

Mecanismo de la inhibición de la comunicación intercelular por inducción de la óxido nítrico sintasa en astrocitos durante el desarrollo

Mechanism of intercellular communication inhibition after induction of nitric oxide synthase in astrocytes during development

BOLAÑOS, J. P.; VERA, B.; SÁNCHEZ-ABARCA, L. I., y MEDINA, J. M.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. del Campo Charro. 37007. Salamanca. España.

RESUMEN

El desarrollo normal del cerebro requiere una activa cooperación metabólica entre las células gliales a través de las comunicaciones intercelulares. Esta comunicación se regula por diversos factores, entre los que destaca la actividad de la óxido nítrico (-NO) sintasa (NOS), que inhibe la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos de neonato de rata. Debido a que este efecto va acompañado de una disfunción mitocondrial, hemos propuesto la posibilidad de que ambos fenómenos estén relacionados. Así, la deficiencia energética causada por antimicina en astrocitos de neonato de rata inhibe la permeabilidad de las uniones comunicantes. Este efecto es reversible y dependiente de calcio. La inhibición por déficit energético de la comunicación intercelular tras la inducción de la síntesis de -NO en las células gliales puede ayudar a esclarecer los mecanismos que causan el daño cerebral por hipoxia perinatal, así como al conocimiento del desarrollo fisiopatológico del cerebro.

Palabras Clave: Óxido nítrico. Astrocito. Gap junction. Energía. Mitocondria. Desarrollo.

ABSTRACT

Normal brain development requires an active metabolic cooperation among glial cells through intercellular communications. This communication is regulated by different factors, such as nitric oxide (-NO) synthase (NOS) activity, which inhibits gap junction permeability in rat neonatal astrocytes. Since this effect is accompanied by a mitochondrial dysfunction, we have proposed the possibility that both phenomena are related. Thus, antimycin-mediated energy deficiency in rat neonatal astrocytes inhibits gap junction permeability. This effect is reversible and calcium-dependent. The energy deficiency-mediated inhibition of intercellular communication after -NO synthesis induction in glial cells may help to clarify the mechanisms causing brain damage by perinatal hypoxia, and also to the knowledge of the brain pathophysiological development.

Key Words: Nitric oxide. Astrocyte. Gap junction. Energy. Mitochondria. Development.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 16-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 971-979]

INTRODUCCIÓN

Las uniones comunicantes ("gap junctions") son conductos que se establecen entre células adyacentes que permiten una comunicación directa de iones citoplasmáticos y pequeñas moléculas entre células sin necesidad de acceder al espacio extracelular (1). De entre las células del sistema nervioso central, los astrocitos se encuentran estrechamente acoplados gracias a las uniones comunicantes (2, 3), cuya permeabilidad se regula por endotelinas (4), por mecanismos de transducción de señales mediadas por Ca^{2+} /cAMP (5) así como por agentes prooxidantes, tales como algunos radicales libres (6) y el derivado del óxido nítrico (-NO), el anión peroxinitrito (ONOO-) (7).

La comunicación intercelular juega un importante papel durante el desarrollo del sistema nervioso central (8). Así, las uniones comunicantes en los astrocitos se encuentran inhibidas hasta el comienzo de la diferenciación (9), lo que sugiere que la comunicación intercelular se encuentra interrumpida durante la proliferación de los astrocitos. Es más, los mismos estímulos que inducen la proliferación también inhiben la permeabilidad de las uniones comunicantes (10). Recientemente se ha observado que la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) aumenta durante el período perinatal (11). Debido a que la inducción de esta enzima se acompaña de la inhibición de las uniones comunicantes (7), cabe sugerir que la inhibición de estas uniones durante la proliferación de los astrocitos en el período perinatal y la inducción de la NOS son fenómenos que están relacionados.

El mecanismo de la inhibición de las uniones comunicantes por inducción de la NOS se desconoce, aunque se puede hipotetizar que esté desencadenado por la inhibición, dependiente de -NO, de la síntesis mitocondrial de ATP (12). En base a estas consideraciones, el objetivo del presente trabajo consiste en estudiar la posibilidad de que la reserva energética intracelular sea capaz de regular la comunicación intercelular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los medios de cultivo, sustratos, enzimas y coenzimas han sido obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA), Boehringer Ingelheim (Heidelberg, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania).

Los astrocitos en cultivo primario se han obtenido a partir de la corteza

cerebral de neonatos de rata de la raza Wistar de 0-24 horas de vida, tal y como se ha descrito anteriormente (13).

La inducción de la NOS se llevó a cabo por incubación con lipopolisacárido (LPS) durante 18 horas según se describe en Bolaños y Medina (7). La actividad de la NOS se determinó en el citosol de los astrocitos mediante la medida de la formación de L-[³H]citrulina a partir de L-[³H]arginina, como se describe en Bolaños et al. (12). Asimismo, la actividad de la NOS se estimó mediante la determinación de los NO₂⁻+NO₃⁻ liberados al medio de incubación (7). La actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se determinó en los homogenados celulares tras la inducción de la NOS según se describe en Bolaños et al. (12). En los experimentos destinados a la determinación de ATP, las células fueron desproteinizadas rápidamente tras la incubación con antimicina y, tras neutralizar los extractos celulares, la concentración intracelular de ATP se midió por quimioluminiscencia (14).

La permeabilidad de las uniones comunicantes se determinó por la técnica de El-Fouly et al. (15), consistente en la determinación del grado de difusión del colorante fluorescente amarillo de Lucifer a través de las células en cultivo. La determinación cuantitativa del grado de difusión del colorante (equivalente al grado de permeabilidad de las uniones comunicantes) se realizó según se describe en Bolaños y Medina (7). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de la "t" de Student. Valores de "p" menores de 0,05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

La inducción de la NOS produjo una disminución concomitante de la permeabilidad de las uniones comunicantes (Fig. 1). Este efecto se previno tanto por la inclusión de N-monometil-L-arginina (NMMA), un conocido inhibidor de la NOS, o de superóxido dismutasa (SOD), que retira anión superóxido (O₂⁻) (Fig. 1b). La inducción de la NOS se comprobó tanto por la determinación de los NO₂⁻+NO₃⁻ liberados al medio de incubación (Fig. 1a) como por la determinación de la actividad de la NOS en extractos celulares (Fig. 2). La inducción de la NOS se acompañó, además, de la inhibición específica de la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, efecto que se previene tanto por NMMA como por SOD (Fig. 2).

Debido a la observación de la disminución de la cadena respiratoria mitocondrial causada por la inducción de la NOS, nos propusimos investigar la posible relación existente entre la disminución del estado energético celular con la inhibición de comunicación intercelular. Para ello, los astrocitos se incubaron en presencia de antimicina, un conocido inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial. La presencia de este inhibidor causó la disminu-

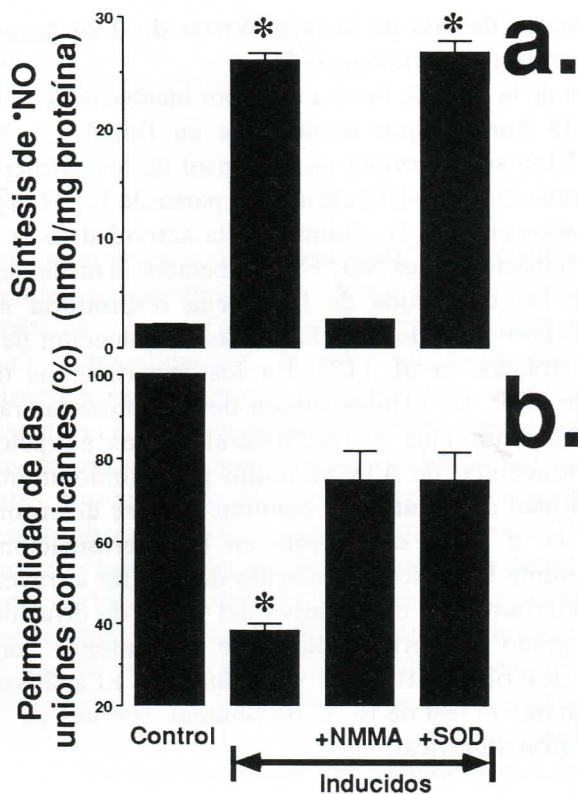


Fig. 1.—Efecto de la inducción de la óxido nítrico sintasa (NOS) sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos de neonato de rata. La inducción de la NOS se consiguió mediante la incubación de LPS (50 ng/ml) durante 18 horas y se estimó mediante la determinación de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en el medio de incubación (a). La determinación de las uniones comunicantes (b) se llevó a cabo por la técnica de la difusión del colorante fluorescente amarillo de Lucifer, tal y como se describe en Material en Métodos. *Estadísticamente significativo con respecto al control.

ción, dosis-dependiente, de la permeabilidad de las uniones comunicantes (Fig. 3a) y del ATP intracelular (resultados no mostrados). Con objeto de esclarecer el posible mecanismo de la inhibición de la comunicación intercelular por antimicina, sugerimos la posibilidad de una mediación por calcio en dicho efecto. Como se observa en la Fig. 3b, la incubación de los astrocitos en presencia del agente quelante de Ca^{2+} , EGTA y del ionóforo A23187, previno la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes causada por antimicina.

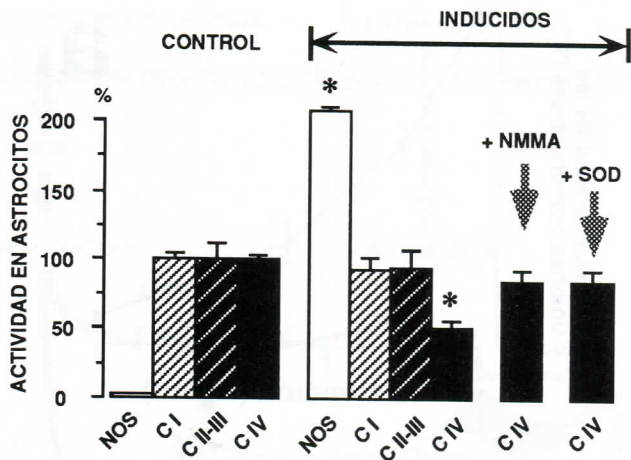


Fig. 2.—Efecto de la inducción de la NOS sobre la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en astrocitos de neonato de rata. Los astrocitos se incubaron en presencia de LPS y de interferón-gamma como se describe en la Ref. 12 y la actividad de la NOS y de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se determinaron como se describe en Material y Métodos. Abreviaturas: C I, complejo I; C II-III, complejo II-III; C IV, complejo IV. *Estadísticamente significativo con respecto al control.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la inducción de la NOS disminuye la comunicación intercelular en astrocitos de rata en desarrollo (Fig. 1). Dicho efecto se previene tanto por la inhibición de la actividad de la NOS como por la retirada de O_2^- (Fig. 1). Debido a que el $-NO$ y el O_2^- reaccionan ávidamente para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), se puede sugerir que se requiere la formación de $ONOO^-$ para que se produzca la inhibición de las uniones comunicantes. Es más, la presencia de $ONOO^-$ auténtico es capaz de inhibir, de forma dosis-dependiente, la comunicación intercelular en astrocitos (7).

El mecanismo de la inhibición de las uniones comunicantes causada por la inducción de la NOS se desconoce. Sin embargo, la inducción de la NOS produce una inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (Fig. 2), por lo que puede sugerirse la posibilidad de que el estado energético celular podría ser responsable de la disminución de la comunicación intercelular. Con objeto de comprobar esta hipótesis hemos utilizado antimicina para producir una disminución de la concentración intracelular de ATP sin estimular la vía de la NOS. Efectivamente, la antimicina indujo una disminución, dosis-dependiente, de la permeabilidad de las uniones comunicantes (Fig. 3a). Es más,

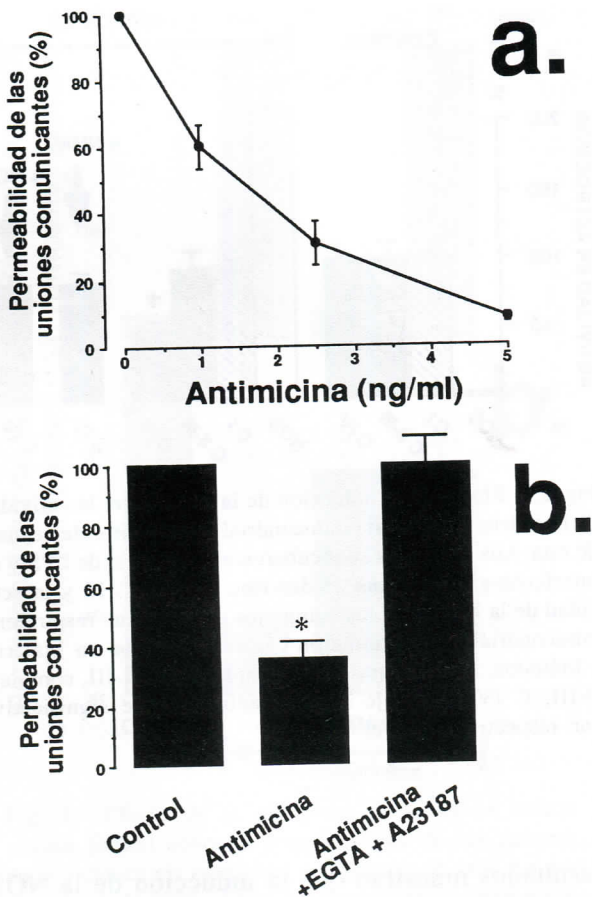


Fig. 3.—Efecto de la antimicina sobre la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos de neonato de rata. Los astrocitos se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de antimicina y la permeabilidad de las uniones comunicantes (a) se determinó al cabo de las 16 horas tal y como se describe en Material y Métodos. En algunos experimentos, la determinación de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos tratados con antimicina se llevó a cabo tras una previa incubación de las células con el agente quelante del Ca^{2+} EGTA y con el ionóforo A23187 (b). *Estadísticamente significativo con respecto al control.

este efecto se vio acompañado de una disminución de la concentración intracelular de ATP (14). Estos resultados sugieren que el estado energético puede jugar un importante papel en la regulación de la comunicación intercelular. Trabajos previos han mostrado que la muerte celular y, por tanto, la disminución

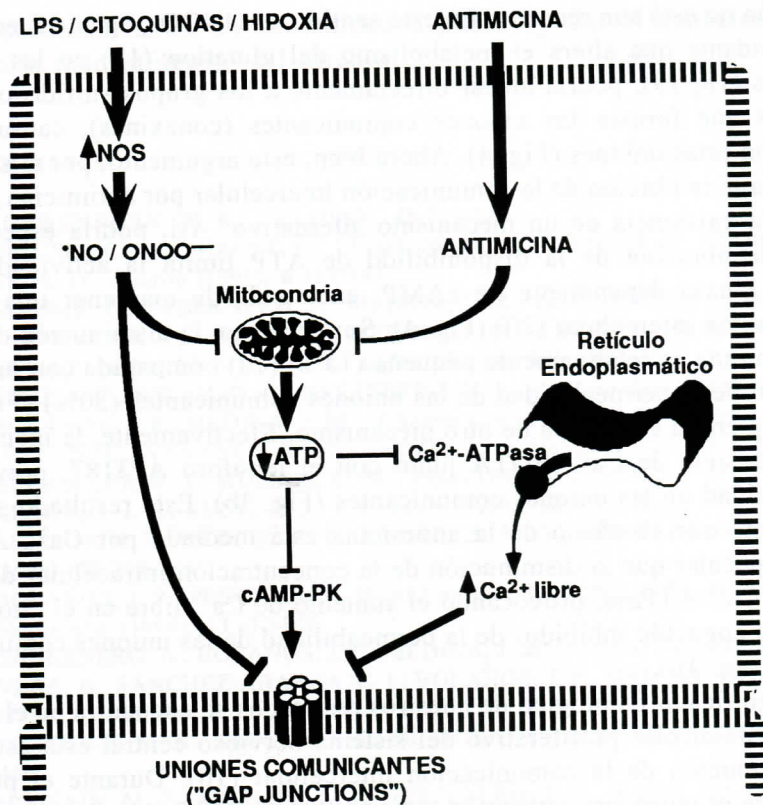


Fig. 4.—Representación esquemática de las posibles hipótesis que explican los mecanismos causantes de la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes en astrocitos de neonato de rata. La inducción de la NOS en los astrocitos, tanto por LPS, citoquinas o hipoxia, causa la producción exacerbada de -NO y/o ONOO- dentro de la célula. Éstos pueden, bien causar la oxidación directa de las proteínas de las uniones comunicantes, bien inhibir la síntesis mitocondrial de ATP. Dicha inhibición puede, a su vez, estar causada por la presencia, *in vitro*, de antimicina. La disminución de ATP inhibe, bien la proteína quinasa dependiente de cAMP (cAMP-PK), cuya actividad mantiene abiertas las uniones comunicantes, bien la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático, permitiendo así la liberación de Ca^{2+} al citosol. Este último mecanismo parece más plausible. El aumento de Ca^{2+} se encargaría de producir la inhibición de la comunicación intercelular.

de las reservas energéticas celulares, se acompaña de la inhibición irreversible de las uniones comunicantes (16). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no hay muerte celular y, además, la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes se revierte al recuperar el ATP endógeno (14).

Por tanto, la inhibición de la función mitocondrial causada por la inducción de la NOS en astrocitos puede ser responsable de la inhibición de la comunicación intercelular. Sin embargo, el mecanismo molecular de dicha

inhibición no está aún resuelto. En este sentido, el ONOO-, agente fuertemente prooxidante que altera el metabolismo del glutatión (17) en las células nerviosas (18, 19), podría atacar directamente a los grupos sulfidrilo de las proteínas que forman las uniones comunicantes (conexinas), causando la disfunción estas uniones (Fig. 4). Ahora bien, este argumento, por sí solo, no explicaría la inhibición de la comunicación intercelular por antimicina, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo. Así, podría especularse que la disminución de la disponibilidad de ATP limita la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP, encargada de mantener una activa comunicación intercelular (20) (Fig. 4). Sin embargo, la disminución de ATP por antimicina es relativamente pequeña (13%) (14) comparada con la fuerte inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes (80%) (Fig. 3a), lo que sugiere la existencia de otro mecanismo. Efectivamente, la incubación con el quelante de Ca^{2+} , EGTA junto con el ionóforo A23187, previno la permeabilidad de las uniones comunicantes (Fig. 3b). Este resultado sugiere fuertemente que el efecto de la antimicina está mediado por Ca^{2+} . Así, se podría especular que la disminución de la concentración intracelular de ATP inhibe la Ca^{2+} -ATPasa, provocando el aumento de Ca^{2+} libre en el citosol, el cual es un conocido inhibidor de la permeabilidad de las uniones comunicantes (21) (Fig. 4).

El significado fisiológico de nuestros resultados se encuentra en el hecho de que el desarrollo proliferativo del sistema nervioso central está asociado a la disminución de la comunicación intercelular (10). Durante el período perinatal se produce una activación transitoria de la NOS (11), lo que sugiere que dicha activación podría ser la responsable de la disminución de la comunicación intercelular, posiblemente por el mecanismo arriba descrito. Este fenómeno permitiría la proliferación de los astrocitos hasta la disminución de la actividad de la NOS, cuando los astrocitos entrarían en diferenciación. Además de este posible papel fisiológico, la disminución de la comunicación intercelular por inducción de la NOS puede tener un significado patológico. Así, se sabe que la isquemia induce la NOS en los astrocitos (22) y el daño cerebral por hipoxia perinatal se previene mediante la inhibición de la NOS (23). Debido a que la hipoxia causa la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, se puede sugerir que el mecanismo descrito en el presente trabajo puede estar relacionado con el cierre de las uniones comunicantes y la proliferación de los astrocitos durante el período perinatal.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la inducción de la óxido nítrico sintasa durante el período perinatal puede causar la inhibición de la permeabilidad de las uniones comunicantes a través de un aumento de la concentración del calcio citosólico causado por la disminución, dependiente de óxido nítrico, de las reservas energéticas celulares. Finalmente, el esclarecimiento de los mecanismos íntimos que regulan la permeabilidad de las

uniones comunicantes en los astrocitos puede ayudar al conocimiento del desarrollo fisiopatológico del cerebro.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LOEWENSTEIN, W. R.: *Cell* (1987), **48**:725-726.
- (2) GIAUME, C., FROMAGET, C., EI AOUMARI, A., CORDIER, J., GLOWINSKI, J., GROS, D.: *Neuron* (1991), **6**:133-143.
- (3) GIAUME, C., TABERNERO, A., MEDINA, J. M.: *Glia* (1996) (en prensa).
- (4) TABERNERO, A., GIAUME, C., MEDINA, J. M.: *Glia* (1996), **16**:187-195.
- (5) KUMAR, N. M., GIGULA, N. B.: *Cell* (1996), **84**:381-388.
- (6) SAEZ, J. C., SPRAY, D. C., HERTZBERG, E. L.: *In Vitro Toxicol* (1990), **3**:69-86.
- (7) BOLAÑOS, J. P., MEDINA, J. M.: *J Neurochem* (1996), **66**:2091-2099.
- (8) GIAUME, C., VENANCE, L.: *Perspect Dev Neurobiol* (1995), **2**:335-345.
- (9) BINMOLLER, F. J., MULLER, C. M.: *Glia* (1992), **6**:127-137.
- (10) KLAUNIG, J. E., RUCH, R. J.: *Lab Invest* (1990), **62**:135-146.
- (11) LIZASOAIN, I., WEINER, C. P., KNOWLES, R. G., MONCADA, S.: *Pediatr Res* (1996), **39**:779-783.
- (12) BOLAÑOS, J. P., PEUCHEN, S., HEALES, S. J. R., LAND, J. M., CLARK, J. B.: *J Neurochem* (1994), **63**:910-916.
- (13) TABERNERO, A., BOLAÑOS, J. P., MEDINA, J. M.: *Biochem J* (1993), **294**:635-638.
- (14) VERA, B., SÁNCHEZ-ABARCA, L. I., BOLAÑOS, J. P., MEDINA, J. M.: *FEBS Lett* (1996), (en prensa).
- (15) EL-FOULY, M. H., TROSCO, J. E., CHANG, C. C.: *Exp Cell Res* (1987), **168**:422-430.
- (16) HOSSAIN, M. Z., MURPHY, L. J., HERTZBERG, E. L., NAGY, J. I.: *J Neurochem* (1994), **62**:2394-2403.
- (17) RADI, R., BECKMAN, J. S., BUSH, K. M., FREEMAN, B. A.: *J Biol Chem* (1991), **266**:4244-4250.
- (18) BOLAÑOS, J. P., HEALES, S. J. R., LAND, J. M., CLARK, J. B.: *J Neurochem* (1995), **64**:1965-1972.
- (19) BOLAÑOS, J. P., HEALES, S. J. R., PEUCHEN, S., BARKER, J. E., LAND, J. M., CLARK, J. B.: *Free Rad Biol Med* (1996), (en prensa).
- (20) LAIRD, D. W., PURANAM, K. L., REVEL, J. P.: *Biochem J* (1991), **273**:67-72.
- (21) POLITOFF, A. L., SOCOLAR, S. J., LOEWENSTEIN, W. R.: *J Gen Physiol* (1969), **53**:498-515.
- (22) ENDOH, M., MAIESE, K., WAGNER, J.: *Brain Res* (1994), **651**:92-100.
- (23) HAMADA, Y., HAYAKAWA, T., HATTORI, H., MIKAWA, H.: *Pediatr Res* (1993), **35**:10-14.