

## Participación del GMPC en los procesos de diferenciación neuronal, en células del ganglio simpático cervical superior de la rata

Mayor M.C. Maricela O. Franco Lira,\* General de Brigada M.C. Jorge Islas Marroquín,\*\* Mayor M.C. David E. García Díaz,\*\*\*

**RESUMEN.** Se estudió la interrelación del factor de crecimiento nervioso (FCN) y el óxido nítrico (NO) sobre los procesos de diferenciación neuronal.

Se cultivaron durante 24 horas células provenientes del ganglio cervical superior (GCS), que producen sintetasa del óxido nítrico (SON) y dependen mucho del FCN para su desarrollo. Usando una pinza de Patch se midieron la capacitancia de la membrana ( $C_M$ ) y la corriente máxima de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de N. El desarrollo morfológico de los cultivos fotografiados se relacionó con la  $C_M$ . Todos los grupos experimentales presentaron desarrollo neurítico. Las células incubadas con nitroprusiato de sodio (NPS) o 8-Br-GMPc sin FCN sobrevivieron hasta las 72 horas. La  $C_M$  y la  $DI_{Ca}$  aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en las células incubadas con FCN, NPS u 8-Br-GMPc en relación con las células control; sin embargo, el uso de FCN con L-NAME sólo incrementó los valores de la  $C_M$ , la  $DI_{Ca}$  no se incrementó en este grupo. Nuestros resultados sugieren que la vía intracelular de señalización iniciada por el FCN para inducir el desarrollo neurítico es diferente de la que desencadena un incremento de  $DI_{Ca}$  a través de los canales de N; esta última implica la participación del NO a través de la GMPC.

**Palabras clave:** Neurona, gangliocervical, GMPC.

En trabajos previos se demostró que algunos efectos del factor de crecimiento nervioso (NGF) en células de la línea celular PC12 (efecto citostático, elevación de GMPC, etc.) se reproducen cuando las PC12 son incubadas con nitroprusiato de sodio (NPS) como donador de óxido nítrico (NO). Para estudiar la interrelación del NGF y NO en los procesos de desarrollo neurítico e incremento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  a través de canales tipo N. En este trabajo se utilizó el modelo de células del ganglio simpático cervical superior en cultivo (CGS), las cuales son células fisiológicas dependientes del NGF para su sobrevivencia y desarrollo, cuentan con la sintetasa del óxido nítrico y el 80% de la población de sus canales de  $Ca^{2+}$  son dependientes de voltaje tipo N relacionados con la liberación de

**SUMMARY.** We studied the interrelation of nerve growth factor (NGF) and nitric oxide (NO) on the neuronal differentiation processes. Cells from the superior cervical ganglion (CGS), which produce nitric oxide synthase (NOS) and depend strongly on NGF for development, were cultivated for 24 hours. Using Patch-clamp the membrane capacitance ( $C_M$ ) and maximum  $Ca^{2+}$  current through N channels were measured. The  $Ca^{2+}$  current density ( $DI_{Ca}$ ) was calculated from each cell. Morphological development of photographed cultures was related with the  $C_M$ . All experimental groups presented neuritic development. Cells incubated with sodium nitroprusside (NPS) or 8-Br-GMPc without NGF survived until 72 hours.  $C_M$  and  $DI_{Ca}$  increased significantly ( $p < 0.05$ ) in cells incubated with NGF, NPS or 8-Br-GMPc in relation to the control cells, however the use of NGF plus L-NAME only increased  $C_M$  values, the  $DI_{Ca}$  was not increased in this group. Our results suggest that the intracellular signaling pathway initiated by NGF to induce neuritic development is different from the one that triggers and  $DI_{Ca}$  increased through N channels, the last one involves the participation of NO through GMPC.

**Key words:** Neuron, cervical ganglion, GMPC.

neurotransmisores en las CGS. Mediante la técnica de fijación de voltaje en su modalidad de célula completa, se midió en las CGS (incubadas 24 horas con distintos tratamientos) la capacitación de membrana ( $C_M$ ) y se midió la corriente máxima de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo N, la cual fue normalizada por la  $C_M$  obteniéndose así la densidad de corriente a través de estos canales para cada célula. Todos los grupos experimentales presentaron arborizaciones neuríticas, y a diferencia de lo reportado en la literatura, las células incubadas con nitroprusiato de sodio (NPS) u 8-Br-GMPc en ausencia de NGF sobrevivieron hasta 72 horas (tiempo al que se suspendió el experimento). La  $C_M$  se incrementó de manera estadísticamente significativa cuando las células se incubaron 24 horas con NGF, o con NPS, o con 8-Br-GMPc, en relación a las células control registradas en fresco (inmediatamente después de la dispersión). Para analizar si este efecto del NGF en CGS es dependiente de NO vía GMPC, se registraron células incubadas con NGF en presencia de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), sin embargo la  $C_M$  se incrementó de manera similar al grupo incubado sólo con NGF. En cuanto a la den-

\* Médico Interno del Hosp. Central Militar.

\*\* Sub Director, de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

\*\*\* Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

sidad de corriente este parámetro se incrementó en las células incubadas con NGF, o NPS u 8-Br-GMPc, en relación a las células control, sin embargo la densidad de corriente en los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N en las células incubadas con NGF en presencia de L-NAME se comportó de manera similar a las células control. De lo anterior se concluye que la vía de flujo de información intracelular que desencadena el NGF en CGS para inducir arborizaciones neuríticas es diferente a la que desencadena para incrementar la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  a través de canales tipo N.

### Antecedentes

Se sabe que el factor de crecimiento nervioso (NGF) ejerce efecto citostático en las células de la línea PC12 (Greene y Tishler, 1976), este efecto se ha reproducido por acción del óxido nítrico (NO) en células de esta misma línea (Peunova y Enikolopov, 1995). Esta neurotrofina induce en PC12 arborizaciones neuríticas, con un patrón morfológico similar al de las neuronas simpáticas, así como incremento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje tipo N (Cavalié y García, 1993) e incremento en la concentración intracelular de GMPc (Saarna y cols., 1990).

Se ha observado que por acción de NGF el número de canales tipo N en PC12 aumenta significativamente (Cavalié y cols., 1993) y este efecto se ha relacionado directamente con el incremento en el RNAm de los genes tempranos *c-fos* y *ju-B*. De esta manera independientemente Haby y sus colaboradores en 1994, demostraron que el GMPc induce el incremento de los genes tempranos *c-fos* y *Ju-B* en PC12, de tal manera que si estos mecanismos se encontraran activos en CGS, sería entonces posible observar un incremento significativo en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  en canales tipo N en las células cultivadas con NGF, nitroprusiato de sodio (NPS) u 8-Br-GMPc) y además este parámetro daría la oportunidad de observar indirectamente actividad del núcleo celular.

Con estos antecedentes se plantearon las siguientes preguntas: ¿Qué papel desempeña el óxido nítrico en los procesos de diferenciación morfológica que induce el NGF en células del ganglio simpático cervical superior?, ¿Qué papel desempeña el GMPc en el incremento de la densidad de corriente a través de canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, producida por el NGF?

Las células del ganglio simpático cervical superior (CGS) de la rata son dependientes del NGF para su supervivencia y desarrollo (Levy Montalcini, 1987), tienen sintetasa de óxido nítrico (NOS) (Cecattelli y cols., 1994) y 80% de su población de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje son de tipo N, estos canales se han relacionado con la función de liberar neurotransmisores (Hirning y cols., 1988) por lo que tal modelo se utilizó en este trabajo con el fin de estudiar la interrelación del NGF con el segundo mensajero GMPc en neuronas totalmente fisiológicas, de tal manera que si los hallazgos realizados en PC12 se en-

contraran de manera similar en CGS sería posible entonces observar un incremento significativo en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  en canales tipo N en células cultivadas con NGF, NPS y con 8-Br-GMPc y probablemente también desarrollo de arborizaciones neuríticas.

### Material y método

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 21 a 25 días de edad y de 70 a 80 gramos de peso, a fin de asegurar el desarrollo de neuritas primarias a partir del soma (Voyvodic, 1987) se prepararon cultivos celulares primarios de neuronas del ganglio simpático cervical superior, siguiendo el método descrito por Shofield y sus colaboradores.

Brevemente: se disecaron ambos ganglios bajo microscopio estereoscópico manteniéndose en solución Hank modificada (libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ), oxigenando la preparación con oxígeno medicinal 100% a razón de 0.5 L/min, durante la disección. La dispersión se llevó a cabo en dos fases continuas.

a) Papaína (20 UI/mL) activada por cisteína (1.6 mg/mL).

b) Colagenasa tipo Y (2 mg/3 mL) y dispasa II (20 mg/3 mL).

Las enzimas se disolvieron en 3 mL de solución Hank modificada, previamente oxigenada y se intercambiaron las soluciones en el tubo de centrifuga, incubándose a 37 °C durante 20 y 15 minutos, sucesivamente. Posteriormente se disociaron las células mecánicamente, hasta la completa dispersión de ambos ganglios, una vez realizada la dispersión se lavaron las células en medio de cultivo de Leibovitz (L15), centrifugado durante 5 minutos a menos de 1,000 r.p.m., en dos ocasiones. Se realizó un tercer lavado con medio modificado de Dulbecco (D-MEM) alto en glucosa el cual ya contenía los fármacos indicados para cada experimento y a las dosis indicadas.

Una vez obtenida la suspensión de células disociadas se sembraron sobre cristales, esterilizados con luz UV y cubiertos con poli-L-lisina (1 mg/mL) y laminina de rata (0.1 mg/mL), incubándose durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda y  $CO_2$  al 5%.

Las células en fresco se prepararon similarmente, al final se mantuvieron en suspensión y en refrigeración, para evitar adhesión entre ellas registrándose en las primeras 6 horas después de la dispersión.

#### *Medición de variables electrofisiológicas*

##### *Procedimientos generales*

Las mediciones electrofisiológicas se llevaron a cabo bajo las técnicas de fijación de voltaje (patch-clamp), modo de célula completa (whole-cell). La fijación de voltaje con respecto al tiempo permite analizar corrientes iónicas en una membrana (Hamill y cols., 1981).

Se utilizó un amplificador L/M-EPC.7. Se cancelaron las corrientes transitorias capacitivas en la pipeta (rápidos)

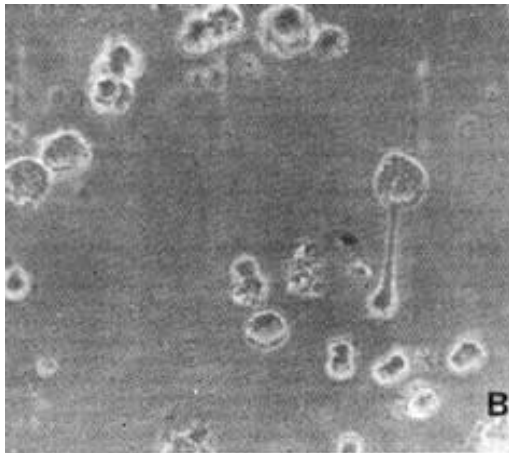
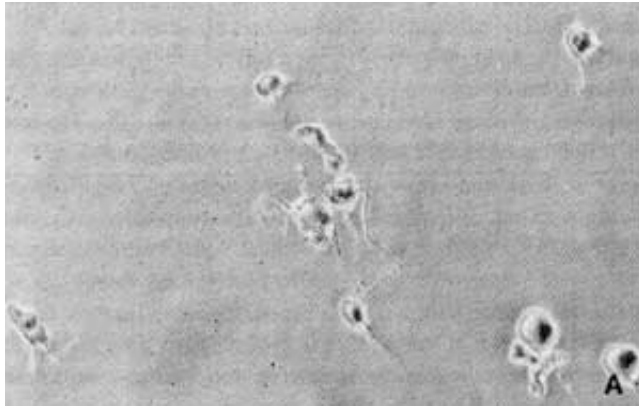
y se compensó aproximadamente 60 a 70% de las resistencias en serie ( $R_s$ ). Se utilizaron micropipetas para fijación de voltaje, con una resistencia de 1 a 3 Mohms.

Las células se mantuvieron en una cámara de registro con aproximadamente 200  $\mu$ L de ringer extracelular que contiene

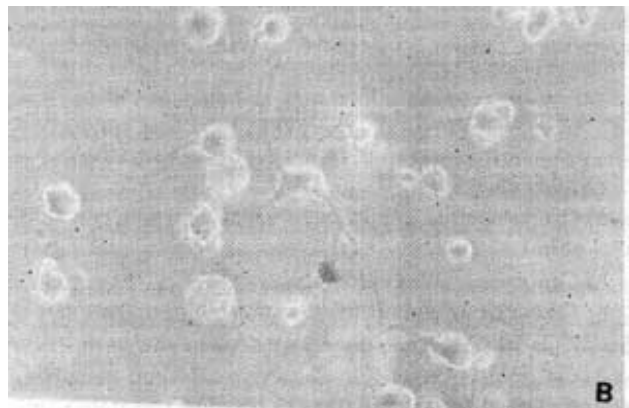
en mM: NaCl 160, KCl 2.5,  $CaCl_2$  5,  $MgCl_2$  1, glucosa 8, HEPES 10, pH 7.4 titulado con NaOH. Se agregó TTX 3  $\mu$ M, al baño a fin de bloquear las corrientes de sodio y nifedipina 2  $\mu$ M a fin de bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Para llenar el microelectrodo de registro se utilizó una solución que contiene en mM: CsCl 175,  $MgCl_2$  5,  $Na_2ATP$  3, HEPES 5, BAPTA 0.1, pH 7.4 titulado con CsOH.

Para medir la capacitancia de membrana de una célula se promedió el resultado de 5 pulsos de 10 mV desde un potencial de -100 mV y duración de 5 ms. Se integró el área bajo la curva de la corriente capacitiva en pA, digitalizada a 5 KHz.

La medición de la corriente de  $Ca^{2+}$  se llevó a cabo aplicando pulsos despolarizantes en pasos de 10 mV hasta +50 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, con una duración de 20.4 ms, la cancelación de componentes lineales y de fuga se realizó con el método de P/n con un total de 4 pulsos de resta. El resultado de la corriente máxima de una célula se dividió entre su capacitancia de membrana ( $C_M$ ), obteniéndose así la densidad de corriente para esa célula.



**Figura 1.** CGS a diferentes tiempos. Muestra en A) células en fresco con forma casi esférica, con nulas o pocas neuritas. B) células en cultivo de 24 horas, únicamente con suero fetal bovino al 10% en el medio de cultivo. la mayoría de células están apoptóticas y sólo algunas con un cono de desarrollo corto. C) células en cultivo de 24 horas (ángulo inferior izquierdo) con NPS 10  $\mu$ M con un gran cono de crecimiento, y a las 48 horas (ángulo superior derecho) con arborizaciones neuríticas.

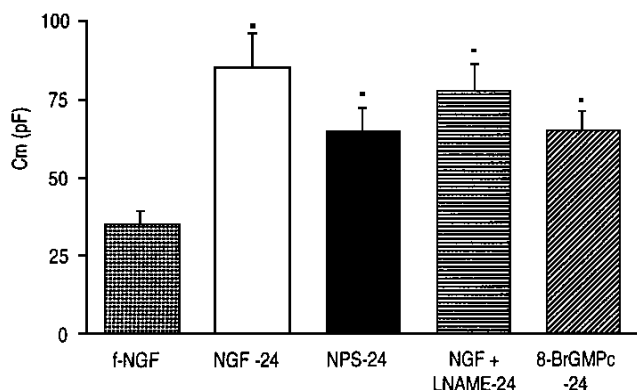


**Figura 2.** A) Células del ganglio simpático cervical superior (CGS), en cultivo de 24 horas con 8-Bromo-monofostato cíclico de guanósina, (8-Br-GMPc) la mayoría de las células tienen membrana nítida y brillante al microscopio de contraste de fases, algunas tienen arborizaciones neuríticas. B) CGS en cultivo a las 72 horas con 8-Br-GMPc que muestran gran arborización neurítica.

**Cuadro 1. Densidad de corriente de calcio (pA/pF) en canales tipo N de células cultivadas del ganglio simpático cervical superior de rata hp-80 mV**

Célula	f-NGF	NGF-24	NPS-24	8-Br-GMPc24	NGF+L-NAME-24
1	10.7706	11.7660	13.9355	5.6916	4.1312
2	4.1636	11.1703	10.8938	23.2401	4.0641
3	8.0405	11.0844	10.2610	7.5749	5.7386
4	4.9864	7.6352	8.3510	13.8769	1.7026
5	5.6714	4.9460		11.3988	3.0012
6	5.0911	7.2700		12.3703	3.3432
7	6.2184	16.3055		11.8/563	4.7310
8	5.3659			17.8945	
Media	6.29 ± 0.756	*10.03 ± 1.414	*10.86 ± 1.159	*12.99 ± 1.967	*3.82 ± 0.489

f-NGF - Células en fresco más NGF 67.7 ng/mL.  
 Células en cultivo de 24 horas más:  
 NGF-24-NGF 67.7 ng/mL.  
 NPS-24 Nitroprusiato de sodio 10 µM.  
 8-Br-GMPc-24-8-Bromo-monofosfato-cíclico de guanosina 100 µM.  
 NGF+L-NAME-24-NGF más L-nitro-metil-arginina-éster 100 µM.  
 Valores media ± e.e.m.  
 \*Indica diferencia significativa (p < 0.05) respecto a f-NGF.



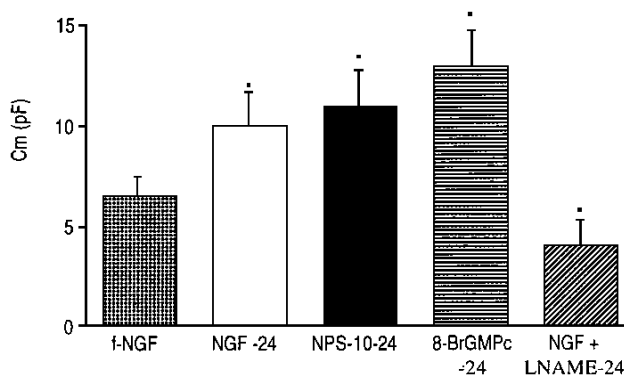
**Figura 3. Capacitancia de membrana (pF).** Células en fresco con factor de crecimiento nervioso (NGF) 67.7 ng/mL (f-NGF), células en cultivo de 24 h con nitroprusiato de sodio 10 µM (NPS-10-24), células en cultivo de 24 h con NGF más L-nitro-arginina-metil-éster 100 µM (NGF+L-NAME-24), células en cultivo de 24 h con 8-Bromo-monofosfato-cíclico de adenosina (8-Br-GMPc-24). Valores multiplicados por -1. Las barras representan la media ± e.e.m.

\*Indica p < 0.05 respecto al grupo f-NGF.

**Grupos de estudio**

- a) Grupo control: células preparadas en fresco con NGF 67.7 ng/mL.
- b) Grupo de células cultivadas con NGF 67.7 ng/mL.
- c) Grupo de células cultivadas con nitroprusiato de sodio (NPS) 10 µM, como donador de óxido nítrico.
- d) Grupo de células cultivadas con 8-bromo-guanosin-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc) 100 µM.
- e) Grupo de células cultivadas con nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) 100 µM, como inhibidor de la síntesis de óxido nítrico.

Los resultados representan el promedio ± e.e.m de N experimentos, las diferencias entre grupos fueron consideradas estadísticamente significativas a un nivel de probabili-



**Figura 4. Densidad de corriente de Ca<sup>2+</sup> (pA/pF) en canales tipo N de CGS.** Células en fresco (f-NGF), y células en cultivo de 24 h con factor de crecimiento nervioso (NGF-24) 67.7 ng/mL, con nitroprusiato de sodio (NPS-24) 10 µM, con 8-Bromo-monofosfato-cíclico de guanosina (8-Br-GMPc-24) 100 OM y con NGF más L-nitro-arginina-metil-éster (NGF+L-NAME-24) 100 µM. Potencial de mantenimiento -80 mV, valores multiplicados por -1, las barras representan la media ± e.e.m.

\*Indica p < 0.05 respecto al grupo f-NGF.

dad de p < 0.05. Se utilizó la prueba de ANOVA (análisis de varianza unifactorial) para la comparación entre grupos, mientras que entre grupos con significancia estadística se realizó prueba de Newman-Keuls.

**Resultados**

*Crecimiento y diferenciación celular*

El modelo de las CGS, presenta la ventaja de depender del NGF para el crecimiento de neuritas en cultivo *in vivo* para el desarrollo del axón que finalmente inerva al tejido blanco.

En nuestro caso los resultados obtenidos son interesantes ya que el desarrollo de arborizaciones neuríticas es reproducido en todos nuestros grupos experimentales y la C<sub>M</sub>

se incrementó de manera estadísticamente significativa en relación a las células registradas en fresco como se describe a continuación:

La morfología de las CGS adecuadamente disociadas y registradas en fresco varió entre ser redondas y conservar algunas neuritas primarias como se muestra en la *figura 1*, la medida de su  $C_M$  fue de  $38.8 \pm 3.15$  pF.

A las 24 horas de cultivo en presencia de NGF la forma de estas neuronas cambió a ser ovalada y en general, con una o dos prolongaciones terminadas en un gran cono de desarrollo. La  $C_M$  de estas células se encontró en  $86.9 \pm 9.93$  pF.

Las células cultivadas con NPS no variaron mucho en su morfología con respecto a las cultivadas con NGF, y también presentaron un gran cono de desarrollo, que en algunas ocasiones representó el 20% del área somática, (*Figura 1*). Su  $C_M$  fue de  $63.3 \pm 4.52$  pF.

El hecho de encontrar células en condiciones adecuadas de registro electrofisiológico aun en ausencia de NGF, con membrana celular que al microscopio de luz con contraste de fases se observó brillante, nítida y la superficie de la célula sin irregularidades, nos llevó a tratar de conservarlas por más tiempo, por lo que se les cambió el medio de cultivo a las 24 horas adicionando una dosis igual a la inicial ( $10 \mu\text{M}$ ) de NPS. El resultado obtenido se muestra en la *figura 1*, en la cual se observa el desarrollo de arborizaciones neuríticas a las 48 horas en donde ya hay conexiones entre las células. Este fenómeno se observó incluso a las 72 horas tiempo en el cual se suspendió este experimento.

Las células tratadas con 8-Br-GMPc morfológicamente se comportaron de manera similar a las tratadas con NGF y a las tratadas con NPS, se les cambió de medio de cultivo a las 24 y 48 horas adicionando  $100 \mu\text{M}$  de 8-Br-GMPc. Se observó también arborizaciones neuríticas y el establecimiento de redes neuríticas (*Figura 2*). La media de la  $C_M$  registrada en estas células a las 24 horas fue de  $78.8 \pm 5.84$  pF (*Figura 3*).

En las células cultivadas con NGF más L-NAME se registró una  $C_M$  de  $64.0 \pm 7.71$  pF, y su morfología fue muy similar a las cultivadas con NGF, NPS u 8-Br-GMPc (*Figura 2*).

En el análisis estadístico se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre cada uno de los grupos experimentales y el grupo de células registradas en fresco, por lo que puede afirmarse que dentro de las primeras 24 horas el área de membrana de las CGS, crece en condiciones de cultivo.

No fue posible el registro de células cultivadas sin NGF y únicamente con suero fetal bovino al 10%, ya que las características de su membrana celular no lo permitieron, pues si bien se realizaron algunos gigasellos, no fue posible romperlos adecuadamente, sin embargo en las células que sobrevivieron en estas condiciones durante 24 horas se observaron conos de desarrollo aunque cortos (*Figura 1*).

#### Corriente de $\text{Ca}^{2+}$

Los valores de densidad de corriente obtenidos por la normalización de la corriente máxima ( $I_{\text{max}}$ ) con la  $C_M$  se muestran en el *cuadro 1*.

El análisis estadístico demostró que la densidad de corriente alcanzada por el grupo de células cultivadas con NGF es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la registrada en las células en fresco, este hallazgo fue similar para los grupos de células cultivadas con NPS y con 8-Br-GMPc. En contraste con las células cultivadas con NGF más L-NAME en donde la densidad de corriente no se incrementó significativamente en relación a las células en fresco (*Figura 4*).

Con base en estos resultados se puede afirmar que los grupos de células cultivadas con NGF, NPS u 8-Br-GMPc, incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) su densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en canales tipo N, lo cual no sucedió con las células cultivadas con NGF en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintetasa L-NAME.

#### Discusión

Actualmente gran parte de los estudios tendientes a analizar el mecanismo de acción del NGF han sido desarrollados, utilizando como modelo de estudio a las células de feocromocitoma de rata PC12. Se han formulado las siguientes preguntas básicas en torno al NGF y sólo se han obtenido respuestas parciales a ellas (Kaplan y Stephens, 1994).

a) ¿Son equivalentes las vías de flujo de información intracelular usadas por el NGF en neuronas en cultivo primario e *in vivo* a las estudiadas en PC12?

b) ¿Cómo los diferentes factores de la familia de las neurotrofinas, actuando a través de los receptores Trk, pueden tener diferentes funciones en la célula?

c) ¿Cuáles son los blancos intracelulares y las vías de flujo de información intracelular, responsables de la respuesta de una neurona al NGF?

En este trabajo se utilizaron CGS de rata, esto se traduce en la ventaja de poder analizar nuestra hipótesis en neuronas que son totalmente fisiológicas y así contribuir a la respuesta de la primera pregunta.

Por la edad de nuestros sujetos de estudio podemos afirmar que la capacidad de desarrollar neuritas primarias se conservó (Voyvodic, 1987), lo cual permite usar este modelo para estudiar vías de flujo de información activas en estas neuronas en el momento en que inician su especialización y adoptan su morfología característica, esto nos permitió tratar de contestar la tercera pregunta.

Nuestras células no sobrevivieron más de 24 horas sin NGF, cuando se les incubó sólo con suero fetal bovino al 10%, ya que su membrana a las 24 horas no se observaba nítida ni brillante, este dato es compatible con lo reportado por algunos autores (Levi Montalcini, 1987; Chun y Patterson, 1977).

Una consecuencia de no poder obtener células que sobrevivieran más de 24 horas sin NGF, es la de no poder observar si el desarrollo de neuritas depende directamente de la presencia de NGF, sin embargo se observó que algunas células cultivadas sin NGF sí desarrollaron un cono de creci-

miento el cual se deterioró en el transcurso de las primeras 24 horas.

Esta observación no fue cuantificada en nuestros experimentos, por lo que no podemos afirmar o descartar que sea significativa, sin embargo en la literatura se ha informado del desarrollo de neuritas en PC12 que no han sido expuestas a NGF (Reuter y cols. 1992; Rasouly y cols, 1994). Esto sugiere que la unión de NGF a su receptor en la membrana no es indispensable para el desarrollo de neuritas.

De acuerdo con lo anterior nosotros encontramos cambios morfológicos en células cultivadas con NPS similares a los desarrollados en los cultivos con NGF, por lo que nos preguntamos si estos cambios son debidos al NO liberado al medio de cultivo. Para responder a esta pregunta se cultivaron células en presencia de 8-Br-GMPc y en presencia así mismo de NGF más L-NAME.

Encontramos que efectivamente la aplicación de 8-Br-GMPc, reprodujo los efectos morfológicos del NGF, lo que podría apoyar a que este fenómeno se debiera al NO sin embargo esta posibilidad se descartó en virtud de que el grupo cultivado con NGF más L-NAME también incrementó su  $C_M$  y desarrolló arborizaciones neuríticas.

Estos resultados sugieren que el NO y su segundo mensajero el GMPc no desencadenan directamente el desarrollo de arborizaciones neuríticas en CGS, sin embargo, el encontrar que por acción de estos fármacos nuestras células sobrevivieron hace pensar que pueden desencadenar fenómenos relacionados con la supervivencia de las células y que una vez pasado cierto estado crítico se inicie desarrollo de arborizaciones neuríticas en estas neuronas.

Nosotros medimos la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  en canales tipo N, ya que se utilizó nifedipina como bloqueador de canales tipo L y en los registros de corriente tomados a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, la corriente se activó a -20 mV, lo cual es congruente con la literatura (Tsien, 1988).

Así mismo, los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N se han relacionado con importantes funciones en las neuronas del sistema nervioso central y periférico de mamíferos, tales como la liberación de neurotransmisores, la integración de señales en el árbol dendrítico de neuronas (Mills y cols, 1994) así como la sinaptogénesis (Verdeiro y cols, 1995), por lo que en nuestro trabajo el incremento en la densidad de corriente en estos canales se relacionó con la funcionalidad de las CGS.

La aplicación de L-NAME al medio de cultivo en presencia de NGF, bloqueó el incremento en la densidad de corriente en canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, en CGS sin embargo, la forma de estas células no varió con respecto a las cultivadas con NGF, esto refleja la existencia de dos posibles mecanismos de acción del NGF relacionados con estos resultados y nos sugiere que el mecanismo de acción por el cual el NGF induce diferenciación morfológica en estas células es independiente del mecanismo de acción seguido para inducir su diferenciación funcional, tomada ésta como incremento en la densidad de corriente a través de canales de  $Ca^{2+}$  tipo N.

En la literatura se encuentran algunos datos relacionados con los mecanismos de acción del NGF que apoyan esta posibilidad (Obermeier, 1995): Se sabe que la unión del NGF a su receptor en la membrana induce la fosforilación de tres proteínas blanco entre las que se encuentran: Ras,<sup>21</sup> fosfolipasa C-gamma, y proteína cinasa del inositol trifosfato.

Por lo que sugerimos la realización de más experimentos manipulando la fosforilación a nivel de estas tres proteínas blanco a fin de analizar cuál de ellas tiene relación con nuestros resultados.

## Conclusiones

El NGF induce desarrollo de arborizaciones neuríticas e incremento de la  $C_M$  y en la densidad de corriente a través de canales de  $Ca^{2+}$  tipo N en CGS.

Estos efectos fueron reproducidos en cultivos primarios de CGS por la aplicación de NPS como liberador de NO al medio de cultivo, así como por la incubación de estas células con 8-Br-GMPc. Sin embargo, la aplicación de L-NAME en presencia de NGF no inhibió el desarrollo de arborizaciones neuríticas, pero sí inhibió el incremento en la densidad de corriente a través de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N. Esto confirma nuestra hipótesis acerca de que el NGF activa dos vías de flujo de información intracelular diferentes, para inducir por un lado desarrollo de arborizaciones neuríticas e incremento en la  $C_M$  y por otro incrementar la densidad de corriente a través de canales de  $Ca^{2+}$  tipo N.

En la vía que se activa para inducir el incremento en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  en canales de tipo N participan el NO y su segundo mensajero GMPc, ya que cuando se inhibió la síntesis de NO con L-NAME este incremento no se observó y cuando se cultivaron las células con un análogo de GMPc el efecto se reprodujo.

## Referencias

1. Bredt D, Snyder S. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 1994; 13: 301-13.
2. Cavalie A, García D. Constitutive up-regulation of calcium channel current in rat pheochromocytoma cells: role of *c-fos*- and *c-jun*. *J Physiol* 1994; 479: 11-27.
3. Ceccatelli S, Lundberg J, Zhang X et al. Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. *Brain Res* 1994; 656: 381-395.
4. Chun L, Patterson P. Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons *in vitro*. *J Cell Biol* 1977; 75: 694-716.
5. Greene LI, Tishler A. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2424-2428.
6. Haby C, Lisovoski F et al. Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes *c-fos* and *junB* in PC12 cells. *J Neurochem* 1994; 62: 496-501.
7. Hamill O, Neher E, Sakmann. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
8. Hirming L, Fox A, McCleskey E et al. Dominant role of N-Type  $Ca^{2+}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 1988; 239: 57-60.

### Participación del GMPc en los procesos de diferenciación neuronal

9. Lazarovici P, Rasouly D. Staurosporine induces tyrosine phosphorylation of a 145 kDa protein but does not activate gp140trk in PC12 cells. *European J Pharmacol* 1994; 269: 255-264.
10. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237: 1154-62.
11. Mills L, Niesen E et al. N-type-Ca<sup>2+</sup> channels are located on somata, dendrites, and subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 6815-24.
12. Obermeier A, Bradshaw A, Seedorf K, Ulrich A et al. Definition of signals for neuronal differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1995; 766: 1-17.
13. Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 1995; 375: 68-73.
14. Reuter H, Bouron A, Neuhaus R et al. Inhibition of protein kinases in rat pheochromocytoma (PC12) cells promotes morphological differentiation and down-regulates ion channel expression. *Proc R Soc Lond* 1992; 249: 211-16.
15. Saarma M, Paves H, Metsis M et al. Rapid morphological and biochemical changes triggered by nerve factor in the rat pheochromocytoma PC12 cells. *Current Topics Dev Biol* 1990; 24: 160-190.
16. Shofield G, Stephen Ikeda. Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflügers Arch* 1988; 411: 481-490.
17. Stephens R, Loeb D, Kaplan D et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma to mediate NGF responses. *Neuron* 1994; 12: 691-705.
18. Tsien RW, Lipscombe D, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in Neurosci* 1988; 11: 431-38.
19. Verdeiro C, Coco S et al. Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: Different involvement of w-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6449-6453.
20. Voyvodic J. Development and regulation of dendrites in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 1987; 7: 904-12.