

## **PAPEL DE LAS CÉLULAS INTERSTICIALES EN LA NEUROTRANSMISIÓN MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO EN LA URETRA.**

María Sancho González

Tutora: Ángeles García Pascual

Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal) Facultad de Veterinaria. UCM

### **INTRODUCCIÓN**

Las células intersticiales (ICCs) fueron descritas hace más de 100 años por D. Santiago Ramón y Cajal, en el tracto gastrointestinal, donde regulan la motilidad actuando como marcapasos y como mediadoras de la neurotransmisión (Burns *et al.*, 1996). Recientemente han sido descritas en diferentes estructuras del tracto urinario como uréteres, próstata, vejiga y uretra (McHale *et al.*, 2006). El músculo liso uretral posee una densa inervación nitrérgica, productora de óxido nítrico (NO), que es responsable de la relajación de esta estructura durante la micción (García-Pascual *et al.*, 1991). El presente trabajo se centra en el estudio de la función de las ICCs como intermediarias en la neurotransmisión nitrérgica; que se fundamenta en la acumulación de GMP cíclico (GMPc), el mediador biológico del NO, en respuesta a compuestos donantes de NO, como la S-nitrocisteína (SNC).

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron tiras transversales o anillos aislados de la uretra proximal de ovejas y ratas Wistar hembras, respectivamente. Su actividad mecánica fue registrada mediante transductores isométricos (Grass FT03C) conectados a un sistema de adquisición de señales (MacLab, AD Instruments). Las preparaciones fueron contraídas con noradrenalina (NA, 50  $\mu$ M) y sometidas a una dosis submáxima de SNC ( $10^{-4}$  M) durante 4 min. Isobutil-metil xantina (IBMX,  $10^{-4}$  M) y zaprinast ( $10^{-4}$  M), inhibidores inespecíficos de fosfodiesterasas, estuvieron presentes desde 30 s antes de la adición de SNC. Además, algunas preparaciones fueron tratadas con ODQ ( $10^{-4}$  M), un inhibidor selectivo de la guanilato ciclasa. Preparaciones paralelas no expuestas a SNC, sirvieron como controles. Las preparaciones recogidas fueron inmediatamente sometidas a un proceso de fijación y crioprotección con paraformaldehído al 4% y sacarosa (10-30%) durante 24h y cortadas a 10  $\mu$ m de espesor con un criostato. Los cortes fueron sometidos a inmunohistoquímica de fluorescencia simple o doble, mediante el empleo de los siguientes anticuerpos primarios: anti-GMPc, combinado, o

no, con anti-NO sintasa neuronal (NOSn), como marcador de nervios nitrérgicos; anti-vimentina, como marcador de ICCs y anti-PGP 9.5 como marcador neuronal inespecífico.

## **RESULTADOS**

### **Inmunofluorescencia simple con GMPc**

La estimulación con SNC originó una intensa inmunoreactividad a GMPc en el músculo liso y especialmente en ICCs (Figura 1C). La desaparición de la inmunoreactividad en presencia de ODQ (Figura 1B), demuestra la existencia de una producción basal de GMPc (Figura 1A) que se estimula por la adición de SNC. Las ICCs aparecen como células bipolares (o multipolares) con escaso citoplasma y largos procesos dendríticos (Figura 2), distribuidas en gran densidad en las capas serosa, muscular y submucosa.

### **Inmunofluorescencia doble GMPc-vimentina**

Se observó una gran densidad de células inmunoreactivas para vimentina a nivel de las capas submucosa, muscular y serosa, con largas prolongaciones que se entrelazan y conectan unas con otras formando verdaderas redes (Figura 3 A). En la capa muscular, tanto longitudinal como circular, las ICC pueden ser intramusculares, paralelas a las células musculares lisas o interfasciculares, rodeando e interconectando fascículos de músculo liso (Figura 3B). Todas las células positivas para GMPc también lo fueron para vimentina. El marcaje con GMPc fué mas intenso en los cuerpos celulares, mientras que la vimentina marca especialmente las largas prolongaciones de estas ICCs (Figura 4).

### **Inmunofluorescencias doble GMPc-NOSn y GMPc-PGP 9.5**

La inmunoreactividad para NOSn y PGP 9.5 se observó en una densa red de nervios intramurales distribuidos en las capas musculares y en la submucosa, así como en troncos nerviosos y en ganglios intramurales de la serosa (en el caso de la oveja). En ningún caso se observó colocalización con GMPc, aunque si una estrecha proximidad entre ICCs y nervios intramurales. En algunos casos los nervios discurrían paralelos y casi en contacto con las prolongaciones de las ICCs (Figura 5).

## DISCUSIÓN

A diferencia del tracto gastrointestinal, la existencia de ICCs en la uretra se conoce desde hace relativamente muy pocos años (Smet *et al.*, 1996) y la primera evidencia fisiológica de su posible papel como marcapasos del músculo liso uretral no se obtiene hasta el comienzo de este nuevo siglo (Sergeant *et al.*, 2000). La hipótesis actual sostiene el tono miogénico uretral, responsable en gran parte de la continencia urinaria, es el resultado del disparo asincrónico de diferentes marcapasos localizados en ICCs (McHale *et al.*, 2006).

La actividad de estos marcapasos podría ser coordinada y modificada por influencias neurales. Las principales influencias excitadoras en la uretra están mediadas por noradrenalina, mientras que el NO es responsable de la relajación uretral que acompaña a la micción (García-Pascual *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la administración de noradrenalina incrementa la frecuencia de la descarga de despolarizaciones espontáneas registradas en ICCs aisladas de la uretra de conejo (Sergeant *et al.*, 2002). Asimismo, el bloqueo farmacológico de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por calcio, específicos de las ICCs en la uretra de esta especie, reduce las contracciones neurogénicas inducidas por noradrenalina (Sergeant *et al.*, 2002), sugiriendo que las ICCs participan en el proceso de neurotransmisión excitadora.

Con respecto al efecto del NO, El presente estudio muestra la aparición de intensa inmunoreactividad para GMPc en respuesta a SNC, un donante de NO en ICCs de la uretra de la rata y de la oveja. La colocalización con vimentina demuestra su carácter mesenquimatoso, y por lo tanto su identidad como ICCs. Por otro lado la falta de colocalización con NOS<sub>n</sub>, demuestra una separación clara entre estructuras productoras de NO, especialmente nervios nitrérgicos y estructuras efectoras del NO, capaces de producir GMPc. En este sentido hay que destacar que el músculo liso mostró también un significativo aumento de inmunoreactividad para GMPc en respuesta a SNC, indicando que ambos tipos de células dispondrían de la maquinaria enzimática necesaria para responder al NO. No obstante, la estrecha relación estructural observada entre ICCs y los nervios intramurales, especialmente nervios nitrérgicos, y la mayor inmunoreactividad para GMPc observada en estas células, sugiere que las ICCs uretrales actuarían como las dianas fundamentales de la acción del NO. Recientemente, Sergeant *et al.* (2006) han demostrado

una reducción en la actividad eléctrica espontánea de las ICCs uretrales en respuesta a donantes de NO y fármacos activadores de la vía GMPc/proteinkinasa G. En cualquier caso, es necesario demostrar que esta función mediadora de las ICCs en la uretra se produce en respuesta a la estimulación de los propios nervios nitrérgicos intramurales y no solo por la adición exógena de donantes de NO.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM & Ward SM. *Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach*. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 93:12008-12013 (1996).
- García-Pascual A, Costa G, García-Sacristan A & Andersson KE. *Relaxation of sheep urethral muscle induced by electrical stimulation of nerves: involvement of nitric oxide*. Acta Physiol. Scand. **141**:531-539 (1991).
- McHale NG, Hollywood MA, Sergeant GP, Shafei M, Thornbury KT & Ward SM. *Organization and function of ICC in the urinary tract*. J. Physiol. 576.3: 689-694 (2006).
- Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD & McHale NG. *Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra*. J Physiol. **526**:359-366 (2000).
- Sergeant, GP, Thornbury KD, McHale NG & Hollywood MA. *Characterization of norepinephrine-evoked inward currents in interstitial cells isolated from the rabbit urethra*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283:C885-C894 (2002)
- Sergeant GP, Johnston L, McHale NG, Thornbury, KD & Hollywood MA. *Activation of the cGMP/PKG pathway inhibits electrical activity in rabbit urethral interstitial cells of Cajal by reducing the spatial spread of Ca<sup>2+</sup> waves*. J. Physiol. 574.1: 167-181 (2006).

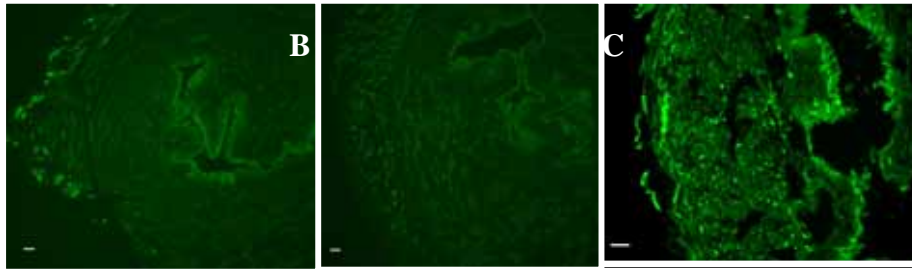


Figura 1: Inmunofluorescencia simple de GMPc en uretra de rata. A. Muestra control. B. Muestra tratada con ODQ. C. Muestra estimulada con SNC. Barra=20µm.

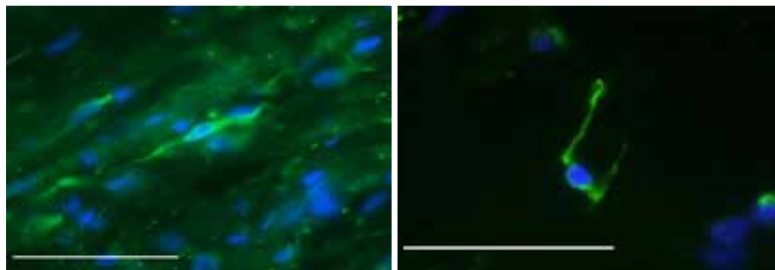


Figura 2: Detalle morfológico de las ICCs presentes en músculo liso uretral mediante inmunofluorescencia simple de GMPc y contratinción de núcleos con DAPI. Barra=20µm.

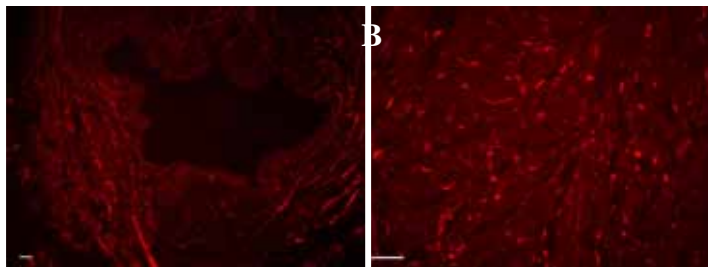


Figura 3: Inmunoreactividad a vimentina en uretra de rata. A. ICCs presentes entre las diferentes capas histológicas. B. ICCs intramusculares e interfasciculares localizadas entre las capas musculares lisas longitudinal y circular. Barra=20µm.

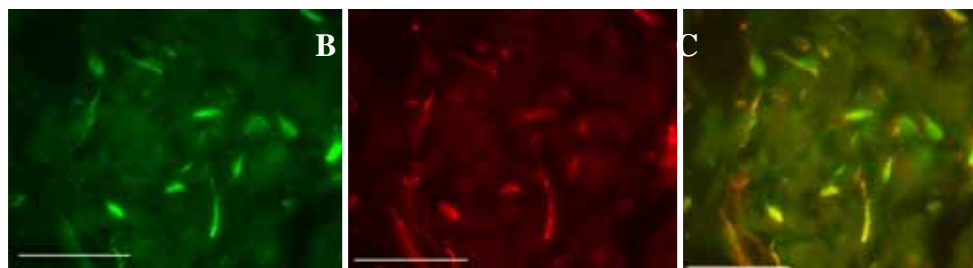


Figura 4: Inmunofluorescencia doble GMPCr-vimentina. A. Marcaje único de GMPCr. B. Marcaje por separado de vimentina. C. Superposición de ambas imágenes, se observa una clara colocalización dando lugar a un color amarillo. Barra=20µm.

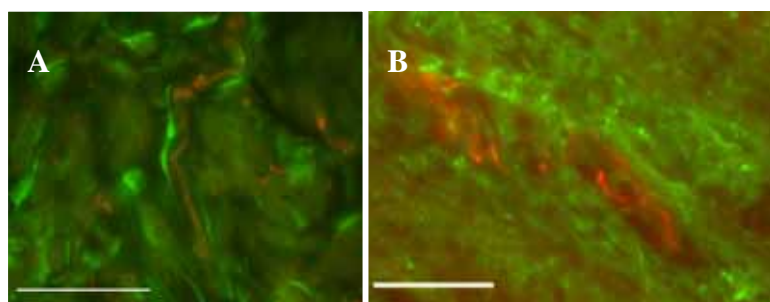


Figura 5: Clara relación estructural entre las ICCs y los nervios intramurales. A. Inmunofluorescencia doble GMPCr-NOSn. B. Inmunofluorescencia doble GMPCr-PGP 9.5. Barra=20µm.