found Symp* **198**: 130-9; discussion 139-41.
- Neary, J. T.; Kang, Y.; Bu, Y.; Yu, E.; Akong, K. & Peters, C. M.** (1999). Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J Neurosci* **19**: 4211-20.
- Neary, J. T.; Kang, Y.; Willoughby, K. A. & Ellis, E. F.** (2003). Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci* **23**: 2348-56.
- Neary, J. T.; Rathbone, M. P.; Cattabeni, F.; Abbracchio, M. P. & Burnstock, G.** (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci* **19**: 13-8.
- Neary, J. T.; van Breemen, C.; Forster, E.; Norenberg, L. O. & Norenberg, M. D.** (1988). ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 1410-6.
- Nedergaard, M.; Ransom, B. & Goldman, S. A.** (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**: 523-30.
- Neufeld, A. H.** (1999). Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**: S129-35.
- Neufeld, A. H.; Sawada, A. & Becker, B.** (1999). Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9944-8.
- Newman, E. A.** (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**: 536-42.
- Nielsen, M. D.; Chan, G. C.; Poser, S. W. & Storm, D. R.** (1996). Differential regulation of type I and type VIII Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases by Gi-coupled receptors in vivo. *J Biol Chem* **271**: 33308-16.
- Nishiya, T.; Uehara, T.; Edamatsu, H.; Kaziro, Y.; Itoh, H. & Nomura, Y.** (1997). Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *FEBS Lett* **408**: 33-8.
- Nishiya, T.; Uehara, T.; Kaneko, M. & Nomura, Y.** (2000). Involvement of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in rat C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 268-73.
- Nomura, K.; Kanemura, H.; Satoh, T. & Kataoka, T.** (2004). Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations. *J Biol Chem* **279**: 22664-73.
- Nomura, Y.** (2001). NF-kappaB activation and IkappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci* **68**: 1695-701.
- O'Donnell, V. B.; Eiserich, J. P.; Chumley, P. H.; Jablonsky, M. J.; Krishna, N. R.; Kirk, M.; Barnes, S.; Darley-USmar, V. M. & Freeman, B. A.** (1999). Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide,

- and nitronium ion. *Chem Res Toxicol* **12**: 83-92.
- O'Mahony, D. & Kendall, M. J.** (1999). Nitric oxide in acute ischaemic stroke: a target for neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**: 1-3.
- O'Neill, L.** (2000). The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* **28**: 557-63.
- O'Neill, L. A. & Greene, C.** (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**: 650-7.
- Okuda, Y.; Sakoda, S.; Fujimura, H. & Yanagihara, T.** (1997). Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **73**: 107-16.
- Ongini, E.; Dionisotti, S.; Gessi, S.; Irenius, E. & Fredholm, B. B.** (1999). Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 7-10.
- Pahan, K.; Liu, X.; McKinney, M. J.; Wood, C.; Sheikh, F. G. & Raymond, J. R.** (2000a). Expression of a dominant-negative mutant of p21(ras) inhibits induction of nitric oxide synthase and activation of nuclear factor-kappaB in primary astrocytes. *J Neurochem* **74**: 2288-95.
- Pahan, K.; Liu, X.; Wood, C. & Raymond, J. R.** (2000b). Expression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits the induction of nitric oxide synthase in human astrocytes. *FEBS Lett* **472**: 203-7.
- Pahan, K.; Namboodiri, A. M.; Sheikh, F. G.; Smith, B. T. & Singh, I.** (1997a). Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* **272**: 7786-91.
- Pahan, K.; Raymond, J. R. & Singh, I.** (1999). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase induces nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide- or cytokine-stimulated C6 glial cells. *J Biol Chem* **274**: 7528-36.
- Pahan, K.; Sheikh, F. G.; Namboodiri, A. M. & Singh, I.** (1997b). Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* **100**: 2671-9.
- Palmer, R. M.; Ferrige, A. G. & Moncada, S.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-6.
- Palsson, E. M.; Popoff, M.; Thelestam, M. & O'Neill, L. A.** (2000). Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1. *J Biol Chem* **275**: 7818-25.
- Park, K.; Kim, S. J.; Bang, Y. J.; Park, J. G.; Kim, N. K.; Roberts, A. B. & Sporn, M. B.** (1994). Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8772-6.
- Park, S. K.; Lin, H. L. & Murphy, S.** (1997). Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kappaB binding to DNA. *Biochem J* **322** ( Pt 2): 609-13.
- Park, S. K. & Murphy, S.** (1994). Duration of expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurosci Res* **39**: 405-11.
- Park, S. K. & Murphy, S.** (1996). Nitric oxide synthase type II mRNA stability is translation- and transcription-dependent. *J Neurochem* **67**: 1766-9.
- Peakman, M. C. & Hill, S. J.** (1994). Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* **111**: 191-8.
- Pearce, B.; Murphy, S.; Jeremy, J.; Morrow, C. & Dandona, P.** (1989). ATP-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P2-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *J Neurochem* **52**: 971-7.
- Peng, H. B.; Libby, P. & Liao, J. K.** (1995a). Induction and stabilization of I kappa B

- alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* **270**: 14214-9.
- Peng, H. B.; Rajavashisth, T. B.; Libby, P. & Liao, J. K.** (1995b). Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **270**: 17050-5.
- Piao, C. S.; Kim, J. B.; Han, P. L. & Lee, J. K.** (2003). Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult. *J Neurosci Res* **73**: 537-44.
- Polte, T.; Oberle, S. & Schroder, H.** (1997). Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett* **409**: 46-8.
- Pou, S.; Keaton, L.; Surichamorn, W. & Rosen, G. M.** (1999). Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **274**: 9573-80.
- Presta, A.; Siddhanta, U.; Wu, C.; Sennequier, N.; Huang, L.; Abu-Soud, H. M.; Erzurum, S. & Stuehr, D. J.** (1998). Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**: 298-310.
- Privat, C.; Lantoine, F.; Bedioui, F.; Millanvoye van Brussel, E.; Devynck, J. & Devynck, M. A.** (1997). Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sci* **61**: 1193-202.
- Proud, C. G.** (2004). Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **63**: 403-13.
- Pryor, W. A. & Squadrito, G. L.** (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* **268**: L699-722.
- Qian, Y.; Vogt, A.; Vasudevan, A.; Sebti, S. M. & Hamilton, A. D.** (1998). Selective inhibition of type-I geranylgeranyltransferase in vitro and in whole cells by CAAL peptidomimetics. *Bioorg Med Chem* **6**: 293-9.
- Raddassi, K.; Berthon, B.; Petit, J. F. & Lemaire, G.** (1994). Role of calcium in the activation of mouse peritoneal macrophages: induction of NO synthase by calcium ionophores and thapsigargin. *Cell Immunol* **153**: 443-55.
- Raingeaud, J.; Gupta, S.; Rogers, J. S.; Dickens, M.; Han, J.; Ulevitch, R. J. & Davis, R. J.** (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**: 7420-6.
- Rajfer, J.; Aronson, W. J.; Bush, P. A.; Dorey, F. J. & Ignarro, L. J.** (1992). Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* **326**: 90-4.
- Rana, A.; Gallo, K.; Godowski, P.; Hirai, S.; Ohno, S.; Zon, L.; Kyriakis, J. M. & Avruch, J.** (1996). The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J Biol Chem* **271**: 19025-8.
- Ransom, B.; Behar, T. & Nedergaard, M.** (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* **26**: 520-2.
- Rausch, O. & Marshall, C. J.** (1999). Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *J Biol Chem* **274**: 4096-105.
- Reddy, S. A.; Huang, J. H. & Liao, W. S.** (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. *J Biol Chem* **272**: 29167-73.
- Rehmann, H.; Schwede, F.; Doskeland, S. O.; Wittinghofer, A. & Bos, J. L.** (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem* **278**: 38548-56.
- Rejto, L.; Huszka, M.; Kaplar, M. & Udvardy, M.** (2003). Effects of in vitro platelet activation on platelet derived nitric oxide production in healthy humans and in

- chronic myeloproliferative diseases with elevated platelet counts. *Platelets* **14**: 283-6.
- Roscioni, S. S.; Elzinga, C. R. & Schmidt, M.** (2008). Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**: 345-57.
- Rossi, F. & Bianchini, E.** (1996). Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 474-8.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M. & Freeman, B. A.** (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* **269**: 26066-75.
- Rudolphi, K. A.; Schubert, P.; Parkinson, F. E. & Fredholm, B. B.** (1992). Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **4**: 346-69.
- Saleshando, G. & O'Connor, J. J.** (2000). SB203580, the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor blocks the inhibitory effect of beta-amyloid on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **288**: 119-22.
- Samdani, A. F.; Dawson, T. M. & Dawson, V. L.** (1997). Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* **28**: 1283-8.
- Santana, P.; Llanes, L.; Hernandez, I.; Gonzalez-Robayna, I.; Tabraue, C.; Gonzalez-Reyes, J.; Quintana, J.; Estevez, F.; Ruiz de Galarreta, C. M. & Fanjul, L. F.** (1996). Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* **137**: 2480-9.
- Sanz, J. M. & Di Virgilio, F.** (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* **164**: 4893-8.
- Sassano, A.; Verma, A. & Plataniias, L. C.** (2005). Mitogen-activated protein kinase pathways in interferon signaling. *Methods Mol Med* **116**: 135-50.
- Saura, J.; Angulo, E.; Ejarque, A.; Casado, V.; Tusell, J. M.; Moratalla, R.; Chen, J. F.; Schwarzschild, M. A.; Lluís, C.; Franco, R. & Serratosa, J.** (2005). Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem* **95**: 919-29.
- Sawynok, J.; Reid, A. & Isbrucker, R.** (1990). Adenosine mediates calcium-induced antinociception and potentiation of noradrenergic antinociception in the spinal cord. *Brain Res* **524**: 187-95.
- Schmeck, B.; Zahlten, J.; Moog, K.; van Laak, V.; Huber, S.; Hocke, A. C.; Opitz, B.; Hoffmann, E.; Kracht, M.; Zerrahn, J.; Hammerschmidt, S.; Rosseau, S.; Suttorp, N. & Hippenstiel, S.** (2004). Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem* **279**: 53241-7.
- Schmidt, E. K.; Fichelson, S. & Feller, S. M.** (2004). PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol* **2**: 7.
- Schmidt, H. H. & Walter, U.** (1994). NO at work. *Cell* **78**: 919-25.
- Schmitz, M. L.; Bacher, S. & Kracht, M.** (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* **26**: 186-90.
- Schulte, G. & Fredholm, B. B.** (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **15**: 813-27.
- Schuman, E. M. & Madison, D. V.** (1994). Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* **17**: 153-83.
- Shapshak, P.; Duncan, R.; Minagar, A.; Rodriguez de la Vega, P.; Stewart, R. V. & Goodkin, K.** (2004). Elevated expression of IFN-gamma in the HIV-1 infected brain. *Front Biosci* **9**: 1073-81.
- Shibuki, K. & Okada, D.** (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**: 326-8.

- Shin, I.; Kim, S.; Song, H.; Kim, H. R. & Moon, A.** (2005). H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem* **280**: 14675-83.
- Siddhanta, U.; Wu, C.; Abu-Soud, H. M.; Zhang, J.; Ghosh, D. K. & Stuehr, D. J.** (1996). Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem* **271**: 7309-12.
- Silvagno, F.; Xia, H. & Bredt, D. S.** (1996). Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* **271**: 11204-8.
- Sizemore, N.; Leung, S. & Stark, G. R.** (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF- $\kappa$ B p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* **19**: 4798-805.
- Slezak, M. & Pfrieger, F. W.** (2003). New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* **26**: 531-5.
- Song, Y. J.; Jen, K. Y.; Soni, V.; Kieff, E. & Cahir-McFarland, E.** (2006). IL-1 receptor-associated kinase 1 is critical for latent membrane protein 1-induced p65/RelA serine 536 phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2689-94.
- Stamler, J. S.** (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**: 931-6.
- Ster, J.; De Bock, F.; Guerineau, N. C.; Janossy, A.; Barrere-Lemaire, S.; Bos, J. L.; Bockaert, J. & Fagni, L.** (2007). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2519-24.
- Stewart, V. C.; Giovannoni, G.; Land, J. M.; McDonald, W. I.; Clark, J. B. & Heales, S. J.** (1997). Pretreatment of astrocytes with interferon-alpha/beta impairs interferon-gamma induction of nitric oxide synthase. *J Neurochem* **68**: 2547-51.
- Stewart, V. C.; Land, J. M.; Clark, J. B. & Heales, S. J.** (1998). Pretreatment of astrocytes with interferon-alpha/beta prevents neuronal mitochondrial respiratory chain damage. *J Neurochem* **70**: 432-4.
- Stuehr, D. J.** (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 339-59.
- Stuehr, D. J.; Cho, H. J.; Kwon, N. S.; Weise, M. F. & Nathan, C. F.** (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7773-7.
- Sul, J. Y.; Orosz, G.; Givens, R. S. & Haydon, P. G.** (2004). Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron Glia Biol* **1**: 3-11.
- Sun, J.; Qian, Y.; Hamilton, A. D. & Sebt, S. M.** (1995). Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion. *Cancer Res* **55**: 4243-7.
- Sunahara, R. K.; Dessauer, C. W. & Gilman, A. G.** (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461-80.
- Tabraue, C.; Diaz Penate, R.; Gallardo, G.; Hernandez, I.; Quintana, J.; Lopez Blanco, F.; Gonzalez Reyes, J.; Fanjul, L. F. & Ruiz de Galarreta, C. M.** (1997). Induction of guanosine triphosphate-cyclohydrolase by follicle-stimulating hormone enhances interleukin-1 beta-stimulated nitric oxide synthase activity in granulosa cells. *Endocrinology* **138**: 162-8.
- Tabuchi, A.; Sano, K.; Oh, E.; Tsuchiya, T. & Tsuda, M.** (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett* **351**: 123-7.
- Tan, Y.; Rouse, J.; Zhang, A.; Cariati, S.; Cohen, P. & Comb, M. J.** (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J* **15**: 4629-42.
- Tannous, M.; Amin, R.; Popoff, M. R.; Fiorentini, C. & Kowluru, A.** (2001). Positive modulation by Ras of interleukin-

- Ibeta-mediated nitric oxide generation in insulin-secreting clonal beta (HIT-T15) cells. *Biochem Pharmacol* **62**: 1459-68.
- Taylor, B. S. & Geller, D. A.** (2000). Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* **13**: 413-24.
- Tian, G. F.; Azmi, H.; Takano, T.; Xu, Q.; Peng, W.; Lin, J.; Oberheim, N.; Lou, N.; Wang, X.; Zielke, H. R.; Kang, J. & Nedergaard, M.** (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* **11**: 973-81.
- Todorov, L. D.; Mihaylova-Todorova, S.; Westfall, T. D.; Sneddon, P.; Kennedy, C.; Bjur, R. A. & Westfall, D. P.** (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* **387**: 76-9.
- Togashi, H.; Sasaki, M.; Frohman, E.; Taira, E.; Ratan, R. R.; Dawson, T. M. & Dawson, V. L.** (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2676-80.
- Tolias, C. M.; McNeil, C. J.; Kazlauskaitė, J. & Hillhouse, E. W.** (1999). Superoxide generation from constitutive nitric oxide synthase in astrocytes in vitro regulates extracellular nitric oxide availability. *Free Radic Biol Med* **26**: 99-106.
- Trincavelli, M. L.; Marroni, M.; Tuscano, D.; Ceruti, S.; Mazzola, A.; Mitro, N.; Abbraccio, M. P. & Martini, C.** (2004). Regulation of A2B adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor  $\alpha$  in human astroglial cells. *J Neurochem* **91**: 1180-90.
- Trincavelli, M. L.; Tonazzini, I.; Montali, M.; Abbraccio, M. P. & Martini, C.** (2008). Short-term TNF- $\alpha$  treatment induced A2B adenosine receptor desensitization in human astroglial cells. *J Cell Biochem* **104**: 150-61.
- Trussell, L. O. & Jackson, M. B.** (1985). Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4857-61.
- Tsai, S. F.; Yang, C.; Wang, S. C.; Wang, J. S.; Hwang, J. S. & Ho, S. P.** (2004). Effect of thuringiensin on adenylate cyclase in rat cerebral cortex. *Toxicol Appl Pharmacol* **194**: 34-40.
- Urbano, F. J. & Buno, W.** (1998). BAPTA-AM blocks both voltage-gated and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in cultured bovine chromaffin cells. *Neuroreport* **9**: 3403-7.
- van Calker, D.; Muller, M. & Hamprecht, B.** (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* **33**: 999-1005.
- Vanden Berghe, W.; Plaisance, S.; Boone, E.; De Bosscher, K.; Schmitz, M. L.; Fiers, W. & Haegeman, G.** (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **273**: 3285-90.
- Vazquez, J. F.; Clement, H. W.; Sommer, O.; Schulz, E. & van Calker, D.** (2008). Local stimulation of the adenosine A2B receptors induces an increased release of IL-6 in mouse striatum: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* **105**: 904-9.
- Venema, V. J.; Ju, H.; Zou, R. & Venema, R. C.** (1997). Interaction of neuronal nitric oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* **272**: 28187-90.
- Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Brown, R. F.; Traynor-Kaplan, A. E.; Heyworth, P. G.; Prossnitz, E. R.; Ye, R. D.; Marder, P.; Schelm, J. A.; Rothfuss, K. J. & et al.** (1995). Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **154**: 2413-22.
- Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Hui, K. Y. & Brown, R. F.** (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**: 5241-8.
- Vodovotz, Y.; Bogdan, C.; Paik, J.; Xie, Q. W. & Nathan, C.** (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **178**: 605-13.

- Vodovotz, Y.; Lucia, M. S.; Flanders, K. C.; Chesler, L.; Xie, Q. W.; Smith, T. W.; Weidner, J.; Mumford, R.; Webber, R.; Nathan, C.; Roberts, A. B.; Lippa, C. F. & Sporn, M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* **184**: 1425-33.
- Wada, K.; Chatzipanteli, K.; Kraydieh, S.; Busto, R. & Dietrich, W. D. (1998). Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* **43**: 1427-36.
- Waldman, S. A. & Murad, F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* **39**: 163-96.
- Wang, D. & Baldwin, A. S., Jr. (1998). Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* **273**: 29411-6.
- Wang, D.; Westerheide, S. D.; Hanson, J. L. & Baldwin, A. S., Jr. (2000). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* **275**: 32592-7.
- Wang, Z.; Haydon, P. G. & Yeung, E. S. (2000). Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* **72**: 2001-7.
- Welch, G. & Loscalzo, J. (1994). Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg* **9**: 361-71.
- Wesselborg, S.; Bauer, M. K.; Vogt, M.; Schmitz, M. L. & Schulze-Osthoff, K. (1997). Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* **272**: 12422-9.
- 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.
- Wieraszko, A. & Ehrlich, Y. H. (1994). On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J Neurochem* **63**: 1731-8.
- Wilms, H.; Rosenstiel, P.; Sievers, J.; Deuschl, G.; Zecca, L. & Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb J* **17**: 500-2.
- Wink, D. A.; Feelisch, M.; Fukuto, J.; Chistodoulou, D.; Jourdeheuil, D.; Grisham, M. B.; Vodovotz, Y.; Cook, J. A.; Krishna, M.; DeGraff, W. G.; Kim, S.; Gamson, J. & Mitchell, J. B. (1998a). The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys* **351**: 66-74.
- Wink, D. A. & Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **25**: 434-56.
- Wink, D. A.; Vodovotz, Y.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Kim, S.; Coffin, D.; DeGraff, W.; Deluca, A. M.; Liebmann, J. & Mitchell, J. B. (1998b). The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. *Biochemistry (Mosc)* **63**: 802-9.
- Wink, D. A.; Vodovotz, Y.; Laval, J.; Laval, F.; Dewhirst, M. W. & Mitchell, J. B. (1998c). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **19**: 711-21.
- Won, J. S.; Im, Y. B.; Singh, A. K. & Singh, I. (2004). Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic Biol Med* **37**: 1834-44.
- Wu, X.; Wang, D. W.; Zhang, G. H.; Chen, H. F.; Shan, Y. M. & Tao, L. Y. (1999). [The changes of GFAP, PCNA after brain contusion: an immunohistochemical study in forensic pathology]. *Fa Yi Xue Za Zhi* **15**: 65-6, 126.
- Xia, H. H.; He, H.; De Wang, J.; Gu, Q.; Lin, M. C.; Zou, B.; Yu, L. F.; Sun, Y. W.; Chan, A. O.; Kung, H. F. & Wong, B. C. (2006). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in

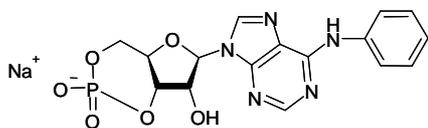
- gastrointestinal cancers. *Cancer Lett* **241**: 268-74.
- Xie, Q. W.; Kashiwabara, Y. & Nathan, C.** (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**: 4705-8.
- Yamasaki, Y.; Matsuura, N.; Shozuhara, H.; Onodera, H.; Itoyama, Y. & Kogure, K.** (1995). Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* **26**: 676-80; discussion 681.
- Yano, H.; Agatsuma, T.; Nakanishi, S.; Saitoh, Y.; Fukui, Y.; Nonomura, Y. & Matsuda, Y.** (1995). Biochemical and pharmacological studies with KT7692 and LY294002 on the role of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc epsilon RI-mediated signal transduction. *Biochem J* **312** ( Pt 1): 145-50.
- Yoshimura, T.; Arimura, N.; Kawano, Y.; Kawabata, S.; Wang, S. & Kaibuchi, K.** (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 62-8.
- Zhai, Q.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Berman, M. A. & Dorf, M. E.** (2004). Low nuclear levels of nuclear factor-kappa B are essential for KC self-induction in astrocytes: requirements for shuttling and phosphorylation. *Glia* **48**: 327-36.
- Zhang, B.; Perpetua, M.; Fulmer, M. & Harbrecht, B. G.** (2004). JNK signaling involved in the effects of cyclic AMP on IL-1beta plus IFNgamma-induced inducible nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *Cell Signal* **16**: 837-46.
- Zhao, T. C.; Taher, M. M.; Valerie, K. C. & Kukreja, R. C.** (2001). p38 Triggers late preconditioning elicited by anisomycin in heart: involvement of NF-kappaB and iNOS. *Circ Res* **89**: 915-22.
- Zimmermann, H.** (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: 299-309.
- Zimmermann, H.** (2006). Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* **276**: 113-28; discussion 128-30, 233-7, 275-81.
- Zwartkruis, F. J. & Bos, J. L.** (1999). Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res* **253**: 157-65.
- A. R. Crossman & D. Neary** (2002). "Neuroanatomía (texto y atlas en color)". ED. MASSON (ISBN: 84-458-1133-9 Edición española).
- George J. Siegel** (2002). "Basic Neurochemistry, 6th Ed.". ED. AMERICAN SOCIETY FOR NEUROCHEMISTRY (ISBN: 0-397-51820-X).
- J. T. Hansen & B. M. Koepfen** (2002). "Netter's Atlas of Human Physiology". ED. ELSEVIER (ISBN: 1929007019, ISBN-13: 9781929007011).
- Mark F. Bear, Barry W. Connors & Michael A. Paradiso** (2002). "Neurociencia: Explorando el cerebro". ED. MASSON (ISBN: 84-458-1259-9 Edición española).
- Roger A. Barker & Stephen Barasi** (2002). "Neurociencia en esquemas". ED. ARS MEDICA (ISBN: 84-95670-12-7 Edición para países de lengua española, excepto Argentina).

## **ANEXO. GLOSARIO DE AGENTES FARMACOLÓGICOS.**

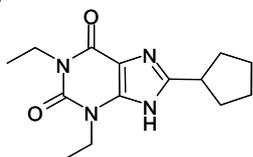


**6-fenil-AMPC (6-Phe-cAMP).**

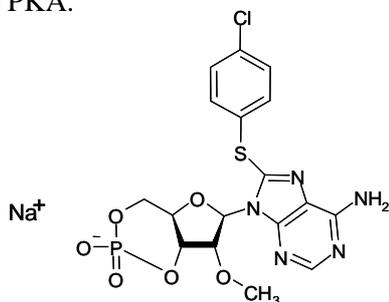
Activador altamente selectivo de PKA.

**8-CPT.**

Antagonista selectivo del receptor A<sub>1</sub> de adenosina.

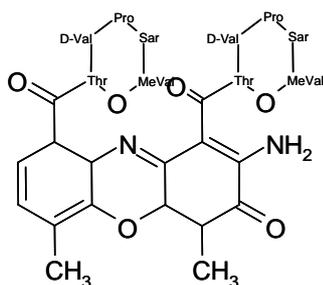
**8-pCPT-2'-O-Me-AMPC.**

Activador permeable de la proteína Epac (cAMP-GEF) *in vitro* e *in vivo*, sin efecto sobre PKA.

**Actinomicina D.**

Actinomicina IV.

Inhibidor de la transcripción a nivel de la RNA polimerasa.

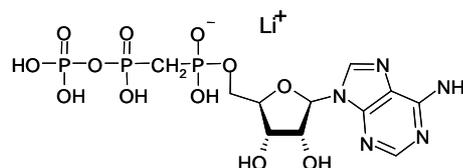
**Adenosina desaminasa (ADA).**

Adenosina aminohidrolasa.

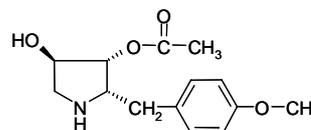
Enzima que cataliza la desaminación de adenosina y 2'-desoxiadenosina.

**α,β-metilén-ATP.**

Agonista de los receptores P2, más potente que el ATP para los subtipos P2X.

**Anisomicina.**

Activador de las proteínas quinasas activadas por estrés, JNK/SAPK y p38<sup>MAPK</sup>, en células de mamífero.

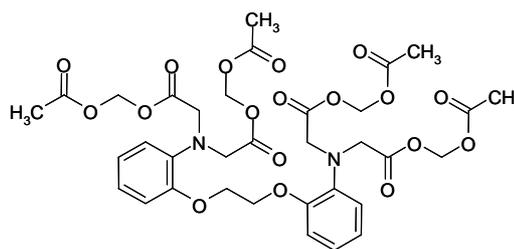
**Apirasa (NTPDasa).**

ATP-disfosfatasa.

ATP difosfo-hidrolasa. Cataliza la liberación del fosfato γ del ATP y del fosfato β del ADP.

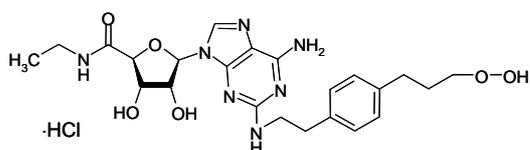
**BAPTA-AM.**

Forma permeable del quelante del Ca<sup>2+</sup> intracelular BAPTA.



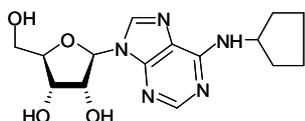
**CGS-21680.**

Agonista del receptor A<sub>2A</sub> de adenosina.



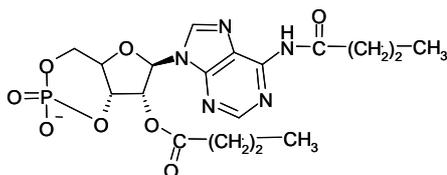
**CPA.**

Agonista del receptor A<sub>1</sub> de adenosina.



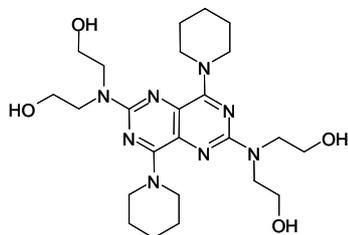
**Dibutiril-AMPC (2But-AMPC, 2bcA).**

Análogo permeable del cAMP.



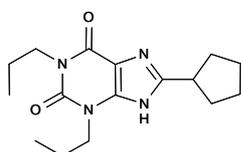
**Dipiridamol.**

Inhibidor permeable de la fosfodiesterasa de cGMP (PDE V; IC<sub>50</sub> = 900 nM). Potente inhibidor de la actividad ectonucleosidasa, también bloquea el transporte de nucleósidos en mamífero.



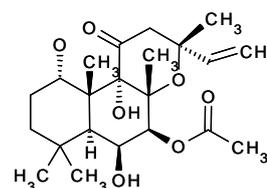
**DPCPX.**

Antagonista del receptor A<sub>1</sub> de adenosina.



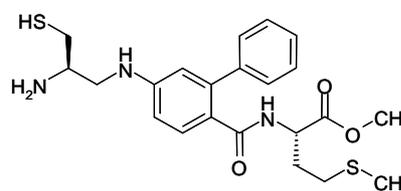
**Forskolina.**

Activador de la adenilato ciclasa.



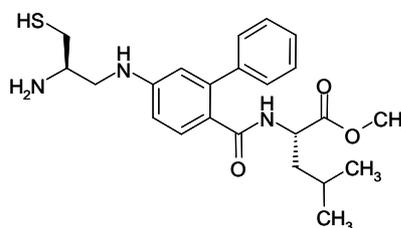
**FTI-277.**

Inhibidor de FTasa (IC<sub>50</sub> = 50 nM). Inhibe el procesado de H-Ras (IC<sub>50</sub> = 100 nM) pero no el de Rap1A geranilgeranilado incluso a 10 μM.



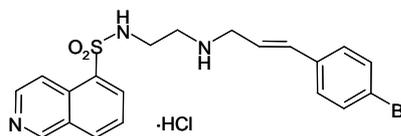
**GGTI-286.**

Inhibidor de GGTasa I.



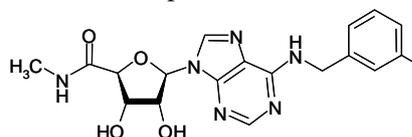
**H-89.**

Inhibidor permeable selectivo de PKA.



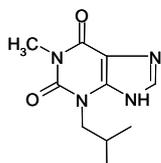
**IB-MECA.**

Agonista del receptor A<sub>3</sub> de adenosina.

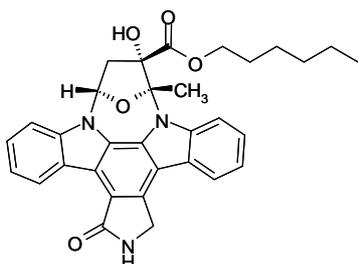


**IBMX.**

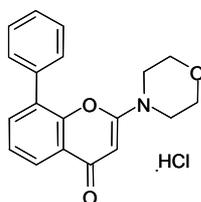
Inhibidor permeable de las fosfodiesterasas de cAMP y cGMP ( $IC_{50} = 2-50 \mu M$ ).

**KT-5720.**

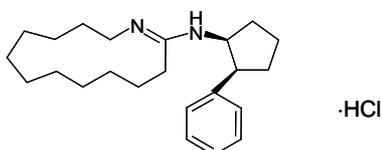
Inhibidor permeable selectivo de PKA.

**LY-294002.**

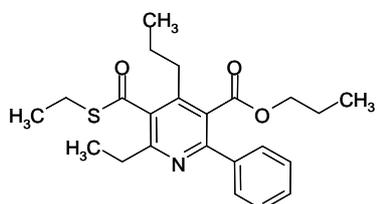
Inhibidor específico de PI3 quinasa.

**MDL-12330A.**

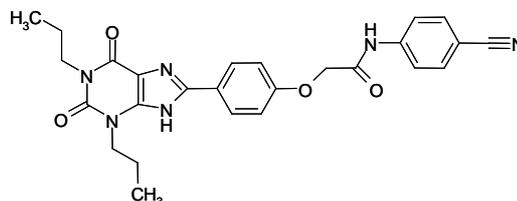
Inhibidor irreversible de la adenilato ciclasa ( $IC_{50} = 250 \mu M$ ).

**MRS-1523.**

Antagonista selectivo del receptor  $A_3$  de adenosina en rata.

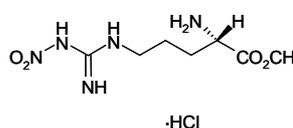
**MRS-1754.**

Antagonista del receptor  $A_{2B}$  de adenosina.

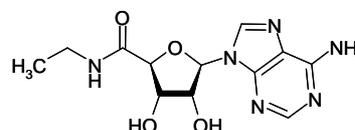
**L-NAME.**

$N^G$ -Nitro-L-arginina-metil-éster

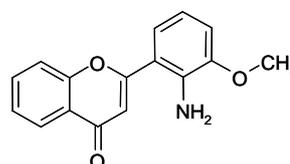
Inhibidor estereoespecífico de la síntesis de óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) a partir de L-arginina.

**NECA.**

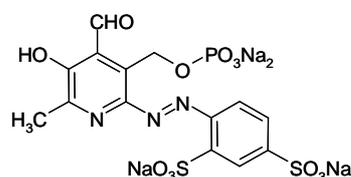
Agonista de receptores de adenosina con similar afinidad por los subtipos  $A_1$  y  $A_2$ .

**PD-98059.**

Inhibidor selectivo de MAP quinasa quinasa (MEK) que actúa inhibiendo la activación de MAP quinasa.

**PPADS.**

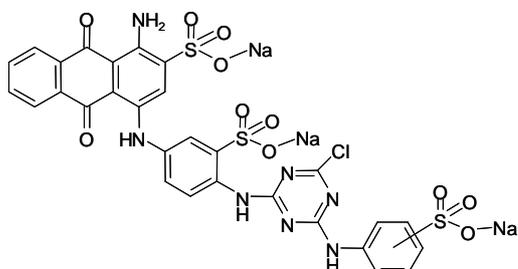
Antagonista selectivo de los receptores P2.



**Reactive Blue 2 (RB 2).**

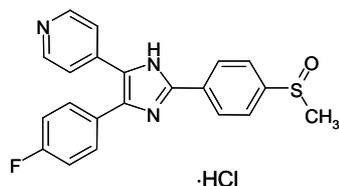
Basilen Blue.

Antagonista de los receptores P2Y, el antagonista más potente para los canales activados por ATP.



**SB-203580.**

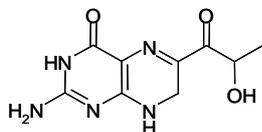
Inhibidor permeable y altamente específico de p38<sup>MAPK</sup> (IC<sub>50</sub> = 34 nM *in vitro*, 600 nM en célula). No inhibe significativamente a JNK ni p42<sup>MAPK</sup> incluso a 100 μM.



**Sepiapterina.**

L-Sepiapterina.

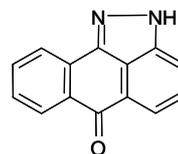
Cofactor de la NOS, convertida intracelularmente en BH<sub>4</sub>.



**SP-600125.**

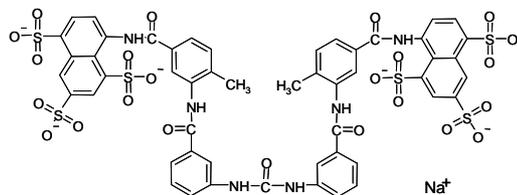
SAPK Inhibitor II.

Inhibidor permeable selectivo de JNK. Presenta 300 veces más selectividad para JNK que para ERK1 y p38 MAP quinasas.



**Suramina.**

Antagonista de los receptores P2X y P2Y. También desacopla las proteínas G de sus receptores e inhibe la PLD.



**ZM-241385.**

Antagonista del receptor A<sub>2A</sub> de adenosina, con selectividades de 1000, 91 y 500000 sobre A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, respectivamente.

