

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Técnicas de cultivo celular

7.1.1 Generalidades

Independientemente de la técnica de cultivo celular específica empleada, durante todo el proceso se deben mantener unas estrictas condiciones de esterilidad. El vidrio es lavado separadamente y esterilizado en un autoclave (20 min a 1 atm). El material quirúrgico se esteriliza con calor seco (30 min a 160°C). Todas las soluciones, siempre que no contengan componentes termosensibles, son esterilizadas en el autoclave (30 min a 120°C). Los medios de cultivo, sueros y demás aditivos deben ser esterilizados mediante filtros estériles comerciales con un tamaño de poro de 0,22 μm (Millipore).

El agua utilizada para preparar las soluciones tamponadas o reconstituir los medios de cultivo en polvo, debe ser destilada de alta calidad. Es preferible utilizar agua bidestilada o, alternativamente, agua corriente tratada por filtración a través de resinas iónicas (Sistema MilliQ, Millipore). Todo el material de plástico utilizado, que incluye tanto las placas de cultivo como los recipientes para guardar los reactivos, tubos y material volumétrico, debe ser de plástico desechable (Nunc, Falcon y Corning). Las puntas de pipeta y otros materiales plásticos como los microtubos deben ser autoclavados. Por último, todas las manipulaciones son realizadas en el interior de una campana de flujo laminar vertical.

En general, los diferentes tipos de cultivos neuronales son mantenidos en una estufa de cultivo celular a una temperatura constante de 37,2°C en una atmósfera de 95% aire, 5% CO₂ con humedad saturada.

7.1.2 Purificación de motoneuronas

Las MTN's son purificadas a partir de embriones de pollo *Arbor acres* de 5,5 días de edad obtenidos de un productor local (COPAGA), según una modificación del protocolo de Arakawa et al. (1990) y de Dohrmann et al. (1986). Tras perforar la cáscara del huevo en la zona correspondiente a la cámara de aire, se retira la membrana corioalantoidea con cuidado para no provocar una hemorragia y, utilizando unas pinzas curvas, se procede a la extracción del embrión.

Seguidamente, con la ayuda de un microscopio de disección y tras fijar el embrión sobre una superficie plástica esteril, se expone la médula espinal por vía dorsal. Se disecciona, se limpia de meninges y de ganglios espinales y se transfiere a un tubo de poliestireno, donde se recogen las médulas espinales de cuatro en cuatro. A continuación, dichas médulas espinales son lavadas dos veces en tampón de disección (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 22,2 mM glucosa, 25 mM tampón HEPES pH 7,4, 20.000 UI/ml penicilina, y 20.000 µg/ml estreptomina; GHEBS) y digeridas con 0,025% tripsina (Sigma) durante 15 min a 37°C. La tripsina es inactivada lavando las médulas espinales en medio de cultivo completo con suero de caballo termoinactivado (HIHS) (composición detallada más abajo).

Posteriormente, se disocian las células aspirando y expulsando la suspensión a través de una punta de pipeta azul (Gilson). La suspensión celular resultante es depositada sobre un "colchón" de 5 ml de medio 15 de Leibovitz (L15) (Sigma) con 22,5 mM HCO₃⁻ (L15-bic) y 3,5% (p/v) BSA, y es centrifugada después a 100 x g durante 5 min para eliminar los residuos celulares. Se resuspenden las células en GHEBS, se depositan nuevamente sobre un "colchón" de 5 ml de 6,8% (p/v) de metrizamida (2-(3-acetamido-5-*N*-metilacetamido-2,4,6-triyodobenzamido)-2-deoxi-D-

glucosa; Nycomed) en GHEBS, y se centrifugan las células a 400 x g en un rotor vasculante durante 15 min. La centrifugación de la suspensión celular sobre el gradiente discontinuo de metrizamida resulta en la formación de una banda turbia de células localizada a nivel de la interfase, que se recoge con la ayuda de una pipeta con punta estéril en un volumen aproximado de 500 µl (cada 4 médulas espinales).

A continuación, se cuentan las células en un hemocitómetro y se transfieren a otro tubo con una cantidad adecuada de medio de cultivo completo (L15H), cuya composición es L15, suplementado con una concentración final de 18 mM glucosa, 22,5 mM HCO₃⁻, 2,5 mM glutamina, 10% HIHS y 20 UI/ml penicilina más 20 µg/ml estreptomicina. La máxima duración de todo el proceso hasta la siembra de las MTN's no debe sobrepasar las 2,5 hr. El rendimiento neto de este procedimiento es de 103.877 ± 7.652 células por médula espinal (n = 22), con un alto porcentaje de viabilidad (>97%).

7.1.3 Cultivo celular de motoneuronas y ensayos de supervivencia

Las MTN's son sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos previamente tratadas con poli-DL-ornitina y laminina (descrito en Apartado 7.1.3.1) a una densidad de 10.000 células por pocillo. De no indicarse de otra forma, las neuronas son cultivadas durante 48 hr en presencia de una concentración saturante (300 µg/ml) de extracto de músculo esquelético (MEX) (técnica de preparación descrita en Apartado 7.1.3.2). Una vez cumplidas las 48 hr, se lavan las células profusamente y se adiciona medio fresco con las cantidades apropiadas de suplementos o drogas. Asimismo se determina, con la ayuda de un objetivo de 20 aumentos en un microscopio de contraste de fase invertido, el número de células con neuritas de al menos 2 diámetros celulares de longitud en el área central de cada pocillo de cultivo.

Este valor habitualmente oscila entre 20 y 70 neuronas y corresponde al 100% corregido de supervivencia. Los pocillos con menos de 20 neuronas al inicio del experimento no son usados. Los contajes de neuronas con neuritas mayores de 2 diámetros celulares se repiten cada 24 hr en el mismo campo microscópico durante la duración del experimento, expresando la supervivencia como un porcentaje de los contajes neuronales respecto al valor 100%. Los valores mostrados representan la media \pm SEM de los porcentajes correspondientes a 6-8 pocillos. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

7.1.3.1 Tratamiento de las placas de cultivo con poli-DL-ornitina y laminina

Las placas de cultivo son tratadas durante 1 hr a temperatura ambiente con poli-DL-ornitina (peso molecular 30,000 kDa) (Sigma) a una concentración de 1,5 μ g/ml en tampón borato 150 mM, pH 8,5, lavadas dos veces con agua doblemente destilada, y secadas en una campana de flujo laminar. Posteriormente, las placas de cultivo son tratadas durante un mínimo de 1 hr con laminina en un incubador de CO₂. La laminina, generosamente proporcionada por el Dr. C.E. Henderson (CNRS-INSERM, Montpellier, Francia) o comprada de Sigma, se disuelve hasta una concentración de 3 μ g/ml en L15-bic. En el mismo momento de la siembra de las MTN's, se aspira la laminina y, sin dejar que se seque, se adiciona el medio de cultivo con las células en suspensión.

7.1.3.2 Preparación del extracto de músculo denervado

Se realiza una denervación de los músculos de las extremidades inferiores de pollos *Arbor acres* postnatales de 5 días de edad. Tras anestesia con pentobarbital sódico (16 μ g por pollo en 0,2 ml de

0,9% NaCl, intraperitoneal), se expone el nervio ciático a nivel del muslo, se realiza una sutura con hilo quirúrgico de 4-0 y se reseca un segmento de 5 mm distal a la ligadura. En el día postnatal 10, tras comprobar el grado de parálisis completa de la extremidad denervada, los animales son sacrificados mediante una sobredosis de cloroformo. Se disecan los músculos de la extremidad inferior separándolos de los tejidos no musculares, se congelan inmediatamente en N₂ líquido y se almacenan a -80°C hasta que se prepara el MEX.

Posteriormente, los músculos denervados durante 5 días obtenidos a partir de pollos de 10 días de edad (P10D5), son descongelados en hielo y homogeneizados con un aparato Polytron ajustado a intensidad 4 durante 2 x 60 seg en 5 vol de tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) con 1 mM EDTA (Sigma), 1 mM benzamidina (Sigma), 1 mM *N*-etilmaleimida (Sigma), 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (Boehringer-Mannheim).

Los homogenados son centrifugados a 100.000 x g durante 75 min, y el sobrenadante resultante es almacenado a -80°C. Tras ser descongelado, el sobrenadante final es guardado en alícuotas de 1 ml a -20°C. Antes de ser utilizado, el MEX es centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga. Las concentraciones de proteína son determinadas con el reactivo de cuantificación de proteínas Bio-Rad, basado en el método de Bradford (1976).

7.1.4 Cultivo celular de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior y ensayos de supervivencia y medición del crecimiento neurítico

Las neuronas simpáticas son disociadas a partir de ganglios cervicales superiores (GCS) de fetos de rata Sprague-Dawley (Harlan) en el día 21 de su desarrollo embrionario (E21). A continuación, son mantenidas en cultivo celular mediante una modificación del método de

Johnson y Argiro (1983). De forma resumida, tras la disección los ganglios son tratados en medio L-15, primero, con colagenasa (1 mg/ml) a 35°C durante 30 min y, a continuación, con tripsina (2,5 mg/ml) durante 30 min.

Tras el tratamiento enzimático, los ganglios son triturados y se procede a la separación de los restos de las células disociadas mediante un filtro de nítex de tamaño 3-20/14 (Tetko). Las células son sembradas en portaobjetos de cristal con dos pocillos (Nunc) cubiertos con colágeno amoniado (técnica de preparación descrita en Apartado 7.1.4.1) para la realización de ensayos de supervivencia celular; en placas de cultivo celular de plástico de 100 mm para la realización de ensayos de fosforilación a nivel de tirosinas, y; para la medición del crecimiento neurítico, las neuronas son sembradas al final de un "hilo" delgado de colágeno aplicado con una pipeta sobre la superficie de plástico de placas de cultivo de 35 mm.

El medio de cultivo *standard* consiste de medio Eagle suplementado con sales según modificación de Earle (DMEM) con 10% suero bovino fetal (FCS) (Gibco), 100 µg/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 20 µM fluorodeoxiuridina, 20 µM uridina, 1,4 mM L-glutamina y 50 ng/ml 2,5S NGF (de glándula submandibular de ratón). En aquellos experimentos que requieren la despolarización crónica de las neuronas con una $[K^+]$ elevada, se reemplaza el NaCl del medio de cultivo por cantidades equimolares de KCl con el objeto de mantener la osmolaridad. Los cultivos son deprivados de NGF mediante su incubación en medio sin NGF añadido y con un exceso de anticuerpo anti-NGF de ratón generado en cabras.

Para los ensayos de supervivencia, se siembran las neuronas del GCS sobre cubreobjetos de cristal con dos pocillos a una densidad de

5.000 células por condición, lo que resulta en 1.000-2.000 neuronas al cabo de 9 días en cultivos controles. Tras 4 días en presencia de 50 ng/ml NGF, se exponen los cultivos a concentraciones crecientes de diferentes inhibidores de la actividad TK en presencia y en ausencia de NGF. Cuatro días después, se fijan las células con paraformaldéhidro al 4% (v/v). Seguidamente, se tiñen las células neuronales con violeta cristal según la técnica de Nissl (EM Diagnostic Systems), se destiñen las preparaciones con agua y se deshidratan con etanol. Finalmente, se montan los cubreobjetos sobre los portaobjetos con medio de montar Pro-Texx (Baxter Diagnostics), y a continuación se codifican los portaobjetos para proceder a su contaje ciego. Esta técnica es un método altamente fiable, aunque muy tedioso, para determinar la supervivencia de estas neuronas. Es superior a los ensayos bioquímicos habitualmente usados para el cálculo de viabilidad neuronal (Deckwerth y Johnson, 1993). Todos los experimentos de supervivencia neuronal fueron realizados por lo menos una vez en placas de cultivo de 24 pocillos antes de proceder a su cuantificación mediante la realización de cultivos celulares sobre portaobjetos. Por inspección visual, en todos los experimentos preliminares se obtuvieron resultados similares a los conseguidos en los experimentos de cuantificación.

Para medir el crecimiento neurítico, utilizamos el método descrito previamente por Franklin et al. (1994). Se siembran las neuronas al final de un "hilo" delgado de colágeno aplicado con una pipeta sobre la superficie de placas de cultivo de 35 mm o de 24 pocillos. Se siembran 5.000 células por condición, lo que resulta en 1.000-2.000 neuronas en cultivos control de 9 días. La longitud neurítica es determinada en el undécimo día de cultivo, tomando como referencia inicial la longitud neurítica medida 6 días después de la siembra celular.

7.1.4.1 Tratamiento de las superficies de cultivo con sustrato colagénico

El colágeno es preparado siguiendo el protocolo utilizado por Kleinman et al. (1979). Se extraen los tendones de las colas de ratas adultas y se incuban en ácido acético 0,4 M a 4°C durante una noche. El material insoluble es eliminado por centrifugación y, a continuación, se precipita el colágeno solubilizado mediante la adición de NaCl al sobrenadante hasta alcanzar una concentración final del 10% (p/v). Se recoge este precipitado por centrifugación y se dializa contra una solución de NaCl 150 mM en Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Tras descartar el material insoluble, se vuelve a dializar el material soluble contra ácido acético al 0,1%. Finalmente, se liofiliza y almacena a -20°C. A fin de recubrir las superficies de cultivo con este sustrato, se prepara una solución de 0,5 mg/ml de colágeno en ácido acético 100 mM. Esta solución es transferida a las placas de cultivo, de manera que el fondo de las mismas queda totalmente cubierto (~1 ml de solución para las placas de cultivo de 35 mm). Se deja incubar a temperatura ambiente durante 30-45 min, a continuación se aspira la solución de colágeno y se lava la placa con medio de cultivo base (DMEM suplementado con 10% HS y antibióticos).

7.1.5 *Evaluación de la apoptosis neuronal*

Para cuantificar el porcentaje de neuronas apoptóticas tras la privación trófica o en otras circunstancias (por ejemplo, en relación con la exposición al AraC), se realizan tinciones de los cultivos con el colorante Hoechst 33258 (Sigma). Se cultivan las neuronas sobre cubreobjetos de cristal (recubiertos con poli-DL-ornitina y laminina o colágeno según se trate de MTN's o neuronas del GCS, respectivamente) a una densidad de 50.000 células/cubreobjetos en placas de cultivo celular de 24 pocillos. En el momento apropiado (por ejemplo, tras

finalizar un determinado tratamiento), se extrae el medio de cultivo de los pocillos y, sin ningún lavado previo, se fijan las neuronas a 4°C con 2,5% (v/v) glutaraldéhid (calidad de microscopía electrónica, Bio-Rad) en PBS durante al menos 6 hr. Posteriormente, se lavan las neuronas tres veces con PBS a 4°C y se tiñen durante 30 min con 0,05 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma). Se lavan los cubreobjetos con las neuronas dos veces con PBS y después se montan en portaobjetos usando como medio de montar 70% (v/v) glicerol en PBS. Finalmente, se observan las neuronas en un microscopio vertical equipado con epifluorescencia y filtros UV.

7.1.6 Cultivo celular de células PC12

Las células PC12 son cultivadas en placas de cultivo de plástico de 100 mm en medio de cultivo DMEM (Sigma) tamponado con 10 mM HEPES y suplementado con 6% HIHS (Gibco), 6% FCS termoinactivado (Gibco), y 20 UI/ml penicilina más 20 µg/ml estreptomina. Cuando las células alcanzan la confluencia (cada 3-4 días), se procede a la división de los cultivos. Para la realización de experimentos, se siembran las células PC12 a una confluencia del 70% y se cultivan durante 24 hr antes de ser utilizadas.

7.2 Métodos morfológicos

7.2.1 Microscopía óptica

La observación regular de los cultivos celulares se ha realizado con un microscopio de contraste de fase invertido Leitz Labovert, equipado con objetivos de fase de 10, 20 y 32 aumentos. Por otro lado, se han practicado las observaciones de inmunofluorescencia con un microscopio

Leitz Dialux-20 equipado con epifluorescencia para rodamina y fluoresceína (bloque de filtros N₂ y L₂).

7.2.2 *Morfometría*

Para el análisis morfométrico de las diferentes fracciones aisladas mediante la técnica de purificación de MTN's de gradiente de metrizamida, se ha utilizado un morfómetro MOP-videoplan con el *software* propio del aparato.

7.2.3 *Microscopía Electrónica*

Se cultivan las MTN's sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-DL-ornitina y laminina a una densidad de 50.000 MTN's/cubreobjetos en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Tras mantener las MTN's 2 días en presencia de una concentración saturante de MEX, se cambian los medios de cultivo, depleccionando de MEX la mitad de los cultivos. Después de un período adicional de 48 hr, se lavan los cultivos dos veces con PBS frío y se fijan durante 4 hr en 2,5% glutaraldéhidro en tampón fosfato 100 mM pH 7,4. A continuación, se fijan los cultivos en 1% OsO₄ tamponado (Dalton), se deshidratan con concentraciones crecientes de acetona y se incluyen en resina de Araldite (Fluka). Seguidamente, se desprenden los cubreobjetos de la resina de Araldite mediante inmersión en N₂ líquido. Los bloques incluidos en Araldite son tallados en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung) en secciones finas siguiendo un plano paralelo a la superficie del cultivo. Tras recoger las secciones en rejillas de cobre (G 300, Polaron), se tiñen con citrato de plomo y acetato de uranilo (Reynolds). Por último, se examinan las secciones en un microscopio electrónico Zeiss EM10.

7.2.4 Inmunocitoquímica

Se han utilizado como anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína del neurofilamento de 68 kDa (dilución de trabajo 1:400) (Sigma); anticuerpo de conejo anti-ChAT de pollo (dilución de trabajo 1:500) (generosamente suministrado por el Dr. M. Epstein, Universidad de Wisconsin); anticuerpo monoclonal anti-SC1 (dilución de trabajo 1:5) (generosamente suministrado por el Dr. C.E. Henderson), y; anticuerpo monoclonal anti-proteína fibrilar de la glía bovina (GFAP) (dilución de trabajo 1:200) (Sigma).

Para la inmunodetección en MTN's de la proteína del neurofilamento, ChAT y GFAP, se realizó el siguiente protocolo. Las MTN's son cultivadas sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-DL-ornitina y laminina en placas de cultivo de 24 pocillos. A los correspondientes tiempos, se lavan las células con PBS, se fijan con 4% paraformaldéhidro en PBS frío durante 10 min, se lavan de nuevo tres veces con PBS con 0,1% Tritón X-100 (PBS-T) y se incuban durante 30 min en PBS-T con 3% (p/v) BSA. A continuación, se incuban los cubreobjetos con las correspondientes concentraciones de anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Tras lavar los cubreobjetos tres veces con PBS-T, se incuban con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (dilución de trabajo 1:40) (Boehringer-Mannheim) y/o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con rodamina (dilución de trabajo 1:40) (Sigma). Por último, se montan los cubreobjetos con Fluoprep, un medio hidrofílico para fluorescencia (Biomérieux), y se observan las preparaciones en un microscopio vertical equipado con ópticas de epifluorescencia para fluoresceína y rodamina.

Para la inmunodetección de SC-1, se realizaron las siguientes modificaciones del protocolo general. Tras cultivar las MTN's durante 48 hr, se reemplaza aproximadamente el 70% del medio de cultivo con

acetona fría (a -20°C). Cinco minutos después, se lavan las células tres veces con PBS y se incuban durante 1 hr a 37°C con el anticuerpo anti-SC1. El anticuerpo unido es detectado con el *kit* ABC de Vectastain (Vector Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3 Técnicas de análisis bioquímico

7.3.1 Cuantificación de la actividad colina acetiltransferasa

La actividad ChAT presente en las diferentes fracciones celulares, obtenida mediante el método de purificación de MTN's de gradiente de metrizamida, fue cuantificada mediante una modificación del método de Fonnum (1975). Tras centrifugar las células, se lisan con 0,5% Tritón X-100 y 10 mM EDTA en tampón fosfato 20 mM pH 7,4 y se vuelve a centrifugar a 12.000 x g durante 5 min. Se mezclan 10 µl del sobrenadante con 10 µl de la mezcla reactiva descrita por Fonnum (1975) con ¹⁴C-acetil-CoA (60 mCi/mmol, 50 µCi/ml; Amersham). Tras una incubación de 30 min a 37°C, se detiene la reacción mediante el lavado de los tubos con 5 ml de tampón fosfato 10 mM pH 7,4 frío. Posteriormente, se mezclan en otro tubo estos 5 ml con 2 ml de 5 mg/ml tetrafenilborato sódico en acetonitrilo y 6 ml de una mezcla fluorescente a base de tolueno. La radioactividad soluble en tolueno, que corresponde sólo a la ¹⁴C-acetilcolina de nueva formación, es cuantificada en un contador de fluorescencia. Se realizan controles adecuados para verificar que la actividad ChAT es específica (Raynaud et al., 1987).

7.3.2 Ensayos de inhibición de la síntesis de proteínas

Para evaluar la eficiencia de la inhibición de la síntesis de proteínas en los cultivos de MTN's, se determinó según el método de DiStefano et al. (1985) la incorporación de una mezcla de metionina y

cisteína marcadas con ^{35}S (ICN-Flow) en la fracción proteica insoluble en ácido tricloroacético (TCA). Se cultivan las neuronas a una densidad de 30.000 MTN's/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. Tras ser cultivadas durante 48 hr en medio basal suplementado con 300 $\mu\text{g/ml}$ MEX, se reemplazan los medios de cultivo y se adicionan cantidades adecuadas de cicloheximida (CHX). Al mismo tiempo, se añade 25 μCi de la mezcla marcada con ^{35}S a cada pocillo.

Después de 15 hr de incubación, se eliminan los medios de cultivo, se lavan los pocillos una vez con PBS frío y se adiciona un volumen de 200 μl de 0,4 M NaOH a cada pocillo. Una hora después, se aplican 100 μl de cada muestra sobre papel Whatman de 1 mm. Se hierven los filtros en 10% TCA, se lavan con TCA y etanol fríos, y se secan finalmente. A continuación, se determina el número de cpm en un contador de fluorescencia. Los contajes son corregidos para eliminar el efecto de las interacciones inespecíficas mediante la substracción de las cuentas unidas a los pocillos de cultivo sin neuronas. Para evaluar la eficiencia de los inhibidores transcripcionales, se utilizó un método experimental similar con la única diferencia de que se añadieron las drogas correspondientes 6 hr antes de la adición de la mezcla marcada con ^{35}S .

7.3.3 Detección de la fragmentación del ADN mediante la técnica de Southern blotting

Se cultivan las MTN's (5×10^5 /condición) en placas de cultivo de 35 mm. Tras 48 hr de cultivo, se lavan las neuronas dos veces con PBS y se desprenden con 2 ml de PBS frío. Se centrifugan las MTN's a 400 x g durante 4 min a 4°C y se resuspenden en 500 μl de tampón de extracción (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS en 10 mM Tris/HCl pH 8,0) con 120 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K (Boehringer-Mannheim) y 10 $\mu\text{g/ml}$ ARNasa libre

de ADNasa (Sigma). Se realiza una digestión a 50°C durante 60 min y se aísla el ADN con el Sistema *Magic DNA Clean-Up* (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se analizan las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y electrotransferencia (*blotting*) a membranas de nylon (Boehringer-Mannheim). Seguidamente, se incuban los *blots* con ADN total de hígado de pollo aislado con el mismo protocolo exceptuando la sustitución del Sistema *Magic DNA Clean-Up* por una extracción con fenol-cloroformo seguida de una precipitación con etanol. El marcaje de las sondas, la hibridación y la detección se realizaron con el *kit* de marcaje y detección de ácidos nucleicos con digoxigenina de Boehringer-Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3.4 *Ensayo de fosforilación a nivel de tirosinas*

Se puede monitorizar la autofosforilación de los receptores Trk a nivel de residuos de tirosina, en relación con la interacción del correspondiente factor neurotrófico, mediante técnicas de *immunoblotting* con los anticuerpos anti-fosfotirosina específicos IgG2bk (UBI) o 4G10 (gentilmente suministrado por el Dr. David Kaplan, del *NCI-Frederick Cancer Research and Development Center* en Frederick, MD, USA). Sin embargo, la aplicación de esta estrategia experimental en cultivos de neuronas primarias resulta altamente complicada, dado la importante limitación que supone la metodología para la obtención de células. Por tanto, en primer lugar se determinó que se necesita un mínimo de 10^6 células por condición (es decir, carril en un gel de SDS-PAGE). Este número de células equivale, en el caso de las MTN's, a aproximadamente 16 médulas espinales por condición o, en el caso de las neuronas del GCS, a dos capas completas por condición, lo que hace que estos experimentos resulten extremadamente arduos por la

compleja logística que comportan. Se realizaron experimentos paralelos con células PC12 (10^7 células por condición).

De forma resumida, se sembraron las células neuronales en placas de cultivo de 100 mm. Antes de iniciar los tratamientos farmacológicos correspondientes, se mantuvieron las MTN's en presencia de MEX (300 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 hr y las neuronas del GCS en presencia de NGF durante 7 días. Alternativamente, las células PC12 fueron cultivadas hasta alcanzar un grado de confluencia del 80%. Tras un período de privación trófica variable según el experimento, se substituyó el medio de cultivo por medio fresco con la concentración apropiada de NT o KCl durante 5 min a 37°C. A continuación, se lavaron rápidamente los cultivos con PBS (pH 7,2) gélido y se solubilizaron a 4°C en 0,5 ml de tampón de lisis Tris/NP-40 con 10 mM Tris (pH 6,8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A y 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina. Tras una incubación de 30 min en hielo, se centrifugaron las muestras en una microcentrífuga durante 15 min a 4°C para eliminar los núcleos y restos celulares. Para determinar el nivel de fosforilación de los receptores Trk a nivel de tirosinas, se inmunoprecipitó los lisados durante 1 hr a 4°C con el anticuerpo de conejo 203 preparado contra un péptido sintético de 15 aminoácidos, que corresponde al extremo carboxi-terminal del TrkA humano (QALAQAPPVYLDVVG). Dicho anticuerpo, que inmunoprecipita indistintamente los receptores TrkA, TrkB y TrkC, nos fue amablemente proporcionado por el Dr. Dionisio Martín-Zanca (CSIC-Instituto de Microbiología Bioquímica, Salamanca).

Los inmunocomplejos resultantes fueron precipitados durante 1 hr a 4°C con proteína A-Sefarosa (Sigma), separados mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 7,5%, y transferidos a filtros de membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). A continuación, se procedió a

inmunodetectar las proteínas fosforiladas a nivel de tirosinas con el anticuerpo monoclonal específico anti-fosfotirosina. De forma paralela, se realizaron experimentos control en los que se utilizó el anticuerpo 203 anti-Trk para la inmunodetección. Por último, se utilizó un Sistema ECL de Detección de Quimioluminiscencia (Amersham) para detectar visualmente las proteínas fosforiladas a nivel de tirosinas sobre la membrana de transferencia.

Para determinar la fosforilación a nivel de residuos de tirosina de proteínas contenidas en los lisados celulares totales, se procedió a separar, transferir e inmunodetectar las proteínas sobre una membrana similar. El grado de fosforilación a nivel de tirosinas de los receptores Trk fue cuantificado mediante densitometría láser.

7.4 Metodología general

7.4.1 Reactivos y factores neurotróficos

La mayor parte de los reactivos y materiales empleados en la realización de los experimentos fueron obtenidos de Sigma. El resto de los reactivos fueron adquiridos de las siguientes compañías: las placas de cultivo, de Nunc, Falcon y Corning; la metrizamida, de Nycomed; el PMSF, la proteinasa K y el anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína, de Boehringer-Mannheim; los sueros equino y bovino fetal, la lavendustina A, la herbimicina A, la genisteína, el metil 2,5-hidroxicinnamato, la tirfostina y el ácido 2-hidroxi-5-(2,5-dihidroxibencil) aminobenzoico, de Gibco; el violeta cristal, de EM Diagnostic System; el glutaraldéhid, de Bio-Rad; el OsO₄, de Dalton; el Araldite, de Fluka; el citrato de plomo y el acetato de uranilo, de Reynolds; el Sistema *Magic DNA Clean-Up*, de Promega; la mezcla de metionina y cisteína marcadas con ³⁵S, de ICN-Flow; el ¹⁴C-acetil-CoA y

el Sistema ECL de Detección de Quimioluminiscencia, de Amersham; el anticuerpo anti-fosfotirosina IgG2bk, de UBI; la membrana de transferencia Immobilon-P, de Millipore, y; la estaurosporina, el K252-a y el K252-b, de CalBiochem.

En general, las sustancias químicas fueron disueltas en dimetilsulfóxido o etanol, ninguno de los cuales afecta la supervivencia celular a las concentraciones utilizadas. Se tomaron precauciones para proteger los cultivos de la luz a fin de impedir la fotoinactivación de las drogas. Por otra parte, diversos anticuerpos fueron amablemente suministrados por otros investigadores: el anticuerpo anti-ChAT de pollo, por el Dr. M. Epstein, de la *University of Wisconsin* (USA); el anticuerpo monoclonal anti-SC1, por el Dr. C.E. Henderson, del *CNRS-INSERM* de Marsella (Francia); el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10, por el Dr. David Kaplan, del *NCI-Frederick Cancer Research and Development Center* (USA), y; el anticuerpo anti-pan-Trk 203, por el Dr. Dionisio Martín-Zanca, del CSIC-Instituto de Microbiología Bioquímica de Salamanca. El NGF fue purificado a partir de glándulas submaxilares de ratón según el método de Bocchini y Angeletti (1969), mientras que el BDNF, la NT-3 y la NT-4/5 fueron obtenidas gracias a la gentileza del Dr. Dionisio Martín-Zanca. Los embriones de pollo y las ratas preñadas fueron obtenidos de COPAGA (Lleida) y Harlan (EE.UU.), respectivamente.

7.4.2 *Material fotográfico*

Las preparaciones examinadas en los microscopios ópticos de contraste de fase y de fluorescencia han sido fotografiadas en película Perutz Chrome 100 ASA con un aparato Wild MPS-45 acoplado a los microscopios. Las fotografías de fluorescencia fueron realizadas a diferentes tiempos de exposición (entre 2 y 8 min), controlados

manualmente después de un período de prueba para determinar estos tiempos en función de la intensidad de la fluorescencia, la sensibilidad de la película y de los objetivos utilizados. Las imágenes seleccionadas fueron positivizadas en papel por el sistema directo de Ciba (Cibachrome).

Las fotografías correspondientes a las observaciones realizadas en el microscopio electrónico fueron efectuadas sobre placas fotográficas Agfa-Gevaert de 6,5x9 (23D56-P3-AH) de Scientia Film, y positivadas en papel Ilford.

7.4.3 Estadística

Para ajustar las ecuaciones a los datos hemos utilizado una rutina de minimización no lineal de cuadrados mínimos de Marquardt-Levenberg (Sigma-Plot versión 5.0, Jandel Scientific). Se representa todas las medias \pm SEM, a menos que se indique de otra forma. Hemos comprobado la significación de las diferencias con pruebas *t* de Student y de Mann-Whitney. Se considera que las diferencias son significativas cuando la *p* es menor de 0,05.

7.4.4 Informática

En la elaboración de los resultados presentados en esta Tesis se ha utilizado los siguientes programas informáticos: Excel v3.0 de Microsoft, para el análisis matemático y estadístico de los resultados; Sigma-Plot v5.0 de Jandel Scientific y Microsoft Graph v5.0 de Microsoft, para la elaboración de gráficos; PowerPoint v4.0 de Microsoft y Corel PhotoPaint v3.00a de Corel Corporation, para el procesado y la edición de imágenes, y; Word v6.0 de Microsoft para la redacción del texto.

RESULTADOS

8. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL FENÓMENO DE LA MUERTE FISIOLÓGICA DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

8.1 Proceso de purificación, evaluación del grado de pureza y procedimientos de cultivo

El método de purificación fue esencialmente el descrito por Arakawa et al. (1990) con las modificaciones menores detalladas en el Apartado 7.1.2. Las MTN's fueron purificadas en base a su densidad usando gradientes de metrizamida. Este procedimiento rindió cultivos puros (>95%) de MTN's como se puede deducir de los siguientes criterios:

1) Como demuestra la Figura 8.1, las células disociadas a partir de médulas espinales tienen un aspecto muy heterogéneo en cuanto a tamaño (diámetro medio \pm SEM, $9,00 \pm 2,01 \mu\text{m}$; rango, 4,84-20,13 μm ; n = 688) (Figura 8.1A) e intensidad de brillo al ser observadas con ópticas de contraste de fase (Figura 8.1D). Tras la purificación con metrizamida, las células de la fase intermedia presentan un aspecto más homogéneo (Figura 8.1E) y un mayor diámetro (diámetro medio \pm SEM, $13,13 \pm 2,19 \mu\text{m}$; rango, 9,18-19,35 μm ; n = 132) (Figura 8.1B) mientras que las células acumuladas en el fondo del tubo siguen mostrando un aspecto heterogéneo (Figura 8.1F) y un menor diámetro (diámetro medio \pm SEM, $8,23 \pm 1,59 \mu\text{m}$; rango, 5,34-13,80 μm ; n = 233) (Figura 8.1C).

2) De acuerdo con las descripciones de otros laboratorios (Martinou et al., 1989; Arakawa et al., 1990; Jeong et al., 1991), fuimos capaces de marcar las MTN's retrógradamente mediante la inyección del colorante liposoluble Dil en el tejido muscular de los embriones de pollo

12 hr antes de su purificación. Encontramos que el 2,3% de las células del disociado de médula espinal inicial estaban marcadas, mientras que el porcentaje alcanzaba el 6,1% en la interfase de metrizamida (datos no mostrados).

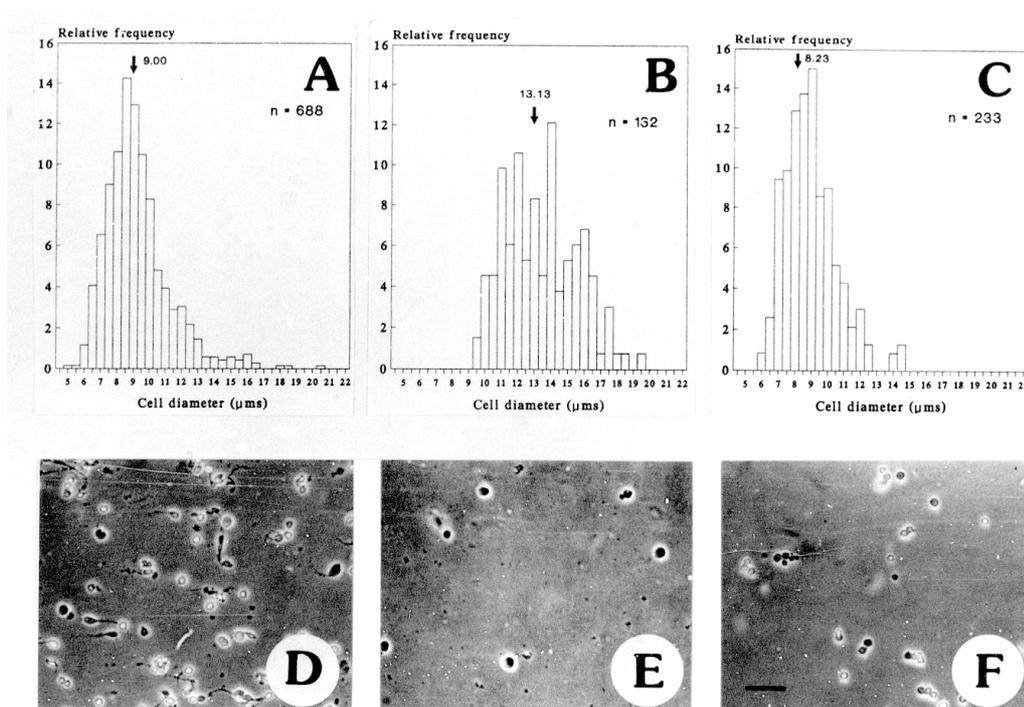


Figura 8.1. La técnica de purificación mediante gradiente de metrizamida permite obtener una población homogénea de células: distribución del tamaño (A-C) y aspecto morfológico bajo microscopía óptica de contraste de fase (D-F) de médulas espinales disociadas enteras (A,D), de las células retenidas en la interfase de metrizamida (B,E) y de las células descartadas en el fondo del tubo (C,F). Las flechas en A-C indican el valor medio. Barra de escala, 50 μm (D-F).

3) La actividad ChAT específica (expresada como $\text{cpm}/10^6$ células \times min de reacción) en las células de la fracción intermedia ($542 \pm 30,4$) estaba significativamente enriquecida en comparación a las células no fraccionadas ($272 \pm 36,7$) o las células descartadas tras la centrifugación en un gradiente de metrizamida ($61,9 \pm 14$) (Figura 8.2).

4) Más del 95% de las células presentes en las placas de cultivo presentan positividad en la doble tinción de cultivos con anticuerpo contra

la proteína del neurofilamento de 68 kDa (Figura 8.3A) y con suero policlonal anti-ChAT (Figura 8.3B). La tinción se concentra en los somas celulares y las neuritas. Ninguna célula mostró positividad a la inmunotinción para GFAP. Este resultado se correlaciona con la ausencia de células proliferativas en las placas de cultivo incluso tras períodos prolongados (hasta 14 días).

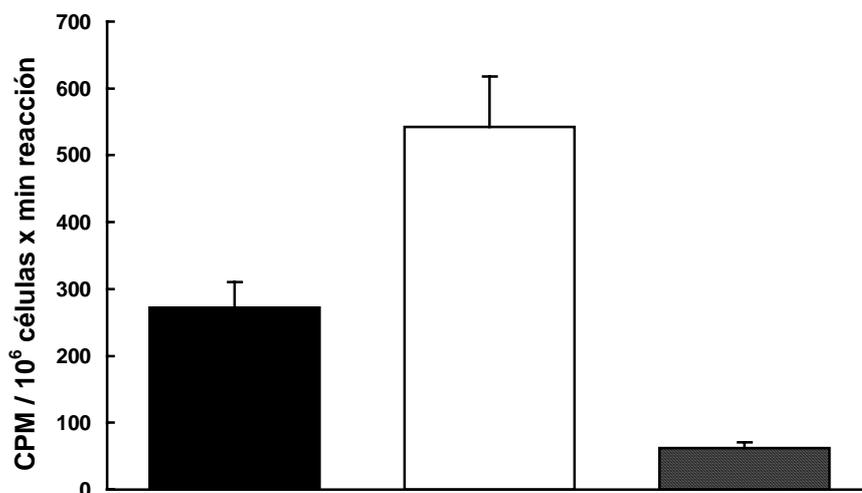


Figura 8.2. Las neuronas aisladas con la técnica de gradiente de metrizamida presentan un importante enriquecimiento de su actividad ChAT. *Columna negra*, actividad ChAT en los disociados de médula espinal completos; *columna blanca*, actividad ChAT en las células de la interfase de metrizamida; *columna gris*, actividad ChAT en las células descartadas. La cuantificación fue realizada por triplicado a partir de seis purificaciones de MTN's diferentes.

5) En cultivos teñidos con un anticuerpo monoclonal anti-SC1, se comprobó cómo más del 90% de las células presentan inmunorreactividad después de 2 días en cultivo. El antígeno SC1 es un marcador de superficie específico para MTN's, neuronas de los ganglios espinales y células de la placa dorsal del embrión de pollo (Tanaka y Obata, 1984). Se estableció el protocolo de detección en base a un trabajo que describe que los antígenos SC1 son sensibles a la tripsinización, reapareciendo tras 36 hr de cultivo *in vitro* (Bloch-Gallego et al., 1991). Las neuronas inmunorreactivas no son células de la placa