

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ACTIVACIÓN DE RECEPTORES NICOTINICOS EN UN
MODELO DE TRAUMA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Rosario Garrido Rodríguez**

Bajo la dirección del Doctor:
Michal Toborek

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1823-X

**ACTIVACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS EN UN MODELO DE
TRAUMA EN MÉDULA ESPINAL**

Tesis Doctoral
Rosario Garrido Rodríguez

Julio 2001

Director de Tesis

Tutor

Michal Toborek

Jesús Pérez-Gil

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

AA:	ácido araquidónico
ATP:	adenosina trifosfato
DAG:	diacilglicerol
DMSO:	dimetil sulfóxido
DTT:	ditiotreitol
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetracético
cGMP:	guanosina monofosfato cíclico
HNE:	4-hidroxinonenal
IP ₃ :	inositol trifosfato
LDH:	lactato deshidrogenasa
NDGA:	ácido nordihidroguanirético
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintetasa
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
PMSF:	parametilsulfonilo
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa inversa
SNC:	sistema nerviosos central
SNP:	sistema nervioso periférico

ABREVIATURAS ADICIONALES USADAS EN LAS FIGURAS

AMT:	2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina
B:	α -bungarotoxina
I:	indometacina
M:	mecamilamina
N:	nicotina
7-NI:	7-nitroindazol

ÍNDICE

▪ Introducción	p. 1
- Fisiología de la médula espinal	p. 2
- Estadísticas	p. 6
- Trauma en la médula espinal	p. 7
- Mediadores secundarios del trauma en médula espinal	p. 10
- Papel del AA en el trauma en médula espinal	p. 13
- Papel del NO en el SNC	p. 16
- Nicotina como agente neuroprotector	p. 17
- Papel de los receptores nicotínicos en el SNC	p. 18
▪ Hipótesis y objetivos concretos	p. 25
▪ Materiales y métodos	p. 26
- Cultivos primarios de neuronas de médula espinal	p. 26
- Preparación de los tratamientos experimentales	p. 26
- Determinación de la función mitocondrial/ ensayo MTT	p. 27
- Determinación de la actividad LDH	p. 28
- Determinación de los niveles de ATP	p. 28
- Determinación de la expresión del enzima NOS	p. 29
- Western blot	p. 29
- Determinación de la actividad enzimática de NOS	p. 31
- Determinación de los niveles de NO	p. 31
- Determinación de los niveles de cGMP	p. 31
- Determinación de la actividad de caspasas	p. 32
- Determinación de la presencia de apoptosis	p. 33
- Análisis estadístico	p. 34

▪ Capítulo I. La activación de los receptores nicotínicos disminuye los efectos neurotóxicos del AA en las neuronas de médula espinal.....	p. 35
- Resultados	p. 37
La activación de los receptores nicotínicos protege a las neuronas de médula espinal frente a la acción del AA sobre la función mitocondrial y la liberación del enzima LDH	p. 37
La activación de los receptores nicotínicos disminuye el efecto del AA sobre los niveles celulares de ATP	p. 43
El bloqueo del metabolismo del AA no inhibe sus efectos sobre los niveles de ATP en neuronas de médula espinal	p. 47
▪ Capítulo II. La activación de receptores nicotínicos disminuye la sobre-expresión del enzima NOS causada por el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal.....	p. 49
- Resultados	p. 51
Regulación de la expresión del gen que codifica para el enzima NOS neuronal mediante el tratamiento con AA y nicotina	p. 51
La activación de los receptores nicotínicos bloquea el aumento de los niveles de NOS neuronal producido tras el tratamiento con AA	p. 54
Variación de la actividad enzimática de NOS tras el tratamiento con nicotina y AA	p. 56
La activación de los receptores nicotínicos disminuye los niveles de nitrito y cGMP observados tras el tratamiento con AA	p. 60

▪ Capítulo III. La activación de receptores nicotínicos disminuye la aparición de apoptosis tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal.....	p. 65
- Resultados	p. 67
La activación de receptores nicotínicos disminuye la fragmentación del DNA inducida por el tratamiento con AA	p. 67
La activación de receptores nicotínicos disminuye la activación de caspasas observada tras el tratamiento con AA	p. 71
El bloqueo del metabolismo del AA no inhibe sus efectos sobre la actividad de caspasa-3 en neuronas de médula espinal	p. 80
La activación de receptores nicotínicos disminuye la liberación de citocromo c de la mitocondria causada por el tratamiento con AA	p. 82
Los niveles de proteína Bcl-2 no se ven alterados por el tratamiento con AA y/o nicotina en neuronas de médula espinal	p. 85
▪ Discusión.....	p. 88
- Modelos utilizados en el estudio del trauma en médula espinal	p. 89
- Papel del AA en la aparición de estrés oxidativo y muerte celular	p. 91
- Mecanismos responsables de la alteración energética, disfunción mitocondrial y apoptosis inducidos por el AA	p. 93
- Mecanismos implicados en la regulación de NOS mediada por AA	p. 96
- Mecanismos neuroprotectores implicados en la activación de los	

receptores nicotínicos

p. 97

- [Conclusiones y Estudios futuros](#)..... p. 103
- [Bibliografía](#)..... p. 108

INTRODUCCIÓN

La lesión de la médula espinal es una de las principales causas de mortalidad entre los menores de 45 años. Diferentes tipos de fractura en la columna vertebral o en el tubo neural pueden dar lugar a esta patología. El estudio detallado de las consecuencias del daño inicial ha llevado a la identificación de procesos de muerte celular y tisular que se producen tras el trauma físico. Desde un principio se propuso la hipótesis de que la degradación celular observada se producía como consecuencia de la activación de una cascada de procesos secundarios que tienen lugar tras el trauma inicial. Mientras que éste no se puede prever o modificar, los mecanismos secundarios que dan lugar a la expansión del daño inicial pueden ser sujeto de intervención terapéutica.

Entre los procesos secundarios que ocurren después del trauma inicial, se ha propuesto que la hidrólisis de fosfolípidos que forman la membrana celular contribuye en gran medida a la extensión del trauma. Debido a la composición de los lípidos de membrana, el ácido AA es el principal ácido graso liberado tras la hidrólisis. La liberación de ácido AA está relacionada con multitud de procesos implicados en la transducción de señales en neuronas. Para llevar a cabo el estudio del efecto de la liberación de ácido AA, y para poder determinar los mecanismos implicados en dicho efecto, se estableció un modelo *in vitro* usando cultivos primarios neuronales a los que se sometió a tratamiento con AA 10 μ M. El uso de dicho modelo *in vitro* permite controlar las condiciones de experimentación en el sistema objeto de estudio.

Por otro lado, debido a la existencia de publicaciones previas que indican la posibilidad de un efecto neuroprotector relacionado con la activación de receptores neuronales nicotínicos en distintos modelos de neurotrauma, se llevó a cabo un estudio para comprobar si la activación de dichos receptores pudiera tener un efecto protector en nuestro modelo de trauma en médula espinal. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M, dos horas antes de la adición de ácido AA, condiciones éstas que se mostraron como las más idóneas para poder observar un efecto neuroprotector.

La investigación de los mecanismos que dan lugar al efecto tóxico del ácido AA, así como el estudio de las rutas celulares responsables del potencial efecto protector inducido por la activación de los receptores nicotínicos son objeto de este estudio.

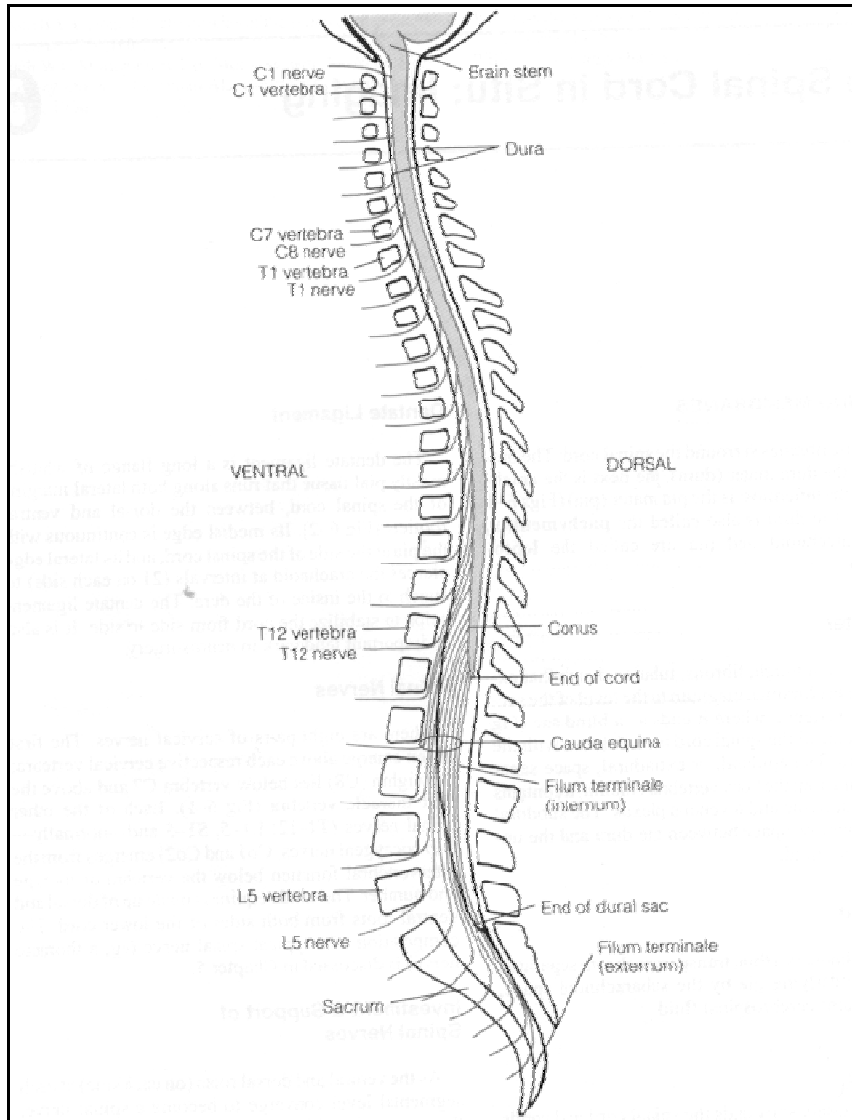
Fisiología de la médula espinal

La médula espinal humana es una estructura segmentada que mide aproximadamente 45 cm de longitud, 1 cm de diámetro, y pesa aproximadamente 35 gramos. La médula espinal se encuentra a continuación del bulbo cerebral, y termina en el denominado *conus medularis* (figura 1). La localización de la médula espinal dentro de la columna vertebral confiere protección, al mismo tiempo que la hace susceptible a posibles lesiones en caso de inflamación o compresión de la columna.

La médula espinal se encuentra limitada por las meninges pía madre y pía-aracnoide. Su estructura interna está dividida en materia gris y materia blanca. La materia gris se encuentra rodeada de la materia blanca, y contiene principalmente cuerpos neuronales, tejido conectivo y componentes vasculares. La materia blanca, de cuya apariencia es responsable el recubrimiento de mielina de los axones nerviosos contiene terminaciones nerviosas y tejido vascular.

La médula espinal está organizada en segmentos a lo largo de su estructura. En cada segmento, nervios espinales conectan la médula con distintas partes del cuerpo. Existen 31 nervios espinales que entran o salen de la médula espinal en diferentes niveles, 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacrales y 1 coccigeal. Cada uno de estos nervios tiene una raíz ventral y otra dorsal. En la raíz dorsal se encuentra el ganglio dorsal, formado por los cuerpos de neuronas dorsales (figura 2). Estos nervios contienen neuronas motoras que transmiten el impulso nervioso desde el cerebro a distintas partes del cuerpo, iniciando acciones de movimiento. La médula espinal termina a la altura de la primera ó segunda vértebra lumbar, en la estructura denominada *conus medularis*. A partir de dicho punto, los nervios espinales de la región lumbo-sacral descienden a través de la columna vertebral, formando la estructura denominada *cauda equina*.

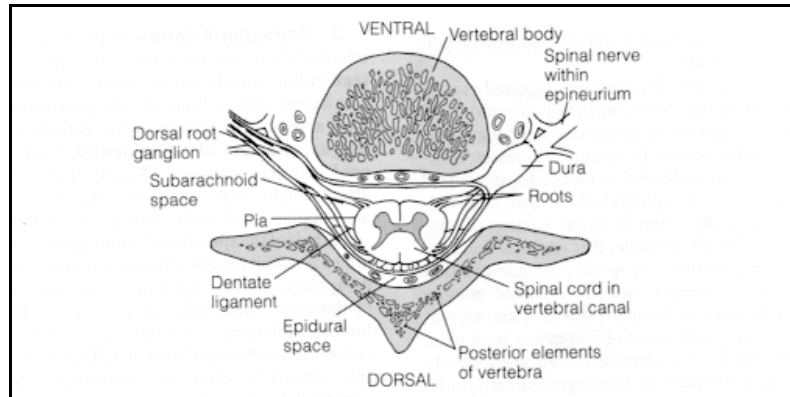
Figura 1. Representación esquemática de la médula espinal



Existen distintos tipos de células, neuronales y no neuronales, que se pueden encontrar en la médula espinal. Los principales tipos de neuronas que forman la médula son neuronas motoras, neuronas sensoriales e interneuronas. Las neuronas motoras poseen largos axones que controlan los músculos del esqueleto, cuello, torso y extremidades. Las neuronas sensoriales, también denominadas neuronas del ganglio dorsal, transmiten la señal nerviosa a la médula espinal. Las interneuronas espinales se sitúan dentro del canal medular, y su función es la integración de la información proveniente de las neuronas sensoriales para producir respuestas nerviosas en el músculo. Las células de la glía se encuentran en mucho mayor número que las neuronas, tanto en el cerebro como en la médula espinal, y llevan a cabo tareas esenciales; los oligodendrocitos forman la mielina que recubre los axones nerviosos, los astrocitos regulan la composición del medio extracelular, y las células de microglía responden en caso de insulto externo, migrando al lugar del daño para eliminar restos celulares. Aunque las células gliales cumplen diversas funciones que posibilitan la supervivencia de las células neuronales, también pueden actuar impidiendo la recuperación tras la lesión.

Las células nerviosas de la médula espinal, y en general de todo el SNC responden de distinta manera que las neuronas del SNP. Las células del SNC poseen un elevado metabolismo, y dependen del suministro sanguíneo de glucosa para conseguir la energía necesaria. El flujo sanguíneo normal es mucho menor en la médula que en otros tejidos, por lo que estas células son más vulnerables que las del SNP a reducciones del flujo sanguíneo (isquemia). Otra característica propia de la médula espinal es la barrera hemato-espinal. Esta barrera, formada por las células que recubren los vasos sanguíneos en el SNC protege a las células nerviosas, restringiendo la entrada de sustancias potencialmente tóxicas y de células del sistema inmune. Lesiones en la médula espinal pueden comprometer el funcionamiento de esta barrera, posiblemente contribuyendo a la expansión del trauma. Por último, la composición de la glía y de la matriz extracelular es diferente en las células del cerebro y de la médula que en el SNP. Todas estas diferencias entre el SNC y el SNP contribuyen a las distintas respuestas observadas tras el trauma.

Figura 2. Sección transversal de la médula espinal



Estadísticas

El trauma en médula espinal es la consecuencia del daño producido al canal espinal. Normalmente, este trauma afecta principalmente a hombres jóvenes, la edad media de las víctimas es de 31.8 años, y la relación de la diferente incidencia entre hombres y mujeres es de 4 a 1. Los accidentes de tráfico son la causa principal entre los casos recogidos (37.4%). La segunda causa son actos violentos, seguidos de caídas y accidentes deportivos.

El porcentaje de individuos que padece tetraplejía (parálisis de las cuatro extremidades) es ligeramente superior a aquel de los que padecen paraplejía (parálisis simétrica de dos extremidades). Desde 1990, la patología neurológica más abundante es tetraplejía incompleta (29.5%) , seguida de paraplejía completa (21.3%) y tetraplejía completa (18.5%). El área más afectada por el traumatismo es la parte inferior del cuello. El segundo área más afectada se encuentra entre la región lumbar y la torácica.

De entre las víctimas del trauma en médula espinal, las causas más frecuentes de muerte son neumonía, embolia pulmonar y septicemia (Becker *et al.*, 1999).

Tabla 1. Esperanza media de vida tras el trauma en médula espinal (años)

Edad en la que se produce el traumatismo	Esperanza media de vida (normal)	Funcion motora afectada a cualquier nivel	Paraplejia	Tetraplejia	Tetraplejia severa	Ventilacion necesaria
20	57.2	51.6	45.2	39.4	33.8	16.2
40	38.4	33.5	27.8	23	18.7	7.2
60	21.2	17.5	13	9.6	6.8	1.2

Trauma en la médula espinal

El trauma en la médula espinal hace referencia a cualquier traumatismo de los elementos neurales del canal espinal. El daño puede producirse a consecuencia de un trauma físico, o de una enfermedad de la médula o de la columna vertebral, aunque la mayoría de los casos son el resultado del trauma físico producido en la columna vertebral. Dicho trauma puede causar la fractura de un hueso o el desgarramiento de ligamentos, con el consiguiente desplazamiento de la columna (Dolan *et al.*, 1980; Tator, 1983). El daño en la columna puede causar contusión con hemorragia e inflamación de la médula espinal, ó puede causar desgarramiento de la médula o de alguna de sus raíces nerviosas. Se supone que la extensión del trauma viene determinado por su localización, así como por las dimensiones del tubo neural en el lugar de la lesión.

El daño en la medula espinal afecta la comunicación entre el cerebro y los sistemas que controlan las funciones sensoriales, motoras y autonómicas por debajo del lugar dela lesión. Los síntomas asociados con esta patología varían dependiendo de la severidad del daño, del segmento en el cuál se produce la lesión, y de las fibras nerviosas afectadas. Una lesión de la médula espinal con mantenimiento de los sistemas nerviosos por debajo del lugar del daño, da lugar al tipo de patología conocida como de neurona motora superior ó parálisis espástica. Los reflejos intrínsecos se encuentran desinhibidos, lo que produce hiperreflexia, aumento del tono muscular, espasmos y espasticidad. Una lesión de la médula con atrofia de los segmentos nerviosos por debajo del lugar del daño da lugar al tipo de patología conocida como de neurona motora inferior, lesión de la *cauda equina*, o parálisis flácida. En este tipo de lesión, el estímulo nervioso no puede alcanzar la médula espinal, y por tanto los reflejos y el tono nervioso están ausentes.

Los cambios morfológicos tras la lesión empiezan a aparecer en cuestión de minutos, y se limitan en un principio al alargamiento de los espacios extracelulares tanto en la materia blanca como en la gris, y a la aparición de hemorragias en la materia blanca que se extienden a lo largo del eje longitudinal del tubo neural. Tras la primera semana, la degeneración del área necrótica es evidente, y tras el primer mes se puede observar la presencia de una cavidad cística, y en la materia blanca restante aparece desmielinización (Curati *et al.*, 1992).

Tras el trauma se pueden observar cierta variedad de alteraciones metabólicas. El primer cambio, y también el más patente, es la disminución de la presión de O₂, lo cual implica la aparición de hipoxia tisular como uno de los factores característicos de la lesión en médula espinal. Por otro lado, medidas del metabolismo energético muestran una rápida disminución en el contenido en ATP, así como un cambio en la distribución de NAD/NADH (Marsala *et al.*, 1989).

Variaciones a nivel celular pueden observarse en cuestión de horas después del trauma. Las neuronas sufren distorsión y destrucción de sus axones. Las células de Nissl se ven sometidas a procesos inflamatorios, y las células de la glía reaccionan dando lugar a la formación de la cicatriz glial junto con la activación de astrocitos y microglía.

A nivel bioquímico también se pueden observar la presencia de cambios tras el trauma, entre ellos, variaciones en el metabolismo de iones y formación de productos provenientes de la degradación de membranas celulares son dos de las rutas bioquímicas más conocidas que se ven afectadas después del daño inicial, y que se proponen como mediadores de la extensión del trauma (Saunders *et al.*, 1987; Sharma y Olsson, 1990; Tator y Fehlings, 1991).

Tabla 2. Alteraciones observadas tras el trauma en médula espinal

1. Variaciones bioeléctricas

Alteraciones en amplitud y duración de potenciales motores y potenciales cerebrales

2. Variaciones vasculares

Isquemia

Edema

Necrosis

Inflamación

3. Alteraciones bioquímicas

Productos de la degradación de membranas celulares

AA

Leucotrienos

Tromboxanos

4. Alteraciones patológicas

Alteraciones en la microvasculatura de la materia gris

Reacción de las células de la glía

Formación de la cicatriz glial

Activación de las células de microglía

Desmielinización

Mediadores secundarios del trauma en médula espinal

La naturaleza progresiva de los cambios morfológicos que se producen tras la lesión inicial sugiere que tras el trauma físico se produce un deterioro de las condiciones iniciales como consecuencia de la activación de mecanismos celulares secundarios, entre los que se puede distinguir la liberación de agentes neurotóxicos, isquemia, edema, inflamación y estrés oxidativo (Dolan y Tator, 1982). De entre los agentes liberados que tienen potencial efecto neurotóxico cabe distinguir aminoácidos excitatorios, ácidos grasos libres, neuropéptidos y radicales libres (Hall y Braughler, 1982; Hall y Braughler, 1986; Regan y Choi, 1991; Lipton, 1993). Estos compuestos pueden ejercer su acción a través de distintos mecanismos, produciendo alteraciones de las membranas celulares y del metabolismo celular, y/o provocando una respuesta inflamatoria. Entre los mecanismos específicos propuestos como causantes de la propagación del daño inicial se pueden destacar alteraciones homeostáticas, hidrólisis de fosfolípidos, alteración de las membranas celulares y aparición de estrés oxidativo (Tator, y Fehlings, 1991).

Tras el trauma en la médula espinal, alteraciones de la barrera hematoencefálica dan lugar a la pérdida de permeabilidad selectiva en el endotelio. Debido a esto, se produce la formación de edema vasogénico, por la acumulación de fluido rico en proteínas en el espacio extravascular. El edema se extiende gradualmente desde la porción central de la médula espinal alcanzando a la materia blanca, permitiendo así la separación del endotelio y el aumento del transporte vesicular a través de él.

La aparición de isquemia tras el trauma se produce como consecuencia de la disminución del contenido en oxígeno en el tejido afectado. Este fenómeno se encuentra detrás de gran parte de los mecanismos celulares activados post-trauma en la médula espinal (Dolan y Tator, 1982). Modelos experimentales han confirmado que existe una relación directa entre el grado de isquemia y la intensidad de la lesión. Isquemia se produce con mayor intensidad en la materia gris, desde donde se extiende gradualmente a la materia blanca (Anthes *et al.*, 1996). La aparición de isquemia da lugar al agotamiento de las reservas celulares de ATP, produciendo alteraciones de procesos dependientes de ATP, como el mantenimiento del gradiente iónico (mediante la bomba Na^+/K^+ ATP-dependiente, Hall y Braughler, 1982). A través de este mecanismo, isquemia produce la

pérdida de homeostasis de las células y la liberación de neurotransmisores y aminoácidos excitatorios, dando lugar a procesos excitotóxicos.

La alteración de las membranas celulares es uno de los procesos críticos que siguen al trauma inicial, con posibles implicaciones en multitud de mecanismos celulares secundarios. Varios estudios (Lucas y Wolf, 1991; Ellis, 1995) han podido relacionar el nivel de intensidad del trauma físico con el grado y el número de membranas celulares afectadas. La alteración de la membrana neuronal puede dar lugar a la activación de fosfolipasas, lo que resulta en un aumento en la liberación de fosfolípidos y ácidos grasos. Dichos fosfolípidos son susceptibles al ataque oxidativo, lo que conduce a la peroxidación de la membrana (Hall, 1993). Este hecho no sólo significa la pérdida de la integridad de la membrana, sino que además conlleva la aparición de una multitud de procesos más complicados, como la alteración en el transporte de proteínas y de iones. El mecanismo a través del cual se produce esta degeneración de la membrana es probablemente más complicado que su simple modificación física, y se piensa que implica la formación de hidroperoxilípidos y aldehídos lipídicos de diferente longitud de cadena hidrocarbonada (Mattson, 1998). Estos compuestos se suponen en gran parte responsables de que la degeneración de la membrana celular lleve a la expansión de la lesión inicial.

El mantenimiento del gradiente iónico es de gran importancia para la conservación de la funcionalidad de las células neuronales. La pérdida del gradiente produce despolarización indiscriminada, lo que permite la liberación masiva de aminoácidos excitatorios, principalmente glutamato, y la entrada de sodio y calcio al interior de la célula a través de canales iónicos dependientes de voltaje y/o de ligando. El aumento de sodio en el interior celular produce degradación de ATP y liberación de calcio de las reservas intracelulares. Por otro lado, activación de receptores glutamatérgicos puede incrementar el flujo de calcio, lo que contribuye al aumento generalizado de los niveles de calcio intracelular. Este hecho tiene una importancia crítica, puesto que puede contribuir a la activación de multitud de mecanismos degradativos, como por ejemplo, activación de proteasas y fosfolipasas dependientes de calcio. Se han podido observar niveles elevados de sodio y calcio tras lesiones en la

médula espinal *in vivo*. *In vitro*, estudios previos indican que se produce un aumento del flujo de calcio y de sus niveles intracelulares.

La hidrólisis de fosfolípidos procedentes de la membrana da lugar al aumento en la concentración de ácidos grasos libres. AA, junto con DAG e IP₃, son los mediadores lipídicos más conocidos. Alteraciones del metabolismo energético, asociadas con el trauma en la médula espinal, impiden la reorganización de fosfolípidos. Mientras que DAG contribuye a la activación de ciertas proteínas kinasas, IP₃ se une a sus correspondientes receptores en el retículo endoplásmico, promoviendo la salida de calcio al citoplasma.

La oxidación del DNA, proteínas y lípidos de membrana se supone una de los mecanismos celulares finales a través del cual diferentes alteraciones ó sustancias tóxicas conducen a la degeneración neuronal. Los radicales libres pueden actuar sobre los ácidos grasos poliinsaturados que forman la membrana, causando una reacción en cadena que destruye fosfolípidos de membrana (Watson y Ginsberg, 1989; Ikeda y Long; 1990, Siesjo, 1993). El ataque de estos radicales libres puede modificar aminoácidos y fragmentos polipeptídicos en proteínas (Oliver *et al.*, 1990). El DNA también está sujeto a ataque oxidativo, principalmente por acción de los radicales OH· y O₂⁻, así como de iones Cu²⁺ y Fe²⁺, resultando en ruptura del DNA y/o modificación de sus bases (Floyd y Carney, 1992).

Aunque varios radicales libres están relacionados con la aparición de estrés oxidativo, el radical OH· parece ser el principal responsable de los efectos destructivos. OH· puede reaccionar virtualmente con cualquier molécula de la célula, y no se conoce ningún sistema enzimático capaz de eliminarlo (Jesberger y Richardson, 1991). Se han propuesto dos rutas principales a través de las cuales se produce la formación de OH·. La primera ruta está relacionada con la reacción que se produce entre el radical O₂⁻ y el hierro contenido en la célula. O₂⁻ se produce como producto secundario en la cadena de transporte de electrones y en rutas metabólicas normales (Watson y Ginsberg, 1989; Ikeda y Long 1990). En una reacción de Fenton, O₂⁻ puede reaccionar con el ión Fe³⁺, produciendo el radical OH·. El sistema nervioso es especialmente susceptible a la generación de OH· a través de esta ruta, dado su elevado contenido en hierro. La segunda ruta de producción de OH· implica la reacción de O₂⁻ con NO. NO es sintetizado a partir

de arginina por la enzima NOS, y tiene características de radical libre (NO·). En condiciones normales, NO actúa como neurotransmisor, llevando a cabo diferentes funciones (Snyder y Brecht, 1991; Zinder, 1992). A concentraciones elevadas, sin embargo, NO puede reaccionar con O₂⁻ para producir peroxinitrito, un radical libre extremadamente reactivo. Tras su protonación, peroxinitrito descompone en NO₂⁻ y OH·.

Papel del AA en el trauma en médula espinal

Debido a su composición lipídica, el AA (5,8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico) es el principal ácido graso liberado procedente de la alteración de membranas neuronales (Bazán, 1970, Bazán, 1989). En condiciones normales, este ácido graso poliinsaturado se encuentra en muy bajos niveles en su forma libre. Durante el trauma, se produce una liberación masiva de AA, debido a la activación de fosfolipasa A₂, y, en menor medida, de fosfolipasa C (Bazán, 1970). La activación de fosfolipasa A₂ tras el trauma puede deberse a la activación de receptores asociados a proteínas G, a alcalinización citoplasmática, y a aumentos en la concentración de calcio intracelular. La activación de fosfolipasa A₂ por la subunidad βγ de la proteína G y por alcalinización se han descrito previamente en plaquetas humanas (Sweatt *et al.*, 1986, Axelrod *et al.*, 1988). Por otro lado, se ha demostrado la existencia en SNC de una isoforma de fosfolipasa A₂ dependiente de calcio. De hecho, esta isoforma parece hidrolizar de manera preferente fosfolípidos que contienen cadenas de AA (Demediuk *et al.*, 1985).

El AA libre está envuelto en diferentes procesos secundarios que ocurren tras el trauma inicial en médula espinal. Aumentos en los niveles de este ácido graso en tejido cerebral de hasta 0.5 mg/kg han sido descritos (Kinouchi *et al.*, 1990). Los efectos del AA pueden deberse bien a su acción directa ó indirecta. La influencia directa del AA puede estar relacionada con interacciones con proteínas de membrana y/o variaciones de la composición lipídica de la membrana. Por otro lado, su acción indirecta puede venir ejercida por alguno de sus metabolitos. Estos derivados metabólicos pueden formarse a través de conversiones enzimáticas, y pueden provenir de reacciones no enzimáticas, de tipo oxidativo, que, debido a su elevado nivel de insaturación, pueden tener lugar. Ambos tipos de acciones del AA se han podido observar previamente en el sistema nervioso. Por ejemplo, se ha observado que el AA es capaz de regular de manera directa la actividad de

canales iónicos, dando lugar a un aumento de la transmisión nerviosa a través de los receptores de NMDA, y disminuyendo la transmisión nicotínica en neuronas simpáticas (Katsuki y Okuda, 1995; Minota y Watanabe, 1997; Tabuchi *et al.*, 1997). El metabolismo del AA a través de la acción de lipooxigenasa y ciclooxigenasa da lugar a la producción de eicosanoides, los cuales pueden actuar como segundos mensajeros, regulando canales y bombas de membrana (Smith, 1989). Además, la producción de eicosanoides resulta en activación de rutas bioquímicas que favorecen la formación de radicales libres. Aunque no se ha podido encontrar ningún metabolito específico responsable de los efectos dañinos del AA, inhibidores de lipooxigenasa demostraron inhibir parcialmente sus efectos neurotóxicos en cultivos celulares primarios de neuronas del estriado (Katsuki *et al.*, 1995). El AA también puede ser metabolizado por la actividad monooxigenasa del citocromo P450 (Karara *et al.*, 1992), dando lugar a la formación de ácido epoxieicosatrienoico (EET), cuyos efectos han sido relacionados con procesos de anti-agregación y secreción de glucagón (Campbell y Harder, 1999). Adicionalmente, es posible que la oxidación no enzimática del AA juegue un papel importante en la neurotoxicidad ejercida por este ácido graso. Se ha demostrado que HNE, producto de la oxidación del AA, puede afectar de modo severo la viabilidad de las neuronas de médula espinal. De hecho, elevados niveles de este aldehído fueron encontrados en un modelo experimental de trauma en médula espinal (Malecki, 2000). Se ha propuesto que los mecanismos implicados en la toxicidad de HNE pueden incluir alteración de los sistemas de transporte de glucosa y modificación conformacional de proteínas (Pedersen *et al.*, 1999).

La liberación del AA ha sido relacionada previamente con muerte celular *in vitro* en diferentes líneas celulares de melanoma y en células tumorales de cerebro (Metzler y Rosecrans, 1998; Williams *et al.*, 1998; Wolf y Laster, 1999). En SNC, la muerte celular tiene implicaciones especiales, debido a la naturaleza post-mitótica de las neuronas adultas. Mientras que la muerte celular ocurre como un fenómeno natural durante el desarrollo, el descenso del número de células nerviosas en la edad adulta puede ocurrir de modo inadecuado, como en el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas (Stefanis *et al.*, 1997). Se han descrito dos tipos principales de muerte celular, necrosis y apoptosis, cada una de ellas relacionada con la activación de distintos mecanismos

celulares. Mientras que el fenómeno de necrosis se relaciona normalmente con la activación de macrófagos y activación de la respuesta inflamatoria, apoptosis, también conocida como muerte celular programada, está relacionada con la condensación de cromatina y con el mantenimiento de la membrana celular. Investigaciones previas han sugerido que apoptosis y necrosis frecuentemente se producen simultáneamente tras la lesión en una misma población de células. Se ha propuesto que apoptosis y necrosis pueden ser condiciones bioquímicas y morfológicas extremas de un mismo fenómeno de muerte celular que puede presentar características intermedias. En muchos casos, la intensidad del insulto determina que mecanismos de muerte celular van a verse activados. Esto sugiere que pueden existir procesos celulares iniciales comunes a ambos mecanismos. Por ejemplo, la activación de segundos mensajeros como el calcio ha sido implicada en ambos tipos de muerte celular.

Además de la naturaleza post-mitótica de las células neuronales, existen otros factores que hacen que la muerte celular presente características particulares en este tipo de células. Los niveles normales de proteínas implicadas en el desarrollo de apoptosis en las neuronas son diferentes en comparación con otros tipos de células, y en algunos casos estas células sintetizan sus isoformas particulares. Asimismo, las neuronas son más susceptibles a la muerte celular causada por señales extracelulares, debido al constante flujo de iones y despolarizaciones de la membrana necesarias para el mantenimiento de su actividad eléctrica.

Hipoxia, activación de receptores de glutamato, disminución de los niveles de factores neurotróficos, y producción de NO son algunos de los mecanismos conocidos capaces de activar la presencia de apoptosis en el SNC (Tamatani *et al*, 1998a; Tamatani *et al*, 1998b). Se han caracterizado distintas rutas que pueden llevar a la aparición de apoptosis en el SNC, y éstas han sido asociadas con algunas enfermedades degenerativas, como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, y demencia asociada con el virus de la inmunodeficiencia hereditaria (Dragunow *et al*, 1995).

Papel del NO en el SNC

Como ya se ha mencionado anteriormente, NO está relacionado con numerosas funciones neuronales (Garthwaite y Boulton, 1995; Zhang y Steiner, 1995). NO es una molécula con propiedades de radical libre, identificada como mensajero molecular en 1988, cuando se encontró que mediaba el aumento en niveles de cGMP que sucede tras la activación de los receptores de NMDA (Garthwaite *et al*, 1989). NO difunde libremente a través de las membranas celulares, característica que lo distingue de otros mensajeros moleculares. Debido a esta propiedad del NO, el único modo de regular sus niveles es mediante la modulación del enzima que lo produce, NOS.

NO es sintetizado por el enzima NOS en la conversión de L-arginina en L-citrulina. Tres isoformas diferentes de este enzima han sido caracterizadas, denominadas neuronal (nNOS ó de tipo I, Bredt *et al*, 1991), inducible (iNOS ó de tipo II, Xie *et al*, 1992) y endotelial (eNOS ó de tipo III, Lamas *et al*, 1992). Estos enzimas se encuentran ampliamente distribuidos en gran variedad de tejidos y tipos de células, y descubrimientos recientes indican la posibilidad de que el mismo tipo de célula pueda expresar más de una isoforma (Radomski *et al*, 1990; Lamas *et al*, 1992; Suschek *et al*, 1993). Sus pesos moleculares varían entre 130 y 160 kDa. NOS se pueden definir como hemoproteínas del tipo citocromo P450. Sus estructuras están divididas en un dominio con actividad reductasa en el extremo carboxilo terminal, y un dominio con actividad oxidasa en el extremo amino terminal. Todas las isoformas contienen sitios de unión para calmodulina, NADPH, FAD y FMN, y poseen varios sitios de fosforilación que se suponen relacionados con la regulación de su actividad enzimática (Bredt *et al*, 1991). Mientras que las isoformas neuronal y endotelial se expresan constitutivamente y son calcio/calmodulina dependientes, la isoforma inducible solamente se expresa en determinadas condiciones, y su actividad no es dependiente de calcio. Las neuronas de médula espinal expresan NOS neuronal de modo constitutivo, aunque su distribución varía según especies (Calsen-Cencic 99). A pesar de su carácter constitutivo, investigaciones previas sugieren que este enzima está sujeto a modulación tras la lesión en médula espinal (Sharma *et al*, 1996; Sharma *et al*, 1998).

En condiciones normales, NO está relacionado con la regulación de gran variedad de procesos fisiológicos, como control de la presión sanguínea, ritmo cardíaco,

potenciación a largo plazo, depresión y liberación de neurotransmisores (Garthwaite, 1991; Shibuki y Okada, 1991; Balligand *et al*, 1993). Sin embargo, incrementos en la producción de NO están asociados con neurotoxicidad y lesiones del SNC (Dawson *et al*, 1993; Gross y Wolin, 1995; Schulz y Wambolt, 1995). NO puede oxidarse, reducirse ó acomplejarse rápidamente con otras biomoléculas. Funcionalmente, NO puede unirse al grupo hemo de guanilato ciclasa, e inducir la producción de cGMP. NO también puede reaccionar con grupos ferro-sulfurosos, resultando en la disolución del grupo e inactivación del enzima afectado. NO puede interaccionar con iones O_2^- , dando lugar al radical libre tóxico peroxinitrito (Lipton, 1993). Se ha postulado que peroxinitrito puede ser responsable por la mayoría de los efectos tóxicos achacados al NO. Peroxinitrito puede oxidar componentes celulares, ó se puede descomponer para formar el radical libre $OH\cdot$ (Beckman, *et al*, 1990).

Nicotina como agente neuroprotector

La nicotina es una sustancia alcaloide procedente de la planta con el mismo nombre, usada como droga psico-activa. Como la mayoría de los productos naturales, la nicotina tiene un amplio efecto de acción en el organismo humano (Lloyd y Williams, 2000).

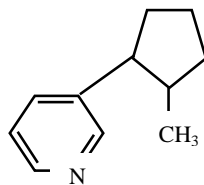


Figura 3. Estructura química de la nicotina

Evidencia previa parece indicar que la nicotina puede ejercer un efecto protector en distintas formas de neurotoxicidad y neurodegeneración. Algunas enfermedades

neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, ó el síndrome de Tourette (Devor y Isenberg, 1989), han sido asociados con una disminución en el número de receptores nicotínicos, y el tratamiento con nicotina parece atenuar los síntomas relacionados con estas enfermedades. La incidencia de enfermedades neurodegenerativas disminuye en aquellos pacientes fumadores en los que el tabaco no ejerce sus conocidos efectos tóxicos. La administración de nicotina en pacientes con enfermedad de Alzheimer parece resultar en una mejora de los síntomas (Lee, 1994). En modelos animales de enfermedad de Parkinson, existe extensa evidencia de que la activación de receptores nicotínicos provee alivio sintomático y protección contra la disminución de la viabilidad celular. En modelos animales, la administración de nicotina parece tener repercusión en varias funciones del comportamiento, como actividad motora, vigilancia, memoria y capacidad cognitiva (Levin, 1992; Levin *et al*, 1993; Decker *et al*, 1995). La mayoría de estos efectos también han sido observados en humanos (Wesnes y Revell, 1984; Levin, 1992). El tratamiento con nicotina también se ha mostrado beneficioso para la mejora de los síntomas del síndrome de Tourette, caracterizado por movimiento corporal y comportamiento incontrolados, mediante la mejora de la actividad neuroléptica de las medicaciones usadas en su tratamiento (Lloyd *et al*, 1998). También parece existir una relación directa entre la mejora de síntomas depresivos y el consumo de nicotina, lo cual puede ser explicado por la liberación de dopamina (y de otros neurotransmisores con actividad antidepresiva) mediada por nicotina. Otras enfermedades neurológicas en las que el tratamiento con nicotina parece tener un efecto protector son esquizofrenia (Goff *et al*, 1992), enfermedad de Huntington (Emerich *et al*, 1991), apnea, demencia con cuerpos de Lewy (Perry *et al*, 1995), y desórdenes de atención/hiperactividad (Changeux *et al*, 1998).

Papel de los receptores nicotínicos en el SNC

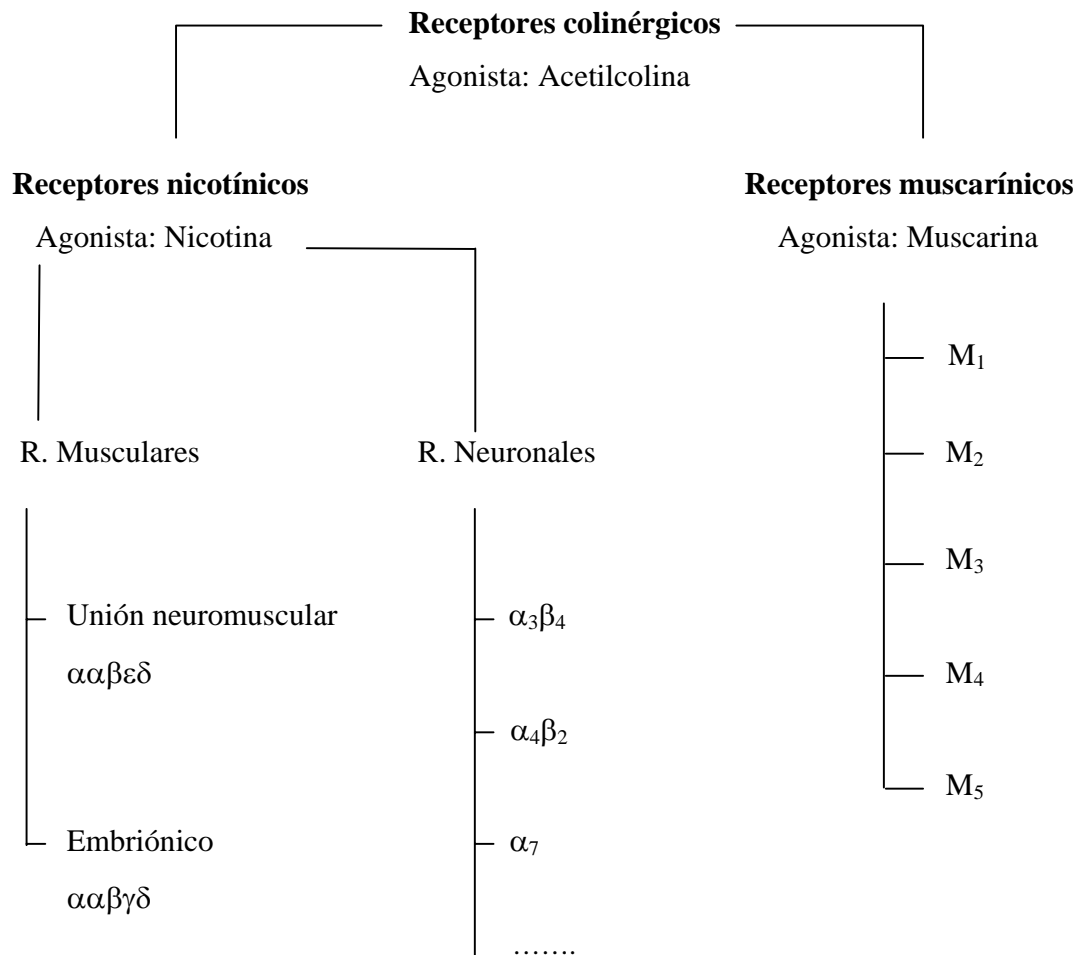
Aunque algunos estudios previos sugieren la posibilidad de una acción de la nicotina no mediada a través de su receptor (Abood *et al*, 1978; Meltzer y Rosecrans, 1989; Singh *et al*, 1998), se cree que la nicotina actúa principalmente a través de la unión a los receptores nACh (Gotti *et al*, 1997; Changeux *et al*, 1998). Estos receptores

activados por ligando forman una familia distribuida en el sistema nervioso, cardiovascular y neuromuscular, y en algunos tipos de células tales como queranocitos. Se ha demostrado que la activación de los receptores nicotínicos puede ejercer un efecto protector frente al glutamato (Akaike *et al*, 1994; Kaneko *et al*, 1997), péptido β -amiloideo (Kihara *et al*, 1998), ácido kaínico (Semba *et al*, 1996), ácido quinolínico (O'Neill *et al*, 1998) y contra los efectos tóxicos mediados por calcio (Kaneko *et al*, 1997). Estudios recientes también sugieren que el tratamiento con nicotina puede inducir neuroprotección por medio de la regulación de los niveles de factores neurotróficos en neuronas de hipocampo (French *et al*, 1999).

A nivel celular, la activación de los receptores nicotínicos puede resultar en la liberación de diversos neurotransmisores, como dopamina, norepinefrina y serotonina en cerebro, y sustancia P en la médula espinal (Wonnacott, 1997). A través de estos mecanismos, la activación de los receptores nicotínicos puede influenciar la transmisión metabotrópica.

Los receptores nicotínicos de acetilcolina pertenecen a la familia de receptores colinérgicos. Los receptores colinérgicos, que reconocen acetilcolina como su principal ligando, pueden dividirse en dos clases, nicotínicos y muscarínicos, dependiendo de su especificidad de unión a nicotina ó muscarina, respectivamente. Los receptores muscarínicos están acoplados a proteínas G, mientras que los receptores nicotínicos funcionan como canales iónicos mediados por ligando. En SNC, los receptores nicotínicos se han encontrado en distintas localizaciones tales como ganglia, junta neuromuscular, sistema límbico, hipocampo, tálamo y córtex, tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas.

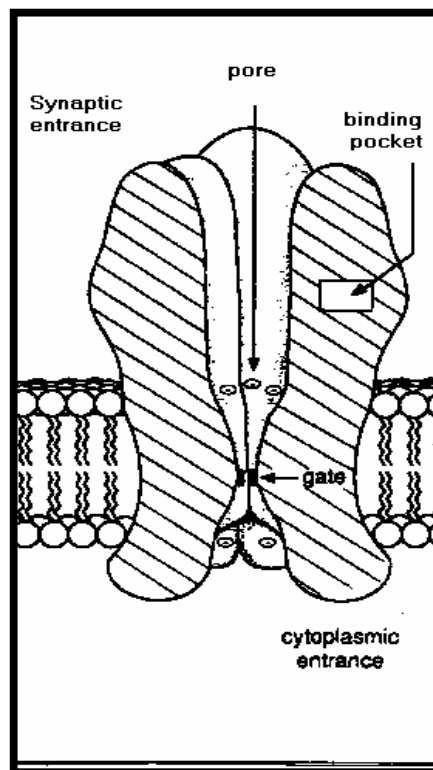
Figura 4. Clasificación de los receptores colinérgicos



El receptor nicotínico de acetilcolina fue uno de los primeros receptores cuya estructura pudo ser estudiada. A pesar de ello, la mayor parte de la información disponible proviene de la caracterización del receptor neuromuscular, mientras que el receptor neuronal ha sido menos estudiado. La estructura del receptor tiene un peso molecular aproximado de 280 kDa, y está formado por cinco subunidades situadas alrededor de un eje central, formando una cavidad, y con la mayor parte de su cadena polipeptídica fuera de la membrana, en el dominio extracelular. La cavidad central sirve como conducto selectivo de cationes, y tras la unión del ligando permite la entrada de sodio y calcio (Cooper *et al*, 1991).

Las distintas subunidades que pueden formar los receptores nicotínicos musculares se denominan α , β , γ , δ , y ϵ (Anand *et al*, 1991). En el receptor neuronal existen dos tipos de subunidades, denominadas α y β por homología con las subunidades α y β del receptor muscular, y de cada una de ellas se ha identificado la existencia de varios subtipos (Sargent, 1993). En concreto, se han caracterizado siete tipos de subunidades α (α_2 - α_9) y tres tipos de subunidades β (β_2 - β_4) (Goldman *et al*, 1987; Patrick *et al*, 1987). La estequiometría del receptor es generalmente $\alpha_2\beta_3$, aunque algunas subunidades pueden formar homopentámeros (α_7 , α_8) (Whiting *et al*, 1991), mientras que otros están compuestos de más de dos tipos distintos de subunidades. Aunque no todas las combinaciones de subunidades han sido descritas, la existencia de diferentes subtipos es responsable por la gran variedad de composición que puede ser observada entre distintos receptores. En SNC, la composición más común que se observa para los receptores nicotínicos es $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ y $(\alpha_7)_5$ (Jones *et al*, 1999). Se cree que las propiedades del receptor están relacionadas con el tipo de subunidades que lo componen así como con su localización celular, pero hasta la fecha no se ha podido establecer ninguna relación específica.

Figura 5. Representación de la estructura general del receptor nicotínico



La función principal de los receptores nicotínicos en SNC permanece objeto de discusión. Mientras que estos receptores son bien conocidos por mediar transmisión sináptica rápida en el músculo (Caratsch *et al*, 1992), su función en el sistema nervioso todavía no está clara. Es posible que la diversidad en la composición del receptor pueda facilitar su localización en regiones específicas de la célula, y además pueda determinar distinta funcionalidad. El hecho de que la distribución y la composición de los receptores varíe durante el desarrollo parece estar de acuerdo con esta hipótesis (O'Hara *et al*, 1999). Los receptores nicotínicos están localizados presináptica y postsinápticamente. En general, los receptores postsinápticos intervienen en la transmisión sináptica, mientras que los presinápticos regulan la liberación de otros neurotransmisores (McGhee *et al*, 1995; Guo *et al*, 1998).

Los receptores neuronales nicotínicos formados por la subunidad α_7 son uno de los tipos más abundantes en el SNC (Couturier *et al*, 1990; Schoepfer *et al*, 1990). Estos receptores están compuestos de cinco subunidades α_7 , y se caracterizan por su unión competitiva al ligando α -bungarotoxina. Aunque han sido localizados postsinápticamente (Frazier *et al*, 1998; Sorenson *et al*, 1998), donde parecen generar corrientes despolarizantes, también se les ha propuesto una función presináptica, en la que estarían implicados en la plasticidad neuronal, debido a su elevada permeabilidad por calcio (Bertrand *et al*, 1993; Seguela *et al*, 1993; Hugo *et al*, 1998). La regulación de los niveles de calcio en células neuronales adultas ó en desarrollo tiene gran influencia en numerosos procesos fisiológicos. Los receptores α_7 han sido relacionados con la regulación de la liberación de neurotransmisores en hipocampo y córtex cerebral (Gray *et al*, 1996; Guo *et al*, 1998). En cultivo, también parecen influenciar el crecimiento neuronal (Pugh y Berg, 1994), y activar sistemas de segundos mensajeros (Vijayaraghavan *et al*, 1995). Disminuciones en el número de subunidades α_7 y en el contenido en su mRNA han sido observadas en tejido cerebral de pacientes con esquizofrenia (Fredman *et al*, 1997), y parece que la elevada incidencia de tabaquismo en estos pacientes está de acuerdo con la hipótesis de que la nicotina puede ayudar a atenuar los síntomas esquizofrénicos, a través de su influencia en procesos de facilitación sensorial auditiva (Leonard *et al*, 2000).

El receptor $\alpha_4\beta_2$ es el otro tipo de receptor neuronal nicotínico más abundante. Receptores formados por subunidades α_4 y β_2 son responsables por la mayor parte de los sitios de alta afinidad por nicotina en el cerebro (Whiting *et al*, 1991). Este tipo de receptor parece implicado en la sobre-regulación de receptores nicotínicos que se produce en cerebro tras estar expuesto a nicotina (Marks *et al*, 1983; Rowell y Li, 1997; Whiteaker *et al*, 1998). Disminución en el contenido de estos receptores ha sido observada en procesos de envejecimiento celular, isquemia, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Perry *et al*, 1995). La actividad postsináptica de estos receptores ha sido descrita previamente en substantia nigra (Sorenson *et al.*, 1998). La liberación de neurotransmisores mediada por nicotina (actividad presináptica) ha sido descrita para los receptores $\alpha_4\beta_2$ así como para los receptores α_7 .

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS CONCRETOS

Estudios previos apoyan el concepto de daño secundario en médula espinal, definido como la cascada de mecanismos celulares y bioquímicos que se ven activados tras la lesión inicial. Este proyecto propone que la liberación de AA es uno de los factores críticos que contribuye a la ampliación del insulto inicial. Por tanto, el estudio de los mecanismos implicados en la aparición de los efectos neurotóxicos observados tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal, es uno de los objetivos principales de este proyecto de investigación. En particular, la hipótesis de este estudio propone que la disminución en viabilidad celular y función mitocondrial, la regulación del enzima NOS neuronal, y la aparición del fenómeno de apoptosis se encuentran entre los mecanismos a través de los cuales el AA ejerce su efecto en neuronas de médula espinal.

Debido al potencial efecto protector mostrado tras el tratamiento con nicotina y/o la activación de receptores nicotínicos en distintos modelos de neurotrauma y neurotoxicidad, este proyecto propone que la activación de los receptores nicotínicos puede tener un efecto protector en este modelo de trauma en médula espinal en el que cultivos primarios de neuronas de médula espinal son tratados con AA. La investigación de los mecanismos detallados relacionados con el posible efecto protector de la nicotina frente a la acción del AA es también objeto de este proyecto.

Para el estudio de la hipótesis anteriormente mencionada, se propusieron tres objetivos concretos:

- Determinar si la estimulación de receptores neuronales nicotínicos puede mejorar la viabilidad celular tras el tratamiento con AA.
- Determinar si la regulación del enzima NOS está relacionada con los efectos tóxicos del AA, y determinar si la activación de receptores nicotínicos puede contrarrestar esta regulación.
- Establecer los mecanismos que llevan a la aparición de apoptosis tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal, e investigar el potencial efecto anti-apoptótico del tratamiento con nicotina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos primarios de neuronas de médula espinal

Los cultivos neuronales de médula espinal fueron establecidos siguiendo el método de Ransom (1977). Brevemente, las médulas espinales fueron obtenidas de embriones de ratón de 13 días de gestación, para lo cual fueron trituradas y tratadas con una solución de papaína 0.67 mg/ml en tampón D1SGH (NaCl 135 mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM, KH₂PO₄ 0.2 mM, glucosa 16.5 mM, sucrosa 22 mM, HEPES 9.86 mM) durante 30 minutos a 37 °C. Tras esto, el tejido se sometió a disgregación mecánica en una solución de DNasa en medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium) suplementado en un 10% con suero equino y en un 10% con suero bovino fetal. El homogenizado celular así obtenido se depositó en placas de cultivo de modo que la concentración celular final fuese de 1.5x10⁶ células/ml. Siete horas después, el medio de cultivo se reemplazó con medio Neurobasal (Gibco) al que se añadió suplemento N₂ (Gibco) gentamicina 100 µg/ml, glutamina 2mM y fungizona 50 µg/ml (Gibco). Tres días más tarde, los cultivos celulares fueron tratados con una mezcla de fluorodeoxiuridina 5.4x10⁻⁵ M y uridina 1.4x10⁻⁵ M. Este tratamiento, junto con la eliminación del suero del medio de cultivo, es capaz de inhibir la proliferación de células no neuronales. Bajo estas condiciones, el porcentaje de células neuronales se sitúa entre el 85-95%. Dos veces por semana, una tercera parte del medio de cultivo se reemplazó con medio Neurobasal fresco, suplementado como se ha descrito anteriormente. Los cultivos celulares de neuronas de médula espinal se mantuvieron durante 21 días a 37 °C y en 10% CO₂. Tras ésto, los cultivos celulares fueron considerados maduros y aptos para su uso experimental.

Preparación de los tratamientos experimentales

- *Tratamiento con AA*

AA de elevada pureza (>99%) fue obtenido a través de Nu-Chek-Prep (Elysian, MN). Soluciones concentradas de este ácido graso fueron preparadas en etanol, siendo

diluidas antes de su uso en medio de cultivo, para conseguir una concentración final de 10 μ M. La concentración de etanol no excedió de 0.1% en los cultivos, y no mostró tener ningún efecto en los cultivos neuronales.

- Tratamiento con nicotina y antagonistas de receptores nicotínicos

Nicotina, mecamilamina (un agente inespecífico de bloqueo del receptor nicotínico), y α -bungarotoxina (un antagonista selectivo de los receptores nicotínicos de tipo α_7) fueron obtenidos a través de RBI (Natick, MA). Una vez establecida experimentalmente, la concentración de nicotina usada fue de 10 μ M, añadida a los cultivos 2 horas previas al tratamiento con AA. Mecamilamina y α -bungarotoxina fueron añadidas a los cultivos neuronales a concentraciones de 10 μ M y 1nM, respectivamente, y fueron utilizadas 30 minutos antes del tratamiento con nicotina.

- Tratamiento con inhibidores específicos del enzima NOS

Para el establecimiento de la(s) isoforma(s) implicada(s) en los efectos observados, se utilizaron inhibidores específicos de la isoformas neuronal e inducible de NOS. 2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina (AMT) 200 nM, y 7-nitroindazol (7-NI) 10 μ M fueron añadidos a los cultivos 30 minutos antes del tratamiento con AA. Mientras que AMT es un inhibidor específico de la isoforma inducible, 7-NI es un inhibidor específico de la isoforma neuronal de NOS.

Determinación de la función mitocondrial/ ensayo MTT

La determinación de la función mitocondrial de las neuronas de médula espinal fue llevada a cabo usando el ensayo de conversión de reactivo MTT. Este método se basa en la capacidad de conversión del reactivo MTT (de color amarillo) en cristales de formazán (púrpura) por medio de la acción del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Brevemente, una solución acuosa de MTT fue añadida a los cultivos neuronales para conseguir una concentración final de 0.25 mg/ml. Tras 2 horas de incubación necesaria para permitir la conversión del reactivo inicial, el medio de cultivo fue eliminado, y las células fueron lisadas con DMSO para promover la disolución de los cristales de formazán. La absorbancia a 595 nm fue determinada, y los resultados obtenidos fueron expresados como % control.

Determinación de la actividad de LDH

La medida de la actividad de LDH puede proveer información adicional en relación con la viabilidad de los cultivos celulares. Este enzima, localizado en el citoplasma de células viables, es liberado al medio de cultivo por células que han perdido su integridad de membrana. La determinación de la actividad de LDH en el medio de cultivo fue llevada a cabo mediante la medida del descenso en la absorbancia a 340 nm, debido a la conversión enzimática del cofactor NADH en NAD^+ (1 unidad enzimática = 0.001 Δ absorbancia/minuto). Alícuotas de 100 μl de medio fueron diluidas en tampón piruvato (0.25 mg piruvato sódico en tampón fosfato salino, 0.1 M, pH=7.4). Una solución de NADH (0.25 mg en tampón fosfato) fue añadida a las muestras, y la absorbancia fue determinada inmediatamente tras la adición de NADH, y 45 s después de la lectura inicial. Como control, cultivos celulares no sometidos a ningún tratamiento fueron lisados mediante varios ciclos de congelación /descongelación consecutivos, y la actividad de LDH total obtenida se utilizó como correspondiente al 100% de la actividad enzimática presente en dichos cultivos.

Determinación de los niveles de ATP

Los niveles de ATP presentes en neuronas de médula espinal fueron determinados mediante la utilización del kit ATP Bioluminescence Assay HS II (Boehringer Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Este método está basado en la cuantificación de la luminiscencia producida en la conversión de luciferasa en luciferina, en presencia de ATP. Brevemente, las neuronas de médula espinal fueron lisadas, y los extractos celulares sonicados y centrifugados para eliminar restos celulares. Las muestras así obtenidas fueron diluidas a la concentración óptima, y los niveles de ATP fueron determinados usando un luminómetro con inyector automático. Para la cuantificación de los niveles de ATP, se generó una recta de calibrado a partir de muestras de ATP de concentración conocida.

Determinación de la expresión del enzima NOS

El método de RT-PCR fue usado para la determinación de la expresión de NOS neuronal en neuronas de médula espinal. Para la lisis de las células, se utilizó el reactivo RNA-STAT-60 (Tel-TEST, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento del RNA celular, se llevó a cabo una extracción con cloroformo, seguida de una precipitación con isopropanol. La concentración de RNA obtenido fue determinada mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. Para la conversión de RNA en cDNA, se utilizó el enzima Superscript II RT (Gibco, NY). Para la amplificación específica del gen correspondiente a NOS neuronal, se utilizaron los siguientes primers, obtenidos mediante el uso del programa Oligo 5.0 (National Biosciences, MN): 5'-CTT GGC ATA GGC TTG GGA TTT G-3' y 5'-GAT TGG CGT TCG TGA TTA CTG T-3'. El uso de estas secuencias, junto con la utilización del enzima Taq DNA polimerasa (Gibco, NY), resulta en la obtención de un producto de 516 bp. La temperatura de amplificación se fijó en 58 °C, y, para las condiciones descritas, se comprobó que la amplificación del gen de NOS neuronal aumenta linealmente entre 23-31 ciclos de amplificación, por lo que se decidió fijar el número de ciclos a utilizar en 27, lo que permite determinación cuantitativa de la expresión de dicho gen. Como control interno de la reacción se llevaron a cabo amplificaciones del gen constitutivo cyclophilin utilizando las mismas muestras. Los productos de la reacción PCR fueron resueltos en un gel 1% de agarosa en tampón TBE(Tris-HCl 20 mM, ácido bórico 20 mM, EDTA 2mM), teñido con la sonda fluorescente Syber Green (Molecular Probes, OR), y visualizados mediante el uso del escáner FLA-2000 (Fuji). La intensidad de fluorescencia relativa (en comparación con la del gen control cyclophilin) fue cuantificada usando el programa Image Gauge 3.0 (Fuji). Medidas correspondientes a distintos experimentos fueron sometidas a análisis para determinar su peso estadístico.

Western blot

Experimentos de western blot fueron llevados a cabo para determinar los niveles de proteína NOS neuronal, citocromo c citoplasmático, y proteína Bcl-2 presentes en los

cultivos neuronales. Para ello, se prepararon extractos de neuronas de médula espinal del siguiente modo:

NOS: Tras el tratamiento correspondiente, se lisaron las células usando una solución de vanadato sódico (1 mM), Tris (10 mM, pH=7.4) y SDS (1%), y el lisado correspondiente se llevó a ebullición durante 5 minutos, seguida de centrifugación a 1100 rpm para eliminar restos celulares. Los niveles de proteína presentes en el sobrenadante fueron determinados siguiendo el método de Lees y Pasman.

Citocromo c y Bcl-2: Para la lisis de las células se utilizó una solución de composición 10 mM HEPES pH=7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatina A, y 10 µg/ml leupeptina, y el lisado obtenido fue sonificado brevemente. Para la determinación de la liberación de citocromo c al citoplasma, se aisló la fracción citoplasmática del extracto mediante centrifugaciones consecutivas a 800x g y a 1200x g durante 15 minutos a 4 °C, recogiendo dicha fracción en el sobrenadante obtenido en la última centrifugación. Alícuotas de la fracción citoplasmática (citocromo c) ó de extracto celular completo (Bcl-2) fueron utilizadas para la determinación de los niveles de proteína.

Concentraciones equivalentes de proteína (10 µg) se sometieron a electroforesis PAGE-SDS en gel de poliacrilamida del 7.5% (NOS) ó 15% (citocromo c y Bcl-2). Las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando una solución de Tris (25 mM, pH=8.3), glicina (150 mM), SDS (3.5 mM), y metanol (20% v/v) durante 3 horas a 4 °C. Para eliminar la unión inespecífica del anticuerpo correspondiente, se incubó la membrana con una solución de lactosa al 5% en tampón TTBS (Tris base 20 mM, NaCl 0.5 M, Tween-20 0.5%), seguida de una incubación con el anticuerpo monoclonal anti-NOS (Transduction Laboratories, dilución 1:500), anti-citocromo c (Pharmingen, dilución 1:800), ó anti-Bcl-2 (Santa Cruz, dilución 1:500) en tampón TTBS +5% lactosa. Tras un prolongado lavado de la membrana con tampón TTBS, se incubó ésta con una dilución 1:1250 del correspondiente anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa de nabo (Santa Cruz). Como método de detección se utilizó el reactivo ECL (Amersham, UK), que emite luminiscencia tras la oxidación de luminol por la acción de la peroxidasa.

Determinación de la Actividad Enzimática de NOS

La determinación de la actividad enzimática de NOS se llevó a cabo mediante la medida de la conversión de [³H]arginina en [³H]citrulina, siguiendo el método de Kiedrowski. Tras el tratamiento correspondiente, los cultivos neuronales de médula espinal fueron incubados con una solución de [³H]arginina 5 µCi/ml (Amersham, OH) durante 20 minutos, tras lo cual las células se lavaron con tampón fosfato, seguido de lisis con HClO₄ 0.3 M. El lisado celular así obtenido se neutralizó con Na₂CO₃ 1M, y se sometió a centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos. 400 µl del sobrenadante obtenido se eluyeron a través de una columna Dowex AG 50W-X8 (Na⁺). La [³H]citrulina formada se eluyó aplicando 1 ml de agua en la columna. La determinación de la reactividad de 50 µl del eluido, así como de 50 µl del sobrenadante (reactividad total de [³H]arginina y [³H]citrulina) se utilizó para expresar el resultado como porcentaje de conversión de [³H]arginina en [³H]citrulina.

Determinación de los Niveles de Nitrito (NO)

Los niveles de NO presentes en los cultivos celulares fueron determinados usando un kit fabricado por Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se recogieron alícuotas del medio de cultivo, que fueron tratadas con el enzima nitrato reductasa, para conseguir la conversión de nitrato (producto de la degradación de NO) en nitrito. La adición del reactivo de Greiss (1 parte de sulfanilamida al 60% en ácido acético, 1 parte de cloruro de naftilendiamina al 0.1% en agua) forma un producto cuyas propiedades colorimétricas permiten su medida a 540 nm. Para cuantificar la concentración de nitrito se generó una recta de calibrado creada a partir de una solución de nitrato de concentración conocida, convertido enzimáticamente en nitrito.

Determinación de los niveles de cGMP

Los niveles de cGMP fueron determinados utilizando un ensayo de ELISA disponible comercialmente a través de Amersham (NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método permite la detección de niveles de cGMP en el rango de 2-512

fmol/pocillo, y está basado en la competición entre el cGMP presente en la muestra y el cGMP marcado con peroxidasa, utilizado como reactivo, por la unión al sustrato en el pocillo, recubierto de anticuerpos específicos para cGMP. Brevemente, se obtuvieron lisados celulares a los que se sometió a acetilación, tras lo cual se incubaron con anti-cGMP durante 2 horas a 4 °C, y con cGMP-peroxidasa durante 60 minutos a 4 °C, consecutivamente. Como sustrato colorimétrico de la peroxidasa se utilizó 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Para la cuantificación de los resultados se generó la correspondiente recta de calibrado.

Determinación de la Actividad de Caspasas

Tras el tratamiento correspondiente, las neuronas de médula espinal fueron lisadas con un tampón isotónico (HEPES 25 mM pH=7.5, MgCl 25mM, EDTA 5mM, DTT 5mM, PMSF 2 mM, 10 µg/ml pepstatina A, 10 µg/ml leupeptina). Los lisados celulares obtenidos fueron incubados a 37 °C con uno de los siguientes sustratos enzimáticos selectivos para determinadas caspasas:

- acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído-7-amino-4-metilcoumarin (DEVD-AMC; Promega, Madison, WI), concentración final 25 µM, incubación durante 2 horas, y detección de fluorescencia a 360 nm (excitación) y 460 nm (emisión) para la determinación de la actividad de caspasa-3;
- acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometilcoumarin (Ac-IETD-AFC, Pharmingen, San Diego CA), concentración final 25 µM, incubación durante 1 hora, y detección de fluorescencia a 400 nm (excitación) y 490 nm (emisión) para la determinación de la actividad de caspasa-8;
- N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC (Ac-LEHD-AFC; Calbiochem, La Jolla, CA), concentración final 25 µM, incubación durante 1 hora, y detección de fluorescencia a 400 nm (excitación) y 490 nm (emisión) para la determinación de la actividad de caspasa-9.

Estos sustratos contienen secuencias específicas de aminoácidos que son sustrato de la hidrólisis enzimática llevada a cabo por distintas caspasas. Los productos de la hidrólisis de estos sustratos son fluorescentes, y por tanto se puede relacionar la intensidad de fluorescencia con la actividad enzimática. Como control negativo se

utilizaron inhibidores específicos de caspasas (DEVD-CHO para caspasa-3 (Nicholson 95), Ac-IETD-CHO para caspasa-8 (Patel 96), y LEED-CHO para caspasa-9 (Thornberry 98)), que se añadieron a los extractos celulares 30 minutos antes de la incubación con el sustrato correspondiente (resultados no incluidos). Las medidas fueron llevadas a cabo utilizando un fluorímetro.

Para la determinación de la actividad de caspasa-3 en células individuales se utilizó un método que emplea DEVD-CHO, un pseudosustrato e inhibidor de dicha enzima. Los cultivos neuronales de médula espinal se permeabilizaron con digitonina 0.005% durante 15 minutos, tras lo cual se incubaron con una solución 10 µg/ml del inhibidor conjugado a biotina DEVD-CHO-biotina (Calbiochem, CA) durante 20 minutos. Tras un lavado extensivo para eliminar restos del sustrato no unidos al enzima, las células se fijaron con 4% paraformaldehído, y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% durante 5 minutos. Por último, se incubaron los cultivos con una disolución de Oregon Green-streptavidina (Molecular Probes) de concentración 5µg/ml, durante 30 minutos. La fluorescencia correspondiente a los conjugados caspasa-3-DEVD-biotina-streptavidina se determinó usando un microscopio confocal a 488 nm excitación y 510 nm emisión.

Determinación de la presencia de apoptosis

Para la determinación de la presencia de apoptosis en neuronas de médula espinal se llevaron a cabo experimentos de marcaje del DNA con la sonda fluorescente Hoescht 33342 (Molecular Probes, OR), así como experimentos para el estudio de la fragmentación del DNA. La utilización de la sonda Hoescht 33342 permite la visualización del DNA condensado, característico de células apoptóticas. Para ello, las neuronas de médula espinal se cultivaron en placas con fondo de cristal (Mat-Tek, MA), y tras el correspondiente tratamiento se fijaron a las placas con metanol durante 30 minutos. Los cultivos fueron tratados con una solución de Hoescht 33342 de concentración final 1 µg/ml en tampón fosfato durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los cultivos se lavaron extensamente con tampón fosfato para eliminar restos de la sonda fluorescente, y las células fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (340 nm excitación, 510 nm filtro) y un objetivo de inmersión 40X.

Para la determinación de la fragmentación del DNA se llevó a cabo la electroforesis del DNA de las neuronas de médula espinal. Para su aislamiento, las células fueron tratadas con una solución de lisis de composición NP-40 1%, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM pH=7.5 durante 5 minutos. Los extractos celulares así obtenidos fueron tratados con ribonucleasa A (concentración final 5µg/ml) durante 2 horas a 56 C, seguido del tratamiento con proteinasa K (concentración final 2.5 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C. El aislamiento del DNA se consiguió mediante precipitación con persulfato de amonio/etanol. Cantidades equivalentes de DNA correspondientes a los distintos tratamientos se resolvieron en un gel de agarosa al 2%. Tras la electroforesis, la detección del DNA se llevó a cabo mediante el uso del reactivo SYBR Green (Molecular Probes), visualizando el gel con la ayuda del escáner FLA-2000 (Fuji).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo usando el programa SYSTAT 8.0 (SPSS, Chicago). El análisis de la varianza (ANOVA, una variable ó dos variables) fue usado para comparar los valores medios de los resultados obtenidos en distintos tratamientos. La consideración de dos variables se utilizó en el análisis estadístico de aquellos experimentos en los que se estudiaron dos variables distintas, como por ejemplo en la variación de determinado parámetro con el tiempo y/ ó con distintos tratamientos. En aquellos casos en los que el valor F obtenido fue significativo, el análisis ANOVA fue seguido de un test de Bonferroni para comparar valores medios correspondientes a distintos tratamientos. Una probabilidad estadística $p < 0.05$ se consideró como significativa.

CAPÍTULO I

La activación de los receptores nicotínicos disminuye los efectos neurotóxicos del AA en las neuronas de médula espinal

La liberación de AA de las membranas celulares tras el trauma en la médula espinal es uno de los mecanismos que pueden conducir a la expansión del daño inicial. El aumento de los niveles de este ácido graso se ha comprobado que ocurre rápidamente tras el trauma, iniciándose en la materia gris y expandiéndose posteriormente a la materia blanca, y, aunque los niveles normales de ácido graso libre son muy bajos, concentraciones de hasta 0.5 mg/kg en tejido cerebral han sido descritas. En células de la médula espinal, el tratamiento con AA conduce a la aparición de procesos de estrés oxidativo, activación del factor transcripcional NF-kB, y estimulación de los sistemas celulares de respuesta al ataque oxidativo (Toborek *et al.*, 1999). Asimismo, el tratamiento con AA presenta efectos tóxicos en otros tipos celulares.

Los mecanismos a través de los cuales el AA ejerce esta acción neurotóxica no se conocen en detalle. Es posible que el tratamiento con AA produzca la formación de alguno de sus metabolitos (eicosanoides), y que éstos sean responsables de su acción. En apoyo de esta posibilidad, se han encontrado niveles elevados de prostaglandinas en lesiones de la médula espinal. Por otro lado, existen estudios que desvinculan la toxicidad del AA de la producción de eicosanoides, sugiriendo que los efectos observados son causados directamente por el ácido graso ó por subproductos de su peroxidación lipídica no enzimática, mediante interacciones con canales iónicos y otras proteínas de membrana, y a través de la formación de radicales libres que pueden interaccionar con distintos componentes celulares, alterando la producción energética celular, y produciendo la activación de enzimas hidrolíticas.

Por otro lado, diversos estudios recientes sugieren que la activación de receptores nicotínicos puede estar relacionada con fenómenos de neuroprotección en distintos sistemas. Investigaciones previas sugieren que el tratamiento con nicotina puede atenuar

los síntomas de algunas enfermedades degenerativas asociadas con la disminución del número ó de la actividad de receptores nicotínicos, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson ó el síndrome de Tourette. A nivel celular, la activación de receptores nicotínicos parece proteger a los cultivos de neuronas corticales frente a la acción del glutamato, calcio intracelular, y péptido β -amiloideo. Asimismo, la activación de receptores nicotínicos en neuronas motoras parece promover su supervivencia (Messi *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que los receptores nicotínicos están presentes en todos los diferentes tipos de neuronas existentes en la médula espinal (Gillberg *et al.*, 1990). Estos receptores juegan un papel importante en diversas funciones de la médula espinal, tales como la regulación de reflejos autonómicos y respuestas al dolor. Existen diversos tipos de receptores nicotínicos en el sistema nervioso formados por combinación de distintas subunidades, de entre ellos, los subtipos $(\alpha_4)_2(\beta_4)_3$ y $(\alpha_7)_5$ son los más abundantes. El receptor $(\alpha_7)_5$ presenta ciertas características que lo diferencian del resto de los receptores nicotínicos neuronales, entre ellas, la más importante es su elevada afinidad por calcio. Esta propiedad hace que el receptor $(\alpha_7)_5$ sea considerado como posible candidato a la regulación de múltiples procesos fisiológicos celulares relacionados con la proliferación ó muerte celular.

Debido a la existencia de investigaciones previas sugiriendo una acción neuroprotectora del tratamiento con nicotina, el propósito de este estudio fue el comprobar si este efecto tiene lugar en cultivos neuronales de médula espinal tratados con AA. Experimentos adicionales fueron llevados a cabo para determinar si dicho efecto se producía en la presencia de antagonistas de determinados receptores nicotínicos.

RESULTADOS

Estudios previos indican que el tratamiento con AA a concentraciones de 10 μM puede inducir diversos efectos neurotóxicos en neuronas de médula espinal (Toborek *et al.*, 1999). Asimismo, niveles similares de dicho ácido graso pueden relacionarse con los niveles encontrados en el sistema nervioso en situaciones patológicas (Dhillon *et al.*, 1994).

Por otro lado, investigaciones previas parecen sugerir la necesidad de pretratamiento para poder observar un efecto protector relacionado con la activación de receptores nicotínicos. En este estudio, se llevaron a cabo distintos experimentos para determinar las condiciones idóneas en las cuales la activación de receptores nicotínicos puede ejercer un efecto máximo frente a la acción del AA. Dichos experimentos indicaron que la adición de nicotina 10 μM , 2 horas antes de la adición de AA a los cultivos neuronales, parece ejercer el máximo efecto. En esta sección se incluyen dichos experimentos, a la vista de cuyos resultados se fijaron las condiciones experimentales anteriormente mencionadas, que fueron utilizadas en el resto de los estudios realizados.

La activación de los receptores nicotínicos protege a las neuronas de médula espinal frente a la acción del AA en la función mitocondrial y la liberación del enzima LDH

La Fig. 1 muestra los efectos de diferentes concentraciones de nicotina en las alteraciones producidas en la función mitocondrial tras el tratamiento con AA en las neuronas de médula espinal. La función mitocondrial se determinó mediante el ensayo de conversión del reactivo MTT. Como se observa en la Fig. 1A, el tratamiento con AA 10 μM durante 48 horas disminuye la conversión del reactivo MTT de modo significativo. Por otro lado, el pretratamiento con dosis de nicotina 10 μM ó 20 μM es capaz de atenuar el efecto del AA. Concentraciones inferiores de nicotina no pudieron modificar la acción del AA. Debido al efecto ejercido por la nicotina a concentraciones de 10 μM , dicho tratamiento fue utilizado en experimentos posteriores.

Para la caracterización del tipo de receptores nicotínicos implicados en el efecto de la administración de nicotina, se trataron los cultivos neuronales con diferentes dosis de los antagonistas de receptores nicotínicos α -bungarotoxina y mecamilamina 30 minutos antes de la adición de nicotina (Fig. 1B y 1C). Como se puede observar, la adición de α -bungarotoxina sólo modifica parcialmente la acción de la nicotina sobre la función mitocondrial, incluso en concentraciones elevadas. Por otro lado, la adición de mecamilamina, un inhibidor inespecífico de los receptores nicotínicos, es capaz de bloquear completamente la acción de la nicotina en el mismo ensayo.

Los efectos del pretratamiento con nicotina 10 μ M sobre la liberación de LDH inducida por el AA se muestran en la Fig. 2. El tratamiento con AA durante 48 h aumentó la liberación de LDH al medio de cultivo. Sin embargo, cuando se utilizó un pretratamiento de 2 horas con nicotina 10 μ M, los niveles de LDH tras el tratamiento con AA son comparables a los de los cultivos celulares control. Como se puede observar, el tratamiento con antagonistas de los receptores nicotínicos parece no afectar significativamente el efecto de la nicotina.

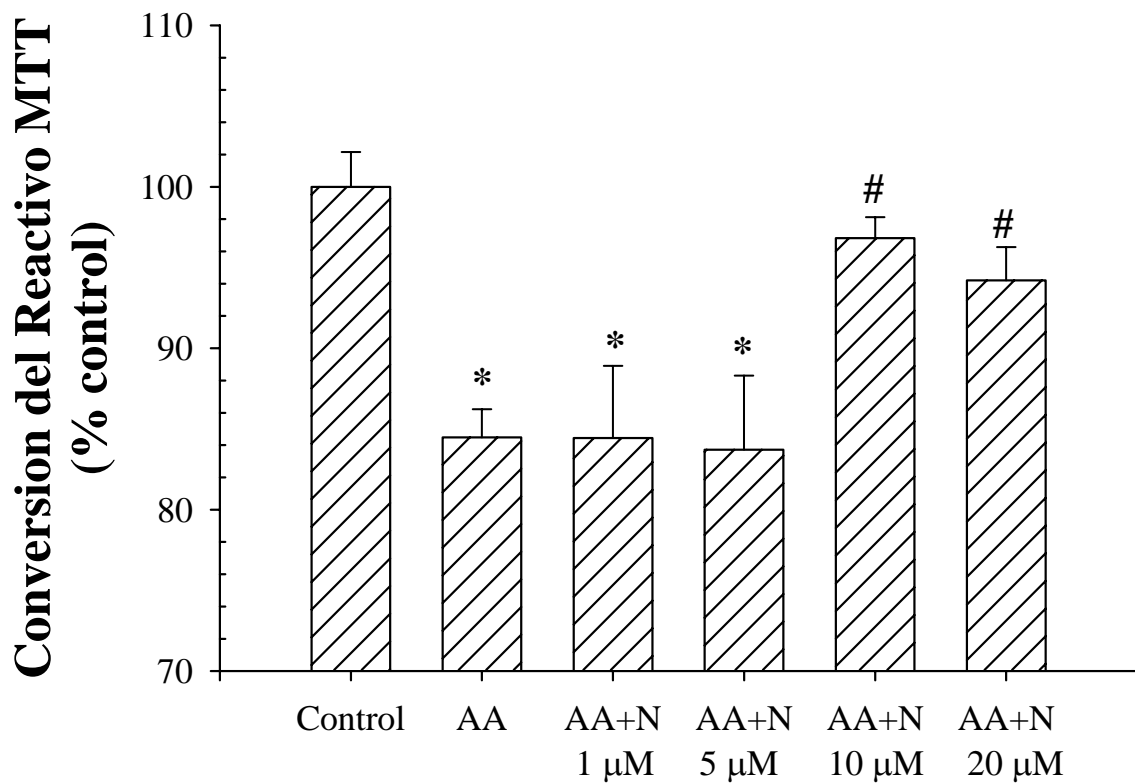


Figura 1(A). Efecto de dosis crecientes de nicotina sobre el descenso en la función mitocondrial observados tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal. La función mitocondrial se determinó mediante el ensayo MTT. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina durante 2 horas, previas a la adición de AA (10 μ M) durante 48 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

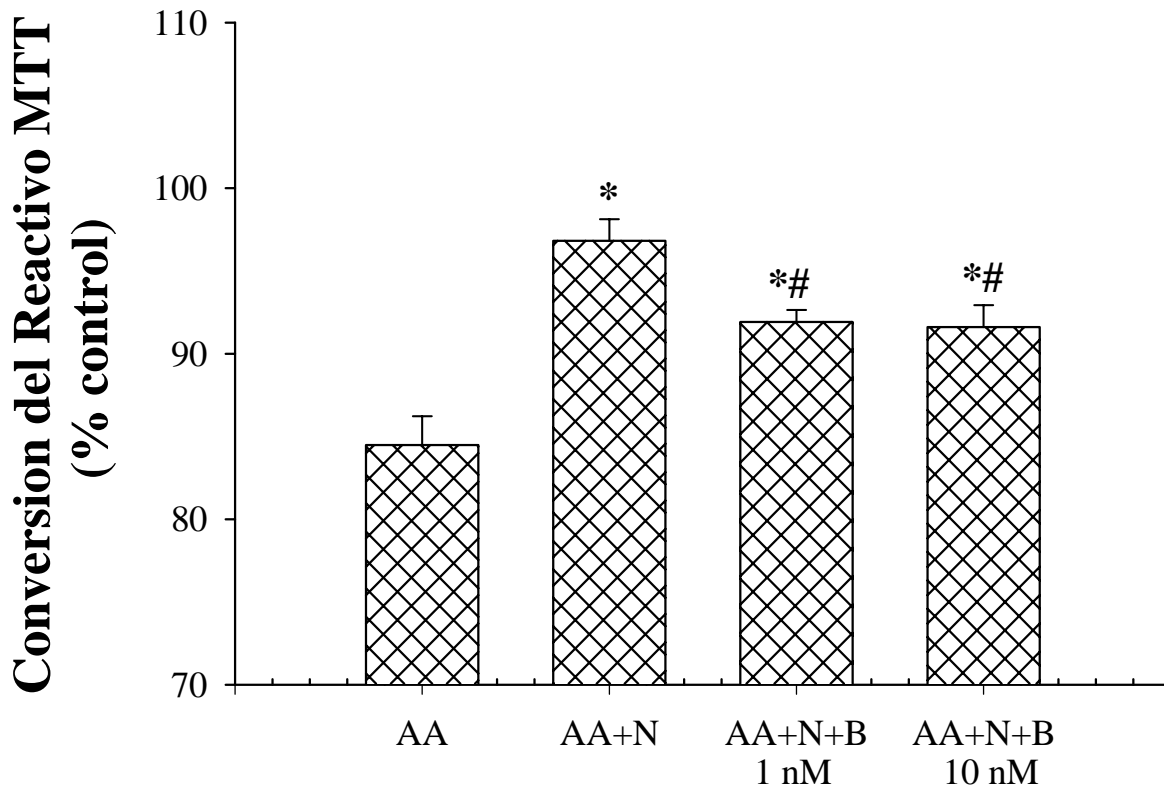


Figura 1(B). Efecto de dosis crecientes de α -bungarotoxina en la recuperación de la función mitocondrial mediada por nicotina tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal. La función mitocondrial se determinó mediante el ensayo MTT. Los cultivos neuronales se trataron con α -bungarotoxina 30 minutos antes de la adición de nicotina durante 2 horas, previas al tratamiento con AA (10 μ M) durante 48 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

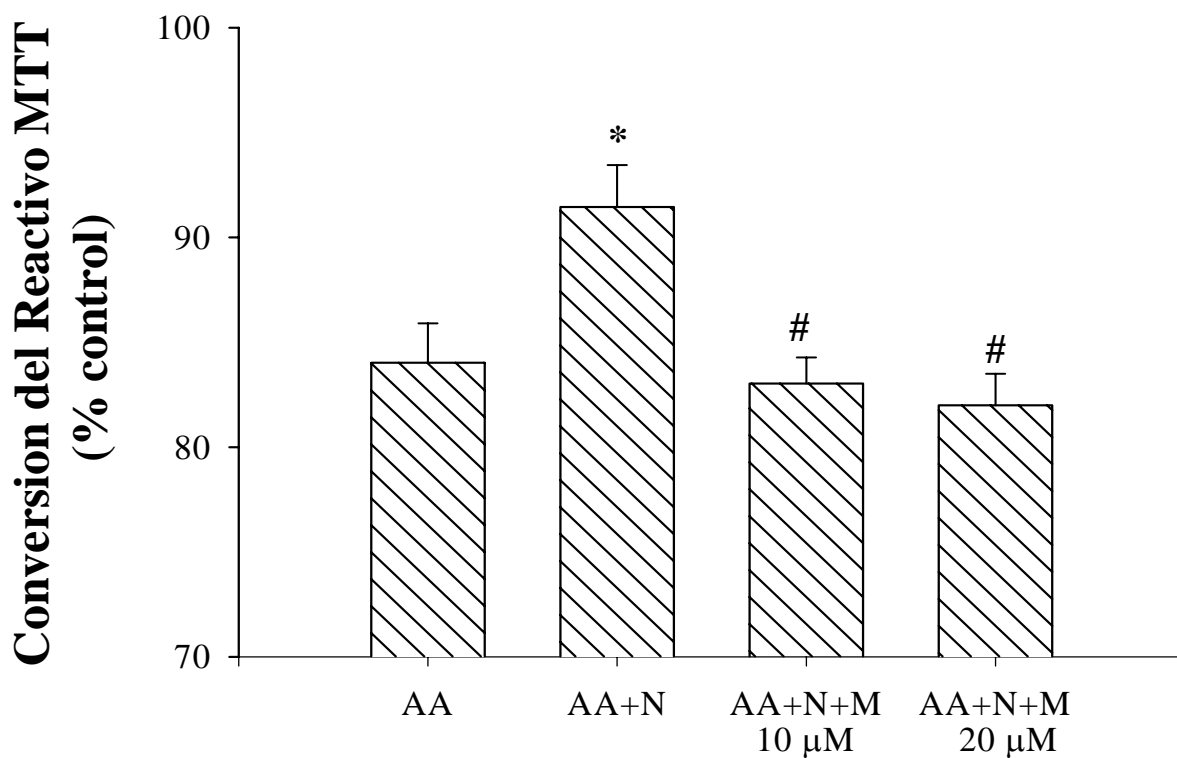


Figura 1(C). Efecto de dosis crecientes de mecamilamina en la recuperación de la función mitocondrial mediada por nicotina tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal. La función mitocondrial se determinó mediante el ensayo MTT. Los cultivos neuronales se trataron con mecamilamina 30 minutos antes de la adición de nicotina durante 2 horas, previas al tratamiento con AA (10 μ M) durante 48 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

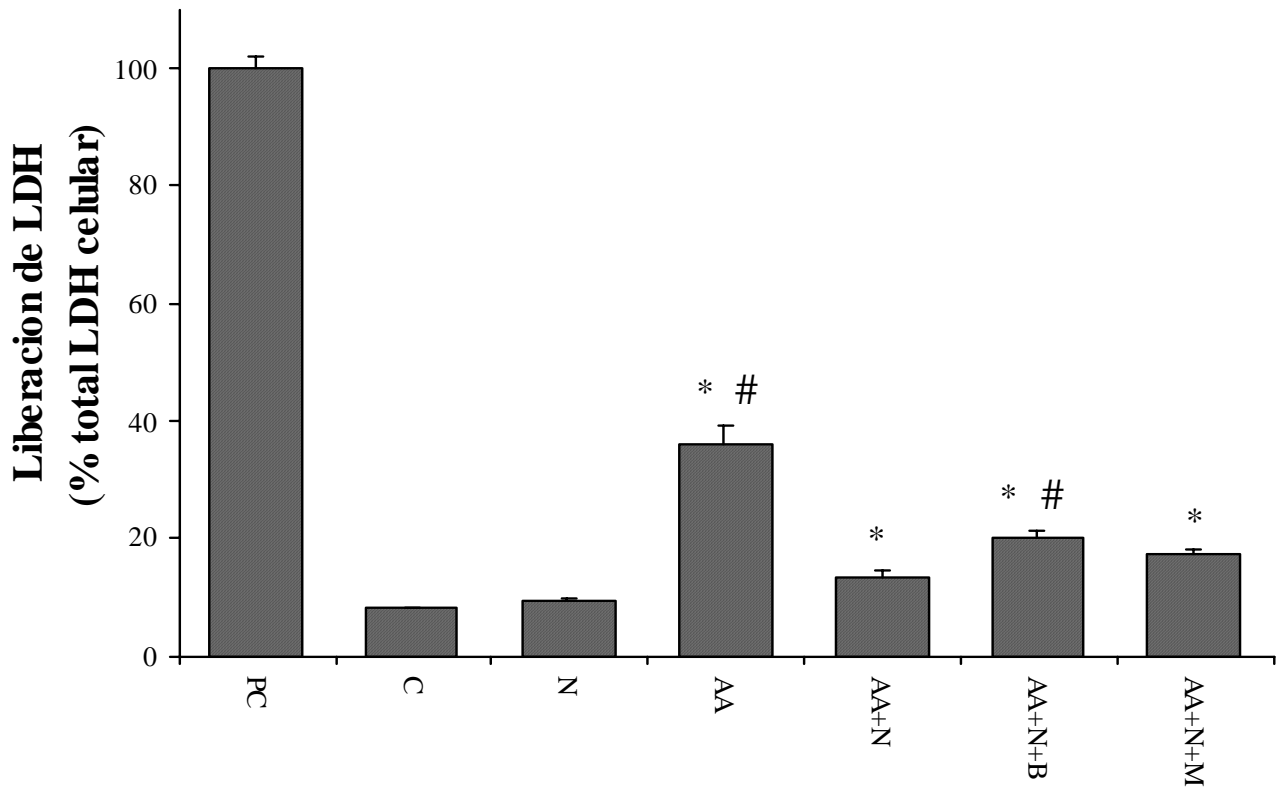


Figura 2. Efecto del tratamiento con nicotina y antagonistas del receptor nicotínico en la liberación de LDH de neuronas de médula espinal expuestas a AA 10 μ M durante 48 horas. Los cultivos neuronales se trataron con α -bungarotoxina (1 nM) ó mecamilamina (10 μ M), 30 minutos antes de la adición de nicotina durante 2 horas, previas al tratamiento con AA (10 μ M) durante 48 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

La activación de los receptores nicotínicos disminuye el efecto del AA sobre los niveles celulares de ATP

Los efectos del pretratamiento con nicotina sobre las alteraciones inducidas por el AA en los niveles de ATP de los cultivos neuronales de médula espinal se muestran en la Fig. 3. En la Fig. 3A se puede observar la variación de los niveles de ATP dependiendo de la duración de los distintos tratamientos. La disminución causada por el tratamiento con AA se puede observar tras un tratamiento de 8 horas, y parece hacerse más marcada tras períodos de mayor duración. Aunque el tratamiento con nicotina no afectó por sí mismo a los niveles celulares de ATP (resultados no incluidos), el pretratamiento de 2 horas con nicotina 10 μM parece contrarrestar los efectos del tratamiento con AA tras 24 y 48 horas, aunque los niveles de ATP permanecieron por debajo de los niveles normales.

La Fig. 3B muestra los efectos de los antagonistas del receptor nicotínico en relación con el efecto protector observado tras el tratamiento con nicotina en los niveles de ATP. Ambos antagonistas, mecamilamina (10 μM) y α -bungarotoxina (1 nM) son capaces de contrarrestar totalmente la acción de la nicotina, disminuyendo los niveles de ATP.

La Fig. 3C muestra la variación del efecto producido en los niveles de ATP por la activación de los receptores nicotínicos mediante el tratamiento con nicotina, en función del tiempo. En estos experimentos, los cultivos neuronales fueron tratados con nicotina 10 μM en distintos momentos antes y después de la adición de AA durante 24 horas. Cuando se añadió nicotina al mismo tiempo ó después de la adición de AA, no se observa ningún efecto protector en la activación de los receptores nicotínicos. No sólo parece necesario el pretratamiento con nicotina para poder observar su efecto, sino que los datos obtenidos sugieren que la adición de nicotina ha de tener lugar al menos 2 horas antes del tratamiento con AA para poder observar una recuperación de los niveles de ATP mediada por nicotina.

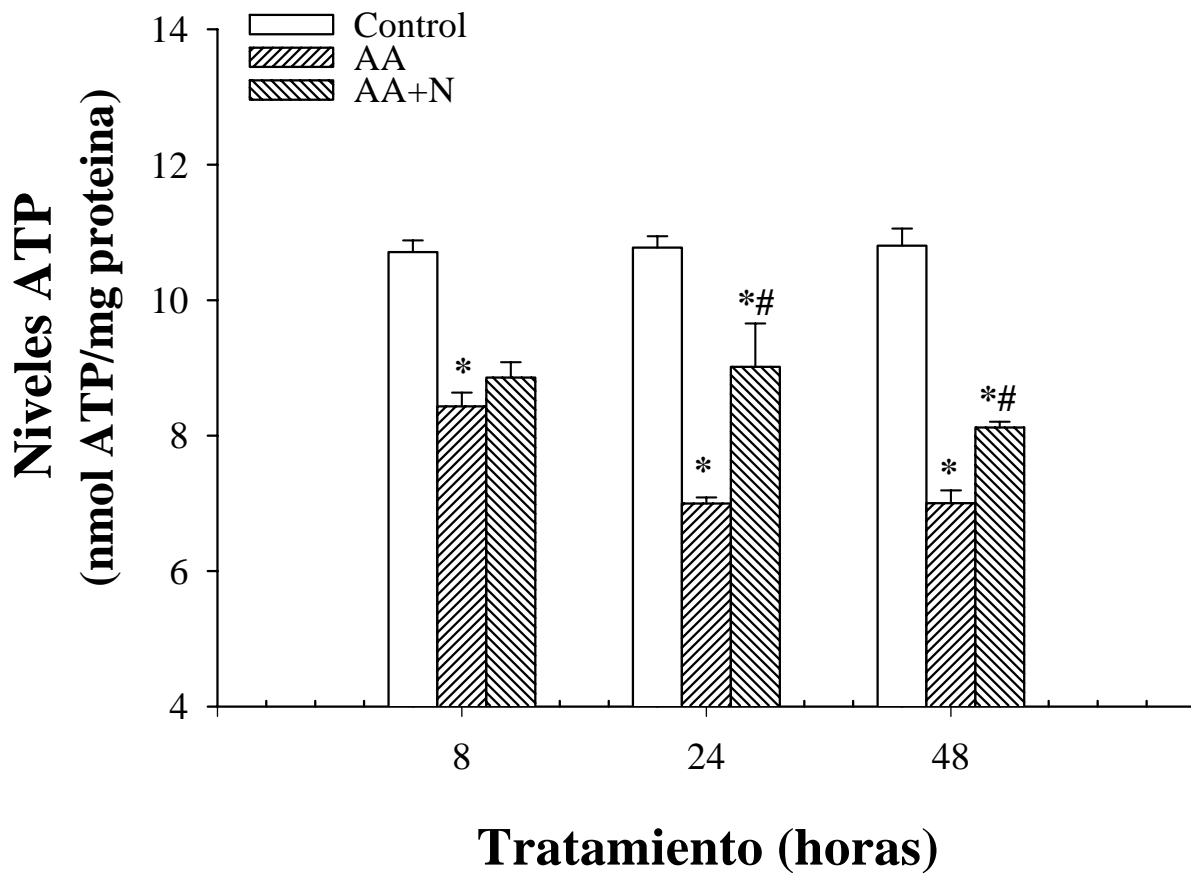


Figura 3(A). Efecto de la duración del tratamiento con AA en los niveles de ATP de neuronas de médula espinal. Las neuronas se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas previas a la adición de AA 10 μ M durante 8, 24 ó 48 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

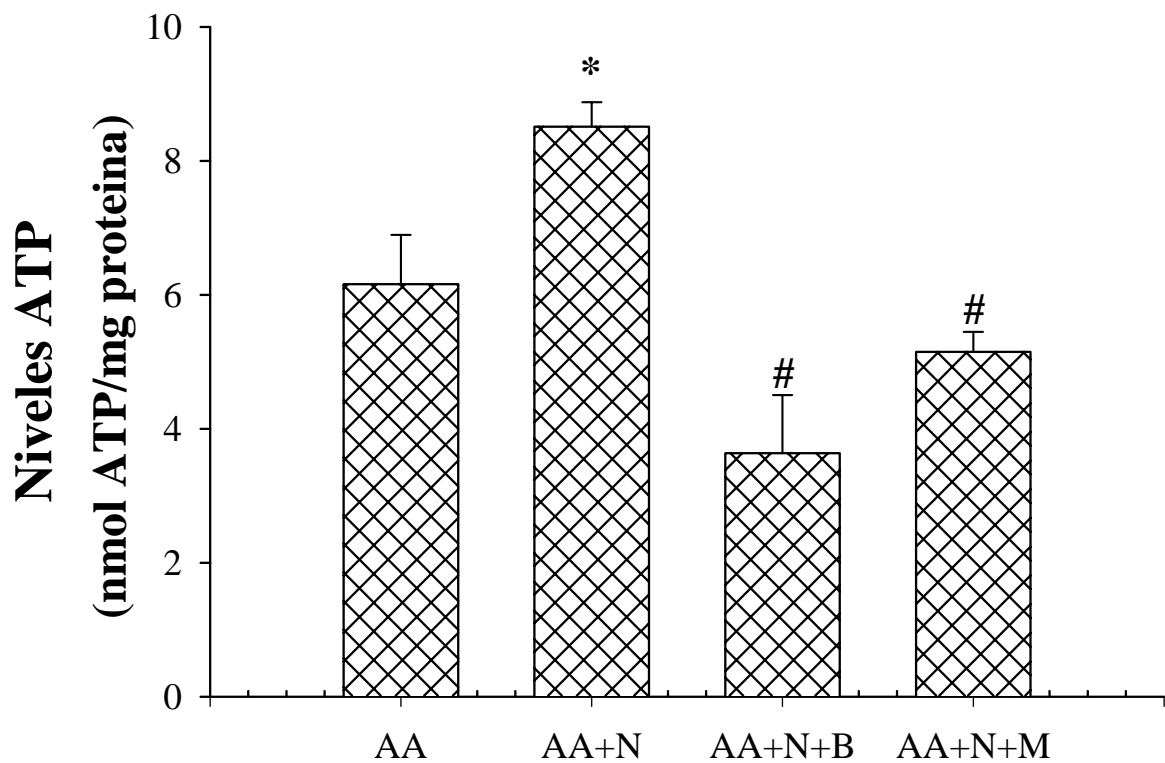


Figura 3(B). Efecto del tratamiento con antagonistas del receptor nicotínico en los niveles de ATP de neuronas de médula espinal. Las neuronas se trataron con α -bungarotoxina (1 nM) ó mecamilamina (10 μ M), 30 minutos antes de la adición de nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas al tratamiento con AA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

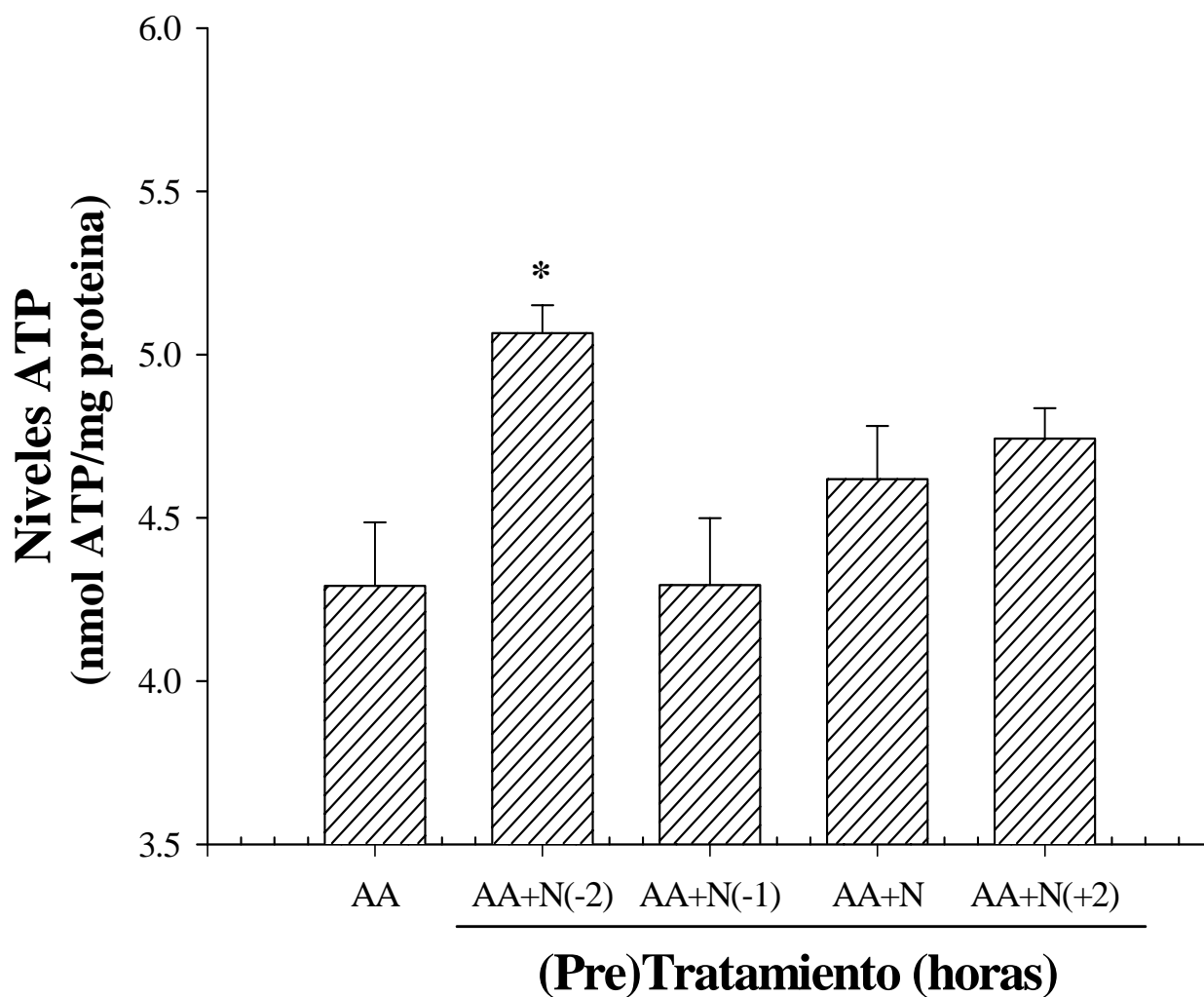


Figura 3(C). Efecto del (pre)tratamiento con nicotina en la alteración de los niveles de ATP causadas por el tratamiento con AA 10 μ M durante 24 horas. La adición de nicotina se llevó a cabo 2 horas (AA+N(-2)) ó 1 hora (AA+N(-1)) antes del tratamiento con AA, al mismo tiempo (AA+N), ó 2 horas después (AA+N(+2)). Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

El bloqueo del metabolismo del AA no inhibe sus efectos sobre los niveles de ATP en neuronas de médula espinal

Para determinar la implicación de determinados metabolitos del AA en los efectos observados, se llevaron a cabo experimentos con indometacina (2 μM) y ácido nordihidroguanirético (NDGA, 2 μM), inhibidores de lipooxigenasa y ciclooxigenasa, respectivamente, los dos enzimas responsables principalmente del metabolismo del AA. En cultivos neuronales tratados con estos compuestos antes de la adición del AA, se comprobó que los niveles de ATP se mantenían similares a los de los cultivos tratados únicamente con AA, y por debajo de los niveles normales, lo que parece descartar la posibilidad de la existencia de metabolitos del AA responsables de los efectos observados (Fig. 4).

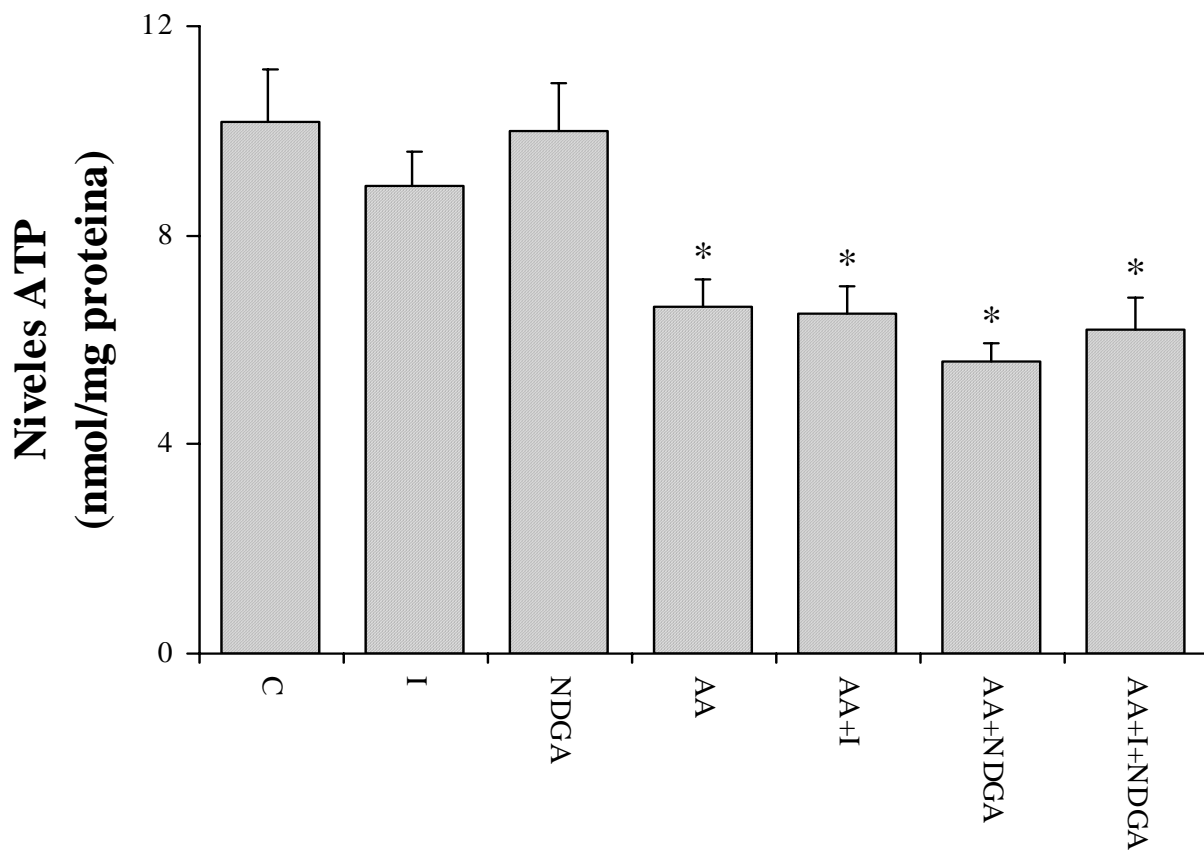


Figura 4. Efecto del bloqueo del metabolismo del AA en los niveles de ATP celular tras el tratamiento con dicho ácido graso en neuronas de médula espinal. Los cultivos neuronales se trataron con indometacina ó ácido nordihidroguanirético 30 minutos antes de la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

CAPÍTULO II

La activación de receptores nicotínicos disminuye la sobre-expresión del enzima NOS causada por el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal

El trauma en la médula espinal está asociado con la liberación de ácidos grasos de las membranas celulares, principalmente por la acción de fosfolipasas A₂ y C. Debido a la composición de la membrana celular, el AA es el principal ácido graso liberado. La liberación de AA puede tener diversas consecuencias a nivel celular, entre ellas, la elevación de los niveles de calcio intracelular y el aumento del estrés oxidativo.

El trauma en la médula espinal está relacionado con multitud de factores, entre los cuales parece encontrarse la alteración del metabolismo de NO. El daño en la médula produce el aumento de la expresión del enzima NOS, que cataliza la producción de NO. Hasta el momento han sido caracterizadas tres isoformas distintas de este enzima, denominadas neuronal (ó tipo I), inducible (ó tipo II), y endotelial (ó tipo III). Dichas isoformas difieren en su localización y en su dependencia por calcio. Asimismo, las isoformas neuronal y endotelial son expresadas constitutivamente, mientras que NOS inducible sólo se expresa en determinadas circunstancias. En condiciones normales, NO actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso (Saito *et al.*, 1994, Jaffrey y Zinder, 1995); sin embargo, la producción excesiva de NO parece estar relacionada con fenómenos de muerte celular (Dawson, 1995). De hecho, NO puede reaccionar con el radical libre O₂⁻ para formar peroxinitrito, un radical libre extremadamente potente y reactivo, que puede aumentar el estrés oxidativo al que están sometidas las células (Packer y Murphy, 1995). Estudios previos señalan la existencia de una relación entre el efecto tóxico ejercido por el aumento de la concentración de glutamato y la estimulación de NOS (Sharma *et al.*, 1998).

Debido a la relación existente entre el trauma en la médula espinal y el aumento en la liberación de AA y en el metabolismo del NO, el objeto de este estudio fue el determinar si existe alguna relación entre el aumento de los niveles de AA y la regulación de NOS, enzima productor de NO.

Por otro lado, debido a la neuroprotección ejercida por la activación de los receptores neuronales nicotínicos en diversas patologías crónicas ó agudas del sistema nervioso central, se pretendió estudiar si la activación de los receptores nicotínicos mediante el tratamiento con nicotina puede producir la regulación de los niveles de NO. A la vista e los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad celular, en los que la activación de los receptores nicotínicos previa al tratamiento con AA parece ejercer efectos neuroprotectores frente a la acción de dicho ácido en neuronas de médula espinal, este estudio pretende determinar si la regulación de NOS se encuentra entre los mecanismos celulares relacionados con el efecto tóxico del aumento de los niveles de AA y/ó con la acción neuroprotectora asociada a la activación de receptores nicotínicos. En este sentido, estudios previos han sugerido que la regulación de la actividad enzimática de NOS puede estar relacionada con el efecto protector que la activación de los receptores nicotínicos ejerce sobre el tratamiento con glutamato en neuronas corticales (Sharma *et al.*, 1998).

Existen distintos tipos de receptores nicotínicos presentes en sistema nervioso, diferenciados por el tipo de subunidades que los forman. Se cree que la composición de los receptores puede determinar su función y localización celular, aunque no ha sido establecida ninguna relación concreta. Para la determinación del papel de tipos específicos de receptores nicotínicos en la regulación de NOS, se utilizaron los correspondientes antagonistas de dichos receptores.

RESULTADOS

Regulación de la expresión del gen que codifica para el enzima NOS neuronal mediante el tratamiento con AA y nicotina

La expresión del gen NOS neuronal se determinó mediante experimentos de RT-PCR en los que se utilizaron primers específicos para la detección de dicho gen. En estos estudios, los cultivos neuronales de médula espinal fueron expuestos al tratamiento con AA durante distintos períodos de tiempo. En aquellos cultivos tratados con AA durante 1 ó 24 horas, los niveles de NOS neuronal tras la adición de AA permanecieron invariables (resultados no incluidos). Sin embargo, cuando se estudió el efecto del tratamiento con AA durante 3 horas se comprobó la existencia de un aumento en la producción de mRNA correspondiente al gen NOS neuronal. En la Fig. 5A se muestran resultados representativos de los experimentos realizados. En la Fig. 5B se muestra el tratamiento estadístico de la fluorescencia relativa de las bandas correspondiente a diversos experimentos. Como se refleja en los resultados presentados en esta figura, el tratamiento con AA 10 μ M durante 3 horas resultó en un aumento de la expresión de NOS neuronal. Sin embargo, aunque la adición de nicotina por sí sola no modifica los niveles de NOS neuronal, el pretratamiento de 2 horas con nicotina 10 μ M es capaz de contrarrestar dicho aumento. Este efecto mediado por nicotina se pudo bloquear parcialmente por la acción de los antagonistas del receptor nicotínico (Fig. 5A y 5B); α -bungarotoxina, antagonista selectivo del receptor α_7 , y mecamilamina, antagonista inespecífico, ejercieron un efecto similar, previniendo parcialmente el efecto del tratamiento con nicotina sobre el aumento de la expresión de NOS neuronal mediada por el AA.

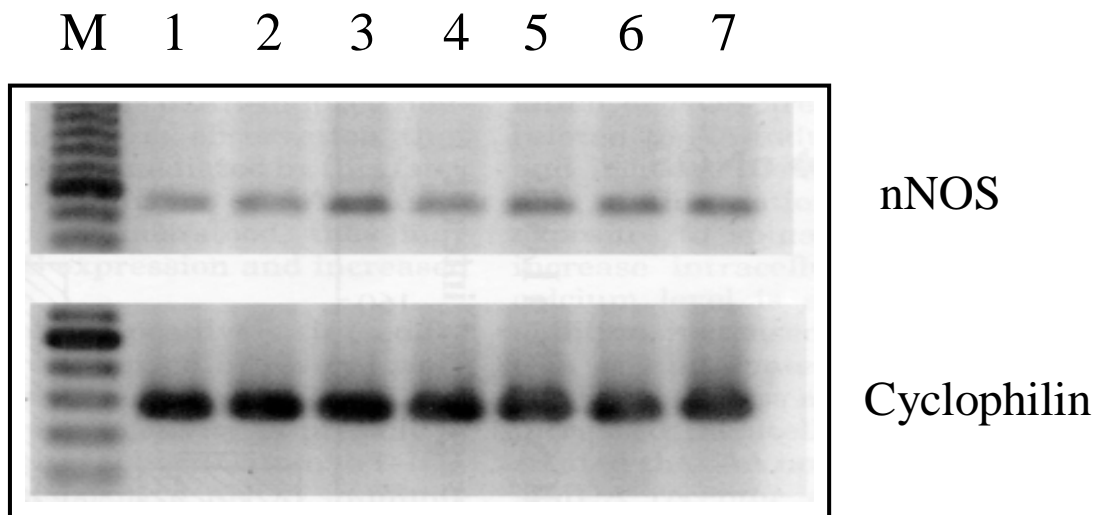


Figura 5(A). Efecto del tratamiento con AA, nicotina, y antagonistas del receptor nicotínico (α -bungarotoxina y mecamilamina) en la expresión del gen de NOS neuronal, determinado mediante experimentos de RT-PCR. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina $10 \mu\text{M}$ durante 2 horas, previas a la adición de AA $10 \mu\text{M}$ durante 3 horas. En experimentos relacionados con la caracterización de los receptores nicotínicos implicados, se adicionó α -bungarotoxina (1 nM) ó mecamilamina ($10 \mu\text{M}$) 30 minutos antes del tratamiento con nicotina. (A) Determinación de la expresión del gen nNOS neuronal mediante RT-PCR. M, patrón de pesos moleculares (100 bp); 1, control; 2, tratamiento con nicotina; 3, tratamiento con AA; 4, neuronas tratadas con nicotina antes de la adición de AA; 5, pretratamiento con nicotina y α -bungarotoxina antes de la adición de AA; 6, pretratamiento con nicotina y mecamilamina antes de la adición de AA; 7, pretratamiento con nicotina, α -bungarotoxina y mecamilamina antes de la adición de AA.

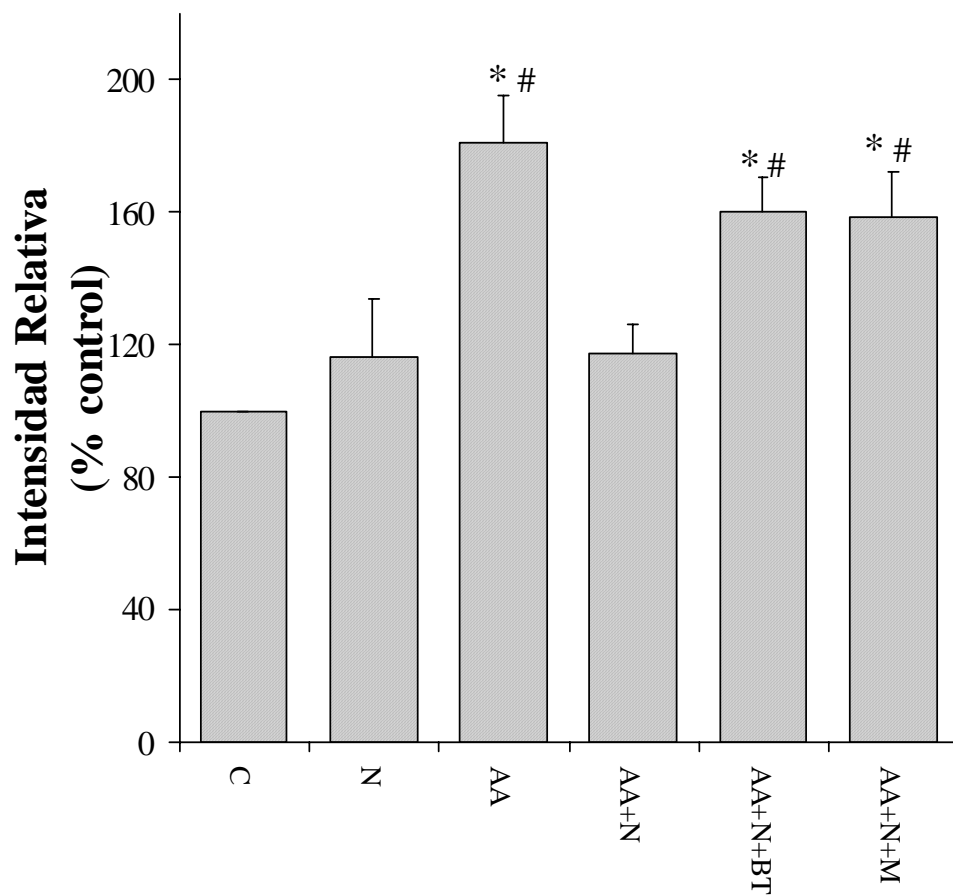


Figura 5(B). Tratamiento estadístico de la fluorescencia relativa de las bandas correspondientes al producto de ampliación del gen NOS neuronal, correspondiente a distintos experimentos. Los resultados se expresaron como valor medio±error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

La activación de los receptores nicotínicos bloquea el aumento de los niveles de NOS neuronal producido tras el tratamiento con AA

El efecto del tratamiento con AA y/o nicotina en los niveles de proteína NOS neuronal se puede observar en la Fig. 6. El tratamiento con AA 10 μ M durante 24 horas produjo un aumento de los niveles de NOS neuronal en comparación con los niveles normales. En concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de NOS neuronal, el pretratamiento con nicotina disminuyó la elevación de los niveles de NOS neuronal causada por la adición de AA.

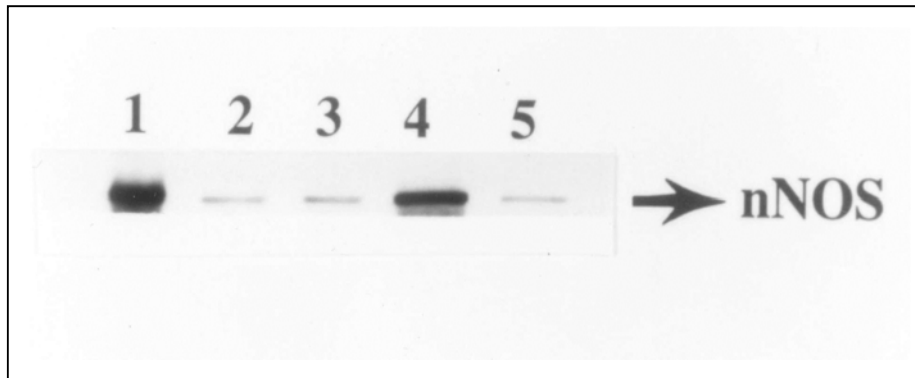


Figura 6. Efecto del tratamiento con AA y nicotina en los niveles de proteína NOS neuronal, determinado mediante experimentos de western blot. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas previas a la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. 1, control positivo; 2, control; 3, tratamiento con nicotina; 4, tratamiento con AA; 5, neuronas tratadas con nicotina antes de la adición de AA.

Variación de la actividad enzimática de NOS tras el tratamiento con nicotina y AA

La Fig. 7 muestra el efecto del tratamiento con nicotina y AA, así como el de la adición de antagonistas del receptor nicotínico, y de inhibidores específicos de distintas isoformas de este enzima. El tratamiento con AA 10 μ M durante 24 horas resultó en el aumento de la actividad enzimática de NOS. Aunque la adición de nicotina por sí sola no deriva en ningún cambio en la actividad enzimática, su adición previa a la de AA bloquea el efecto de éste y mantiene los niveles de actividad de NOS similares a los normales (Fig. 7A).

Experimentos adicionales con α -bungarotoxina ó mecamilamina no consiguieron contrarrestar de manera significativa la acción de la nicotina, sin embargo, cuando se utilizaron ambos antagonistas al mismo tiempo, se pudo bloquear significativamente la disminución del efecto del AA producida por el tratamiento con nicotina (Fig. 7B).

Este ensayo enzimático no es específico para ninguna de las isoenzimas de NOS, y por lo tanto no permite determinar de qué modo las distintas isoformas de NOS contribuyen a la actividad enzimática observada. Aunque entre un 85-95% de las células en cultivo son neuronas y podríamos suponer por tanto que la actividad enzimática es debida a NOS neuronal, las células restantes, células de la glía, pueden expresar la isoforma NOS inducible, la cual puede contribuir a la actividad total observada. Para determinar las isoformas implicadas en el aumento de actividad enzimática observado tras el tratamiento con AA, se utilizaron inhibidores específicos de NOS neuronal, 7-NI, e inducible, AMT. En la Fig. 7C se observa que sólo la adición de 7-NI redujo de manera significativa el aumento de la actividad de NOS producido por el AA. Estos resultados indican que la isoforma neuronal del enzima NOS es responsable mayoritario de las variaciones de la actividad de NOS inducidas por el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal.

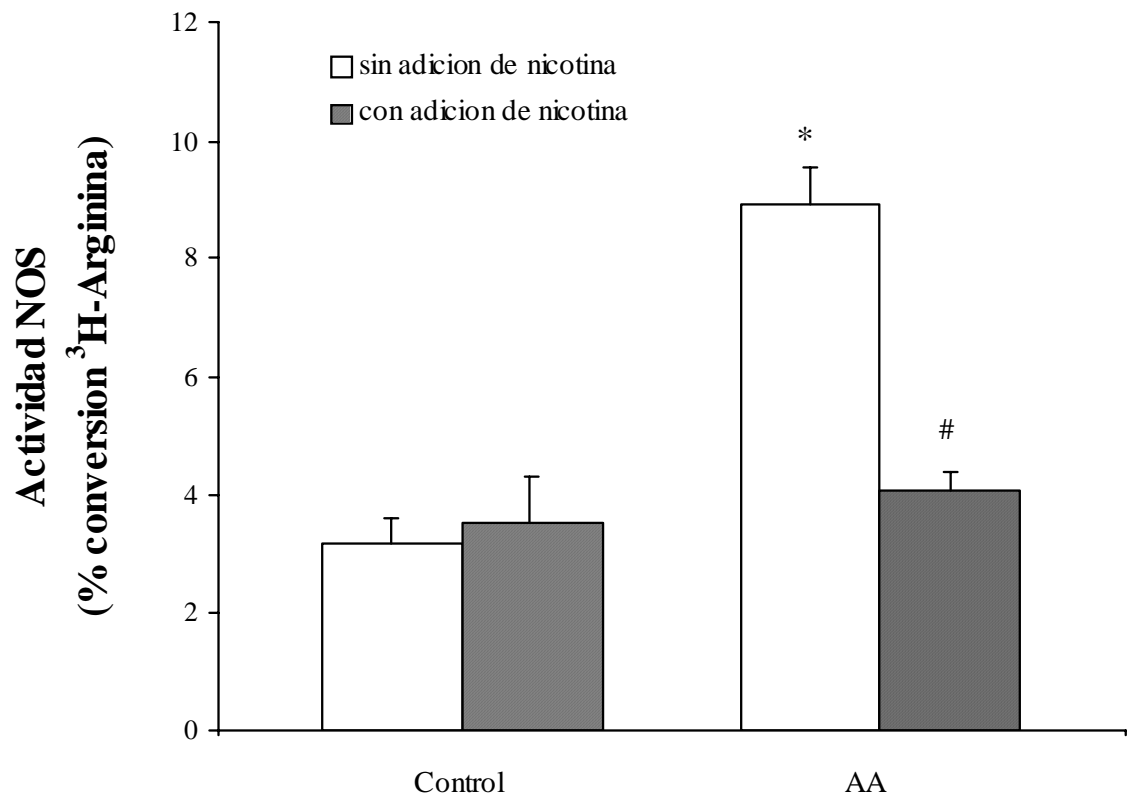


Figura 7(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la actividad enzimática de NOS. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas previas a la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

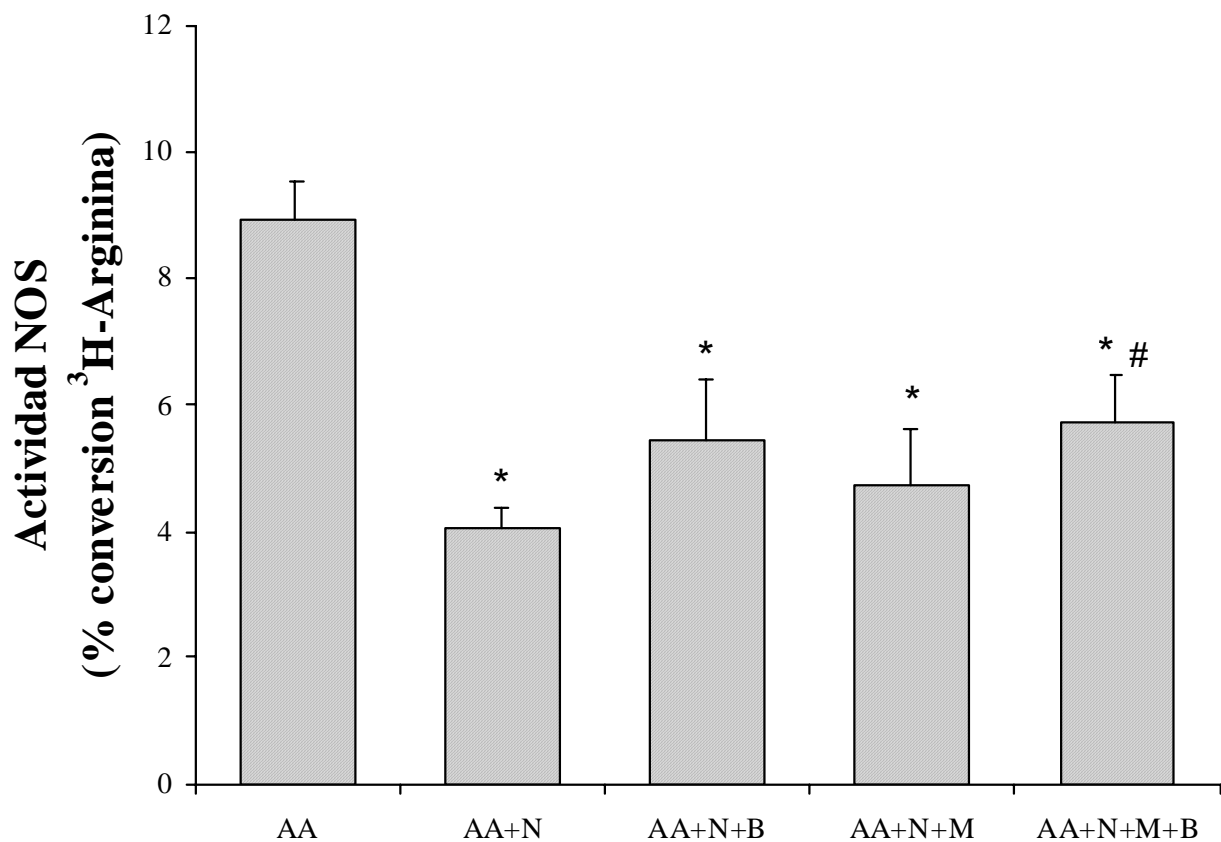


Figura 7(B). Efecto del tratamiento con antagonistas del receptor nicotínico (α -bungarotoxina y mecamilamina) en la actividad enzimática de NOS. Los cultivos neuronales se trataron con α -bungarotoxina (1 nM) ó mecamilamina (10 μ M) 30 minutos antes de la adición de nicotina. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

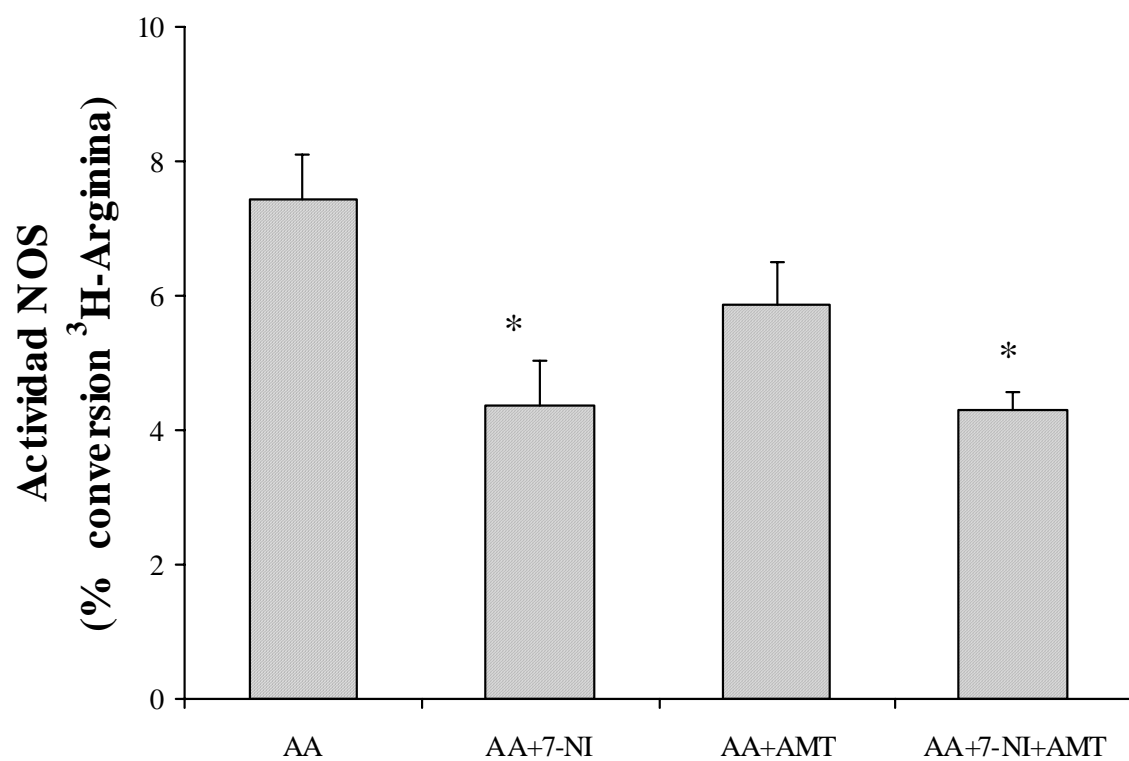


Figura 7(C). Efecto del tratamiento con inhibidores selectivos de distintas isoformas del enzima NOS en la actividad enzimática observada. Los cultivos neuronales se trataron con 7-nicotinaI 10 μ M (inhibidor de nicotinaOS neuronal) y/o AMT 200 nM (inhibidor de NOS inducible) previamente a la adición de AA durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

La Activación de los Receptores Nicotínicos Disminuye los Niveles de Nitrito y cGMP Observados Tras el Tratamiento con AA

La Fig. 8 refleja los cambios que se producen en los niveles de nitrito en respuesta al tratamiento con AA y nicotina. En concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de la actividad enzimática de NOS, el tratamiento con AA durante 24 horas aumenta la producción de nitrito en comparación con los niveles normales (Fig. 8A). Asimismo, se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que los cultivos neuronales fueron tratados con AA en presencia de 7-NI y AMT. Al igual que en los ensayos de actividad enzimática, solamente 7-NI, el inhibidor específico de NOS neuronal, puede contrarrestar la elevación de los niveles de nitrito producida por el tratamiento con AA (Fig. 8B).

La liberación de NO a través de la reacción catalizada por NOS puede estimular la actividad del enzima guanilato ciclasa, y por tanto puede aumentar los niveles de cGMP. Debido a esto, los niveles de cGMP pueden servir como un marcador de la formación de NO y de la actividad de NOS. Los cambios observados al analizar los niveles de cGMP en los cultivos tratados con AA, nicotina, e inhibidores de las isoformas de NOS son similares a los obtenidos en el estudio de los niveles de nitrito en el medio de cultivo. El tratamiento con AA produjo un aumento de los niveles de cGMP, que pudo ser bloqueado por la adición de nicotina (Fig. 9A). Además, la inhibición ejercida por 7-NI sobre NOS neuronal disminuye los niveles de cGMP en cultivos tratados con AA, mientras que la adición de AMT, inhibidor específico de NOS inducible, no parece tener ningún efecto significativo (Fig. 9B).

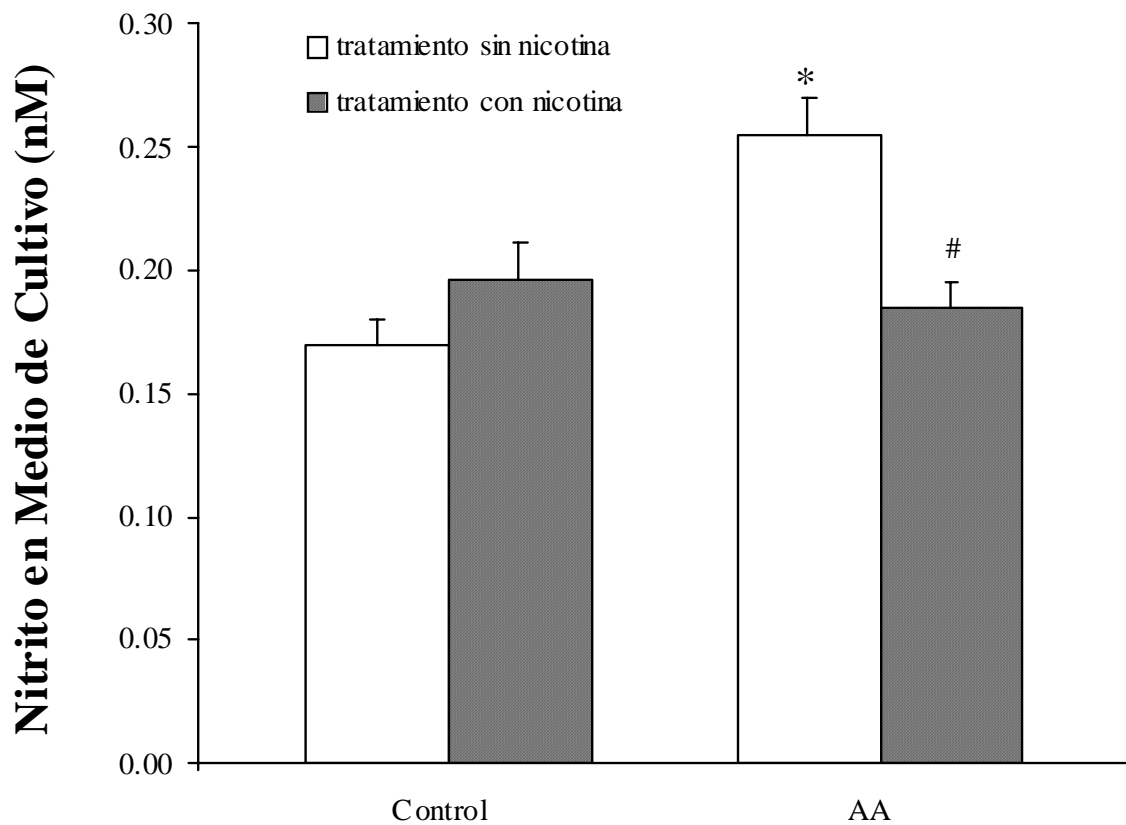


Figura 8(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en los niveles de nitrito en el medio de cultivo. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

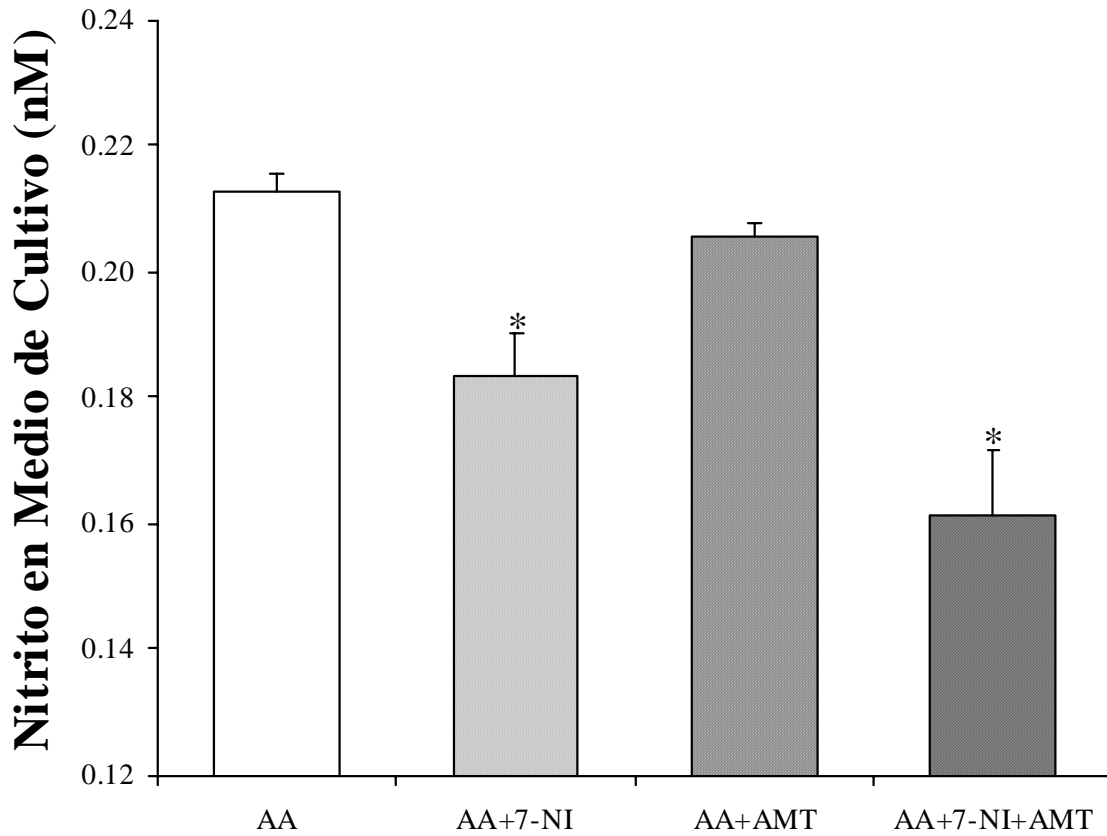


Figura 8(B). Efecto del tratamiento con inhibidores selectivos de distintas isoformas del enzima NOS en los niveles de nitrito en el medio de cultivo. Los cultivos neuronales se trataron con 7-nicotinaI 10 μ M (inhibidor de NOS neuronal) y/o AMT 200 nM (inhibidor de NOS inducible), previamente a la adici3n de AA durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparaci3n con el grupo AA.

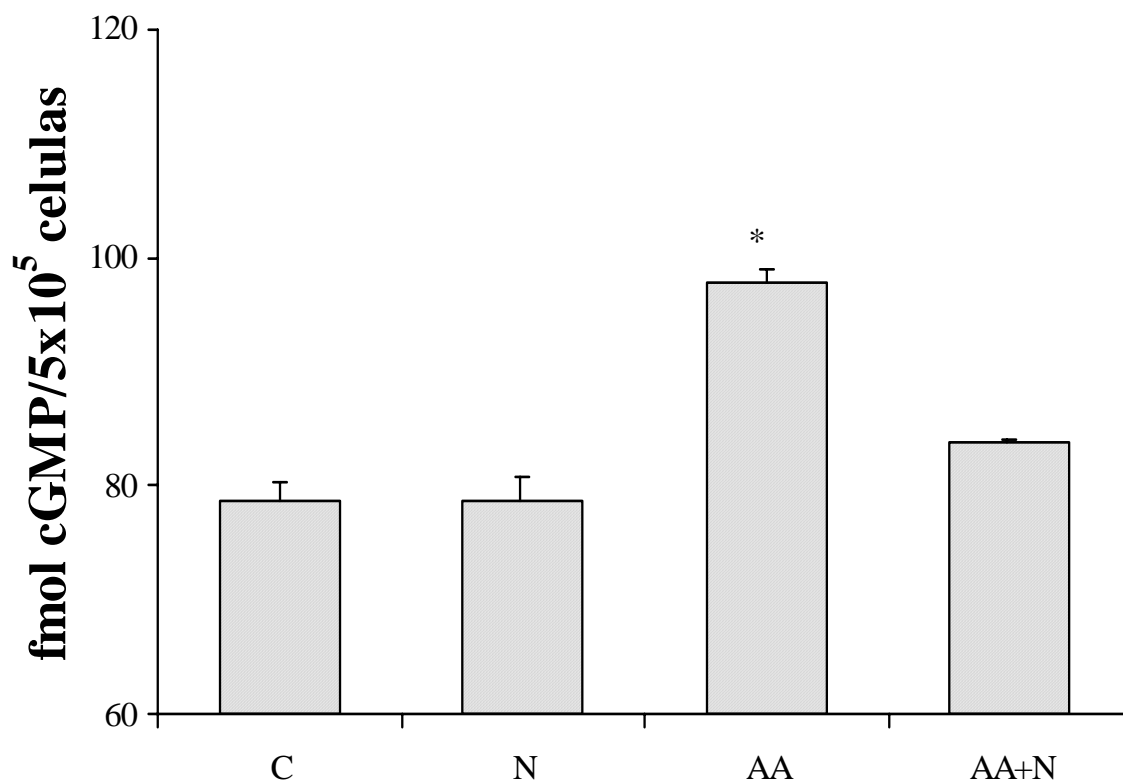


Figura 9(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en los niveles de cGMP. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

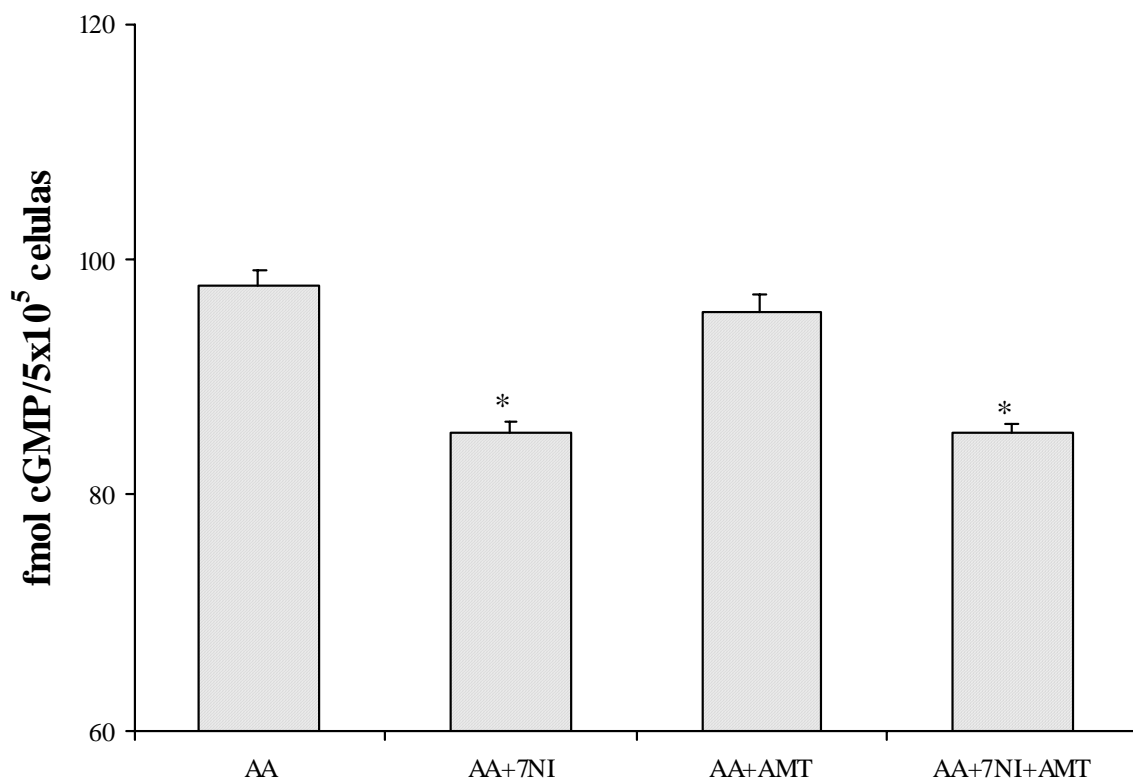


Figura 9(B). Efecto del tratamiento con inhibidores selectivos de distintas isoformas del enzima NOS en los niveles de cGMP. Los cultivos neuronales se trataron con 7-NI 10 μ M (inhibidor de NOS neuronal) y/o AMT 200 nM (inhibidor de NOS inducible) previamente a la adición de AA durante 24 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo AA

CAPÍTULO III

La activación de receptores nicotínicos disminuye la aparición de apoptosis tras el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal

En estudios precedentes se ha podido comprobar que el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal conduce a la disminución de la viabilidad celular, en un proceso que parece estar relacionado con el descenso de la función mitocondrial. Por tanto, se hace necesario determinar con exactitud que mecanismo ó mecanismos se encuentran implicados en la muerte neuronal producida por el AA.

Existen principalmente dos mecanismos generales a través de los cuales se produce la muerte celular, necrosis y apoptosis, que presentan características diferentes. Mientras que necrosis se caracteriza por la ruptura de la membrana celular y la rápida pérdida de homeostasis interna, el fenómeno de apoptosis viene caracterizado por la condensación de cromatina en el núcleo y la aparición de moléculas en el exterior de la membrana que normalmente se encuentran confinadas al interior celular (Ej. fosfatidilserina). Una diferencia principal entre ambos tipos de muerte celular es la implicación que ésta presenta para las células vecinas. Las células apoptóticas son secuestradas rápidamente por fagocitos, antes de que se produzca la lisis de la membrana y el vertido del contenido celular, que puede causar una reacción inflamatoria. En las células del sistema nervioso es particularmente crítico el vertido de glutamato, que por sus propiedades excitotóxicas puede causar un daño severo a las células vecinas (la concentración intracelular de glutamato es de 3-10 mM, mientras que concentraciones de 10-20 μ M pueden causar la muerte celular de neuronas, Nicholls, 1993). Por tanto, necrosis neuronal (y el vertido incontrolado de glutamato asociado a ella) es especialmente dañina en el sistema nervioso.

Distintos tipos de muerte celular pueden producirse al mismo tiempo en el sistema nervioso (Choi, 1995). Aunque el aumento de la liberación de enzimas citoplasmáticos al medio (liberación de LDH) tras el tratamiento con AA parece indicar la pérdida de la integridad de la membrana, y por tanto la existencia de un fenómeno de necrosis celular,

evidencia previa indica que existe la posibilidad de que distintos tipos de muerte celular coexistan en el mismo sistema. Por tanto, es necesario determinar si el tratamiento con AA produce apoptosis en neuronas de médula espinal. La aparición de apoptosis tras el trauma en la médula espinal ha sido observada previamente (Springer *et al.*, 1999). Debido a la naturaleza postmitótica de las neuronas adultas, apoptosis puede producir alteraciones significativas. La aparición de apoptosis en regiones de la médula espinal alejadas del lugar del daño se supone responsable, al menos en parte, de las perturbaciones neurológicas que produce la lesión a largo plazo. En relación con la aparición de apoptosis en la médula espinal, se ha observado la activación de una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas (Emery *et al.*, 1998, Springer *et al.*, 1999). Estos enzimas se encuentran normalmente como zimógenos, y sólo se ven activados durante la ejecución de apoptosis, siendo responsables de la aparición de características morfológicas específicas de este mecanismo de muerte celular.

Debido a la importancia del fenómeno de apoptosis en el trauma en la médula espinal, se trató de determinar si el aumento de los niveles de AA puede inducir la aparición de apoptosis en este sistema. Para ello, se estudiaron distintos parámetros asociados con dicho fenómeno, como la activación de caspasas, la fragmentación del DNA nuclear, y la posible alteración de sistemas celulares responsables de la activación de caspasas. De entre dichos sistemas regulatorios, el más estudiado la proteína Bcl-2. Según estudios previos, esta proteína regulatoria es capaz de inhibir la aparición de apoptosis tras el trauma en la médula espinal. Por otro lado, debido al efecto protector observado tras la activación de los receptores nicotínicos en la viabilidad celular de cultivos neuronales de médula espinal, se trató de determinar si la activación de dichos receptores puede presentar propiedades anti-apoptóticas, como sugieren algunos estudios previos en los que la administración de nicotina parece prevenir la aparición de apoptosis en distintas líneas de células tumorales (Heusch y Maneckjee, 1998).

RESULTADOS

La activación de receptores nicotínicos disminuye la fragmentación del DNA inducida por el tratamiento con AA

Debido a la disminución de la viabilidad neuronal observada tras el tratamiento con AA, es necesario determinar que mecanismos celulares están implicados en los procesos de muerte neuronal observados, y si estos mecanismos están relacionados con la aparición de apoptosis en neuronas de médula espinal, un tipo de muerte celular con características especiales, particularmente en el sistema nervioso. Para determinar la incidencia de apoptosis en estos cultivos celulares tratados con AA, se determinó la aparición de fragmentación en el DNA internucleosomal en cultivos neuronales de médula espinal (Fig. 10). El tratamiento con AA durante 24 horas resultó en la observación del característico conjunto de fragmentos de DNA internucleosomal de bajo peso molecular, utilizado normalmente como indicador de la presencia de apoptosis. El pretratamiento con nicotina disminuye significativamente la degradación del DNA observada tras la adición de AA (muestra 6 en comparación con muestra 5).

Por otro lado, la utilización de antagonistas de los receptores nicotínicos α -bungarotoxina y mecamilamina bloquea parcialmente la acción del pretratamiento con nicotina (muestras 7 y 8, en comparación con muestra 6), lo que sugiere la activación del receptor α_7 como necesaria, al menos en parte, para la observación de dicho efecto.

El efecto del AA en la fragmentación de los núcleos neuronales se determinó mediante el uso de la sonda fluorescente para DNA Hoescht 3342. En la Fig. 11 (A y B) se recoge el aumento en el número de células que presentan núcleo apoptótico tras el tratamiento con AA durante 48 horas. El pretratamiento adicional con nicotina 10 μ M disminuyó el porcentaje de núcleos apoptóticos a niveles similares a los normales (Fig. 11A-C en comparación con 11A-D).

M 1 2 3 4 5 6 7 8

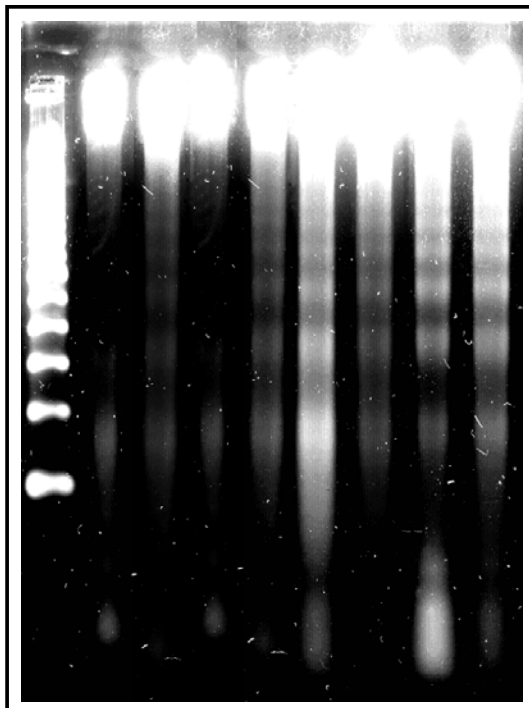


Figura 10. Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la fragmentación del DNA en neuronas de médula espinal. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA 10 μ M durante 24 horas. M, patrón de pesos moleculares (100 bp); 1, control; 2, tratamiento con nicotina; 3, tratamiento con α -bungarotoxina; 4, tratamiento con mecamilamina; 5 tratamiento con AA; 6, neuronas tratadas con nicotina antes de la adición de AA; 7, pretratamiento con nicotina y α -bungarotoxina antes de la adición de AA; 8, pretratamiento con nicotina y mecamilamina antes de la adición de AA.

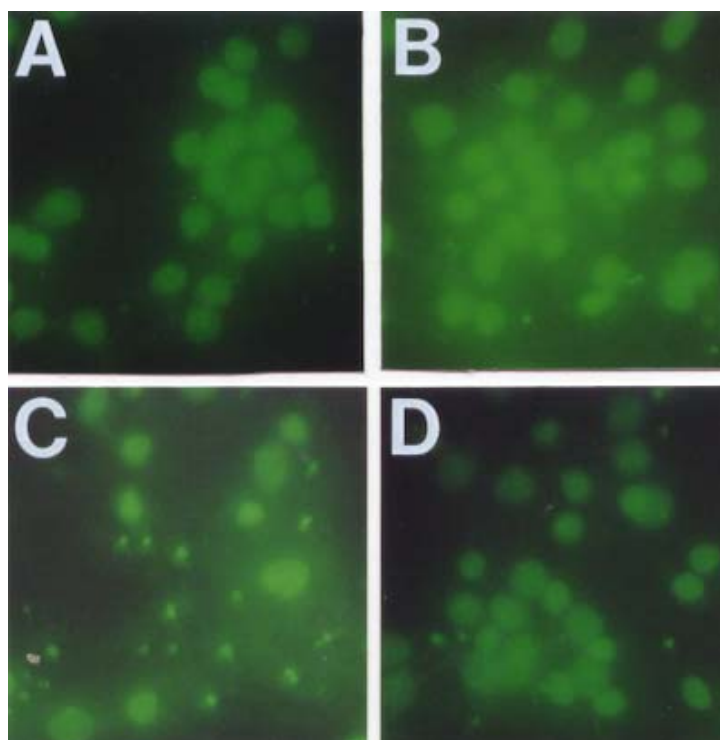


Figura 11(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la aparición de núcleos fragmentados en neuronas de médula espinal, determinado mediante el uso de la sonda Hoescht 33342. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA 10 μ M durante 48 horas. Las imágenes son representativas del resultado total de distintos experimentos. Las fotografías se tomaron usando un microscopio de fluorescencia con un objetivo de inmersión de 40X. A, control; B, nicotina; C, AA; D, pretratamiento con nicotina seguido de adición de AA.

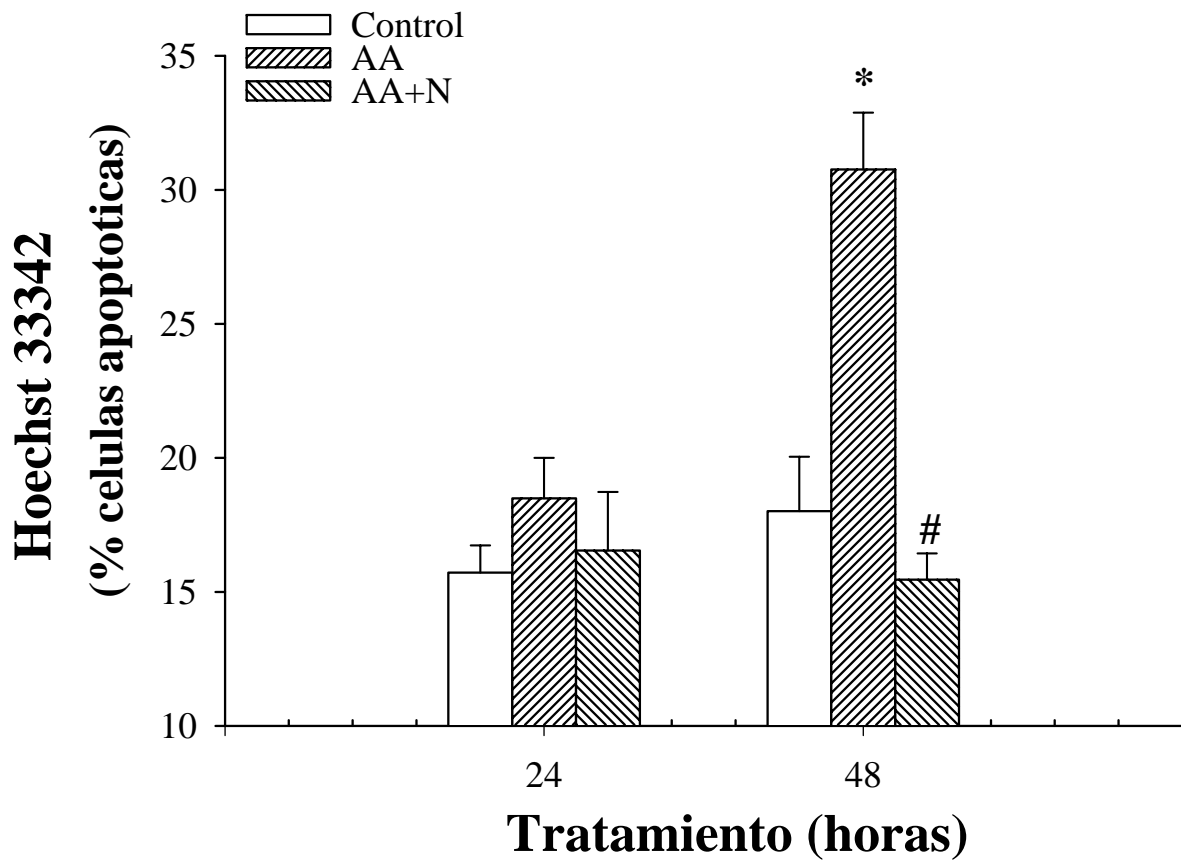


Figura 11(B). Tratamiento estadístico del número de células que presentan núcleo apoptótico tras el tratamiento con AA durante 24 ó 48 horas, correspondiente a distintos experimentos. Los resultados se expresaron como valor medio±error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA.

La activación de receptores nicotínicos disminuye la activación de caspasas observada tras el tratamiento con AA

Para determinar el papel de la activación de caspasas en la inducción de apoptosis ejercida por el AA, y para establecer si la activación de receptores nicotínicos puede influenciar este proceso, se determinaron las actividades enzimáticas de caspasa-3, -8 y -9 tras tratamientos con AA de diferente duración, y en la presencia ó ausencia de un pretratamiento con nicotina 2 horas antes de la adición de AA. Por otro lado, para establecer el tipo de receptores nicotínicos supuestamente implicados en la acción de la nicotina, se llevaron a cabo experimentos adicionales utilizando antagonistas de los receptores nicotínicos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 12-15.

El efecto del tratamiento con AA en la actividad de caspasa-3 se puede observar en la Fig. 12A. Dicho tratamiento fue capaz de aumentar la actividad de caspasa-3 hasta un 45%, alcanzado tras un período de 12 horas posterior a la adición de AA. En la presencia de nicotina 10 μ M, añadida a los cultivos celulares 2 horas previas a la adición de AA, el aumento de la actividad de caspasa-3 se vio inhibido significativamente.

El efecto del tratamiento con AA en la actividad de caspasa-8 se muestra en la Fig. 14A. Tras sólo 30 minutos de tratamiento con AA se pudo observar un aumento de la actividad de caspasa-8, que alcanza su nivel máximo 3 horas después. Aunque la adición de nicotina por sí sola no induce cambios en la actividad de caspasa-8, un pretratamiento de 2 horas con nicotina 10 μ M bloqueó el efecto del AA sobre dicho enzima.

La Fig. 15A muestra el efecto del tratamiento con AA en la actividad de caspasa-9. En contraste con el rápido aumento de la actividad de caspasa-8, aumentos en la actividad de caspasa-9 de aproximadamente el 35% se detectaron sólo tras 6 horas de tratamiento con AA. Como en el caso de los otros enzimas, el pretratamiento con nicotina bloqueó los efectos del AA sobre caspasa-9.

Para la determinación del papel de receptores nicotínicos específicos en el efecto protector ejercido por el tratamiento con nicotina frente a la inducción de la actividad de caspasas mediada por el AA, se trataron los cultivos neuronales con α -bungarotoxina y mecamilamina previamente a la adición de nicotina y AA. La elección de la duración de los tratamientos se hizo teniendo en cuenta la cinética observada en los experimentos reflejados en las Fig. 12A, 14A y 15A, es decir, 3 horas para caspasa-8, 6 horas para

caspasa-9 y 12 horas para caspasa-3. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Fig. 12B, 14B y 15B. La utilización de ambos antagonistas inhibió el efecto protector de la nicotina frente al aumento de actividad de caspasa-3 y -9 causado por el tratamiento con AA. Debido a la especificidad de α -bungarotoxina para bloquear los receptores nicotínicos de tipo α_7 , estos resultados parecen sugerir que la inhibición de la activación de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 ejercida por el tratamiento con nicotina está mediada por la activación de los receptores nicotínicos α_7 .

La visualización de la actividad enzimática de caspasa-3 *in situ* se muestra en la Fig. 13. Estos experimentos permiten demostrar la presencia de caspasa-3 en su forma activa en neuronas de médula espinal tras el tratamiento con AA durante 12 horas, en comparación con los niveles de enzima activo que se encuentran en dichas células en condiciones normales (imagen superior en comparación con imagen inferior, presencia de enzima activo señalada con flechas).

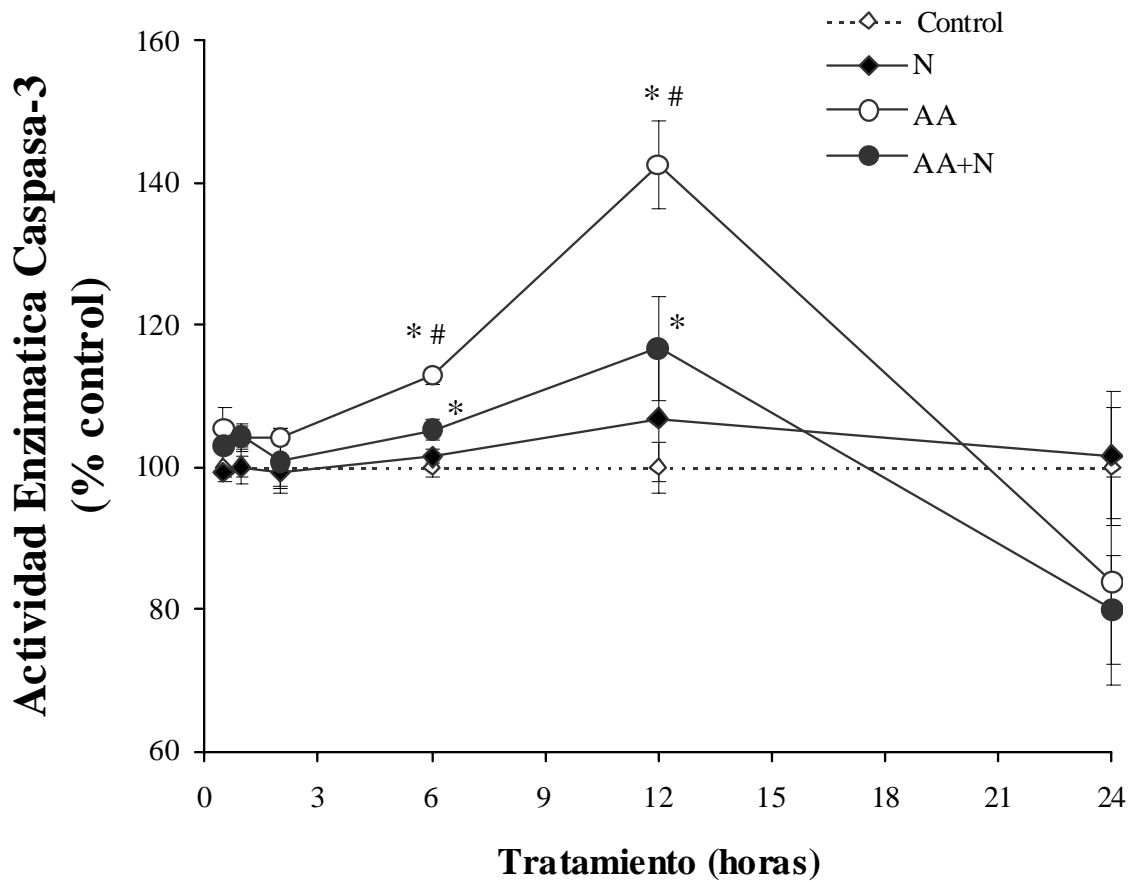


Figura 12(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la actividad enzimática de caspasa-3. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA de distinta duración. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

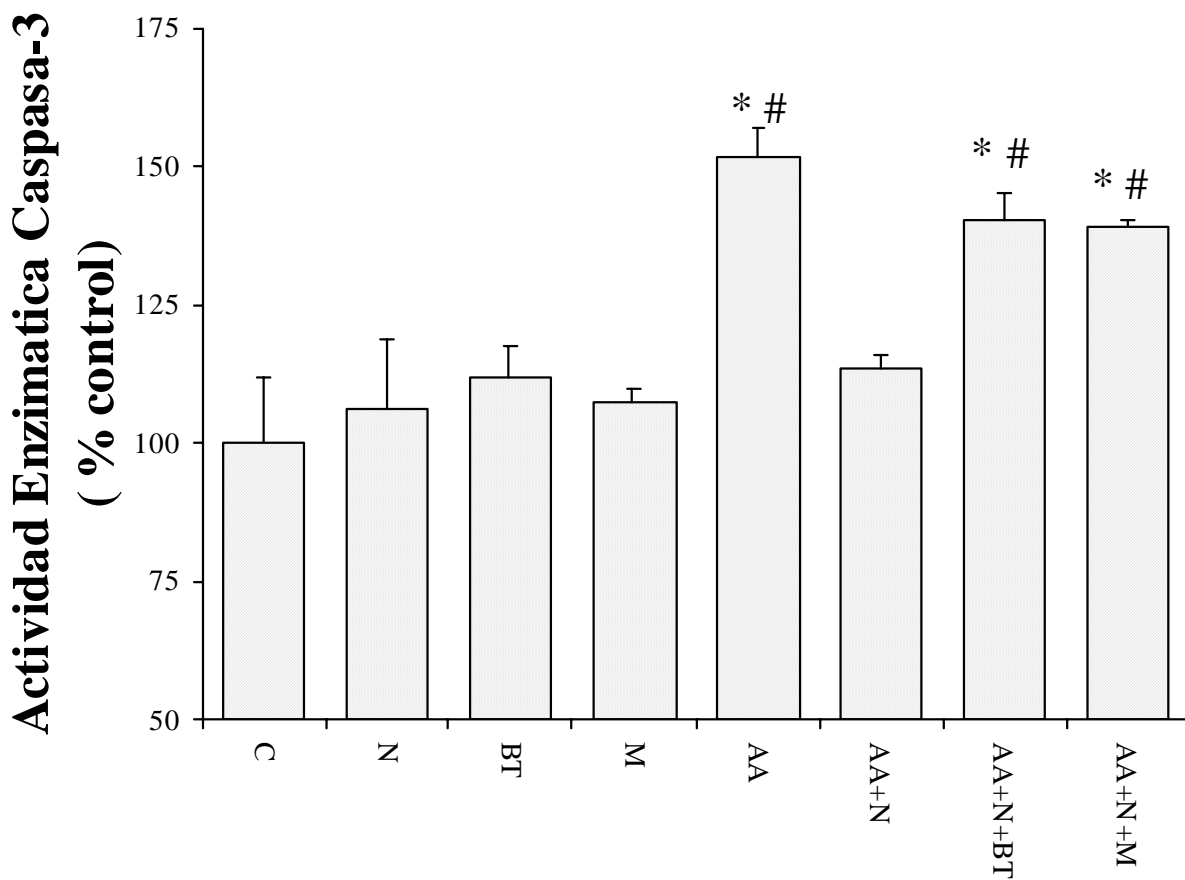


Figura 12(B). Efecto del tratamiento con antagonistas del receptor nicotínico (α -bungarotoxina y mecamilamina) en la actividad enzimática de caspasa-3. Los cultivos neuronales se trataron con mecamilamina (10 μ M) ó α -bungarotoxina (1 nM) 30 minutos antes de la adición de nicotina, seguido del tratamiento con AA durante 12 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

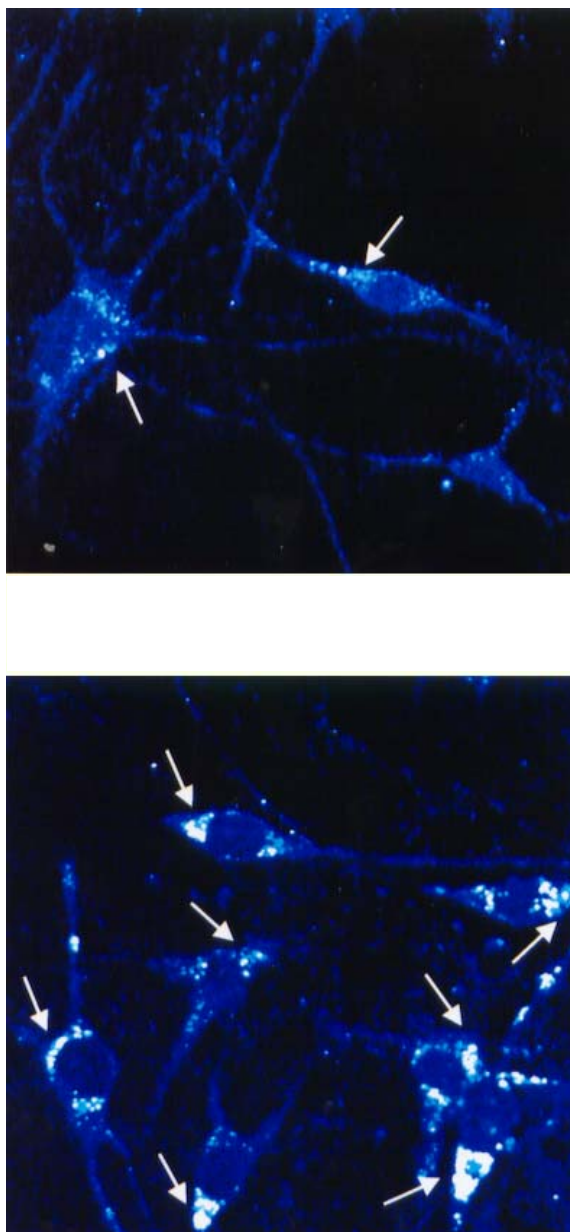


Figura 13. Imágenes tomadas en el microscopio confocal de la actividad de caspasa-3 (indicada mediante flechas) presente en neuronas de médula espinal. Imagen superior, cultivos normales; imagen inferior, cultivos tratados con AA 10 μ M durante 24 horas.

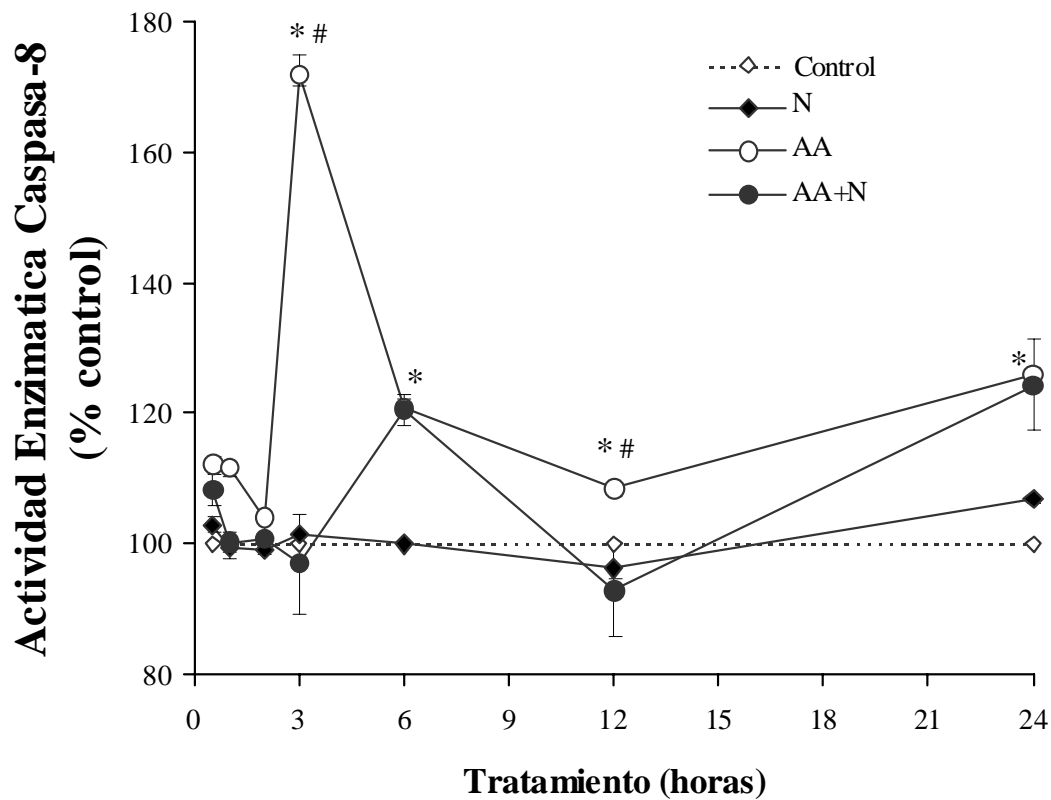


Figura 14(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la actividad enzimática de caspasa-8. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA de distinta duración. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

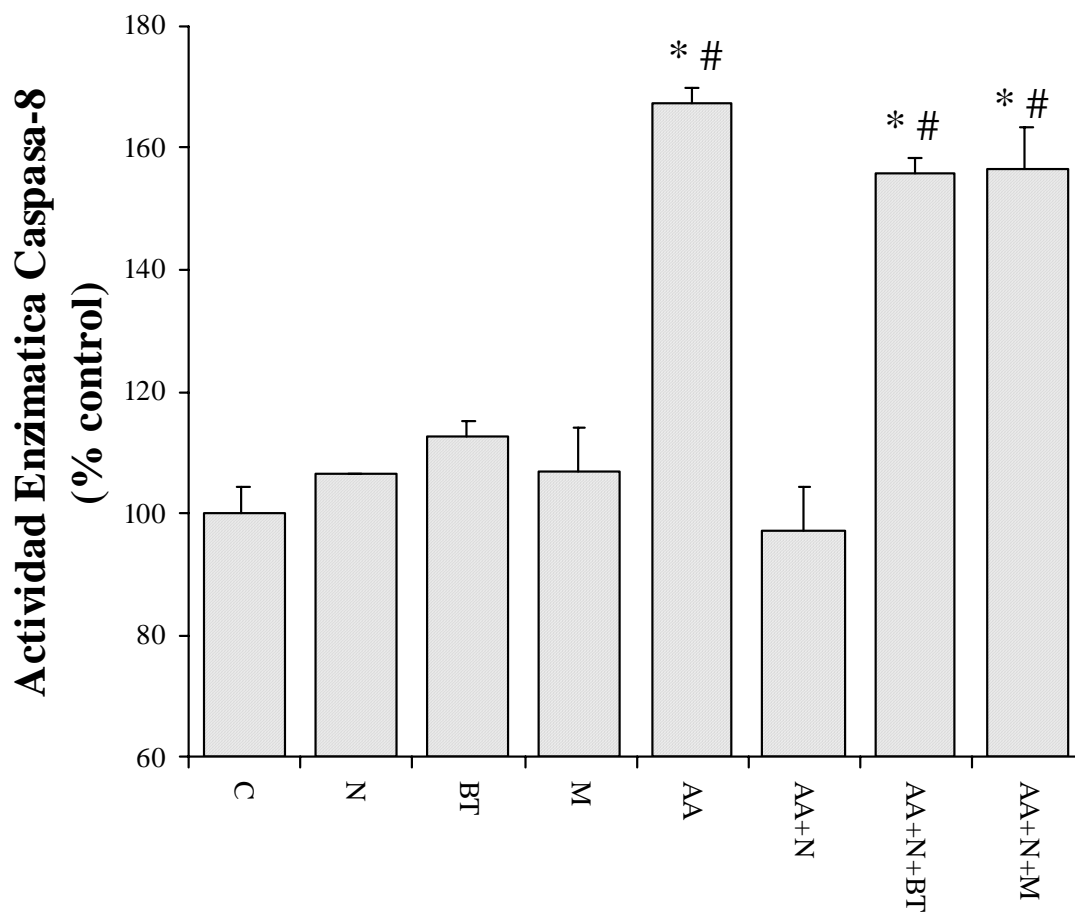


Figura 14(B). Efecto del tratamiento con antagonistas del receptor nicotínico (α -bungarotoxina y mecamilamina) en la actividad enzimática de caspasa-8. Los cultivos neuronales se trataron con mecamilamina (10 μ M) ó α -bungarotoxina (1 nM) 30 minutos antes de la adición de nicotina, seguido del tratamiento con AA durante 3 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

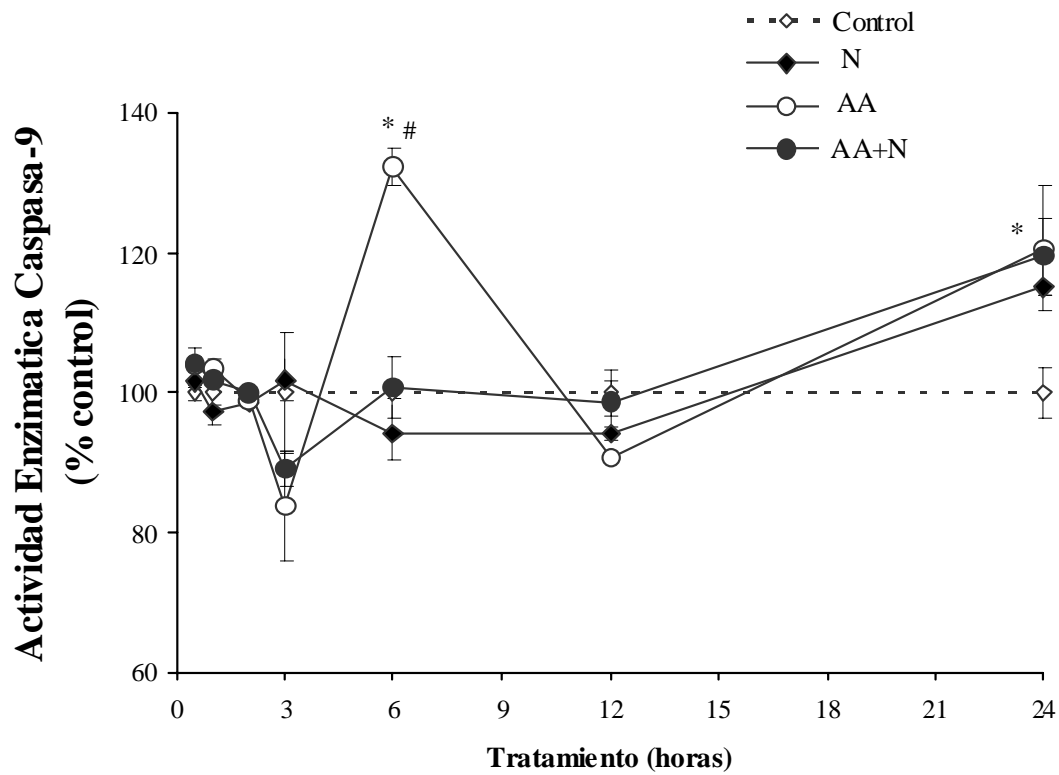


Figura 15(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la actividad enzimática de caspasa-9. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA de distinta duración. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

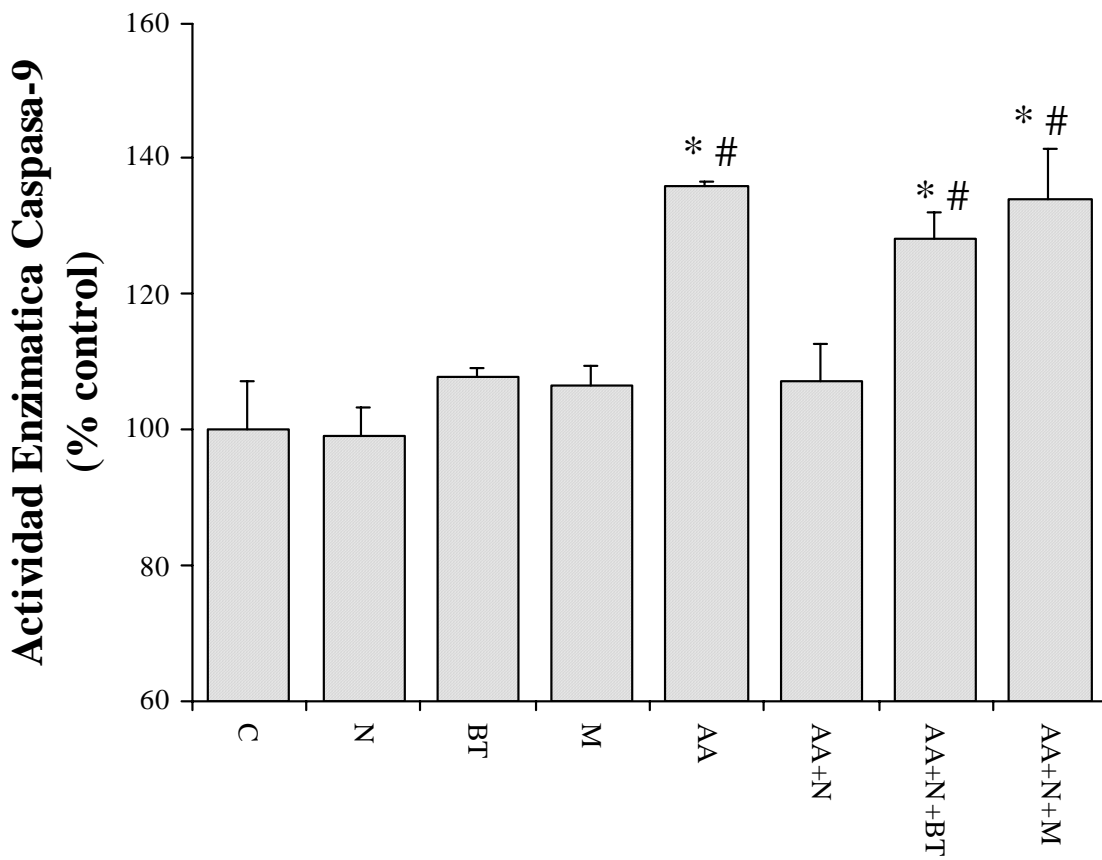


Figura 15(B). Efecto del tratamiento con antagonistas del receptor nicotínico (α -bungarotoxina y mecamilamina) en la actividad enzimática de caspasa-9. Los cultivos neuronales se trataron con mecamilamina (10 μ M) ó α -bungarotoxina (1 nM) 30 minutos antes de la adición de nicotina, seguido del tratamiento con AA durante 6 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

El bloqueo del metabolismo del AA no inhibe sus efectos sobre el aumento de la Actividad de Caspasa-3 en neuronas de médula espinal

Para determinar la implicación de determinados metabolitos del AA en los efectos observados, se llevaron a cabo experimentos con indometacina (2 μ M) y NDGA (2 μ M), inhibidores de lipooxigenasa y ciclooxigenasa, respectivamente, los dos enzimas responsables principalmente del metabolismo del AA.

Experimentos con los inhibidores del metabolismo del AA anteriormente mencionados fueron llevados a cabo para determinar el efecto del bloqueo de dichas rutas metabólicas en la activación de caspasa-3. En concordancia con los resultados de la Fig. 4, la Fig. 16 muestra que el tratamiento con indometacina ó NDGA no inhibe el aumento en la actividad enzimática de caspasa-3 observado tras el tratamiento con nicotina.

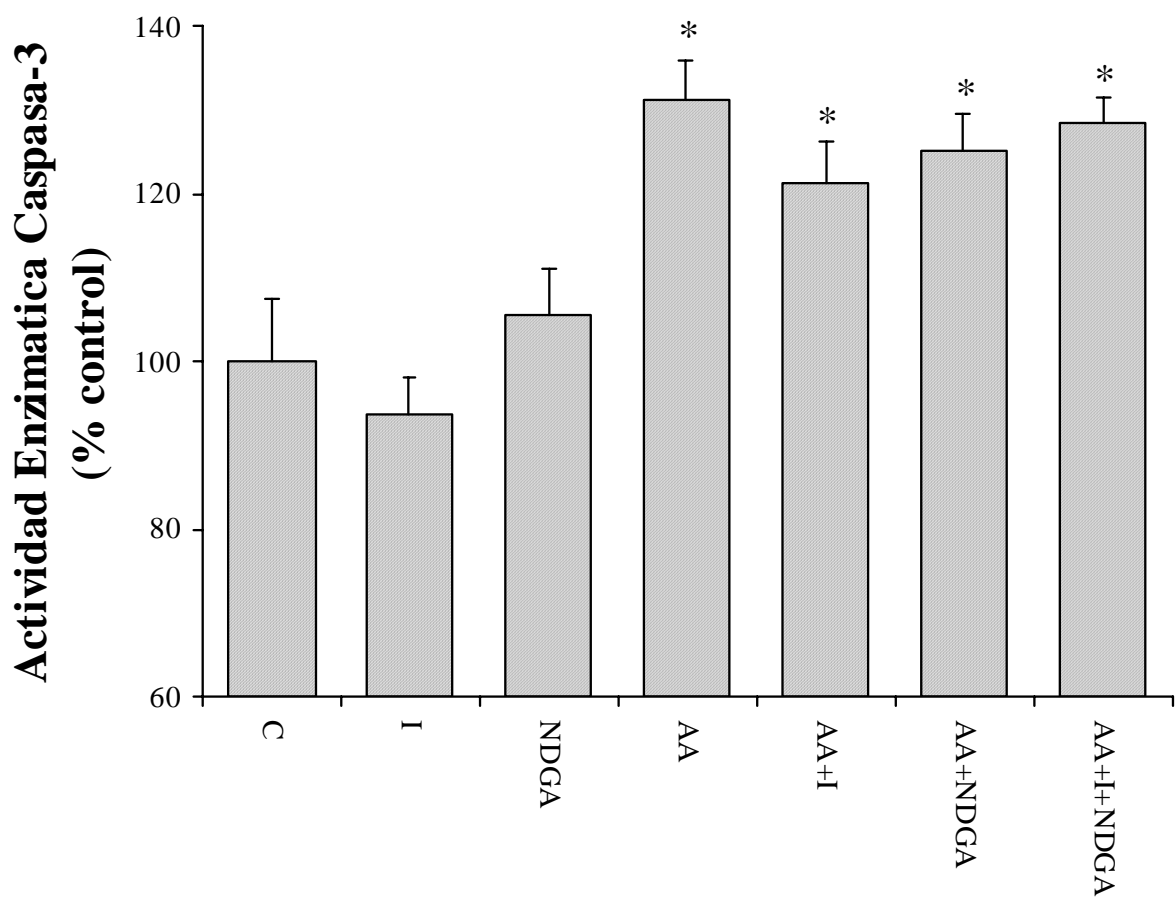


Figura 16. Efecto del bloqueo del metabolismo del AA en la activación del enzima proteolítico caspasa-3 en neuronas de médula espinal. Los cultivos neuronales se trataron indometacina ó ácido nordihidroguanirético 30 minutos antes de la adición de AA 10 μ M durante 12 horas. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el grupo control

La activación de receptores nicotínicos disminuye la liberación de citocromo c de la mitocondria causada por el tratamiento con AA

La liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma puede ser usado como medida de la disfunción mitocondrial asociada con la aparición de apoptosis. Asimismo, la presencia de citocromo c en el citoplasma está directamente relacionada con la activación de caspasa-9. Por lo tanto, se determinaron los niveles citoplasmáticos de citocromo c en neuronas de médula espinal tratadas con AA usando la técnica de western blot (Fig. 17A). Adicionalmente, en la Fig. 17B se muestra la cuantificación estadística de los resultados de estos experimentos, mediante medidas densitométricas. Como se puede observar, los niveles más elevados de citocromo c se encontraron en aquellos cultivos neuronales tratados con AA durante 4 horas, y dicho efecto continuó existiendo tras 8 horas de tratamiento. Mientras que la adición de nicotina a cultivos normales no tuvo ningún efecto en la liberación de citocromo c, la activación de los receptores nicotínicos previa a la adición de AA disminuye el efecto producido por dicho ácido graso (muestra 4 en comparación con muestra 3, Fig. 17A y 17B).

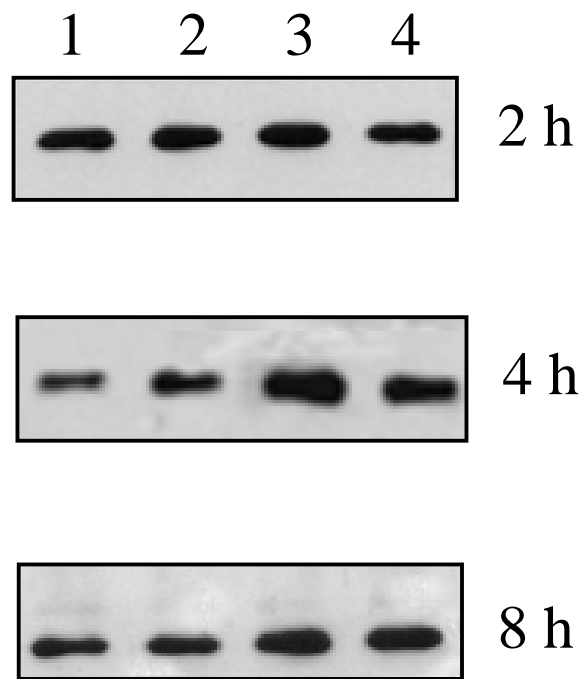


Figura 17(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en la liberación de citocromo c en neuronas de médula espinal, determinado mediante experimentos de western blot. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA durante 2, 4 y 8 horas. 1, control; 2, tratamiento con nicotina; 3, tratamiento con AA; 4, neuronas tratadas con nicotina antes de la adición de AA.

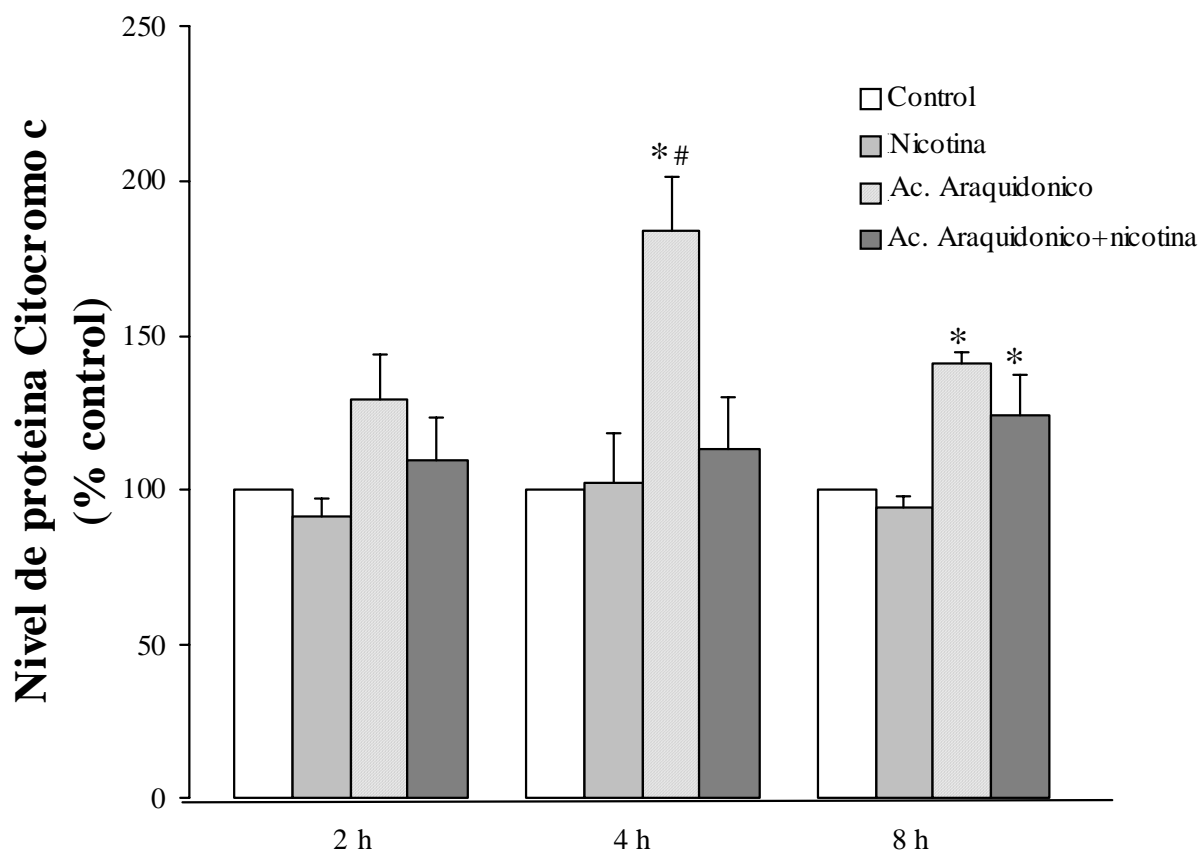


Figura 17(B). Tratamiento estadístico del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la proteína citocromo c, correspondiente a distintos experimentos. Los resultados se expresaron como valor medio±error medio.

* Significativamente diferente en comparación con el respectivo grupo control

Significativamente diferente en comparación con el grupo AA+nicotina

Los niveles de proteína Bcl-2 no se ven alterados por el tratamiento con AA y/ó nicotina en neuronas de médula espinal

La activación de caspasas está regulada por diversos mecanismos celulares, entre los que se encuentra la modulación de los niveles de proteína Bcl-2 como uno de los principales y más estudiados. Por este motivo, se determinaron los niveles de Bcl-2 en cultivos neuronales de médula espinal tratados con AA y nicotina, utilizando la técnica de western blot. Como control positivo se utilizó un lisado de células Jurkat. Como se indica en las Fig. 18A y 18B, los niveles de Bcl-2 no se vieron alterados por ninguno de estos tratamientos en los diferentes tiempos estudiados (1, 3, y 6 horas). Estos resultados sugieren que las alteraciones de los niveles de Bcl-2 no se encuentran entre los mecanismos regulados por el tratamiento con AA ó por la activación de receptores nicotínicos.

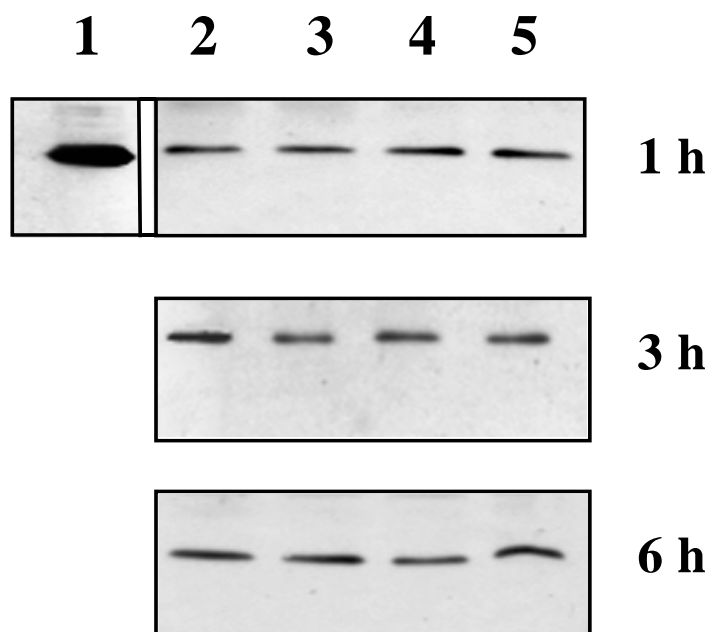


Figura 18(A). Efecto del tratamiento con AA y nicotina en los niveles de proteína Bcl-2 en neuronas de médula espinal, determinado mediante experimentos de western blot. Los cultivos neuronales se trataron con nicotina 10 μ M durante 2 horas, previas a la adición de AA durante 1, 3 y 6 horas. 1, control; 2, tratamiento con nicotina; 3, tratamiento con AA; 4, neuronas tratadas con nicotina antes de la adición de AA.

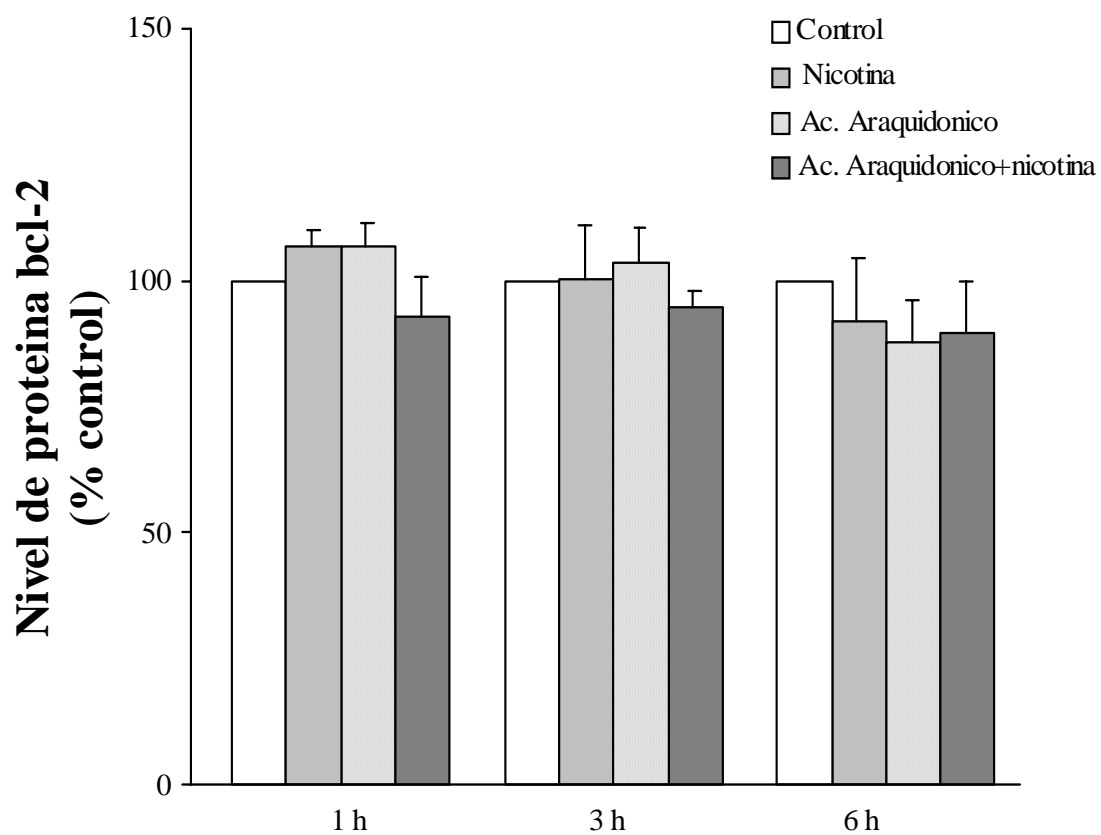


Figura 18(B). Tratamiento estadístico del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la proteína citocromo c, correspondiente a distintos experimentos. Los resultados se expresaron como valor medio \pm error medio.

DISCUSIÓN

Estudios clínicos y observaciones experimentales apoyan el concepto de daño secundario en la médula espinal como consecuencia de los mecanismos bioquímicos activados tras la lesión inicial, que contribuyen a la extensión del trauma. Las consecuencias iniciales del trauma en médula espinal y su relación patológica con la degeneración neuronal no han sido totalmente establecidas (Lipton, 1993; Winkler *et al*, 1998). El estudio de los mecanismos que regulan los fenómenos que se producen tras la lesión física, y el conocimiento detallado de las reacciones celulares que ocurren tras el trauma son de importancia crítica, ya que pueden permitir intervención clínica para intentar disminuir las consecuencias de la lesión.

Tras el insulto físico, despolarización y aumento de la concentración intracelular de calcio llevan a la activación de multitud de procesos que se saben relacionados con la expansión del proceso degenerativo, como la activación de fosfolipasas, fosfatasa, endonucleasas, alteraciones mitocondriales y degeneración axonal. La activación de fosfolipasas, ya sea por estimulación mecánica ó mediada por calcio, produce la liberación de ácidos grasos de las membranas celulares.

Debido a la composición de la membrana, el AA (5,8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico) es el principal ácido graso liberado por la acción de las fosfolipasas (Bazán, 1970). En condiciones normales, el AA se encuentra presente en muy bajas concentraciones, sin embargo, tras el trauma, las concentraciones de ácido graso libre aumentan dramáticamente, llegando a alcanzar concentraciones locales de hasta 200 μM (Dhillon *et al*, 1994). En este estudio, la concentración de AA utilizado fue de 10 μM , que puede corresponder con concentraciones de este ácido graso presentes en tejido afectado. En apoyo de un efecto específico del AA, concentraciones similares de otros ácidos grasos no han mostrado afectar la viabilidad celular en el mismo cultivo neuronal (Toborek *et al*, 1999).

Modelos utilizados en el estudio del trauma en médula espinal

Las limitaciones que presentan algunas de las técnicas fotográficas utilizadas hacen que el estudio del trauma en la médula espinal humana sea complicado. Por ello, se ha hecho necesario el uso de modelos animales experimentales que permitan comprender la patología de esta condición. Sin embargo, ninguno de los modelos animales utilizados puede simular con exactitud las condiciones que se producen tras la lesión en la médula espinal humana, ya que ésta es el resultado de varios tipos de insultos físicos y mecánicos que van a ser los que determinen las consecuencias de la lesión, y que normalmente varían para cada caso individual. Por otro lado, la mayoría de las técnicas usadas para producir la lesión en animales producen una compresión posterior de la médula, mientras que en el caso de los humanos el trauma es principalmente anterior.

Existen principalmente dos modelos experimentales de trauma en médula espinal que han sido utilizados extensamente para estudiar las consecuencias de la lesión. Aunque algunos modelos usados en experimentos previos resultaron en la caracterización de algunos de los cambios histológicos y neurológicos que se producen, el primer modelo que permitió la cuantificación de la severidad del trauma fue introducido por Allen en 1911, dejando caer un peso determinado sobre la médula espinal expuesta en la región torácica. Este modelo puede reproducir distintas condiciones mediante la variación del peso y de la altura desde donde éste se deja caer. La magnitud de la lesión se expresa en gramos x centímetro. A pesar de su aceptación generalizada, este modelo presenta algunas desventajas, entre ellas, la principal es que la energía de la contusión no puede ser expresada correctamente en gramos x centímetro, ya que dos lesiones correspondientes al mismo producto peso x altura pueden conferir una energía de contusión muy diferente.

El segundo modelo más utilizado es el modelo de compresión con pinza, utilizando una pinza de aneurisma Kerr-Lougheed modificada, introducido por Rivlin y Tator en 1978. Este modelo asemeja la compresión circunferencial de la médula que se produce tras el trauma, y permite medir la intensidad de la lesión. Como principal desventaja, la médula necesita ser manipulada más extensamente que en otros métodos, lo que puede modificar sustancialmente los resultados experimentales.

Otros modelos experimentales utilizados son el modelo de compresión estática, en el que determinados pesos se sitúan directamente sobre la médula durante cierto tiempo, y el modelo de compresión introducido por Tarlov en 1953, usando perros como animales de experimentación, y que más adelante fue modificado para su uso en monos y ratas. Este método consiste en la introducción de un globo hinchable en el espacio extradural para producir la lesión. La principal desventaja de este método es la dificultad de su uso en animales pequeños, así como la imposibilidad de cuantificar la presión inducida.

Todas estas observaciones llevan a la conclusión de que los modelos de experimentación en animales solamente pueden simular algunas de las condiciones que se producen en el trauma humano, y durante las dos últimas décadas, un número creciente de nuevos modelos animales han tratado de reproducir distintos aspectos de la patología de la lesión en humanos. Aunque todos estos modelos tratan de establecer las condiciones de modo que se asemejen lo más posible a las condiciones del trauma humano, existen algunos factores que no se han podido controlar, como la influencia de la edad, sexo, ó la presencia de otras patologías previas (hipertensión, enfermedades vasculares). Por otro lado, mientras que la mayoría de las lesiones en humanos se producen sin contacto directo de la médula con el agente físico causante de la lesión, la mayoría de los modelos experimentales requieren que el trauma se produzca directamente sobre la médula expuesta.

Cada uno de los modelos animales presenta sus propias ventajas y desventajas, y, en general, la complejidad del sistema puede resultar en un difícil acceso al tejido ó tipo celular de interés. En contraste, los modelos *in vitro* permiten el control preciso de las condiciones del entorno extracelular, acceso al tejido ó células objeto de estudio, y menores costes asociados. Distintos modelos de experimentación *in vitro* han sido desarrollados, tratando de simular el trauma mediante la exposición directa de las células a compresión, presión hidrostática, ó estrechamiento. Para ello, se han usado diferentes tipos de cultivos celulares, desde líneas celulares inmortalizadas a cultivos primarios y organotípicos (Morrison *et al*, 1998). De entre todos ellos, el uso de cultivos celulares primarios se presenta como el más ventajoso. Los cultivos celulares primarios, aunque difíciles de mantener, permiten conservar características moleculares y bioquímicas

similares a los modelos en animales, al mismo tiempo que permiten el estudio de un tipo celular determinado ó de toda una población celular heterogénea.

Papel del AA en la aparición de estrés oxidativo y muerte celular

Tras el trauma inicial, la movilización de AA de las membranas celulares puede producir la activación de diversos procesos degradativos, como peroxidación lipídica y producción de radicales libres (Hall, 1989; Evans, 1993). Evidencia previa indica que peroxidación de la membrana está relacionada con lesiones del SNC (Demediuk *et al*, 1985; Saunders y Horrocks, 1987). Por sus características de ácido graso poliinsaturado, el AA puede ser atacado por radicales libres, lo que puede resultar en la formación de diferentes peróxidos lipídicos (Hall, 1993). Estos compuestos son especies altamente reactivas que pueden atacar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos celulares. En particular, los peróxidos lipídicos pueden interaccionar con membranas celulares produciendo la oxidación de receptores y otras proteínas de membrana. Por otro lado, pueden producir una reacción en cadena mediante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que no habían sido liberados inicialmente de las membranas celulares.

El AA puede ser metabolizado por acción de lipooxigenasa y ciclooxigenasa, dando lugar a la síntesis de eicosanoides, prostagandinas, leucotrienos y tromboxanos. Distintas prostaglandinas han sido implicadas en varias respuestas patológicas y fisiológicas en el cerebro (Bazán *et al*, 1995). En lesiones de la médula espinal se han encontrado niveles elevados de prostaglandinas (Sharma *et al*, 1993), y aunque éstas se suponen relacionadas con la regulación de microcirculación y permeabilidad vascular, poco se conoce de su mecanismo de acción. Además de la producción de eicosanoides, el metabolismo del AA a través de estas rutas bioquímicas puede llevar al aumento de los niveles de metabolitos intermediarios, especies oxidadas relativamente inestables como el radical libre araquidonilo y ciertos hidroperoxiácidos, capaces de reaccionar con radicales libres llevando a la formación de nuevos compuestos oxidados (Tsai *et al*, 1998; Khaselev y Murphy, 2000). De acuerdo con algunos experimentos adicionales realizados, se puede concluir que los productos metabólicos del AA parecen no tener influencia en el efecto observado producido por este ácido graso en neuronas de médula espinal, ya que el bloqueo de las rutas correspondientes no disminuye la toxicidad del AA. En apoyo del

papel crítico de los derivados oxidados del AA como responsables, al menos en parte, de su efecto tóxico, existe evidencia previa a favor del efecto protector que ejercen algunas sustancias antioxidantes, como es el caso de Ebselen, en un modelo de trauma en médula espinal causado por el tratamiento con AA (Malecki *et al*, 2000). Estos estudios sugieren la implicación de procesos de peroxidación lipídica en el efecto tóxico del AA. En apoyo de esta teoría, se ha descubierto que hidroperoxiácidos (HPETE), productos procedentes de la oxidación del AA, pueden causar disfunción celular en células del músculo liso (Rao *et al*, 1996) y en células de retinoblastoma (Vento *et al*, 2000). Varios HPETE, principalmente 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE, han sido relacionados con la regulación de los niveles de calcio mitocondrial (Reynaud y Pace-Asciak, 1997) y con la inhibición de la bomba Na,K-ATPasa neuronal (Silverman y Drazen, 1999). De manera similar, el ácido epoxieicosatetranoico (EET), otro derivado de la oxidación del AA, ha sido relacionado con la modificación de los niveles de calcio intracelular (Mombouli *et al*, 1999, Wu y Cederbaum, 2000). Conocidos productos de peroxidación del AA, como HNE, han mostrado similares efectos neurotóxicos *in vitro*, produciendo muerte celular mediante un mecanismo de acción que parece estar relacionado con la disfunción mitocondrial, alteraciones de los transportadores de glucosa y glutamato, reducción de la actividad acetilcolina transferasa, y apoptosis (Pedersen *et al*, 1999). El aumento de los niveles de HNE ha sido observado tras el tratamiento de neuronas de médula espinal con AA (Malecki *et al*, 2000).

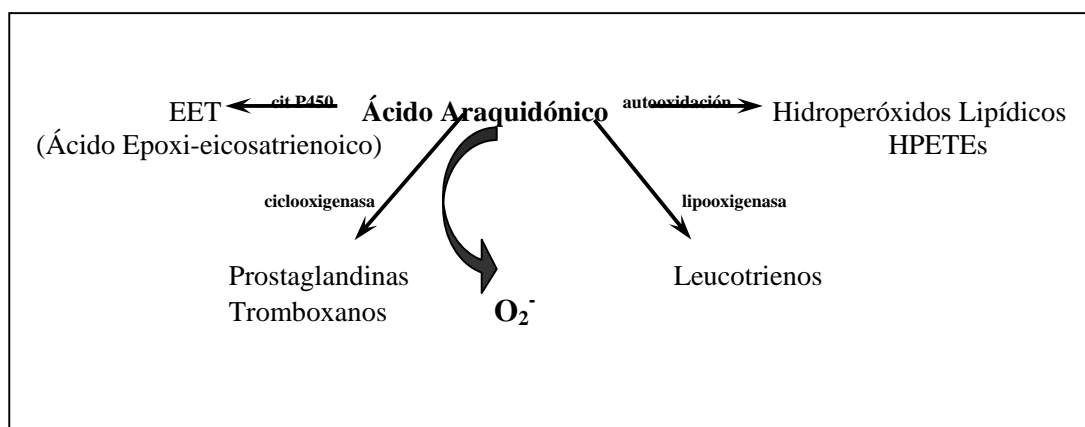


Figura 1. Esquema de los mecanismos de degradación del AA

Mecanismos responsables de la alteración energética, disfunción mitocondrial y apoptosis inducidos por el AA

Este estudio demuestra que el tratamiento con AA puede disminuir la viabilidad neuronal e incrementar la disfunción mitocondrial, de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de liberación de LDH, medida de los niveles de ATP, y conversión del sustrato MTT. El enzima lactato deshidrogenasa es liberado al medio por células que han perdido la integridad de su membrana, y por lo tanto este parámetro normalmente indica la incidencia de necrosis. Los niveles de ATP se han propuesto como indicadores del tipo de mecanismo de muerte celular en proceso, de modo que niveles relativamente bajos de ATP indican la presencia de necrosis, mientras que niveles relativamente similares a los niveles normales pueden garantizar la síntesis de determinadas proteínas necesarias durante el proceso de apoptosis (Leist *et al*, 1997; Nicotera *et al*, 1998). La concentración específica de ATP necesaria para distinguir entre apoptosis y necrosis es objeto de discusión, y es probable que varíe para distintos tipos celulares. En el presente estudio, el tratamiento con AA es capaz de disminuir la conversión de MTT, indicando una disminución de la función mitocondrial. Además de esto, se produce una disminución de los niveles de ATP, y un aumento de la liberación de LDH.

Aunque estos datos parecen implicar la incidencia de necrosis tras el tratamiento con AA, experimentos posteriores revelan la presencia de apoptosis en este modelo. Al ser examinados, mecanismos específicos característicos de apoptosis, como por ejemplo la activación de caspasas y la condensación de cromatina, pueden ser observados claramente en las neuronas de médula espinal tratadas con AA. Es posible que el mismo insulto pueda dar lugar a distintas formas de muerte celular en un mismo sistema. De hecho, la coexistencia de apoptosis y necrosis en el mismo sistema ha sido observada previamente, y se ha propuesto que apoptosis y necrosis son sólo casos extremos de una gran cantidad de estados de muerte celular intermedios que pueden presentar características bioquímicas y fisiológicas apoptóticas y necróticas (Leist y Nicotera, 1998).

Evidencia previa indica que el fenómeno de apoptosis juega un papel crítico en la progresión del trauma en médula espinal. Por ejemplo, apoptosis ha sido definida como

una prominente alteración patológica en el trauma en médula espinal en humanos (Emery *et al*, 1998). En un modelo experimental de trauma en médula espinal, se observaron incrementos dramáticos de los niveles de actividad de caspasa-3 y de fragmentación del DNA 1 y 4 horas, respectivamente, tras el trauma. Por otro lado, aumentos en la actividad de caspasa-9 han sido observados sólo 30 minutos tras el trauma (Springer *et al*, 1999). La presencia de apoptosis en regiones del tubo neuronal alejadas del lugar inicial de la lesión se cree responsable en parte por los efectos de la lesión a largo plazo. Parece ser que el fenómeno de apoptosis no solamente afecta a neuronas (neuronas motoras e interneuronas) (Lawson y Lowry, 1998), sino también a astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Shuman *et al*, 1997). En experimentos de contusión severa en roedores, el estadio apoptótico más avanzado se ha observado tres días después del trauma (Yong *et al*, 1998). Aunque parece evidenciarse como cierta la posible presencia de apoptosis tras lesiones de la médula espinal, los mecanismos específicos que llevan a su aparición no han sido caracterizados totalmente. Este estudio sugiere que la liberación de AA puede ser responsable en parte de la activación de este proceso.

Aunque la aparición de apoptosis tras el tratamiento con AA ha sido observada en otros sistemas celulares, las rutas específicas activadas no han sido caracterizadas. En este estudio, el AA es capaz de inducir apoptosis a través de la liberación de citocromo c y de la activación de diferentes caspasas. En general, se ha descrito la existencia de dos rutas principales que llevan a la activación de caspasas. La primera ruta implica la activación de receptores miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Peter *et al*, 1997). La unión del ligando correspondiente provoca la multimerización del receptor y la posterior unión de la proteína FADD (“Fas-associating death domain”). Esta proteína, a través de su dominio DED (“death efector domain”), puede unirse al proenzima procaspasa-8, resultando en su hidrólisis y consiguiente activación. La activación de la segunda ruta no está mediada por receptor, sino que está relacionada con la inducción de disfunción mitocondrial (Krippner *et al*, 1996). La disfunción mitocondrial puede llevar a la liberación de citocromo c al citoplasma, donde puede unirse a dATP y Apaf-1 (factor activador de apoptosis-1), provocando la activación de caspasa-9 (Zou *et al*, 1997). En el mecanismo mediado por receptor, caspasa-8 parece actuar como el enzima inicial que promueve la activación de los otros

miembros de esta familia, mientras que en el mecanismo mitocondrial, la activación de caspasa-9 puede dar lugar a la activación secuencial de otras caspasas. Aunque es posible que diferentes estímulos determinen la activación de uno u otro mecanismo, la activación simultánea de caspasa-8 y caspasa-9 tras el mismo estímulo ha sido descrita previamente (Zhuang y Simon, 2000), lo que sugiere que ambas rutas pueden estar interrelacionadas. De hecho, se ha propuesto que los niveles de caspasa-8 pueden determinar la implicación del mecanismo mitocondrial, de modo que niveles elevados de caspasa-8 pueden ser suficientes para la activación de otras caspasas, sin necesidad de la liberación de citocromo c de la mitocondria (Kuwana *et al*, 1998). Dado que se sabe que las células neuronales expresan niveles relativamente bajos de caspasa-8, en comparación con otras células, esta teoría puede explicar la activación tanto de caspasa-8 como de caspasa-9 tras el tratamiento con AA. Además, el hecho de que la activación de caspasa-8 ocurra previamente a la activación de caspasa-9 también está de acuerdo con esta teoría.

Varios mecanismos regulatorios capaces de modular la activación de caspasas han sido descritos, y, entre ellos, la producción de Bcl-2 ha sido probablemente el más estudiado. Bcl-2 pertenece a una amplia familia de proteínas relacionadas con la estimulación ó inhibición de caspasas (Merry y Korsmeyer, 1997). Bcl-2 se encuentra localizada en mitocondria, membrana nuclear y membrana del retículo endoplásmico, y su mecanismo específico de acción aún no ha sido caracterizado. Se ha propuesto que este mecanismo puede implicar procesos de dimerización e interacción con otros miembros de la misma familia de proteínas (Oltvai *et al*, 1993). Aunque varios estudios han detectado que la sobre-expresión de Bcl-2 tiene efectos protectores tras el trauma en médula espinal ó tras el tratamiento con AA en otros tipos de células (Chen *et al*, 1997; Springer *et al*, 1999), en este estudio no se han detectado cambios en los niveles de Bcl-2 tras el tratamiento con nicotina ó con AA. Sin embargo, no se puede eliminar la posibilidad de que otros miembros de la familia de proteínas a la que pertenece Bcl-2 estén implicados en la activación de apoptosis mediada por AA, ó en el efecto protector observado tras la activación de receptores nicotínicos.

Mecanismos implicados en la regulación de NOS mediada por AA

Para determinar los posibles mecanismos implicados en la manifestación del efecto tóxico ejercido por el AA, se estudió la producción de NO. En condiciones normales, NO actúa como un importante neurotransmisor en el sistema nervioso, relacionado con la liberación de otros neurotransmisores, potenciación a largo plazo y depresión (Snyder y Bredt, 1991; Zinder, 1992; Schuman y Madison, 1994). Sin embargo, la excesiva producción de NO se ha propuesto como uno de los principales factores neurotóxicos implicados en el desarrollo de distintas patologías, entre ellas, trauma en la médula espinal (Sharma *et al.*, 1996). NO es producido por el enzima NOS en la conversión de L-arginina en L-citrulina. De las tres isoformas cuya presencia ha sido caracterizada en el sistema nervioso, dos de ellas (endotelial y neuronal) son expresadas constitutivamente y su actividad está regulada por los niveles de calcio. La tercera isoforma (inducible) solamente se expresa durante estados patológicos, y su actividad no se ve modulada por calcio.

NO ha sido relacionado con diversos efectos en el sistema nervioso (Gross y Wolin, 1995; Schulz y Wambolt, 1995). Se ha sugerido que la mayoría de los efectos tóxicos que puede tener el NO son debidos a la producción del radical libre peroxinitrito, en su reacción con O_2^- (Lipton, 1993). Peroxinitrito es un radical libre extremadamente potente, capaz de inducir oxidación por sí mismo, ó mediante la producción de $OH\cdot$ (el radical libre más dañino) a través de su descomposición,



La extremada reactividad del peroxinitrito y de sus derivados sugiere que este mecanismo es fundamental en la patología asociada con la producción de NO.

Este estudio muestra que el tratamiento con AA es capaz de aumentar la producción de NO y la actividad de NOS. Para la determinación de la isoforma(s) responsable del observado aumento de la actividad enzimática, se llevaron a cabo distintos experimentos con inhibidores selectivos de las isoformas inducible y neuronal. Los resultados muestran que sólo la inhibición de la isoforma neuronal es capaz de contrarrestar el efecto del AA. Por tanto, se puede concluir que el AA produce un

aumento de la producción de NO mediante la regulación específica de la isoforma neuronal de NOS. El AA parece modular este enzima incluso a nivel transcripcional, modificando su expresión y la producción de esta proteína, como demuestran los resultados obtenidos en experimentos de western blot y RT-PCR.

Mecanismos neuroprotectores implicados en la activación de los receptores

nicotínicos

En el sistema objeto de estudio, la concentración de nicotina usada para la activación de los receptores nicotínicos se fijó en 10 μ M, dado que esta concentración ejerció el máximo efecto protector en los cultivos neuronales. El pretratamiento con nicotina al menos dos horas antes de la adición de AA parece ser necesario para observar la presencia de dicho efecto protector, como lo demuestran varios experimentos en los que la adición de nicotina no tuvo ningún efecto cuando se realizó al mismo tiempo ó tras el tratamiento con AA. La necesidad de pretratamiento sugiere la existencia de mecanismos de transducción de señales aún no identificados, cuya activación es necesaria para proteger a las células contra la acción del AA.

Para la determinación del papel de receptores nicotínicos específicos en el efecto protector ejercido por el tratamiento con nicotina, se llevaron a cabo experimentos con α -bungarotoxina y mecamilamina. Mientras que mecamilamina actúa bloqueando el receptor de modo inespecífico (Banerjee 90), α -bungarotoxina es un antagonista específico del receptor nicotínico α_7 (Couturier *et al*, 1990). El estudio detallado del papel de los receptores α_7 está justificado por la existencia de estudios previos en los que se señala la habilidad de este receptor para estimular la supervivencia de neuronas motoras de médula espinal, y para proteger neuronas corticales contra la acción del glutamato (Kaneko *et al*, 1997; Messi *et al*, 1997). El receptor α_7 presenta además ciertas características que lo hacen objeto de estudio detallado; a diferencia de otros tipos de receptores, contiene más de dos sitios de unión para el ligando por molécula, presenta una permeabilidad por calcio mayor que cualquiera de los otros receptores (la relación de permeabilidad $P_{Ca}:P_{Na}$ es 20 para el receptor α_7 , 1.5 para otros receptores neuronales, Seguela *et al*, 1993), y presenta mayor selectividad por nicotina que por el ligando natural, acetilcolina (Seguela *et al*, 1993, Patrick *et al*, 1993). Además, los receptores α_7

han sido implicados en procesos de liberación de neurotransmisores, regulación del crecimiento neuronal y de supervivencia (Pugh y Berg, 2000). Ya que se han establecido elevados niveles de permeabilidad para el calcio en este receptor (algunos estudios le atribuyen mayor selectividad para calcio que a los receptores NMDA), es posible que la activación de los receptores α_7 esté implicada en los mecanismos que llevan a la regulación de la expresión génica observada tras el tratamiento con nicotina. En diferentes ensayos de viabilidad celular, α -bungarotoxina mostró propiedades antagonistas del efecto mediado por nicotina, pero mientras que el bloqueo fue total en la recuperación de los niveles de ATP, la adición de α -bungarotoxina sólo pudo contrarrestar parcialmente la recuperación de los niveles de funcionalidad mitocondrial. De modo similar, los antagonistas del receptor son capaces de inhibir el efecto de la nicotina en experimentos de activación de caspasas y fragmentación del DNA. La extensión del bloqueo se mostró diferente al llevar a cabo medidas de distintos parámetros, lo que sugiere un papel complejo de los receptores nicotínicos en el efecto protector mediado por nicotina. Por otro lado, es posible que otros receptores nicotínicos no estudiados estén implicados en mediar la acción de la nicotina.

En todos los experimentos realizados, el pretratamiento con nicotina se mostró capaz de bloquear el efecto del AA, recuperando la función mitocondrial, los niveles de ATP, y disminuyendo la liberación de LDH. Estudios previos sugieren la existencia de efectos protectores tras la activación de receptores nicotínicos en distintas formas de neurotoxicidad; por ejemplo, el tratamiento con nicotina es capaz de proteger a neuronas corticales contra los efectos de glutamato (Kaneko *et al*, 1997), del péptido β -amiloide (Kihara *et al*, 1998) y del aumento de calcio intracelular (Kaneko *et al*, 1997). La activación de receptores nicotínicos también se ha mostrado protectora, promoviendo la supervivencia de neuronas motoras de médula espinal (Messi *et al*, 1997). En adición, el tratamiento con nicotina parece aminorar los síntomas de algunas enfermedades degenerativas, como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Brenner *et al*, 1993; Ishikawa y Miyatake, 1993).

Cuando los cultivos neuronales fueron tratados con nicotina, se observaron descensos en los niveles de NO, y de la actividad de NOS neuronal. Al igual que en el caso de los ensayos de viabilidad celular, la activación de los receptores nicotínicos

parece ser necesaria para la observación de la influencia de nicotina en la regulación de NOS neuronal. Por tanto, aunque los mecanismos responsables del efecto protector observado tras el tratamiento con nicotina no se conocen en detalle, se puede especular que están relacionados con la regulación de NOS neuronal. De hecho, niveles elevados de NO han sido relacionados con la presencia de apoptosis no sólo en neuronas (Sastry y Rao, 2000), sino también en sistema inmune (Brune *et al*, 1997) y endotelio (Dart y Chindusting, 1999). Por tanto, es posible que los efectos anti-apoptóticos del tratamiento con nicotina estén relacionados con su capacidad para disminuir la producción de NO.

El tratamiento con nicotina y la activación de receptores nicotínicos presentan efectos anti-apoptóticos en neuronas de médula espinal tratadas con AA, posiblemente mediante el bloqueo de la activación de diferentes caspasas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos tras el estudio del efecto del tratamiento con nicotina en el mantenimiento de la función mitocondrial. La recuperación de la función mitocondrial observada tras la adición de nicotina en cultivos neuronales de médula espinal tratados con AA puede estar relacionada con la disminución de la liberación de citocromo c y por tanto de la activación de caspasa-9 en cultivos tratados con nicotina. De hecho, el tratamiento con nicotina ha mostrado su capacidad de inhibición de apoptosis en diversas líneas celulares. Sin embargo, estudios previos realizados parecen ofrecer conclusiones contradictorias, y parece que el tratamiento con nicotina puede promover ó inhibir apoptosis dependiendo de la línea celular y de la etapa del desarrollo del sistema estudiado. Por ejemplo, el tratamiento con nicotina parece inducir apoptosis en células progenitoras de hipocampo y en células cerebrales en etapas tempranas del desarrollo (Berger *et al*, 1998; Slotkin *et al*, 1997). En contraste, efectos anti-apoptóticos tras el tratamiento con nicotina pueden ser observados en una variedad de líneas celulares tumorales (Wright *et al*, 1993; Heusch *et al*, 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes estudios previos que señalan las posibles propiedades anti-apoptóticas de la activación de los receptores nicotínicos. Heusch *et al*. (1998) propuso que dicho efecto puede estar mediado por la activación de las rutas bioquímicas relacionadas con la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK), en concreto mediante la activación de ERK-2. Estas rutas bioquímicas parecen tener un papel crítico en la transducción de señales y en la

regulación de la expresión génica necesaria para el control del crecimiento celular y de apoptosis. Además de la posible relación de este mecanismo con los efectos del tratamiento con nicotina, existen estudios previos que indican que el mecanismo de acción del AA también puede estar relacionado con estas rutas, mediante la inducción de MAPK fosfatasa-1 (MKP-1), una proteína inhibidora de las rutas bioquímicas relacionadas con MAPK (Metzler *et al*, 1998).

Investigaciones previas indican que el tratamiento con AA puede producir un aumento de los niveles de calcio intracelular en neuronas de médula espinal. Aunque el aumento incontrolado de los niveles de calcio se supone como uno de los principales mecanismos que llevan a la muerte celular, variaciones controladas de la concentración de calcio citoplasmático son capaces de regular una gran variedad de procesos celulares relacionados con el control del crecimiento celular, diferenciación celular, y plasticidad sináptica en neuronas.

En muchos casos, el mismo mecanismo inducido por la alteración de los niveles de calcio se ha demostrado que puede conducir a la proliferación celular ó a apoptosis, sugiriendo que el control de los niveles de calcio es crítico para la determinación del estado de la célula. La activación de los receptores nicotínicos puede promover la entrada de calcio al citoplasma, a través del canal iónico del receptor (los receptores nicotínicos neuronales presentan mayor selectividad por calcio que por sodio, en comparación con los receptores musculares), y también a través de la estimulación de canales de membrana regulados por voltaje. El tratamiento con nicotina ha sido asociado con fenómenos regulados por calcio, como la modulación de proteínas kinasas y fosfatasas, y la activación de otros canales de membrana, algunos de los cuales están relacionados con la regulación de la expresión génica. El mecanismo concreto por el cual la activación de receptores nicotínicos, y también de otros receptores ionotrópicos, puede afectar al programa genético se desconoce, pero podría estar relacionado con la regulación del metabolismo del calcio.

Estudios previos indican la posibilidad de que la activación de receptores nicotínicos pueda regular la expresión de los denominados genes de inducción temprana. Estos genes expresan proteínas que actúan como factores transcripcionales, regulando la expresión de gran número de genes. El factor nuclear kB (NF-kB) y la proteína

activadora 1 (AP-1) se encuentran entre los genes tempranos más conocidos, capaces de regular la expresión de otros genes implicados en procesos regulatorios del ciclo celular y de supervivencia en diferentes tipos de células. El aumento en la expresión de c-fos, junB y c-jun (subunidades miembros de la familia de proteínas que forma el complejo conocido como AP-1) ha sido descrito tras el tratamiento con nicotina en células del ganglio cervical superior (Bartel *et al*, 1989; Kostinaho *et al*, 1993). La activación de estos genes lleva a la producción de proteínas que son capaces de dimerizar y actuar como factores transcripcionales, uniéndose a secuencias regulatorias específicas, principalmente secuencias AP-1, presentes en la región regulatoria de muchos genes. La regulación del factor AP-1 se supone crítica en distintas patologías del sistema nervioso, tales como trauma, isquemia, y enfermedades crónicas como Parkinson y Alzheimer. Por otro lado, el factor AP-1 parece estar relacionado con la regulación de procesos oxidativos en distintos tipos de células (Iwata *et al*, 1997, Gius *et al*, 1999).

Aunque la implicación de la regulación de genes tempranos se ha demostrado en diferentes condiciones patológicas, los genes afectados posteriormente no han sido descubiertos en la mayoría de los casos. Estudios previos sugieren que los genes que codifican neurotrofinas (ó factores neurotróficos) y tiroxina hidroxilasa pueden estar entre los genes afectados por la activación de los receptores nicotínicos (Kostinaho *et al*, 1993, French *et al*, 1999). Niveles elevados de tiroxina hidroxilasa, enzima limitante de la expresión de catecolaminas, se han encontrado tras el tratamiento con nicotina en un modelo experimental de Parkinson (Maggio *et al*, 1998), y los efectos neuroprotectores ejercidos por el aumento de la transmisión sináptica son bien conocidos. Por otro lado, la capacidad de las neurotrofinas para promover la supervivencia celular y para rescatar a las células tras trauma isquémico ó hipóxico, ha suscitado un gran interés en el campo de investigación del neurotrauma (Frisen *et al*, 1992; Samdani *et al*, 1997). Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que, en general, promueven el crecimiento y la diferenciación neuronal (Barbacid, 1995; Schwab, 1993). La mayoría de estos factores neurotróficos, al igual que sus receptores, se encuentran presentes en la médula espinal. De entre las neurotrofinas cuya expresión puede estar afectada por la activación de los receptores nicotínicos cabe destacar el factor de crecimiento nervioso (NGF), ya que ha sido el más caracterizado. De hecho, NGF, uno los factores de

crecimiento más importantes de sistema nervioso, ha sido descrito como capaz de prevenir la degeneración de neuronas colinérgicas en la médula espinal (Hagg *et al*, 1993; Henderson, 1996). Además de NGF, el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) se ha mostrado como protector de neuronas colinérgicas, aunque de modo menos potente y efectivo que NGF (Williams *et al*, 1996). Por tanto, es posible que aumentos de los niveles de estos factores de crecimiento se encuentren implicados en la acción protectora de la nicotina. En soporte del papel de las neurotrofinas en el efecto de la nicotina, evidencia previa indica que los factores neurotróficos pueden atenuar la activación de NOS en trauma en médula espinal (Sharma *et al*, 1998).

CONCLUSIONES Y ESTUDIOS FUTUROS

Conclusiones

Tras los resultados de este estudio, podemos concluir que la activación de los receptores nicotínicos puede ejercer efectos protectores contra el tratamiento con AA en neuronas de médula espinal. El efecto tóxico del AA parece no estar mediado por ninguno de sus metabolitos enzimáticos, como sugieren experimentos realizados en los que inhibidores de lipooxigenasa y ciclooxigenasa no consiguieron atenuar el efecto del AA. Puede concluirse, por lo tanto, que la toxicidad del AA es ejercida por sí mismo, y/o por alguno de sus productos de degradación no enzimática. La ineffectividad de agentes de bloqueo del metabolismo del AA contra los efectos neurotóxicos de éste ha sido descrita previamente en otros sistemas (Winkler *et al*, 2000). El mecanismo a través del cual el AA puede ejercer efectos tóxicos en neuronas de médula espinal implica la inducción de disfunción mitocondrial, el aumento de la producción de NO y la activación del proceso de apoptosis. El pretratamiento con nicotina parece ejercer su efecto protector a través de un mecanismo que implica la regulación de NOS neuronal, de la activación de caspasas, y de la liberación de citocromo c de la mitocondria. La regulación de la aparición de apoptosis parece ser el resultado final del tratamiento con nicotina en el sistema objeto de estudio. Aunque se puede proponer que este efecto está mediado al menos en parte por la activación de los receptores nicotínicos neuronales del tipo α_7 , los mecanismos detallados responsables del efecto anti-apoptótico de la nicotina están aún por descubrir, y necesitan ser estudiados en mayor detalle.

Estudios futuros

El estudio de los mecanismos que llevan a la progresión del trauma en la médula espinal tiene una relevancia significativa en el desarrollo de nuevas terapias que puedan ser aplicadas a los procesos que se producen tras la lesión. Dicho estudio ha llevado al descubrimiento de varias terapias farmacológicas que pueden tener un potencial uso en el tratamiento del trauma en la médula espinal. De entre ellas, la más frecuentemente utilizada es el tratamiento con metilprednisolona. El uso de este fármaco está basado en su habilidad para estabilizar enzimas lisosomales, inhibir la peroxidación lipídica y

prevenir la formación del edema. Sin embargo, estos efectos se consiguen con la aplicación de dosis muy elevadas que están frecuentemente relacionadas con la aparición de efectos secundarios adversos (Faden *et al.*, 1984).

Hoy en día, muchas otras alternativas están siendo estudiadas. El estudio del metabolismo del AA, peroxidación lipídica, producción de radicales libres, y la síntesis de NO se encuentran entre los mecanismos celulares que se tratan de regular con el uso de nuevos fármacos. Varios compuestos con propiedades inhibitorias del metabolismo del AA, como ibuprofeno e indometacina, mostraron efectos protectores en estudios experimentales (Hall y Wolf, 1986; Rechtman, 1992). De modo similar, terapias antioxidativas (mediante el uso de sustancias anti-oxidantes endógenas ó compuestos sintéticos) son capaces de disminuir la producción de radicales libres y la peroxidación lipídica. Neuroprotección a través de la inhibición de la formación de NO es todavía un tema controvertido, debido a la inexistencia de una relación proporcional entre la concentración de los agentes usados y el efecto conseguido, ó de una inhibición selectiva de los compuestos utilizados en estudios in vivo (Urushitani *et al.*, 1998). De acuerdo con ésto, parece evidente que el estudio de los mecanismos específicos implicados en la producción de radicales libres y en la peroxidación lipídica es crítico para el descubrimiento de nuevas terapias que sirvan para aminorar el trauma en médula espinal.

Como se deriva de las conclusiones de este proyecto, estudios futuros estarían relacionados con la investigación del metabolismo del calcio y de la regulación de los factores neurotróficos, además del uso de técnicas in vivo para intentar simular más fielmente la situación clínica. El control de los niveles de calcio parece ser un punto crítico en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, y un determinante importante en la progresión celular tras el insulto tóxico. Debido a la propiedad de los receptores nicotínicos neuronales de actuar como canales de calcio, y debido a los efectos del AA en la regulación de los niveles intracelulares de dicho ión, la caracterización de la cinética y de la magnitud de la respuesta celular tras el tratamiento con nicotina y/ó AA con respecto a la variación de las concentraciones de calcio parece tener una importancia crítica.

Como se ha mencionado anteriormente, la regulación de los factores neurotróficos en relación con el trauma en sistema nervioso ha sido objeto de un interés creciente. El

uso de neurotrofinas se perfila como una estrategia terapéutica emergente en el estudio del trauma en médula espinal bajo un punto de vista regenerativo. Aunque el uso de neurotrofinas se encuentra en una etapa puramente experimental, algunos estudios realizados hasta la fecha son prometedores. La caracterización de una posible relación entre la administración de nicotina y la regulación de factores neurotróficos puede ser de un gran interés en este modelo de trauma en médula espinal. El establecimiento de los efectos de la activación de los receptores nicotínicos en la regulación de neurotrofinas puede llevar a la identificación de rutas celulares activadas tras el tratamiento con nicotina, responsables de su efecto neuroprotector.

Otro posible mecanismo de acción del AA podría implicar su interacción con los receptores de glutamato. La liberación de aminoácidos excitatorios ocurre en etapas muy tempranas tras la lesión de médula espinal (Panter *et al.*, 1990). Los efectos tóxicos del glutamato en el sistema nervioso han sido recogidos extensamente, aunque los mecanismos detallados responsables de su toxicidad no han sido bien estudiados en detalle. En cultivo, el glutamato induce daño celular mediante la activación de los receptores de NMDA. Tras la activación de fosfolipasa A₂, la liberación de AA ha sido relacionada con la potenciación de corrientes a través del receptor NMDA (Miller *et al.*, 1992), y con la inhibición de la recaptación de glutamato en células adyacentes (Volterra *et al.*, 1992). La estimulación de los receptores de NMDA produce aumentos en la concentración intracelular de calcio que pueden promover la liberación de mayor cantidad de AA, a través de la activación de la isoforma de fosfolipasa A₂ dependiente de calcio. Sería de gran interés el determinar si el AA libre puede actuar de modo circular, aumentando la actividad de fosfolipasa A₂ tras el trauma en médula espinal. En este sentido, es interesante la teoría de que el tratamiento con nicotina puede inhibir la actividad de fosfolipasa A₂ en neuronas del estriado (Marin *et al.*, 1997). Según esta teoría, el mecanismo protector del tratamiento con nicotina frente a la acción del AA podría estar relacionado con la regulación de la actividad de fosfolipasa A₂.

Aunque nuestro sistema *in vitro* permite un control total de las condiciones experimentales en un entorno específicamente neuronal, el uso de sistemas *in vivo* parece ser una consecuencia obvia de los resultados presentados en el sistema *in vitro*. Aunque algunos estudios han caracterizado la importancia del fenómeno de peroxidación lipídica

y del metabolismo del ácido AA en animales (Farooqui *et al.*, 1999), los efectos directos del AA en trauma en médula espinal no han sido estudiados. Este nuevo enfoque puede también ayudar en la caracterización de la respuesta de células no neuronales al tratamiento con AA. *In vitro*, el tratamiento con AA ha sido relacionado con ciertas alteraciones en células de la glía (Winkler *et al.*, 2000). *In vivo*, los efectos del AA han sido asociados principalmente a la presencia de sus metabolitos. En cualquier caso, los mecanismos de acción del AA han de ser establecidos en mayor detalle.

Por otro lado, es necesario caracterizar los efectos del tratamiento con nicotina en modelos *in vivo*. Hasta ahora, los estudios realizados *in vivo* con nicotina se han limitado principalmente a la observación de los efectos en el comportamiento, tanto animal como humano. Algunos estudios realizados (Iwata *et al.*, 1994, Maggio *et al.*, 1997) sugieren un efecto protector del tratamiento con nicotina en ratas, pero los mecanismos celulares potencialmente activados se desconocen por el momento.

Tabla 1. Estrategias terapéuticas propuestas en trauma en médula espinal

Estudios clínicos
Metilprednisolona
Naxolona
Antagonistas del receptor opioide
Estudios experimentales
21-aminoesteroides
Reducción de la peroxidación lipídica
MK-801
Bloqueo de los receptores de glutamato
GM-1 gangliósido
Mecanismo desconocido. Posible participación de la regulación de la actividad de NOS, receptores NMDA y proteína kinasa
Inhibidores de NOS
Indometacina
Regulación del metabolismo del AA
Ibuprofeno
Regulación del metabolismo del AA
NOS antisuero
Nimodipina
Bloqueo de los canales de calcio
Antioxidantes endógenos, y compuestos sintéticos con actividad antioxidante (vitamina E, H290/51)
Reducción de necrosis y edema
Neurotrofinas

BIBLIOGRAFÍA

Abood L.G., Lowy K., Booth H. (1979) Acute and chronic effects of nicotine in rats and evidence for a noncholinergic site of action. *NIDA Res. Monog.r* (23):136-49.

Akaike A., Tamura Y., Yokota T., Shimohama S., Kimura J. (1994) Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* 644(2):181-7.

Anand R., Conroy W.G., Schoepfer R., Whiting P., Lindstrom J. (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 266(17):11192-8.

Anthes D.L., Theriault E., Tator C.H. (1996) Ultrastructural evidence for arteriolar vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurgery* 39(4):804-14.

Axelrod J., Burch R.M., Jelsema C.L. (1988) Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neurosci.* 11(3):117-23.

Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A., Smith T.W., Michel T. (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90(1):347-51.

Banerjee S., Punzi J.S., Kreilick K., Abood L.G. (1990) [3H]mecamylamine binding to rat brain membranes. Studies with mecamylamine and nicotine analogues. *Biochem. Pharmacol.* 40(9):2105-10.

Barbacid M. (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7(2):148-55.

Bartel D.P., Sheng M., Lau L.F., Greenberg M.E. (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* 3(3):304-13 .

Bazan N.G. Jr. (1970) Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 218(1):1-10.

Bazan N.G. (1989) Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (559):1-16.

- Bazan N.G. (1989) Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid. *Prog. Clin. Biol. Res.* (312):15-37.
- Bazan N.G., Rodriguez de Turco E.B., Allan G. (1995) Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. *J. Neurotrauma.* 12(5):791-814.
- Becker B.E., DeLisa J.A. (1999) Model Spinal Cord Injury System trends, and implications for the future. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 80(11):1514-21.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87(4):1620-4.
- Berger F., Gage F.H., Vijayaraghavan S. (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosci.* 18(17):6871-81.
- Bertrand D., Galzi J.L., Devillers-Thiery A., Bertrand S., Changeux J.P. (1993) Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90(15):6971-5.
- Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92(16):7162-6.
- Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7(4):615-24.
- Brenner D.E., Kukull W.A., van Belle G., Bowen J.D., McCormick W.C., Teri L., Larson E.B., (1993) Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology* 43(2):293-300.
- Brune B., Gotz C., Messmer U.K., Sandau K., Hirvonen M.R., Lapetina E.G., (1997) Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272(11):7253-8.
- Campbell W.B., Harder D.R., (1999) Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ. Res.* 84(4):484-8.

- Caratsch C.G., Grassi F., Eusebi F., (1992) Functional regulation of nicotinic acetylcholine receptor channels in muscle. *Ion Channels* (3):177-206.
- Changeux J.P., Bertrand D., Corringer P.J., Dehaene S., Edelstein S., Lena C., Le Novere N., Marubio L., Picciotto M., Zoli M., (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26(2-3):198-216.
- Chen Q., Galleano M., Cederbaum A.I., (1997) Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J. Biol. Chem.* 272(23):14532-41.
- Choi D.W., (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18(2):58-60.
- Cooper E., Couturier S., Ballivet M., (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350(6315):235-8.
- Couturier S., Bertrand D., Matter J.M., Hernandez M.C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M., (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5(6):847-56.
- Crow J.P., Beckman J.S., (1995) Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv. Pharmacol.* (34):17-43.
- Curati W.L., Kingsley D.P., Kendall B.E., Moseley I.F., (1992) MRI in chronic spinal cord trauma. *Neuroradiology* 35(1):30-5.
- Dart A.M., Chin-Dusting J.P., (1999) Lipids and the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 43(2):308-22.
- Dawson V.L., Dawson T.M., Bartley D.A., Uhl G.R., Snyder S.H., (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13(6):2651-61.
- Dawson V.L., (1995) Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22(4):305-8.
- Decker M.W., Brioni J.D., Bannon A.W., Arneric S.P., (1995) Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci.* 56(8):545-70.
- Demediuk P., Saunders R.D., Anderson D.K., Means E.D., Horrocks L.A., (1985) Membrane lipid changes in laminectomized and traumatized cat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82(20):7071-5.

- Devor E.J., Isenberg K.E., (1989) Nicotine and Tourette's syndrome. *Lancet* 2(8670):1046.
- Dhillon H.S., Donaldson D., Dempsey R.J., Prasad M.R., (1994) Regional levels of free fatty acids and Evans blue extravasation after experimental brain injury. *J. Neurotrauma* 11(4):405-15.
- Dolan E.J., Tator C.H., Endrenyi L., (1980) The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *J. Neurosurg.* 53(6):749-55.
- Dolan E.J., Tator C.H., (1982) The effect of blood transfusion, dopamine, and gamma hydroxybutyrate on posttraumatic ischemia of the spinal cord. *J. Neurosurg.* 56(3):350-8.
- Dragunow M., Faull R.L., Lawlor P., Beilharz E.J., Singleton K., Walker E.B., Mee E., (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* 6(7):1053-7.
- Ellis M.F., (1993) High-dose steroid therapy offers improvement in spinal cord injuries. *AACN Clin Issues Crit. Care Nurs.* 4(3):566-72.
- Emerich D.F., Zanol M.D., Norman A.B., McConville B.J., Sanberg P.R., (1991) Nicotine potentiates haloperidol-induced catalepsy and locomotor hypoactivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38(4):875-80.
- Emery E., Aldana P., Bunge M.B., Puckett W., Srinivasan A., Keane R.W., Bethea J., Levi A.D., (1998) Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 89(6):911-20.
- Evans P.H., (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* 49(3):577-87.
- Faden A.I., Jacobs T.P., Patrick D.H., Smith M.T., (1984) Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. *J. Neurosurg.* 60(4):712-7.
- Farooqui A.A., Yang H.C., Rosenberger T.A., Horrocks L.A., (1997) Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J. Neurochem.* 69(3):889-901.
- Floyd R.A., Carney J.M., (1992) Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 32 Suppl:S22-7.
- Frazier C.J, Buhler A.V., Weiner J.L., Dunwiddie T.V., (1998) Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 18(20):8228-35.

Freedman R., Coon H., Myles-Worsley M., Orr-Urtreger A., Olincy A., Davis A., Polymeropoulos M., Holik J., Hopkins J., Hoff M., Rosenthal J., Waldo M.C., Reimherr F., Wender P., Yaw J., Young D.A., Breese C.R., Adams C., Patterson D., Adler L.E., Kruglyak L., Leonard S., Byerley W., (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94(2):587-92.

French S.J., Humby T., Horner C.H., Sofroniew M.V., Rattray M., (1999) Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 67(1):124-36.

Frisen J., Verge V.M., Cullheim S., Persson H., Fried K., Middlemas D.S., Hunter T., Hokfelt T., Risling M., (1992) Increased levels of trkB mRNA and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89(23):11282-6.

Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M., Moncada S., (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172(4-5):413-6.

Garthwaite J., (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14(2):60-7.

Garthwaite J., Boulton C.L., (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57:683-706.

Gillberg P.G., Askmark H., Aquilonius S.M., (1990) Spinal cholinergic mechanisms. *Prog Brain Res.* 84:361-70.

Gius D., Botero A., Shah S., Curry H.A., (1999) Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicol. Lett.* 106(2-3):93-106.

Goff D.C., Henderson D.C., Amico E., (1992) Cigarette smoking in schizophrenia: relationship to psychopathology and medication side effects. *Am. J. Psychiatry* 149(9):1189-94.

Goldman D., Deneris E., Luyten W., Kochhar A., Patrick J., Heinemann S., (1987) Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* 48(6):965-73.

Gotti C., Fornasari D., Clementi F., (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* 53(2):199-237.

- Gray R., Rajan A.S., Radcliffe K.A., Yakehiro M., Dani J.A., (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383(6602):713-6.
- Gross S.S., Wolin M.S., (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57:737-69.
- Guo J.Z., Tredway T.L., Chiappinelli V.A., (1998) Glutamate and GABA release are enhanced by different subtypes of presynaptic nicotinic receptors in the lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* 18(6):1963-9.
- Hagg T., Rende M., Magal E., Burnham P., Oudega M., Varon S., (1993) Potential regulation by trophic factors of low-affinity NGF receptors in spinal motor neurons. *Brain Res. Bull.* 30(3-4):347-52.
- Hall E.D., Braugher J.M., (1982) Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺ + K⁺-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J. Neurosurg.* 57(2):247-53.
- Hall E.D., Braugher J.M., (1982) Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg. Neurol.* 18(5):320-7.
- Hall E.D., Braugher J.M., (1986) Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration: a review. *Cent. Nerv. Syst. Trauma* 3(4):281-94.
- Hall E.D., (1989) Free radicals and CNS injury. *Crit. Care Clin.* 5(4):793-805.
- Hall E.D., Wolf D.L., (1986) A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *J. Neurosurg.* 64(6):951-61.
- Hall E.D., (1993) Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann. Emerg. Med.* 22(6):1022-7.
- Hall E.D., (1993) The role of oxygen radicals in traumatic injury: clinical implications. *J. Emerg. Med.* 11 Suppl 1:31-6.
- Henderson C.E., (1996) Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6(1):64-70.
- Heusch W.L., Maneckjee R., (1998) Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 19(4):551-6.
- Ikeda Y., Long D.M., (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27(1):1-11.

- Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J.S., (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem. Biophys.* 298(2):446-51.
- Ishikawa A., Miyatake T., (1993) Effects of smoking in patients with early-onset Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 117(1-2):28-32.
- Iwata F., Endoh K., Leung F.W., (1994) Intragastric nicotine protects against 40% ethanol-induced gastric injury despite pretreatment with NG-nitro-L-arginine methyl ester or adrenal medullectomy in rats. *Dig. Dis. Sci.* 39(2):347-52.
- Iwata E., Asanuma M., Nishibayashi S., Kondo Y., Ogawa N., (1997) Different effects of oxidative stress on activation of transcription factors in primary cultured rat neuronal and glial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 50(1-2):213-20.
- Jaffrey S.R., Snyder S.H., (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:417-40.
- Jesberger J.A., Richardson J.S., (1991) Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int. J. Neurosci.* 57(1-2):1-17.
- Jones S., Sudweeks S., Yakel J.L., (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci.* 22(12):555-61.
- Kaneko S., Maeda T., Kume T., Kochiyama H., Akaike A., Shimohama S., Kimura J., (1997) Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res.* 765(1):135-40.
- Karara A., Wei S., Spady D., Swift L., Capdevila J.H., Falck J.R., (1992) Arachidonic acid epoxygenase: structural characterization and quantification of epoxyeicosatrienoates in plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182(3):1320-5.
- Katsuki H., Okuda S., (1995) Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog. Neurobiol.* 46(6):607-36.
- Katsuki H., Akino N., Okuda S., Saito H., (1995) Antioxidants, but not cAMP or high K⁺, prevent arachidonic acid toxicity on neuronal cultures. *Neuroreport* 6(8):1101-4.
- Khaselev N., Murphy R.C., (2000) Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmemyl glycerophosphocholine. *J. Lipid Res.* 41(4):564-72.
- Kihara T., Shimohama S., Urushitani M., Sawada H., Kimura J., Kume T., Maeda T., Akaike A., (1998) Stimulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.* 792(2):331-4.

- Kinouchi H., Imaizumi S., Yoshimoto T., Yamamoto H., Motomiya M., (1990) Changes of polyphosphoinositides, lysophospholipid, and free fatty acids in transient cerebral ischemia of rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.* 12(3):215-28.
- Koistinaho J., Pelto-Huikko M., Sagar S.M., Dagerlind A., Roivainen R., Hokfelt T., (1993) Differential expression of immediate early genes in the superior cervical ganglion after nicotine treatment. *Neuroscience* 56(3):729-39.
- Krippner A., Matsuno-Yagi A., Gottlieb R.A., Babior B.M., (1996) Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271(35):21629-36.
- Kuwana T., Smith J.J., Muzio M., Dixit V., Newmeyer D.D., Kornbluth S., (1998) Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 273(26):16589-94.
- 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(14):6348-52.
- Lawson S.J, Lowrie M.B., (1998) The role of apoptosis and excitotoxicity in the death of spinal motoneurons and interneurons after neonatal nerve injury. *Neuroscience* 87(2):337-48.
- Lee K.F., Davies A.M., Jaenisch R., (1994) p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* 120(4):1027-33.
- Lee P.N., (1994) Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence. *Neuroepidemiology* 13(4):131-44.
- Leonard S., Breese C., Adams C., Benhammou K., Gault J., Stevens K., Lee M., Adler L., Olincy A., Ross R., Freedman R., (2000) Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression *Eur. J. Pharmacol.* 393(1-3):237-42.
- Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S., Nicotera P., (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185(8):1481-6.
- Leist M., Nicotera P., (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell. Res.* 239(2):183-201.
- Levin E.D., (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)* 108(4):417-31.

Levin E.D., Briggs S.J., Christopher N.C., Rose J.E., (1992) Persistence of chronic nicotine-induced cognitive facilitation. *Behav. Neural. Biol.* 58(2):152-8.

Levin E.D., Briggs S.J., Christopher N.C., Rose J.E., (1993) Prenatal nicotine exposure and cognitive performance in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15(4):251-60.

Lipton S.A., (1993) Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 6(4):588-96.

Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., Stamler J.S., (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364(6438):626-32.

Lloyd G.K., Menzaghi F., Bontempi B., Suto C., Siegel R., Akong M., Stauderman K., Velicelebi G., Johnson E., Harpold M.M., Rao T.S., Sacaan A.I, Chavez-Noriega L.E., Washburn M.S., Vernier J.M., Cosford N.D., McDonald L.A., (1998) The potential of subtype-selective neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists as therapeutic agents. *Life Sci.* 62(17-18):1601-6.

Lloyd G.K., Williams M., (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292(2):461-7.

Lucas J.H., Wolf A., (1991) In vitro studies of multiple impact injury to mammalian CNS neurons: prevention of perikaryal damage and death by ketamine. *Brain Res.* 543(2):181-93.

Maggio R., Riva M., Vaglini F., Fornai F., Molteni R., Armogida M., Racagni G., Corsini G.U., (1998) Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J. Neurochem.* 71(6):2439-46.

Malecki A., Garrido R., Mattson M.P., Hennig B., Toborek M., (2000) 4-Hydroxynonenal induces oxidative stress and death of cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.* 74(6):2278-87.

Marks M.J., Burch J.B., Collins A.C., (1983) Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226(3):817-25.

Marin P., Hamon B., Glowinski J., Premont J., (1997) Nicotine-induced inhibition of neuronal phospholipase A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280(3):1277-83.

Marsala M., Danielisova V., Chavko M., Hornakova A., Marsala J., (1989) Improvement of energy state and basic modifications of neuropathological damage in rabbits as a result of graded postischemic spinal cord reoxygenation. *Exp. Neurol.* 105(1):93-103.

- Mattson M.P., (1998) Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 21(2):53-7.
- McGehee D.S., Heath M.J., Gelber S., Devay P., Role L.W., (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269(5231):1692-6.
- Meltzer L.T., Rosecrans J.A., (1988) Nicotine and arecoline as discriminative stimuli: involvement of a non-cholinergic mechanism for nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29(3):587-93.
- Merry D.E., Korsmeyer S.J., (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:245-67.
- Messi M.L., Renganathan M., Grigorenko E., Delbono O., (1997) Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* 411(1):32-8.
- Metzler B., Hu Y., Sturm G., Wick G., Xu Q., (1998) Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273(50):33320-6.
- Miller B., Sarantis M., Traynelis S.F., Attwell D., (1992) Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature* 355(6362):722-5.
- Minota S., Watanabe S., (1997) Inhibitory effects of arachidonic acid on nicotinic transmission in bullfrog sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* 78(5):2396-401.
- Mombouli J.V., Holzmann S., Kostner G.M., Graier W.F., (1999) Potentiation of Ca²⁺ signaling in endothelial cells by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 33(5):779-84.
- Morrison B. 3rd, Saatman K.E., Meaney D.F., McIntosh T.K., (1998) In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J. Neurotrauma.* 15(11):911-28.
- Nicholls D.G., (1993) Ion channels and the regulation of neurotransmitter glutamate release. *Biochem. Soc Trans.* 21(1):53-8
- Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E., (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* 102-103:139-42.
- O'Hara B.F., Macdonald E., Clegg D., Wiler S.W., Andretic R., Cao V.H., Miller J.D., Heller H.C., Kilduff T.S., (1999) Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 66(1-2):71-82.

- Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J., Carney J.M., Floyd R.A., (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87(13):5144-7.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J., (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-19.
- O'Neill A.B., Morgan S.J., Brioni J.D., (1998) Histological and behavioral protection by (-)-nicotine against quinolinic acid-induced neurodegeneration in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 69(1):46-64.
- Packer M.A., Murphy M.P., (1995) Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Eur. J. Biochem.* 234(1):231-9.
- Panter S.S., Yum S.W., Faden A.I., (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann. Neurol.* 27(1):96-9.
- Patrick J., Boulter J., Goldman D., Gardner P., Heinemann S., (1987) Molecular biology of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 505:194-207.
- Patrick J., Sequeira P., Vernino S., Amador M., Luetje C., Dani J.A., (1993) Functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog. Brain Res.* 98:113-20.
- Pedersen W.A., Cashman N.R., Mattson M.P., (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp. Neurol.* 155(1):1-10.
- Perry E.K., Morris C.M., Court J.A., Cheng A., Fairbairn A.F., McKeith I.G., Irving D., Brown A., Perry R.H., (1995) Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience* 64(2):385-95.
- Peter M.E., Kischkel F.C., Scheuerpflug C.G., Medema J.P., Debatin K.M., Krammer P.H., (1997) Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27(5):1207-12.
- Pugh P.C., Berg D.K., (1994) Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *J. Neurosci.* 14(2):889-96.

Pullen A.H., Humphreys P., Baxter R.G., (1997) Comparative analysis of nitric oxide synthase immunoreactivity in the sacral spinal cord of the cat, macaque and human. *J. Anat.* 191 (Pt 2):161-75.

Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S.,(1990) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87(24):10043-7.

Rao G.N., Glasgow W.C., Eling T.E., Runge M.S., (1996) Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J. Biol. Chem.* 271(44):27760-4.

Rechtman M.P., (1992) Sensory nerves in the airways as a target for drug development. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19(1):31-9.

Regan R.F., Choi D.W., (1991) Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neuroscience* 43(2-3):585-91.

Reynaud D., Pace-Asciak C.R., (1997) 12-HETE and 12-HPETE potently stimulate intracellular release of calcium in intact human neutrophils. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56(1):9-12.

Rivlin A.S., Tator C.H., (1978) Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol.* 10(1):38-43.

Rowell P.P., Li M., (1997) Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J. Neurochem.* 68(5):1982-9.

Saatman K.E., Meaney D.F., McIntosh T.K., (1998) In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J. Neurotrauma* 15(11):911-28.

Saito S., Kidd G.J., Trapp B.D., Dawson T.M., Bredt D.S., Wilson D.A., (1994) Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF, Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 59(2):447-56.

Samdani A.F., Newcamp C., Resink A., Facchinetti F., Hoffman B.E., Dawson V.L., Dawson TM, (1997) Differential susceptibility to neurotoxicity mediated by neurotrophins and neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurosci.* 17(12):4633-41.

Sanberg P.R., Silver A.A., Shytle R.D., Philipp M.K., Cahill D.W., Fogelson H.M., McConville B.J., (1997) Nicotine for the treatment of Tourette's syndrome. *Pharmacol. Ther.* 74(1):21-5.

Sargent P.B., (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:403-43.

- Sastry P.S., Rao K.S., (2000) Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74(1):1-20.
- Saunders R.D., Dugan L.L., Demediuk P., Means E.D., Horrocks L.A., Anderson D.K., (1987) Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J. Neurochem.* 49(1):24-31.
- Saunders R., Horrocks L.A., (1987) Eicosanoids, plasma membranes, and molecular mechanisms of spinal cord injury. *Neurochem. Pathol.* 7(1):1-22.
- Schnellmann R.G., Yang X., Carrick J.B., (1994) Arachidonic acid release in renal proximal tubule cell injuries and death. *J. Biochem. Toxicol.* 9(4):211-7.
- Schoepfer R., Conroy W.G., Whiting P., Gore M., Lindstrom J., (1990) Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron* 5(1):35-48.
- Schulz R., Wambolt R., (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 30(3):432-9.
- Schuman E.M., Madison D.V., (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:153-83.
- Schwab M.E., (1993) Experimental aspects of spinal cord regeneration. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 6(4):549-53.
- Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W., (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13(2):596-604.
- Semba J., Miyoshi R., Kito S., (1996) Nicotine protects against the dexamethasone potentiation of kainic acid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 735(2):335-8.
- Sharma H.S., Olsson Y., (1990) Edema formation and cellular alterations following spinal cord injury in the rat and their modification with p-chlorophenylalanine. *Acta Neuropathol. (Berl)* 79(6):604-10.
- Sharma H.S., Olsson Y., Nyberg F., Dey P.K., (1993) Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience* 57(2):443-9.

- Sharma H.S., Westman J., Olsson Y., Alm P., (1996) Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci. Res.* 24(4):373-84.
- Sharma H.S., Nyberg F., Westman J., Alm P., Gordh T., Lindholm D., (1998) Brain derived neurotrophic factor and insulin like growth factor-1 attenuate upregulation of nitric oxide synthase and cell injury following trauma to the spinal cord. An immunohistochemical study in the rat. *Amino Acids* 14(1-3):121-9.
- Shibuki K., Okada D., (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349(6307):326-8.
- Shuman S.L., Bresnahan J.C., Beattie M.S., (1997) Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurosci. Res.* 50(5):798-808.
- Siesjo B.K., (1993) A new perspective on ischemic brain damage? *Prog. Brain. Res.* 96:1-9
- Silverman E.S., Drazen J.M., (1999) The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111(6):525-36.
- Singh I.N., Sorrentino G., Sitar D.S., Kanfer J.N., (1998) (-)Nicotine inhibits the activations of phospholipases A2 and D by amyloid beta peptide. *Brain Res.* 800(2):275-81.
- Slotkin T.A., McCook E.C., Seidler F.J., (1997) Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevations of c-fos protooncogene expression. *Brain Res.* 750(1-2):180-8.
- Smith W.L., (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* 259(2):315-24.
- Snyder S.H., Bredt D.S., (1991) Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.* 12(4):125-8.
- Snyder S.H., (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257(5069):494-6.
- Sorenson E.M., Shiroyama T., Kitai S.T., (1998) Postsynaptic nicotinic receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience* 87(3):659-73.
- Springer J.E., Azbill R.D., Knapp P.E., (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat. Med.* 5(8):943-6.

- Stefanis L., Burke R.E., Greene L.A., (1994) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 10(4):299-305.
- Suschek C., Rothe H., Fehsel K., Enczmann J., Kolb-Bachofen V., (1993) Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. IL-1 beta-mediated induction regulated by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. *J. Immunol.* 151(6):3283-91.
- Sweatt J.D., Connolly T.M., Cragoe E.J., Limbird L.E., (1986) Evidence that Na⁺/H⁺ exchange regulates receptor-mediated phospholipase A2 activation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261(19):8667-73.
- Tabuchi S., Kume K., Aihara M., Ishii S., Mishina M., Shimizu T., (1997) Lipid mediators modulate NMDA receptor currents in a *Xenopus* oocyte expression system. *Neurosci. Lett.* 237(1):13-6.
- Tamatani M., Ogawa S., Niitsu Y., Tohyama M., (1998) Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 71(4):1588-96.
- Tamatani M., Ogawa S., Tohyama M., (1998) Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 58(1-2):27-39.
- Tator C.H., (1983) Spine-spinal cord relationships in spinal cord trauma. *Clin. Neurosurg.* 30:479-94.
- Tator C.H., Fehlings M.G., (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.* 75(1):15-26.
- Toborek M., Malecki A., Garrido R., Mattson M.P., Hennig B., Young B., (1999) Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.* 73(2):684-92.
- Tsai A.L., Palmer G., Xiao G., Swinney D.C., Kulmacz R.J., (1998) Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with manganese protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.* 273(7):3888-94.
- Urushitani M., Shimohama S., Kihara T., Sawada H., Akaike A., Ibi M., Inoue R., Kitamura Y., Taniguchi T., Kimura J., (1998) Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann. Neurol.* 44(5):796-807.

Vento R., D'Alessandro N., Giuliano M., Lauricella M., Carabillo M., Tesoriere G., (2000) Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp. Eye Res.* 70(4):503-17.

Vijayaraghavan S., Huang B., Blumenthal E.M., Berg D.K., (1995) Arachidonic acid as a possible negative feedback inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors on neurons. *J. Neurosci.* 15(5 Pt 1):3679-87.

Volterra A., Trotti D., Racagni G., (1994) Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 46(5):986-92.

Wada E., Wada K., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W., (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284(2):314-35.

Watson B.D., Ginsberg M.D., (1989) Ischemic injury in the brain. Role of oxygen radical-mediated processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 559:269-81.

Wesnes K., Revell A., (1984) The separate and combined effects of scopolamine and nicotine on human information processing. *Psychopharmacology (Berl)* 84(1):5-11.

Whiteaker P., Sharples C.G., Wonnacott S., (1998) Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Mol. Pharmacol.* 53(5):950-62.

Whiting P.J., Schoepfer R., Conroy W.G., Gore M.J., Keyser K.T., Shimasaki S., Esch F., Lindstrom J.M., (1991) Expression of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in brain and retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 10(1):61-70.

Williams L.R., Inouye G., Cummins V., Pelleymounter M.A., (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor sustains axotomized basal forebrain cholinergic neurons in vivo: dose-response comparison to nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277(2):1140-51.

Williams J.R., Leaver H.A., Ironside J.W., Miller E.P., Whittle I.R., Gregor A., (1998) Apoptosis in human primary brain tumours: actions of arachidonic acid. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 58(3):193-200.

Winkler T., Sharma H.S., Stalberg E., Badgaiyan R.D., Alm P., Westman J., (1998) Spinal cord evoked potentials and edema in the pathophysiology of rat spinal cord injury. Involvement of nitric oxide. *Amino Acids* 14(1-3):131-9.

Winkler A.S., Baethmann A., Peters J., Kempfski O., Staub F., (2000) Mechanisms of arachidonic acid induced glial swelling. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76(2):419-23.

- Wolf L.A., Laster S.M., (1999) Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochem. Biophys.* 30(3):353-68.
- Wonnacott S., (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20(2):92-8.
- Wright S.C., Zhong J., Zheng H., Larrick J.W., (1993) Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J.* 7(11):1045-51.
- Wu D., Cederbaum A.I., (2000) Ethanol and arachidonic acid produce toxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol. Cell. Biochem.* 204(1-2):157-67.
- Wu S.N., Li H.F., Chiang H.T., (2000) Actions of epoxyeicosatrienoic acid on large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in pituitary GH(3) cells. *Biochem. Pharmacol.* 60(2):251-62.
- Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C., (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256(5054):225-8.
- Yong C., Arnold P.M., Zoubine M.N., Citron B.A., Watanabe I., Berman N.E., Festoff B.W., (1998) Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J. Neurotrauma* 15(7):459-72.
- Zhang J., Steiner J.P., (1995) Nitric oxide synthase, immunophilins and poly(ADP-ribose) synthetase: novel targets for the development of neuroprotective drugs. *Neurol. Res.* 17(4):285-8.
- Zhuang S., Simon G., (2000) Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279(2):C341-51.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X., (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3):405-13.