

Figura 8.6. Patrón escalonado de degradación del ADN que acontece en MTN's deprivadas de MEX *in vitro*: ADN de MTN's cultivadas en presencia de MEX (A) y de MTN's deprivadas de MEX cultivadas sin (B) o con (C) CHX (0,5 µg/ml). El ADN fue extraído a partir de cultivos de 2 días de antigüedad. Las flechas indican la posición y el número de bandas de tamaño oligonucleosomal de degradación del ADN. Las referencias de peso molecular están indicadas a la izquierda y están expresadas en kpb.

8.7 El “compromiso” letal de las motoneuronas deprivadas de extracto muscular

Como se puede deducir de los resultados previos, la muerte celular de las MTN's tras la deprivación de MEX reúne las principales características de la apoptosis. Por consiguiente, decidimos determinar con precisión la cinética de este proceso. Un trabajo previo (Edwards et al., 1991) argumenta que el NGF puede rescatar las neuronas simpáticas en estadios más tardíos del proceso de muerte que los inhibidores de la síntesis de proteínas y ARN. Estos resultados fueron explicados sobre la base de que el NGF podría ser capaz de modificar a nivel posttraduccional las supuestas proteínas asesinas sintetizadas por las neuronas simpáticas deprivadas de factor trófico. Sin embargo, Martin et al. (1992) han documentado que, cuando las neuronas pierden su potencialidad para ser rescatadas de la muerte mediante la inhibición de la síntesis de proteína y ARN, también pierden la capacidad de ser rescatadas por su factor trófico específico, el NGF.

Tomando en consideración estos resultados aparentemente contradictorios, decidimos investigar el proceso de “compromiso” hacia la muerte celular en otra población de células neuronales, las MTN's, que no dependen del NGF para su supervivencia aunque sí de las actividades tróficas presentes en el MEX (Arakawa et al., 1990). En nuestro sistema de cultivo, primero investigamos la existencia de un tiempo de “compromiso” hacia la muerte celular en MTN's deprivadas de MEX.

Con este objetivo, se cultivaron las MTN's durante 48 hr en presencia de MEX. En ese momento, se deprivaron los cultivos de MEX y se determinó el número de MTN's presentes en el área central de los pocillos de cultivo. A intervalos de tiempo regulares tras la deprivación (hasta 36 hr), se readicionó MEX a los subgrupos de MTN's. Posteriormente se evaluó la supervivencia de las MTN's así tratadas según se especifica en Materiales y Métodos.

La Figura 8.7A muestra un experimento en el que sobrevivieron un $74,0 \pm 7,2\%$ de las MTN's previamente mantenidas en presencia de MEX. Sin embargo, sólo un $17,5 \pm 4,3\%$ de las MTN's inicialmente contadas sobrevivieron cuando se les deprivó indefinidamente de su ambiente trófico. Establecimos el tiempo de “compromiso” letal entorno a 10 hr, dado que en ese momento la readición de MEX sólo consigue evitar la muerte de la mitad de las MTN's deprivadas. Después de 15 hr de deprivación, el MEX ya no fue capaz de rescatar MTN's de la muerte celular. Este experimento fue repetido en dos ocasiones más con resultados prácticamente idénticos.

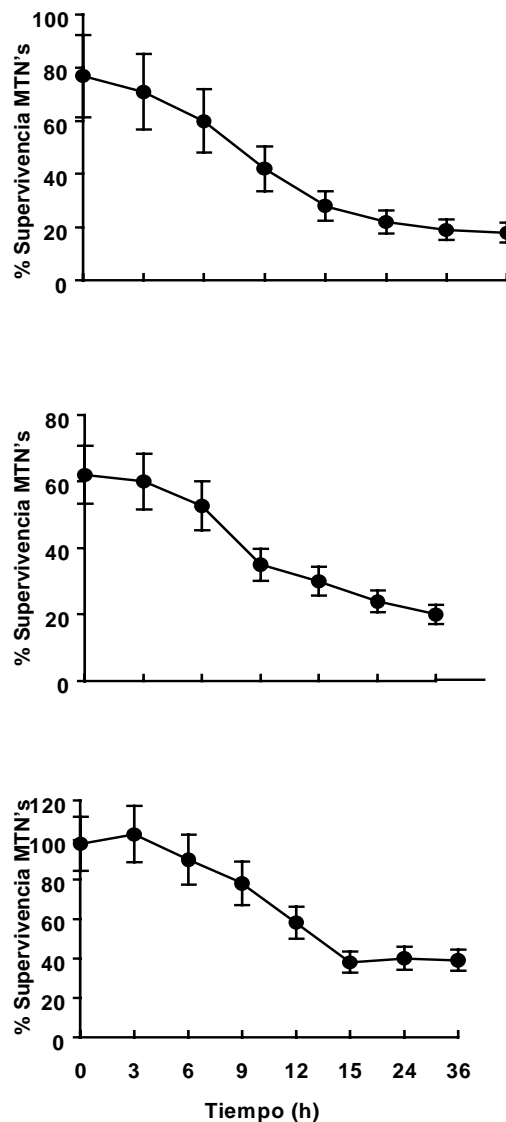


Figura 8.7. Compromiso letal de las MTN's tras la deprivación *in vitro*. Se cultivaron las MTN's durante 48 hr en presencia de una concentración saturante (300 $\mu\text{g/ml}$) de MEX, a continuación se deprivaron y a intervalos de tiempo regulares (hasta 36 hr) se adicionó al medio de cultivo: (A) MEX (300 $\mu\text{g/ml}$); (B) ActD (10 $\mu\text{g/ml}$), o; (C) CHX (0,5 $\mu\text{g/ml}$). La supervivencia fue evaluada 48 hr (A y C) o 36 hr (B) tras la adición de MEX o de las drogas. En todos los gráficos, *Tiempo 0* representa el número de MTN's mantenidas de forma continuada en presencia de MEX. El *último punto* de las gráficas (tiempo 36 hr para A y C, y tiempo 24 hr para B) representa el porcentaje de supervivencia cuando las MTN's fueron cultivadas sin MEX y nunca se expusieron a un medio de cultivo con MEX (A) o no recibieron ActD (B) ni CHX (C). Los valores de supervivencia mostrados son medias \pm SEM de un único experimento que fue repetido dos veces más con resultados comparables a los aquí presentados ($n = 6$ para todos los grupos).

A continuación, decidimos determinar cuánto tiempo necesitan las MTN's deprivadas de MEX para sintetizar los productos que inducen su propia muerte. Por tanto, investigamos hasta cuánto tiempo después de

la privación de MEX se puede retrasar la adición al medio de cultivo de ActD o CHX observando aún su efecto de rescate de la muerte neuronal. En estos experimentos, se privaron las MTN's después de haberlas mantenido en presencia de MEX durante 48 hr. Los cultivos recibieron CHX a intervalos de tiempo diversos tras la privación (hasta 36 hr), evaluándose la supervivencia 36 hr después. Los experimentos con ActD se limitaron a 24 hr dada la elevada toxicidad de esta sustancia.

Como ilustra la Figura 8.7C, durante las primeras 6 hr de privación de MEX, la CHX fue capaz de rescatar de la muerte celular más del 90% de las células que hubieran muerto de otra forma. Sin embargo, tras 15 hr en ausencia de MEX, la CHX no fue capaz de rescatar ninguna MTN de la muerte celular. Usando esta estrategia, establecimos el tiempo de "compromiso" letal en ~10 hr. Estos resultados se correlacionan bastante bien con los obtenidos mediante experimentos en los que se utilizó la readición de MEX para rescatar las neuronas. Se realizaron también experimentos similares en los que se usó ActD en lugar de CHX. Como muestra la Figura 8.7B, los resultados obtenidos con ActD no difieren significativamente de los conseguidos mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, objetivándose un tiempo de "compromiso" letal de ~10 hr.

8.8 El programa de muerte celular se activa de forma transitoria tras la privación trófica

El principio que subyace la muerte neuronal programada tras la privación trófica es la activación de la expresión de genes de muerte. Sin embargo, se desconoce si esta expresión es permanente o no. Trabajos previos de Martin et al. (1988) y Edwards et al. (1991) han demostrado que el NGF es capaz de rescatar neuronas simpáticas privadas de NGF mantenidas vivas previamente con CHX durante períodos de 48 hr y 72 hr. Si se asume que la transcripción de los genes

de muerte tras la deprivación trófica es permanente y que la CHX es capaz de mantener la supervivencia neuronal durante períodos de tiempo prolongados a través de la inhibición de la traducción de estos ARNm's, lo lógico sería que el programa de muerte progresara independientemente del momento en que se eliminara la CHX de los cultivos, ocasionando la muerte de las neuronas.

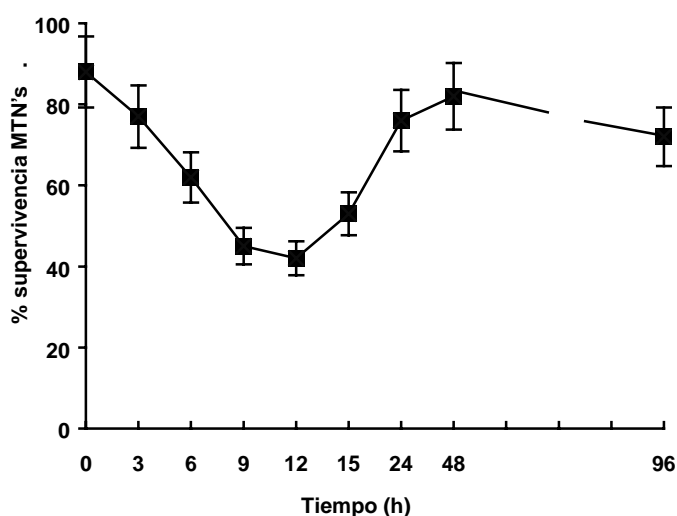


Figura 8.8. La activación del programa de muerte celular en las MTN's tras la deprivación trófica *in vitro* parece ser transitoria. Se cultivaron las MTN's durante 48 hr en presencia de una concentración saturante (300 $\mu\text{g/ml}$) de MEX, a continuación se deprivaron y se mantuvieron vivas en presencia de CHX (0,5 $\mu\text{g/ml}$), y a intervalos de tiempo regulares (hasta 96 hr) se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco con MEX y sin CHX en su composición. La supervivencia fue evaluada 48 hr tras la readición de MEX. Los valores mostrados son medias \pm SEM de la supervivencia celular en los tiempos indicados de un único experimento que fue repetido dos veces más con resultados comparables a los aquí presentados ($n = 6$ para todos los grupos).

Sin embargo, se podría pensar que, incluso en caso de traducirse los ARNm's de las proteínas de muerte, el NGF podría contrarrestar los efectos de dichas proteínas a través de mecanismos posttraduccionales, como han sugerido Edwards et al. (1991). Sin embargo, si éste fuera el caso sería lógico que el efecto de rescate del NGF ocurriera independientemente del tiempo de deprivación trófica y exposición a CHX de las neuronas. A fin de comprobar esta hipótesis, realizamos una serie de experimentos en los que, al deprivar las MTN's de MEX, la transcripción no fue interferida directamente aunque sí se inhibió la

síntesis de proteína con CHX. Después de tiempos crecientes (hasta 48 hr), se eliminó la CHX de los cultivos para readicionar MEX a continuación. La supervivencia fue evaluada 24 y 48 hr después.

La Figura 8.8 ilustra los resultados obtenidos en un experimento representativo diseñado según esta estrategia. A partir de 4 hr tras la privación de MEX, se observó una progresiva disminución del porcentaje de MTN's que podían ser rescatadas de su muerte, alcanzándose valores mínimos a las 12 hr. El MEX rescató la mitad de las MTN's después de ~10 hr de iniciar la inhibición de la síntesis proteica. Sin embargo, cuando se cultivaron las MTN's sin MEX aunque en presencia de CHX durante 24 o 48 hr, a continuación se eliminó la CHX y finalmente se readicionó MEX a los cultivos durante otras 48 hr, observamos que la muerte de MTN's fue mínima. Es decir, el MEX estimuló la supervivencia de casi todas las MTN's (Figura 8.8). Este experimento fue repetido seis veces, todos ellos con resultados comparables.

8.9 Participación del cAMP y de la proteína kinasa A en la señalización de la supervivencia de las motoneuronas *in vitro*

La posible implicación del segundo mensajero cAMP y de las PKA's en la señalización neurotrófica es muy controvertida (revisado en Apartado 3.6.4.6). Con la intención de establecer si la elevación de los niveles intracelulares de cAMP tienen algún efecto sobre la supervivencia de las MTN's *in vitro*, se trataron cultivos con dibutilil-cAMP (db-cAMP) -un análogo permeable del cAMP- y forskolina -un activador de la adenilato ciclasa- (Tabla 8.3). Tras mantener las MTN's en presencia de MEX durante 48 hr, se substituyó el medio de cultivo con concentraciones crecientes de ambas drogas, y se evaluó la supervivencia neuronal después de 24 hr. Como se detalla en la Tabla 8.3, tanto la forskolina como el db-cAMP estimularon la supervivencia de MTN's deprivadas de