

## **Localización de la Enzima Oxido Nítrico Sintasa y de Proteínas Nitradas en el Septum Medial y Lateral de la Rata Vieja**

Alberto García-Garrido, María L. del Moral, María A. Peinado, Francisco J. Esteban

*Programa de Doctorado "Biología Molecular y Celular". Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén.*

[festeban@ujaen.es](mailto:festeban@ujaen.es)

### **Resumen**

Con el fin de conocer la posible implicación de los sistemas productores de óxido nítrico en las alteraciones morfofuncionales que, asociadas al septum cerebral, tienen lugar en el envejecimiento, y mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas y de análisis de imagen, se describe la localización de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), del marcador histoquímico NADPH-diaforasa (NADPH-d), y de los complejos de nitración proteica (N-Tyr) en el septum medial y lateral de ratas adultas y viejas.

Los principales resultados obtenidos mostraron un descenso significativo del inmunomarcaje frente a la isoforma neuronal de las NOS con el envejecimiento, y un aumento detectado a nivel vascular para la actividad NADPH-d. Además, se observó un aumento significativo en la formación de complejos N-Tyr tanto a nivel neuronal como glial en las ratas viejas.

Puesto que el septum es una región cerebral que forma parte del sistema límbico y que está implicada en funciones tales como el aprendizaje y la memoria, las emociones, el miedo, la agresión y el estrés, se concluye que el sistema nitrérgico puede participar en las alteraciones morfofuncionales del septum cerebral y, por tanto, en el declive cognitivo que suele acompañar a la senescencia.

### **INTRODUCCIÓN**

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células que conforman los seres vivos, las cuales, con el paso de del tiempo se ven sometidas a un deterioro morfofuncional que puede conducir las a la muerte (Peinado et al., 2000, *Rev Neurol* 31:1054-1065). Así pues, encontrar una respuesta adecuada que permita explicar cómo se desencadenan los cambios funcionales, macroscópicos y microscópicos, a nivel celular es clave para entender el proceso de envejecimiento.

Entre los múltiples mecanismos, hasta hoy demostrados, inductores del desarrollo del proceso de envejecimiento -y de diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas- se cuentan las deficiencias en factores neurotróficos, la hipoxia e hipoglucemia, la excitotoxicidad, y la producción de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno (Peinado et al., 2000, *Rev Neurol* 31:1054-1065); aunque son muchas las teorías emitidas en las últimas décadas sobre el envejecimiento, sólo algunas de ellas, como la de los radicales libres, han resistido exitosamente al paso del tiempo.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que actúa como una molécula neuromoduladora (revisado en Rodrigo et al., 2000, *Anales Sist Sanit Navarra* 23:195-235). En los sistemas vivos, el NO es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que cataliza la transformación de la arginina en citrulina con la formación de cantidades equimoleculares de NO. Se han descrito tres isoformas de la NOS: dos de ellas actúan de forma constitutiva y corresponden a la NOS-I, también denominada nNOS por estar presente principalmente en neuronas, y a la NOS-III, o eNOS por su localización inicial en endotelio vascular; la expresión de la tercera isoforma requiere la presencia de inductores, por lo que se denomina iNOS, o NOS-II, y se detecta fundamentalmente en las células del sistema inmune, aunque puede ser inducida en prácticamente cualquier tipo celular.

Como molécula neuromoduladora, el NO actúa sobre la célula diana mediante la activación de la enzima guanilato-ciclase, la cual produce un mensajero intracelular, el cGMP, que puede, a su vez, poner en marcha diferentes mecanismos fisiológicos, destacando los procesos de memoria y aprendizaje (Rodrigo et al., 2000, *Anales Sist Sanit Navarra* 23:195-235). Se ha postulado que los cambios detectados en los niveles de producción de NO en ciertas regiones del cerebro de animales viejos podrían ser la base de las pérdidas de memoria y aprendizaje propias de la vejez (Peinado et al., 2000; *Rev Neurol* 31:1054-1065).

Sin embargo, los mecanismos de actuación del NO resultan bastante más complejos y ha podido constatarse que, cuando es producido en exceso, puede llegar a inducir cascadas tóxicas, bien de forma indirecta, mediante la activación de los mecanismos responsables de la liberación de aminoácidos excitotóxicos (AAE), o bien de forma directa por su capacidad de unirse a otros radicales libres (revisado en Peinado et al., 2003; *Recent Res Develop Biochem* 4:185-192). Concretamente, el NO puede unirse al ión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ) para originar peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), que su vez puede nitrar residuos tirosina de determinadas proteínas, impidiendo las interacciones funcionales de las mismas a través de estos residuos y poniendo en peligro la viabilidad celular. Además, el  $ONOO^{\cdot-}$  no solamente es tóxico en sí mismo, sino que además se descompone en dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) e hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ), siendo este último uno de los radicales libres más tóxicos en cuanto a su potencial de reacción; de esta forma, el NO contribuye considerablemente al daño oxidativo que tiene lugar en determinadas enfermedades neurodegenerativas y en el propio envejecimiento. Así, se están reconduciendo las posibles causas del deterioro y muerte neuronal que concurren en los procesos de isquemia, y en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como una consecuencia de la acción tóxica del NO. Recientemente se ha demostrado la expresión de la iNOS en astrocitos y células microgliales próximos a las placas seniles de los enfermos de Alzheimer, de forma que la producción de NO por estas células podría estar en la base de la muerte neuronal que se produce en las zonas afectadas.

El septum (revisado en Jakab & Leranth, 1995, *The rat nervous system* (2ed.), G Paxinos Ed., Academic Press, San Diego) es una región cerebral que forma parte del sistema límbico y que está implicada en el control de toda una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento asociados a funciones cognitivas superiores (el aprendizaje y la memoria, las emociones, el miedo, la agresión y el estrés), así como en la regulación de funciones autónomas (ingesta, fiebre, hibernación, osmorregulación y respuesta inmune humoral); el sustrato anatómico subyacente a todas estas funciones se establece mediante extensas y recíprocas interconexiones con áreas del telencéfalo y diencefalo y, en menor medida, con regiones del mesencéfalo, del tronco cerebral inferior y de la espina cordal. La situación cerebral del septum es a nivel del telencéfalo, de modo que se localiza bajo las regiones anterior y media del cuerpo calloso, entre las

protrusiones anteriores de los ventrículos laterales, y dorsalmente a la porción media de la comisura anterior; está unido anteriormente al rudimento anterior hipocampal (*taenia tecta*), y dorsalmente a las comisuras hipocampales; ventrolateralmente está separado del núcleo accumbens por las islas de Calleja magnas.

Sobre la base de su topografía, citoarquitectura y conexiones, el septum, comprende las divisiones medial, lateral y posterior. La división medial contiene, a su vez, al núcleo septal medial (MS) y al núcleo medial de la banda diagonal de Broca (BD). En cuanto a la división lateral, ésta se encuentra subdividida en las regiones dorsal (LSD), intermedia (LSI) y ventral (LSV), debido a la diferente densidad y tamaño de las neuronas que la constituyen, aunque dicha subdivisión no presenta bordes bien definidos. Por último, en la división septal posterior podemos detectar el núcleo septofimbrial lateral (SF<sub>i</sub>) y el núcleo septal triangular (TS).

Estudios inmunocitoquímicos e histoquímicos previos han demostrado la presencia de la nNOS en: el septum de la rata adulta, principalmente en sus divisiones media y lateral (Rodrigo et al., 1994, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221) y en otras especies animales. Además, diferentes trabajos bioquímicos y fisiológicos han asociado la producción de NO en las divisiones septales con ciertas funciones en las que participa esta región cerebral (Karami et al., 2003, *Brain Res* 976:30-40; Saad et al., 2002, *Life Sci* 70:2403-12), tales como la dependencia a la morfina, la erección, la secreción salival, la agresión maternal, la modulación del sistema renina-angiotensina, y en la regulación central global de las funciones autónomas.

Sin embargo, aún no han sido elucidada la posible variación de la expresión de la nNOS con el envejecimiento, ni tampoco la presencia de la iNOS o de proteínas nitradas –como marcador de las posibles dianas del NO– en el septum, por lo que el objetivo del presente trabajo es la detección inmunocitoquímica de la nNOS, iNOS y de proteínas nitrotirosiladas, así como la detección histoquímica de la actividad NADPH-diaforasa –asociada a la actividad NOS en tejidos fijados– en el septum medial y lateral de la rata envejecida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

*Animales.* Se utilizaron un total de cinco ratas macho adultas (4 meses de edad) y cinco viejas (26 meses de edad) de la variedad Wistar, estabuladas bajo condiciones estándar de luz y temperatura y alimentadas *ad libitum* con pienso comercial. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los criterios establecidos por la UE para la investigación bioquímica con animales (86/609/EU).

*Preparación de muestras.* Los animales, previamente anestesiados (15mg/100g peso corporal, i.p.; Ketolar, Parke Davis, Madrid, España), fueron perfundidos vía ventrículo izquierdo utilizando como solución lavadora 50 ml de tampón fosfato salino (PBS) 0.01M, pH 7.4, y como solución fijadora 500 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M, pH 7.4. A continuación, se extrajo el cerebro y las muestras se postfijaron durante tres horas a temperatura ambiente, con la misma solución fijadora. Posteriormente fueron crioprotegidos mediante inmersión en una solución de sacarosa al 30% en PB 0.1M, pH 7.4, durante toda la noche a 4°C.

*Inmunocitoquímica.* Se realizaron cortes rostro caudales de 40 µm de grosor con ayuda de un criostato (Reicher-Jung, Viena, Austria). Las secciones fueron posteriormente sumergidas durante cuatro horas en Tritón X-100 al 0.1%

en PBS, tras lo cual se incubaron la presencia de antisueros contra la nNOS (1:3.000), iNOS (1:2.500), o nitrotirosina (1:300) diluidos en Tritón X-100 al 0.2% en PBS, a 4°C durante toda la noche; estos antisueros han sido donados por el Dr. Rodrigo (Instituto Cajal, Madrid). Tras sucesivos lavados, los cortes se procesaron mediante la técnica del complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad peroxidasa se puso de manifiesto mediante la técnica del revelado con diaminobencidina intensificado con níquel. Se realizaron controles utilizando secciones adyacentes de los mismos tejidos y no se observó marcaje alguno cuando se omitió el anticuerpo primario, o cuando éste se sustituyó por una concentración equivalente de suero preinmune o de suero normal de conejo.

*Histoquímica.* La técnica histoquímica NADPH-diaforasa (NADPH-d) se usó como un método complementario para la visualización indirecta de la actividad de las isoformas NOS a nivel de microscopía óptica. Las secciones fueron incubadas en libre flotación durante cuatro horas en PBS conteniendo 0.1% Tritón-X100. Después de varios lavados en tampón 0.1M Tris-HCl, pH 7.4 se incubaron en la oscuridad (45 min, 37°C) en 0.1M Tris-HCl, pH 7.4, conteniendo 1mM de  $\beta$ -NADPH y 2mM de NTB (en 70% dimetilformalmida). Las secciones, posteriormente, se lavaron dos veces con 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, y fueron deshidratadas en unas series graduadas de etanol, aclaradas y montadas en DPX (Fluka, Madrid, Spain). El control de la reacción se llevó a cabo omitiendo o remplazando  $\beta$ -NADPH con una cantidad equivalente de  $\alpha$ -NADPH o 0.1 M Tris-HCl.

*Procesamiento de imagen y análisis estadístico.* Las estructuras inmunoreactivas para la nNOS (NOS-IR) o nitrotirosina (nTyr-IR), y las positivas para la reacción histoquímica NADPH-d, fueron cuantificadas por análisis de imagen computerizado mediante el uso del programa ImageJ (obtenido gratuitamente desde <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) conectado a un microscopio de luz (Olympus, Hamburgo, Alemania). En todos los casos experimentales, se cuantificó un campo aleatorio de 1.56 mm<sup>2</sup> de cada sección (correspondiente a una imagen tal y como se observa en la pantalla del ordenador, capturada a 8 bits; es decir, 2<sup>8</sup> niveles de grises, desde el negro [0] al blanco [255]), y diferentes secciones (rostrocaudales; n=4 para nNOS y nTyr; n=3 para NADPH-d) del estriado de cada rata. A todas las imágenes se les realizó un procesamiento de substracción de fondo (tamaño mínimo de partícula de 10 píxeles). El área de campo se eligió de acuerdo tanto a la extensión del estriado como a la intensidad de inmunorreacción, con el fin de salvar un posible solapamiento repetitivo en la medición. Para evitar el sesgo que habitualmente se comete cuando se realiza una segmentación manual de las estructuras teñidas, el área inmunoreactiva de cada campo se calculó como una función de la densidad óptica sobre la base del *método de Sternberger*, el cual ha sido recientemente implementado (Prf. Dr. FJ Esteban, Universidad de Jaén) de modo que el segmento de la gráfica que corresponde a la inmunotinción se extrapola matemáticamente (mediante el uso del programa Origin 5.0) al eje que representa el porcentaje de área por campo; la selección de los puntos de la recta a extrapolar se realiza por derivación continuada de cada una de las funciones gráficas hasta la obtención del punto de inflexión.

El tratamiento estadístico se realizó con el programa Statgraphics Plus 5.1. Puesto que los datos no se ajustaron a una distribución normal, tal y como se puso de manifiesto tras la realización del test de Kolmogorov-Smirnov, el grado de significación estadística se obtuvo aplicando el test no paramétrico de Man-Whitney.



## RESULTADOS

*nNOS*. Se ha detectado inmunorreactividad frente a la nNOS en neuronas localizadas principalmente en el MS y en el LSD de las ratas adultas, inmunorreactividad que, en los individuos viejos, mostró un descenso aparente en el MS y muy acusado en el LSD (Fig. 1). La cuantificación conjunta, mediante procesamiento de imagen, del área de inmunoreacción de ambas regiones septales confirma el descenso estadísticamente significativo de marcaje específico frente a la isoforma neuronal de la enzima óxido nítrico sintasa ( $p < 0.05$ ;  $0.73 \pm 0.09$  en individuos adultos frente a  $0.51 \pm 0.10$  en viejos).

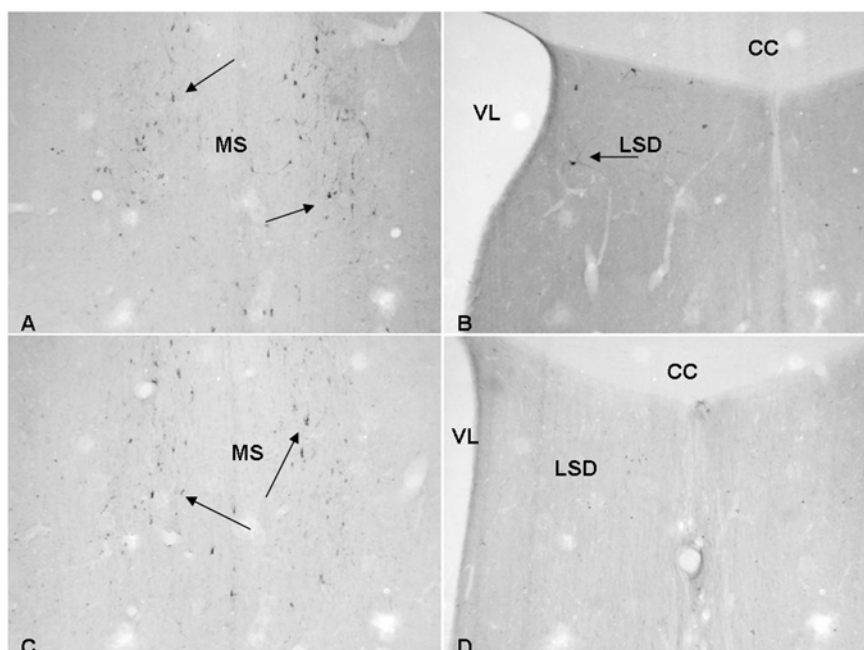


Figura 1. Fotomicrografías de secciones de cerebro de rata adulta (A,B) y vieja (C,D) que muestran inmunorreactividad frente a la nNOS en las divisiones medial (MS) y lateral dorsal (LSD) del septum. CC: cuerpo calloso. VL: ventrículo lateral. Flechas: somas neuronales.

*NADPH-diaforasa*. Detectamos actividad NADPH-diaforasa en las mismas divisiones –y tipo celular– en las que se observó la nNOS (MS y LSD), tanto en las ratas adultas como en las de edad avanzada, actividad que no parecía descender con el envejecimiento (Fig. 2). En los individuos adultos pudo constatarse, además, la presencia de sales de formazán (productos de la reacción histoquímica) en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales, lo cual no fue observado en los viejos (Fig. 2). Los datos cuantitativos obtenidos mediante el procesamiento de las imágenes indicaron un ligero aumento que no fue significativo para los individuos viejos ( $1.12 \pm 0.17$  en adultos frente a  $1.22 \pm 0.29$  en viejos).

*iNOS*. No se ha detectado inmunorreactividad apreciable frente a la iNOS en ninguna de las divisiones septales ni en las ratas adultas ni en las viejas (resultados no mostrados).

*Nitración proteica*. En las ratas adultas se observó una inmunorreactividad débil frente a las proteínas nitradas (nTyr-IR) en neuronas del MS y del LSD (Fig. 3). Sin embargo las ratas viejas mostraron un intenso marcaje en ambas divisiones, de modo que se detectó nTyr-IR tanto en neuronas como en células

gliales, con morfología propia de astrocitos, principalmente localizadas a nivel del LSD (Fig. 3). El aumento de inmunoreactividad para la nitración de residuos de tirosina proteicos en las ratas viejas fue constatado con el procesamiento y análisis matemático de las imágenes correspondientes, que puso de manifiesto el alto grado de significación estadística del mismo ( $p < 0.01$ ;  $0.87 \pm 0.15$  en adultos frente a  $2.46 \pm 0.42$  en viejos).

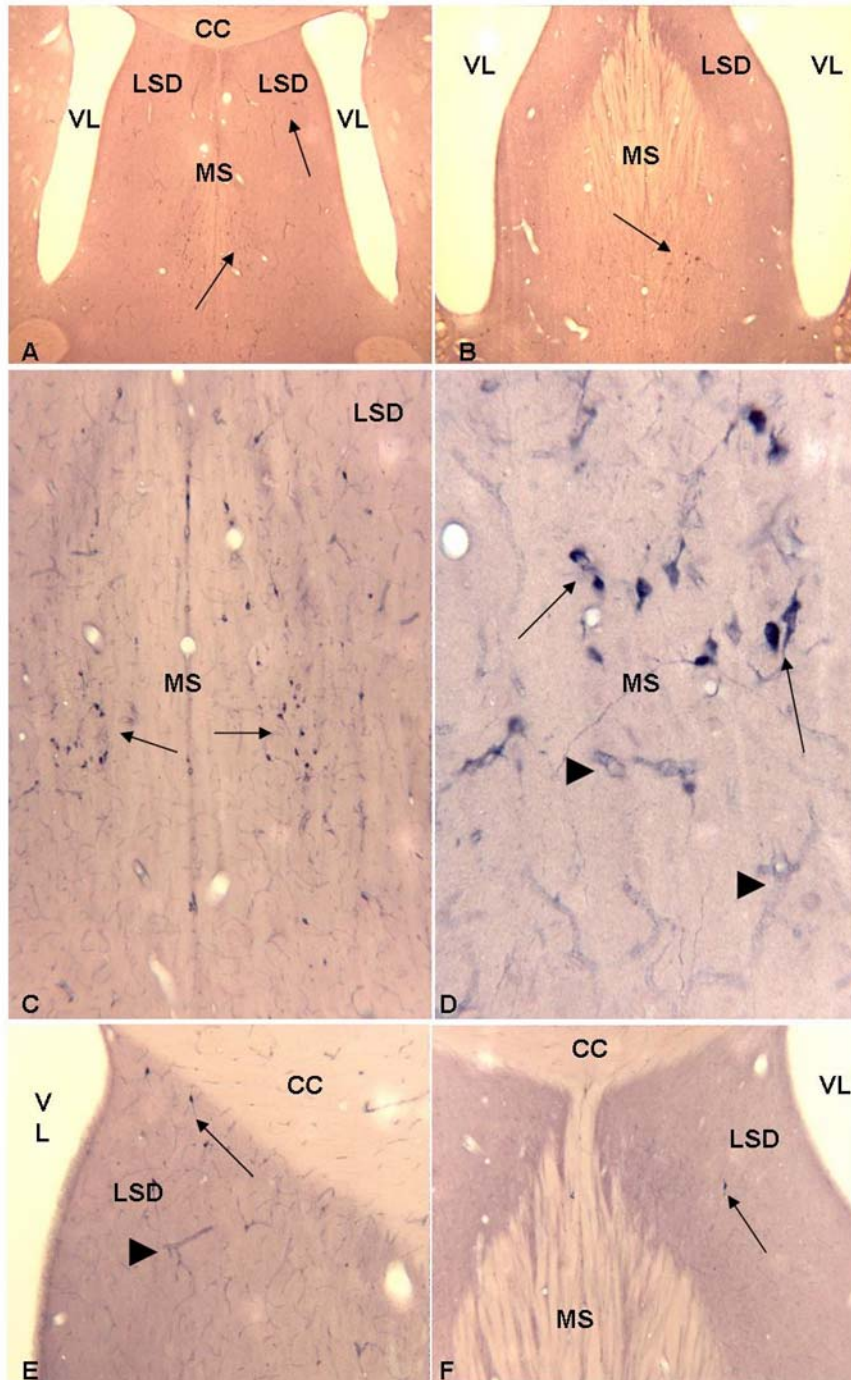


Figura 2. Fotomicrografías de secciones de cerebro de rata adulta (A,C,D,E) y vieja (B,F) que muestran actividad NADPH-diaforasa en las divisiones medial (MS) y lateral dorsal (LSD) del septum. CC: cuerpo calloso. VL: ventrículo lateral. Flechas: somas neuronales. Puntas de flecha: vasos sanguíneos.

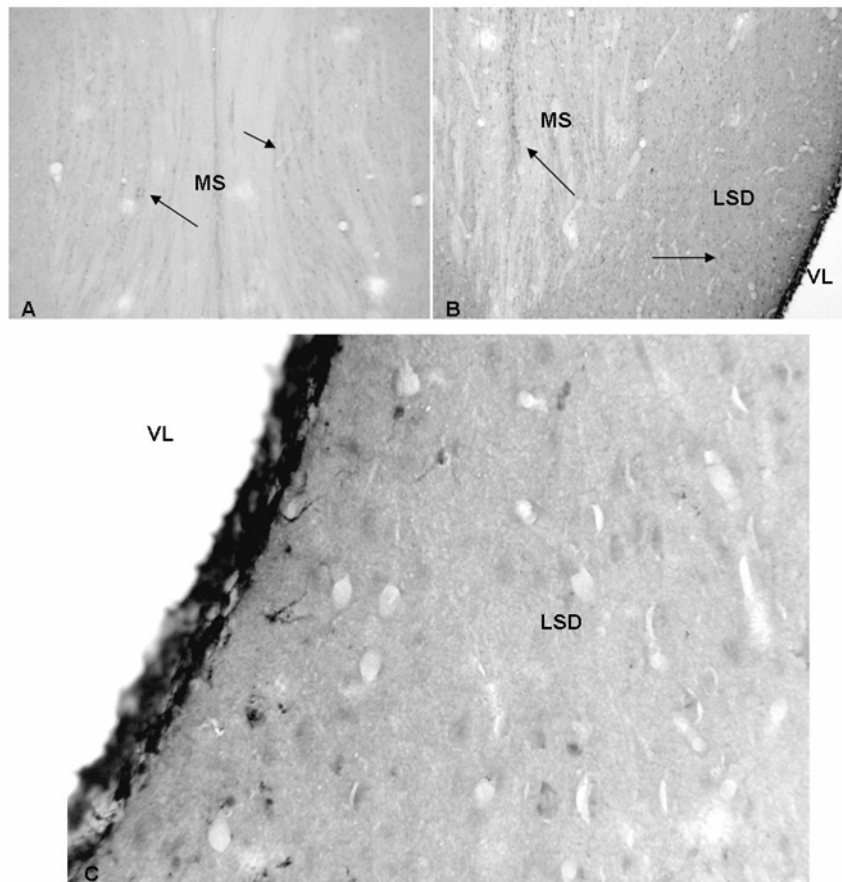


Figura 3. Fotomicrografías de secciones de cerebro de rata adulta (A) y vieja (B,C) que muestran inmunoreactividad frente a proteínas nitradas en las divisiones medial (MS) y lateral dorsal (LSD) del septum. VL: ventrículo lateral. Flechas: neuronas. Puntas de flecha: glía de tipo astrocitario.

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados demuestran, por primera vez, que durante el envejecimiento cerebral se produce un descenso de la inmunoreactividad para la isoforma neuronal de la enzima óxido nítrico sintasa en las divisiones MS y LSD del septum, así como un aumento en la nitración proteica en las mismas zonas, lo cual apunta a una posible relación entre una alteración en la producción de NO y el declive funcional del septum con la edad, un hecho planteado desde hace algunos años (Sugaya & McKinney, 1994, *Brain Res Mol Brain Res* 23:111-25), pero que aún no ha sido demostrado.

A nivel septal se ha detectado la coexistencia de la óxido nítrico sintasa neuronal con la proteína quinasa (tipo II)-cGMP dependiente (PKII-cGMPdpte), lo cual indica que esta quinasa puede ser un mediador principal de la acción del NO en esta región límbica (El-Husseini et al., 1999, *J Chem Neuroanat* 17:45-55). Puesto que la PKII-cGMPdpte está implicada en procesos de señalización celular que participan en fenómenos de plasticidad sináptica, su falta de activación debida a la carencia de NO podría formar parte de la alteración molecular subyacente a las alteraciones propias del envejecimiento septal. Del mismo modo, se ha detectado colocalización de la NOS con tirosina quinasa A y con galanina en el MS (Sobreviela



et al., 1998, *Neuroscience* 87:447-61), lo cual también indica la elevada complejidad de señalización química septal y las múltiples vías que pueden verse afectadas durante el envejecimiento, y en desórdenes patológicos, por una disregulación de las mismas.

La presencia de actividad NADPH-diaforasa en los vasos sanguíneos del septum de los individuos adultos indica la participación de la eNOS en la regulación del flujo cerebral, un hecho constatado y cuya alteración conduce al desencadenamiento de accidentes cerebrovasculares. Así pues, la práctica ausencia de actividad NADPH-d que hemos observado en el septum vascular de los individuos viejos sugiere que la alteración en la producción de NO a nivel vascular puede estar implicada en la elevada susceptibilidad del septum a sufrir este tipo de patologías (Araki et al., 1989, *Acta Neurol Scand* 80:548-53).

Por otro lado, no hemos detectado la presencia de la iNOS en ninguna de las divisiones septales estudiadas en ambos grupos de edad, coincidiendo con resultados previos de otros autores que indican la ausencia de expresión de la iNOS durante el envejecimiento fisiológico cerebral (Necchi et al., 2002, *Brain Res* 933:31-41), si bien estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelan su producción en el cerebro envejecido (Siles et al., 2002, *Brain Res* 956:385-92), datos que sugieren que la expresión de esta isoforma debe producirse en poblaciones celulares particulares y a un nivel cuya detección puede depender de la sensibilidad de la técnica empleada.

Por último, el estudio del grado de nitración proteica pone de manifiesto la relevancia y participación de este mecanismo de inactivación molecular en el proceso de envejecimiento septal, en el cual, al menos, indicamos una aportación tanto de la población neuronal como de la astrocitaria, en concordancia con la idea, generalmente aceptada, del papel de las especies reactivas de nitrógeno en la senescencia (Peinado et al., 2003, *Recent Res Develop Biochem* 4:185-192), apoyada en los resultados experimentales concluyentes (Siles et al., 2002, *Brain Res* 956:385-92).

Por todo lo expuesto, podemos concluir que el sistema nitrérgico puede participar en las alteraciones morfofuncionales del septum cerebral y, por tanto, en el declive cognitivo que suele acompañar a la senescencia.

## AGRADECIMIENTOS

Financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM98-0126-CO2-02) y por la Junta de Andalucía (CVI-0184).