

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC:

Per als cultius primaris de neurones i de glia corticals es van utilitzar embrions de rates de la soca OFA, de 17 dies de gestació, proporcionades pel Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2. REACTIUS GENERALS I DE CULTIUS:

- Àcid Glutàmic-[³H] (63Ci/mmol) ; Amersham Pharmacia Biotech
- Penicilina/estreptomicina, sèrum fetal boví (FCS) i sèrum fetal de cavall (FHS); GibcoBRL
- Medis de Cultiu i PBS (Phosphate buffered saline): Pan i SIGMA CHEMICAL Co.
Respectivament:
 - Basal Medium Eagle's (BME) suplementat amb 10% FCS, 30mM glucosa, 2mM Glutamina, 25.000 u de penicil·lina i 25mg d'estreptomicina;
 - Basal Medium Eagle's (BME) suplementat amb 10% FHS, 30mM glucosa, 2mM Glutamina, 25.000 u de penicilina i 25mg d'estreptomicina;
 - PBS suplementat amb 30mM glucosa, 100.000 u de penicil·lina, 100 mgr d'estreptomicina
- Tripsina, desoxiribonucleasa, l'inhibidor de la tripsina (SBTI), PBS, Poli-L-Lisina, albúmina de sèrum boví; SIGMA CHEMICAL Co.
- Anticossos primaris: anti-caspasa 3 activa (Asp175), anti-caspasa 9 activa (Asp353) específic per rata, anti-caspasa 7 activa (D198) de Cell Signaling; anti-Caspasa 3 (H-277) i anti-NFkB p65 de Santa Cruz Biotechnology; Mouse anti- β -Tubulina i mouse anti-rat CD11b/c monoclonal (OX42) de Pharmingen; mouse anti-MAP2 monoclonal i mouse anti-GFAP monoclonal de Chemicon. Anti-rat TNF-alpha antigen affinity purified policlonal de Peprotech EC Ltd.

- Anticossos secundaris: Fluorescein isothiocyanate conjugated-(FITC) conjugated affinipure F(Ab')₂ goat anti rabbit IgG, TexasRed-conjugated affinipure F(Ab')₂ goat anti mouse IgG i Rhodamin (TRITC)-conjugated affinipure F(Ab')₂ rabbit anti goat IgG de Jackson Immunoresearch; Anti-rabbit i anti-mouse IgG's policlonals conjugats amb Horseradish peroxidase de Transduction Biolabs;
- TNF α específic de rata de R&D systems.
- NFkB SN50, inhibidor peptídic permeable de Calbiochem;
- Reactiu d'extracció de proteïnes de mamífers M-PER™ de Pierce
- Z.VAD.FMK i Fumonisina B1 de Alexis Biochemicals
- Kit Elisa anti TNF α de rata de Diaclone
- La resta de reactius químics: Sigma MERCK, BIORAD, PANREAC i FLUKA

3.3. PREPARACIÓ DELS CULTIUS PRIMARIS NEURONALS :

3.3.1. Dissecció i obtenció dels còrtex:

Els còrtex es van extreure d'embrions de rata de 17 dies de gestació; es van netejar de meninges per limitar la contaminació de fibroblasts i se'ls va escindir l'estriat. L'hipocamp es va incloure en la majoria dels casos.

3.3.2. Obtenció de la suspensió cel·lular:

El teixit es va disgregar primer enzimàticament, amb un tampó Krebs-Ringer (NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, Glucosa 14.3mM; 3 gr/L d'Albúmina de sèrum boví) amb tripsina, i posteriorment es va dissociar mecànicament amb l'ajuda d'una malla de niló (el porus de la qual mesurava 40 μ m de diàmetre) i

una pipeta pasteur, per aconseguir una suspensió unicel.lular (Patel A.J.,1985).

Les neurones corticals es van sembrar a una densitat de 300.000 cèl.lules/ cm² amb medi de cultiu BME suplementat amb un 5% de FHS i amb un 5% de FCS; els cultius estaven enriquits en neurones però la presència de glia era destacable. El 7è dia *in vitro* (DIV) es va fer un únic canvi de medi i el medi de sembra es va reemplaçar per medi BME suplementat amb 10%FHS i 10µM de Citosina Arabinòsid, per aturar la proliferació no neuronal del cultiu (vegeu figura 4.1 de l'apartat de Resultats). Les plaques foren mantingudes dins d'un incubador en una atmosfera humida, amb un 5% de CO₂ i a 37°C fins el dia d'utilització.

3.4. DETERMINACIÓ DE L'ALLIBERAMENT DE [³H]-GLUTAMAT:

Aquesta tècnica es va posar a punt per tal de comprovar que les cèl.lules en cultiu responien a estímuls despolaritzants i, per tant, eren funcionals. Aquesta tècnica permet mesurar l'alliberament de glutamat provocat per estímuls despolaritzants com poden ser altes concentracions de K⁺. El protocol que es va utilitzar fou una adaptació dels protocols descrits per Gallo P. et al., (1982) i per Rodríguez J. et al.,(1991).

Taula 3.1. Solucions utilitzades en els experiments d'alliberament de [³H]-glutamat: tots els tampons Krebs-Ringer (KRB) s'ajustaren a un pH de 7.35 i es pretemperaren a 37°C per a la seva utilització.

Composició mM	KRB 5mM K ⁺	KRB MODIFICAT 55mM K ⁺

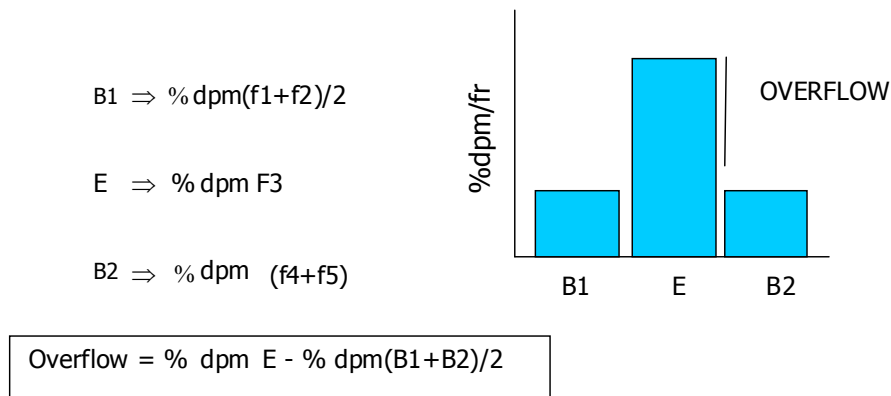
Neurones corticals de 12 DIV es rentaren amb tampó KRB 5mM KCl (vegeu taula 3.1) a 37°C i s'incubaren amb 1 µCi/ml de [³H]-Glutamat (63 Ci/mmol) en tampó KRB 5mM K⁺ durant 15 minuts. Seguidament, s'aspirà el medi i s'afegí 1ml de KRB 5mM K⁺. Aquesta operació es repetí una altra vegada i després es van deixar equilibrar les cèl·lules durant 10 minuts. Passat aquest temps, s'aspirà el medi, i a partir d'aquí, es va anar recollint i renovant el ml de KRB 5mM K⁺, cada 5 minuts. Aquest procediment es va realitzar sis vegades i es recolliren 6 ml tal com s'explica a continuació: la primera fracció s'anomenà f0.; després de recollir la tercera fracció o f2, s'estimularen les cèl·lules amb 1 ml de KRB modificat amb 55 de K⁺ (vegeu taula 3.1) que constituí la fracció estimulada o F3. Seguidament, es van fer dos rentats amb tampó KRB 5mM K⁺ de cinc minuts cadascun, corresponents a la f4 i f5 i també es recolliren. Finalment, per obtenir l'última fracció f6, s'afegí als pous 0.5ml de NaOH 0.5M, i es rascaren les cèl·lules. La radioactivitat de les mostres recollides s'analitzà en un comptador de guspireig, afegint 0.4 ml de les mostres en vials amb 2 ml de líquid de guspireig biodegradable.

Es va confirmar la dependència del Calci en l'alliberament de Glutamat, portant a terme experiments en paral·lel en absència de calci. Aquests experiments es realitzaren de la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment però, a partir del pas de l'equilibrat (aquest inclòs), els tampons utilitzats, idèntics a la Taula 3.1., no contenien CaCl₂·2H₂O; a més s'hi va afegir 1mM d'EGTA, per quel·lular-ne les possibles traces.

Els resultats s'expressaren en % de dpm's de cada fracció recollida, vers les dpm's totals del pou en el moment de l'inici de la fracció, tal com s'aprecia a la fórmula següent:

$$\% \text{ dpm } f_n = \frac{\text{dpm } f_n}{\Sigma (\text{dpm totals} - \text{dpm } f_{n-1})} \times 100$$

n = n^o de la fracció;



Aquests percentatges de cada fracció permetien calcular l'*Overflow*, que és el resultat de la normalització del % $[^3\text{H}]$ -Glutamat alliberat en la fracció estimulada E, corresponent a F3, respecte al percentatge de $[^3\text{H}]$ -Glutamat alliberat en condicions basals, corresponents a les fraccions pre- i post- estímul.

3.5. EXPOSICIÓ A LA DEPRIVACIÓ DE GLUCOSA I OXIGEN (OGD):

Neurones corticals de 12 DIV, sembrades en plaques de plàstic de 24 pous, es sotmeteren a una deprivació de glucosa- O_2 (OGD), segons els protocols descrits anteriorment per Goldberg MP. & Choi DW. (1993), amb mínimes variacions.

Per aconseguir una atmosfera saturada de nitrogen, s'utilitzà una cambra anòxica (C.B.S. Scientific Company) connectada a una bombona amb 5% CO_2 i la resta, N_2 . La barreja de gasos es saturà prèviament amb aigua per evitar l'evaporació del tampó durant l'experiment. S'aspirà el medi de cultiu dels pous i es va reservar en un tub de centrífuga estèril; es van rentar les cèl·lules dos cops amb 1 ml de BSS (NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, NaHCO_3 26.2 mM, Glicina 0.01 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM, pH 7.4, filtrat i a 37°C), prèviament bombollejat amb la barreja de gasos 95% N_2 /5% CO_2 per desplaçar-ne l'oxigen dissolt.

Amb els dos rentats descrits anteriorment, s'aconseguí diluir la glucosa residual del medi romanent unes 2000 vegades. Posteriorment, s'afegí 0.5 ml de BSS i es col·locà la placa dins la cambra anòxica. La cambra es tancà hermèticament i es va connectar durant 15 minuts a un flux continu de 95% N₂/5%CO₂. Passats els 15 minuts, es va segellar l'entrada i la sortida dels gasos i es va col·locar dins l'incubador a 37° C el temps desitjat. Es va finalitzar l'OGD aspirant el BSS i retornant als pous el medi de cultiu reservat inicialment. Els cultius neuronals, sotmesos a diferents períodes d'OGD, foren utilitzats per estudiar la viabilitat cel·lular al llarg del temps amb diferents tècniques: determinació de la reducció del MTT, la determinació de l'activitat LDH, la tinció fluorescent per Hoechst 33258 i Iodur de Propidi, tal com es descriu més endavant. Els resultats de les tècniques del MTT o de l'activitat LDH es referiren als valors obtinguts en una placa control tractada en paral·lel, exposada a condicions de normòxia, on les cèl·lules foren exposades a BSS carbogenat i amb 5 mM de Glucosa durant els mateixos períodes de temps que els cultius sotmesos a OGD. La manipulació mecànica que suposaven els rentats no minvava la viabilitat cel·lular de manera significativa.

3.6. DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR:

3.6.1. Assaig de la reducció del MTT:

El MTT o Bromur de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5, difeniltetrazoli, és una sal de tetrazoli hidrosoluble. El MTT és reduït a formazan, un compost lila insoluble en medi aquós, per les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules viables. Es pot solubilitzar amb DMSO i se'n pot mesurar l'absorbància espectrofotomètricament a 570 nm, correlacionant l'absorbància obtinguda amb la viabilitat cel·lular. Aquesta tècnica s'utilitza per a determinar el percentatge de cèl·lules viables que romanen al cultiu,

després d'un tractament amb algun compost determinat o bé després d'un període d'OGD. Aquesta tècnica no permet discriminar el tipus de mort cel·lular que es produeix (Mosmann T., 1983)

A partir d'una solució de MTT de 5mgr/ml en aigua destil·lada, s'afegí el mínim volum per tal d'aconseguir una concentració de MTT final als pous de 0,2 mgr/ml. Les cèl·lules s'incubaren a 37°C durant 30-45 minuts; s'aspirà el medi de cultiu i s'afegí la meitat del volum del pou de DMSO per dissoldre el formazan format.

Es transferí ràpidament 100 µl del contingut de cada pou en una placa de 96 pous, per tal de fer la mesura espectrofotomètrica a 570nm en un lector de plaques (Labsystem Multiskan).

3.6.2. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa :

La Lactat deshidrogenasa (LDH) és un enzim citosòlic que és alliberat al medi de cultiu quan les cèl·lules es moren produint-se el trencament de la seva membrana; per tant es pot establir una correlació entre la quantitat de LDH al medi i la proporció de cèl·lules mortes (Koh JY., 1987). Es va mesurar a 340nm, el decrement d'absorbància resultant de l'oxidació del NADH emprant el piruvat com a substrat. Per això, es recolliren els medis de les cèl·lules en tubs de microcentrífuga i es mantingueren en gel fins al moment de la mesura. Per recollir els extractes cel·lulars, s'afegiren 100 µl de M-PER (Pierce) a cada pou, per lisar les cèl·lules. Les mesures de l'activitat LDH de cada mostra es van realitzar amb un analitzador automàtic (COBAS). El tampó de reacció (Tris 80mM, Piruvat 1.6mM, NaCl 200mM, NADH 0.2mM; pH 7.2;) utilitzat fou el descrit en el kit comercial de Biosystems per a la mesura automàtica de l'activitat LDH. Els valors obtinguts foren expressats en µmols de NADH desapareguts per minut. Els valors de les pendents es multiplicaren pels ml de medi recollits per pou.

Per poder expressar el % de LDH alliberada al medi vers el total de LDH que contenen les cèl.lules es féu el següent càlcul:

$$\% \text{ LDH} = \frac{\text{LDH medi}}{\text{LDH medi} + \text{LDH extractes}} \times 100$$

Els percentatges obtinguts es normalitzaren entre el valor mínim de mort, és a dir, l'activitat LDH que presentaven les plaques control, i el valor màxim de mort, induït per 1 mM de Glutamat, que assegurava pràcticament el 100% de la mort neuronal. La presència de Glutamat a unes concentracions excitotòxiques no afectaren la viabilitat de la glia del cultiu.

3.7. AVALUACIÓ DE LA NECROSI I L'APOPTOSI MITJANÇANT ELS MARCADORS FLUORESCENTS IODUR DE PROPIDI I HOECHST 33258.

El Iodur de Propidi (PI) és un compost fluorescent que tenyeix el RNA i el DNA. És un compost molt polar i si s'afegeix abans de fixar els cultius, només tenyeix les cèl.lules que tenen la membrana trencada, trets essencials en la mort cel.lular per necrosi o apoptosi tardana. D'altra banda, el Hoechst 33528 o Bisbenzimidazol (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) és un compost fluorescent que s'uneix al DNA. Si la cromatina es troba condensada o fragmentada, tal com esdevé en processos de mort cel.lular per apoptosi, aquest compost es concentra en major proporció a causa de la condensació de les estructures i el senyal que s'obté amb el microscopi de fluorescència és molt més intens. Per tant, amb aquesta doble tinció i observant l'estat de condensació de la cromatina dels nuclis, es pot quantificar la mort necròtica i la mort apoptòtica . Després del tractament amb OGD, les cèl.lules s'incubaren durant 12 hores amb 10 µM de PI; es rentaren amb TBS (Trizma base 0.05M, NaCl 0.15M, H₂O pH 7.3-7.4) pretemperat a 37°C.

Es van fixar amb Paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat 0.1M pH 7.2 durant 10 minuts en agitació suau. Es rentaren amb TBS fred (4°C) dues vegades i s'afegí una dissolució de Hoechst 33258 1µgr/ml. Es deixà incubar durant 5 minuts en agitació suau i es van fer dos rentats amb TBS fred. Amb unes gotes de medi de muntatge, es realitzà el muntatge amb un cobreobjectes sobre el porta per a la seva observació al microscopi de fluorescència (Leica). Les longituds d'ona per a les observacions foren 650 nm per al Hoechst i 538 nm pel PI. Es comptaren totes les cèl·lules d'un mínim de quatre camps en cada pou (unes 800 cèl·lules per cada condició de l'experiment) segons els criteris resumits en la taula 3.2.

Taula 3.2. Criteris de discriminació entre necrosi i apoptosi

CONDICIÓ	CROMATINA NUCLI (Hoechst 33258)	PI
Viables	laxa	-
Apoptòtiques	condensada/grànuls	-/+
Necròtiques	laxa	+

Els resultats es van expressar en forma de percentatge de cèl·lules apoptòtiques o necròtiques vers el total de cèl·lules comptades.

3.8. IMMUNOCITOQUÍMICA:

Neurones corticals de 12 DIV, sembrades en portes de 8 pous recoberts amb Poli-D-lisina (Biocoat, FALCON) es rentaren amb TBS pretemperat a 37°C i s'incubaren amb Paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat 0.1M pH 7.2, durant 1 hora a 4° C.

Es van rentar els portes tres vegades amb TBS-Tween 0.1% (TBST) a temperatura ambient i es van bloquejar amb (TBST , 5% FHS , 3% BSA) durant 45-60 minuts.

Posteriorment es van incubar les cèl·lules amb l'anticòs primari diluït en TBST 5% BSA, durant 16 hores a 4°C. Es van fer tres rentats amb TBST i es van incubar durant una hora amb l'anticòs secundari pertinent conjugat amb FITC, TRIT o TexasRed diluïts 1:500 en TBST 5% BSA segons els anticossos primaris a detectar. Després de tres rentats amb TBST, es va fer un últim rentat amb TBS i es van muntar les preparacions amb medi de muntatge.

Per a detectar dues proteïnes diferents, s'incubà amb els dos anticossos primaris a la vegada durant 16 hores a 4°C. Es procedí de la mateixa manera amb els anticossos secundaris, conjugats amb FITC, TRIT o TexasRed segons els anticossos primaris utilitzats.

Es van observar les preparacions sota un microscopi de fluorescència a una longitud d'ona de 492 nm per al FITC, a 552 nm per el TRITC i a 595nm per al Texas Red.

3.9 WESTERN BLOT:

Els tampons utilitzats en la tècnica de western blot foren els següents:

- Tampó d'extracció proteica M-PER(Pierce) amb Leupeptina 10 μ M, PMSF 1 mM, i Aprotinina 10 μ M
- Tampó de càrrega: 62.5mM Tris-HCl (pH6.8 a 25°C), 2% p/v SDS, 10% glicerol, 50mM DTT, 0.01% p/v de blau de bromofenol
- Tampó d'electroforesi: 25mM Tris/192mM Glicina, 20%SDS
- Tampó de transferència: 25mM Tris/192mM Glicina, 20% de Metanol
- Tris-buffered saline (TBS): 20mM Tris, 137mM NaCl, pH 7.6
- TBST: TBS-Tween 0.1%
- Tampó de bloqueig: TBST-5%BSA

Es van recollir les cèl·lules directament de les plaques mitjançant el tampó d'extracció M-PER suplementat amb els inhibidors de les proteases (100 μ M PMSF, 2.5 μ M Aprotinina i 1 μ M Leupeptina).

La quantitat de proteïna dels extractes va ser mesurada pel mètode de Bradford (Bradford MM.,1976). Les mostres es van diluir amb el tampó de càrrega, es van bullir 5 minuts i es van separar en gels d'acrilamida al 15%. A cada carril es va carregar la mateixa quantitat de proteïna, entre 20 i 35 μg segons la proteïna a detectar. Un cop finalitzada l'electroforesi es van transferir les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Amersham) prèviament activada amb metanol. El sistema de transferència utilitzat fou un sistema *semidry*. La membrana amb les proteïnes transferides es va bloquejar amb tampó de bloqueig durant una hora i posteriorment es va incubar amb l'anticòs primari (diluint en tampó de bloqueig) pertinent durant tota la nit a 4°C. Després de cinc rentats de 10 minuts amb TBST, la membrana fou incubada durant una hora amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa en tampó de bloqueig, a temperatura ambient. Les proteïnes es van detectar per quimioluminiscència (Super Signal west pico, Pierce).

3.10. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE TNF α :

Els cultius neuronals es van sotmetre a 75 minuts d'OGD o de normòxia. I es va recollir una mostra del tampó BSS o del BSS 5mM glucosa en que havien estat en contacte les cèl·lules durant els 75 minuts d'isquèmia o de normòxia, respectivament. Posteriorment, es va recollir el medi de cultiu dels pous, 24 hores després de la OGD o la normòxia. Es va determinar la concentració total de proteïna dels pous pel mètode de Bradford (Bradford MM., 1976). Els medis de cultiu i els tampons BSS o BSS-5mM Glucosa s'analitzaren per tècniques d'ELISA per tal de determinar la seva concentració de TNF α seguint el protocol indicat en el Kit de Diaclone, específic per a rata. Els valors obtinguts de TNF α (pg/ml) s'expressaren en funció de quantitat de proteïna: pgTNF α /mg prot

3.11. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DIACILGLICEROLQUINASA (DAG QUINASA) :

La quantitat total de ceramida es va determinar amb l'assaig d'activitat diacilglicerolquinasa (Preiss JE.,1989). Les cèl·lules es van recollir directament de les plaques amb tampó Krebs-EDTA fred (116 mM NaCl, 25mM NaCO₃,11mM glucosa , 4.7 mM de KCl, 1.2 mM de KH₂PO₄ i 10 mM d'EDTA) i es van transferir a tubs de vidre que contenen 1.2 ml cloroform/metanol (1:2, v/v). Després de 30 minuts en gel, es va afegir a cada tub 0.5 ml de cloroform i els tubs es van agitar vigorosament. Després de 5 minuts, els tubs es van centrifugar a 2000x g per separar la fase orgànica de la fase aquosa. La fase superior aquosa va ser eliminada i la fase inferior orgànica, que contenia els lípids fou evaporada sota un flux de nitrogen. L'assaig de la DAG quinasa va ser realitzat de la següent manera: els lípids es van dissoldre en 20 µl de tampó de solubilització (7,5% octylglucòsid, 5mM difosfatidilglicerol i 1mM DETAPAC sonicant durant 15 segons. La reacció de la quinasa es va realitzar durant trenta minuts a temperatura ambient en el tampó 50 mM imidazol pH6.6 de reacció que contenia: 50mM NaCl, 1 mM EGTA, 12.5 mM Mg Cl₂, 2 mM DTT, 2.5 µg sn.1,2-diacilglicerol quinasa d'*E. coli* recombinant i 9.4 mM [γ ³²P]ATP (activitat específica 12.5 mCi/mmol) en un volum final de 100 µl . La reacció també es va portar a terme amb concentracions conegudes de ceramida per tal de confeccionar una recta patró que permetés la quantificació de ceramida dels extractes lipídics recollits. La reacció fou aturada afegint 0.6 ml cloroform/metanol/HCl 1M (1:2:0.01, v/v). S'obtingué la fase orgànica tal com s'ha descrit anteriorment, se'n van evaporar 0.3 ml i els lípids obtinguts van ser resuspesos en 15 µl de cloroform/metanol (4:1,v/v). El resultat es va resoldre en una placa de TLC de silica gel -60. La TLC es va posar en contacte amb la fase mòbil cloroform/acetona/metanol/ àcid acètic /aigua (10.4.3.2.1, vol.)

La mobilitat de la fosfoceramida (Rf=0,41), la fosphoC₂-ceramida (Rf=0,22) i el PtdOH

($R_f=0,6$) va ser mesurada amb estàndards exògens després de revelar la TLC amb vapors de I_2 . La radioactivitat de la [^{32}P]fosfoceramida i de la [^{32}P]PtdOH fou visualitzada amb el GS-525 Molecular Imager system de Biorad i quantificada amb el software Molecular Analysis v 1.5.

3.12. MARCATGE METABÒLIC AMB [^{14}C]-SERINA I [3H]-PALMITAT:

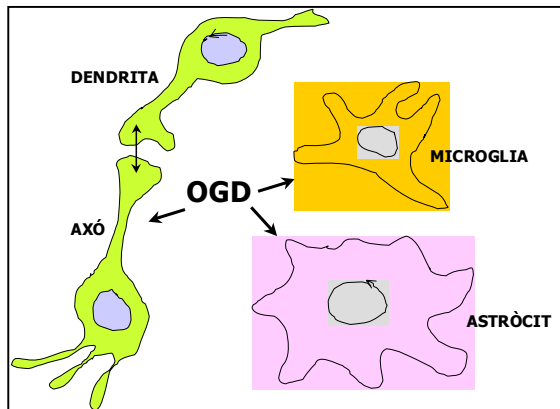
Per determinar la síntesi de ceramida *de novo*, les cèl·lules foren marcades (*pulse-chase*) amb [3H]-palmitat ($1\mu Ci/ml$) i [^{14}C]-serina ($0.5\mu Ci/ml$),

Les cèl·lules es van exposar a la normòxia o a l'OGD seguint el procediment descrit anteriorment, però en l'últim rentat de 0.5ml de BSS o BSS 5mM de glucosa, es van afegir els precursors radioactius. Els lípids foren extrets després de l'OGD o la normòxia, o alternativament al cap de dues hores de retornar el medi inicial als pous. Després de l'extracció lipídica, es van evaporar 600 μl de la fase orgànica de les mostres i es van resuspendre amb 15 μl de cloroform/metanol (4/1, v/v). Posteriorment, els lípids de les mostres es van separar en una TLC. Les cromatografies es posaren en contacte amb la primera fase mòbil cloroform/metanol/aigua (100:42:6, v/v/v), i es van deixar progressar fins a 14 cm. Es van deixar evaporar els solvents i les cromatografies foren revelades 3 vegades fins a 19 cm amb una fase mòbil composta per hexà/dietilèter/ àcid fòrmic (55:45:1, v/v/v). La ceramida (R_f 0.62) i l'esfingomielina (R_f 0.11) foren identificades per comigració amb els estàndards exògens els quals foren revelats per vapors de I_2 . Les taques foren rascades i disposades en vials, i la radioactivitat fou quantificada mitjançant el comptador de guspireig.

3.13. ANÀLISI ESTADÍSTICA:

Els resultats de les gràfiques i de les taules estan expressats com a mitja \pm SEM. Els grups experimentals foren comparats per un test ANOVA d'una via, seguit pel test de multicomparació de Tukey, quan era necessari. Els valors de $p < 0.05$ foren considerats significatius.

4. RESULTATS



4.1. MORT CEL·LULAR INDUÏDA PER L'EXPOSICIÓ A UNA DEPRIVACIÓ DE GLUCOSA I OXIGEN: NECROSI VERS APOPTOSI

4.1.1. Establiment dels cultius de neurones corticals:

El model d'OGD va ser utilitzat en cultius de neurones corticals de rata. Es van optimitzar les condicions de cultius i es va demostrar la seva funcionalitat. S'hagueren d'assajar una sèrie de condicions de cultiu degut a la impossibilitat de reproduir els resultats descrits en la bibliografia referent als cultius cerebrocorticals. Les condicions es van dissenyar segons les següents variables:

- el temps d'addició de l'inhibidor mitòtic Citosina arabinòsid (Ara C) 10uM, per aturar la proliferació de cèl·lules no neuronals;
- el nombre de canvis de medi;
- el percentatge de medi fresc afegit en els canvis;

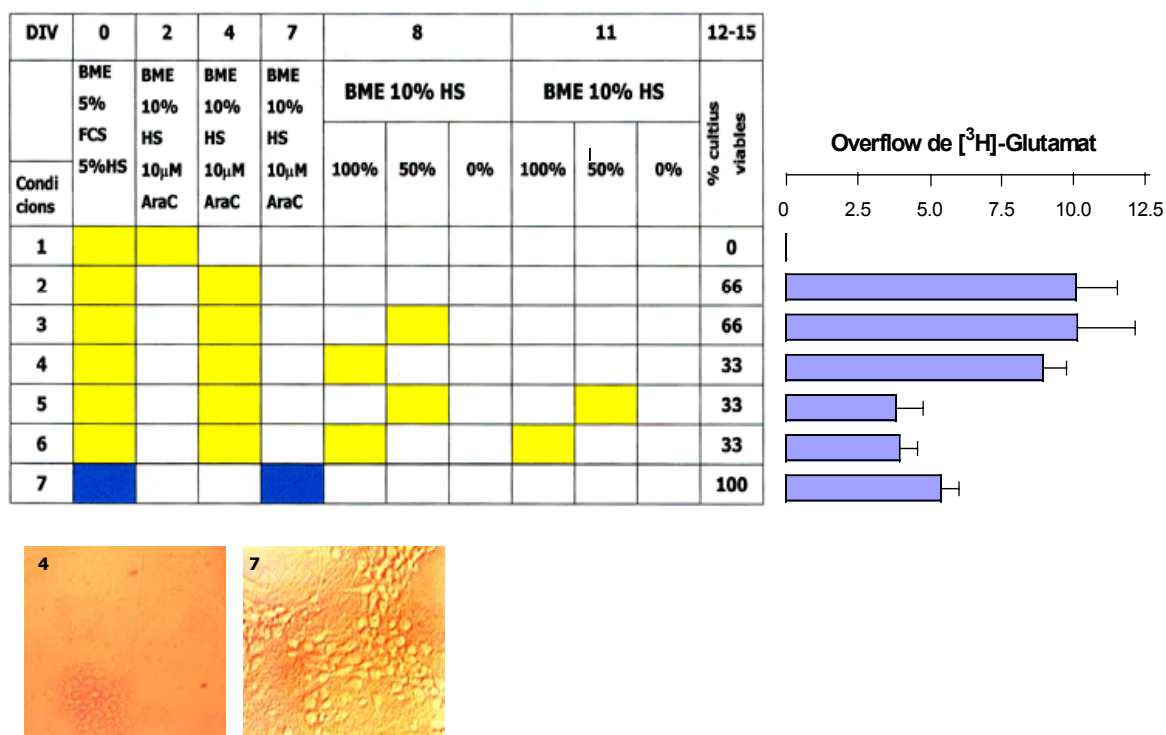


Figura 4.1. Condicions per a l'obtenció de cultius primaris de neurones corticals de rata. En la part esquerra de la taula es descriuen les diferents condicions assajades. Els paràmetres que van variar foren els dies in vitro (DIV) on es van realitzar els canvis de medi, el dia d'addició de l'ara C, i la proporció de medi fresc afegit. El % de cultius viables es refereix al nombre de cultius supervivents en relació al nombre total de cultius assajats per a cada condició. Els quadres colorejats indiquen els paràmetres seguits en cada condició i estan marcats en blau els passos que porten a obtenir un 100% de cultius viables. El pannel de la dreta expressa l'Overflow de [³H]-glutamat obtingut en els cultius cultivats segons cada condició descrita en la taula. Cada barra és la mitjana \pm SEM d'almenys 3 experiments. Les micrografies inferiors s'obtingueren amb un microscopi invertit de contrast de fase i mostren neurones cultivades segons la condició 4 i segons la condició 7.

La taula descriu les diferents condicions seguides per tal d'obtenir cultius de neurones corticals de rata en funció de la composició del medi de sembra, del dia d'addició de l'Ara C i el nombre i dia dels posteriors canvis de medi. De totes les variacions, la condició 7(marcada amb quadrats blaus) fou la que va donar millors resultats, amb un 100% de cultius viables vers tots els cultius realitzats. La condició 7 es caracteritzava pel reemplaç, el dia 7 in vitro (7 DIV), del medi de sembra BME 5%FCS/5%FHS per un medi BME 10%FHS suplementat amb 10 μ M d'Ara C. Aquest únic canvi de medi i el retràs en l'addició de l'antimitòtic va implicar el sacrifici de part de la puresa neuronal del cultiu per millorar-ne la viabilitat fins els 12DIV. Les dues fotografies inferiors

mostren l'aspecte de les cèl·lules cultivades segons la condició 4 (esquerra) i la condició 7 (dreta). Podem observar que les cèl·lules de la condició 7, al cap de 12 DIV conserven el volum del soma i presenten una xarxa neurítica ferma a diferència de les neurones de la condició 4.

Pel que fa a la funcionalitat dels cultius neuronals, es van realitzar estudis de mesura d'alliberament de [³H]-glutamat en funció d'un estímul despolaritzant, com per exemple 55mM de K⁺ (part dreta de la taula), tal com està descrit en Materials i Mètodes. Pel que fa la condició 7, l'overflow de glutamat obtingut és discret però rellevant. Tant les neurones com la glia tenen sistemes de recaptació de glutamat molt eficients. El fet d'ajornar l'addició de l'antimitòtic fins el 7 DIV va fer augmentar la proporció glial. La discreció de l'overflow en aquesta condició per tant, no es deuria a una disminució de la funcionalitat de les neurones sinó a un augment del nombre d'astròcits capaços de recaptar glutamat ràpidament. De fet, es van realitzar experiments d'alliberament de [³H]-glutamat en neurones cultivades sobre una monocapa de glia i els resultats d'overflow foren gairebé nuls (dades no mostrades).

4.1.2. Estudi de la viabilitat cel·lular dels cultius al llarg del temps:

Un cop establerta la millor condició per a cultivar neurones corticals de rata, s'havia de fixar el dia més adequat per realitzar els experiments d'isquèmia *in vitro*, basant-nos en la viabilitat cel·lular òptima i la maduresa de les neurones. Per això es va mesurar la viabilitat dels cultius sota la condició 7 al llarg del temps, considerant com a 100% de viabilitat els valors obtinguts el DIV 7, just abans de l'únic canvi de medi (vegeu figura 4.2). A partir del 11 DIV, la viabilitat s'estabilitzà. Aquest fet era primordial per tal d'evitar valorar una mort artefactual inherent al cultiu, en els experiments que vindrien posteriorment. Es va decidir acotar els dies d'experiment entre el 12è i el 14è DIV, per a poder treballar amb neurones totalment diferenciades.

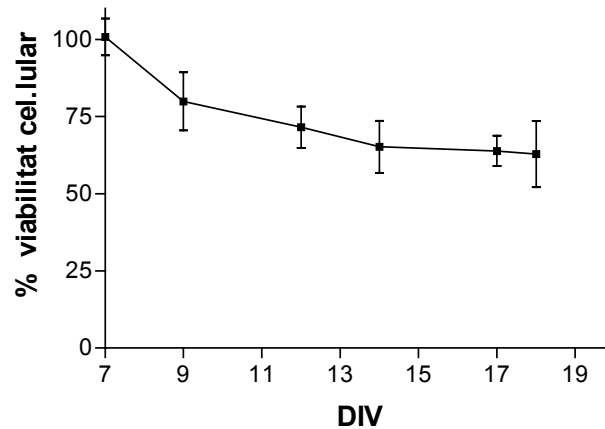


Figura 4.2. Corva de viabilitat de neurones corticals cultivades segons el patró de la condició 7. Es varen sembrar neurones corticals segons la condició 7 (descrita a la taula 4.1) i es va mesurar la viabilitat cel.lular al llarg del temps amb la tècnica del MTT; la gràfica mostra el decrement de la viabilitat cel.lular a mesura que passen els dies en cultiu. El DIV 7, dia on es reemplaça el medi de sembra per BME 10% HS suplementat amb 10 μ M AraC, es compta com a punt de referència a l'hora d'expressar el % de viabilitat dels dies posteriors. Els resultats són la mitja \pm SEM de tres experiments (realitzats per quadruplicat) i cadascun en un cultiu independent.

va observar que el model d'isquèmia *in vitro* era capaç de generar mort cel·lular i que aquesta mort era proporcional a la durada de l'exposició a l'OGD. Així doncs, 24 hores després de 15, 45 i 75 minuts d'OGD restaven viables, amb la tècnica de la reducció del MTT, un 75, un 70 i un 50 % del total de cèl·lules, respectivament (vegeu figura 4.3). Els resultats amb la tècnica de la LDH foren semblants.

Gran part del dany neuronal en una isquèmia cerebral es deu a l'alliberament massiu de glutamat a la fenedura sinàptica. Tal com s'ha descrit en la introducció, la sobreestimulació dels receptors de glutamat provoquen una sobrecàrrega iònica a la cèl·lula acompanyada d'una entrada de clor i aigua. Aquesta situació compromet la membrana citoplasmàtica i desencadena la mort de les neurones. En el model d'isquèmia *in vitro* es va estudiar la dependència del dany neuronal a l'activació dels receptors de glutamat. Es van exposar els cultius a l'OGD en presència o absència d'antagonistes del receptor NMDA, com és el (+)-MK801 10 µM, o d'antagonistes dels receptors AMPA/KA com el CNQX 10µM, i es va mesurar la viabilitat cel·lular al cap de 24 hores (vegeu Taula 4.1).

TRACTAMENT	NORMÒXIA	N	75' OGD	
_____	101.14 ± 1.32	6	39.50 ± 3.94	*p<0.05
10 µM (+)-MK 801	99.77 ± 1.05	6	92.22 ± 2.51	
10 µM CNQX	101.58 ± 2.15	6	66.55 ± 7.03	*p<0.05

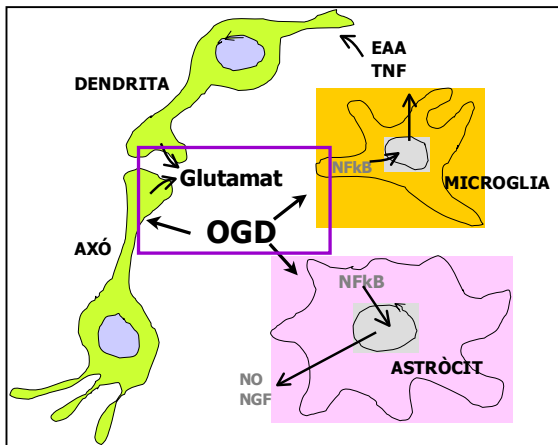
Taula 4.1. Efecte dels antagonistes dels receptors ionotròpics del glutamat en l'OGD. La taula descriu els valors de viabilitat obtinguts per l'assaig del MTT, 24 hores després d'exposar els cultius a condicions normòxiques o a 75'd'OGD, amb o sense (+)-MK801 o CNQX. Els resultats estan expressats en % de cèl·lules viables (mitja ± SEM de 6 experiments diferents, en cultius independents i realitzats per quadruplicat en cada condició)

En els cultius paral·lels sotmesos a condicions de normòxia i en presència dels antagonistes, la viabilitat no es veia afectada en comparació als cultius sense fàrmacs. Pel que fa als cultius exposats a l'OGD, l'antagonista del receptor NMDA conferia una protecció cel·lular en un 92 %, a diferència de l'antagonista dels receptors AMPA/KA, que només proporcionava protecció en un 66% del total de cèl·lules. Per tant, la implicació del glutamat i del seus receptors, principalment per via receptor NMDA, quedava demostrada.

4.1.4. Caracterització dels tipus de mort generats pel model d'OGD:

Per estudiar els mecanismes de mort que es desencadenen en una OGD, es van visualitzar els nuclis cel·lulars mitjançant la tinció fluorescent de la cromatina. Els cultius es van exposar a 15, 45 i 75 minuts d'OGD. 24 hores després, es van tenyir amb Iodur de Propidi (PI), llavors es van fixar amb 4% paraformaldèhid i finalment es tenyiren amb Hoechst 33258. (vegeu figura 4.4).

En el control de normòxia, s'aprecien només les cèl·lules tenyides amb Hoechst 33258, amb la cromatina laxa. En el control de necrosi, corresponent al tractament de 1 mM de glutamat durant 24 hores, s'observen nuclis blaus amb la cromatina laxa i tenyits amb PI. I finalment, en el control d'apoptosi corresponent al tractament de 1 μ M d'Estaurosporina, s'observen nuclis amb la cromatina totalment condensada sense tenyir-se amb PI. Aquestes cèl·lules es trobarien en les primeres fases de l'apoptosi on encara no s'ha perdut la integritat de la membrana citoplasmàtica. D'altra banda, també s'observen nuclis d'un blau brillant amb la cromatina condensada o fragmentada tenyits amb PI, que correspondrien a cèl·lules que estan en fases apoptòtiques més tardanes.



4.1.3. Establiment i caracterització

del model d'isquèmia

in vitro per OGD.

Entre el 12è i el 14è DIV, els cultius de neurones corticals de rata s'exposaren a una deprivació de glucosa i oxigen (OGD) durant 15, 45 i 75 minuts. Al cap de 24 hores, es va mesurar la viabilitat dels cultius per l'assaig de la reducció del MTT.

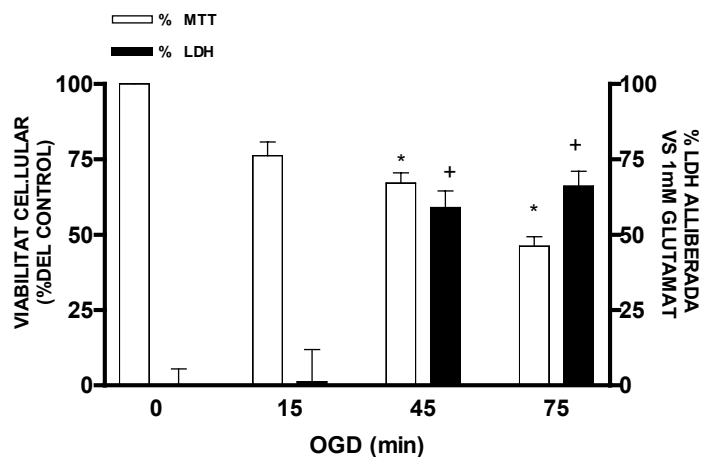


Figura 4.3. Viabilitat cel·lular en funció de la durada de l'OGD. Els cultius es van sotmetre a 0 (condicions normòxiques), a 15, 45 o 75 minuts d'OGD. Es va mesurar la viabilitat cel·lular al cap de 24 hores per mitjà la tècnica del MTT i per la tècnica de l'activitat LDH, considerant que el % màxim de LDH alliberada s'aconseguia tractant les cèl·lules amb 1 mM de glutamat. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments diferents, amb quadruplicats per a cada condició. (+) $p < 0.01$ versus normòxia (0 min OGD) (*) $p < 0.01$ versus normòxia (0 min OGD)

Paral·lelament es va mesurar la viabilitat cel·lular amb la determinació de la LDH. Els resultats del MTT indiquen el % de cèl·lules viables que resten en el cultiu. En canvi, la tècnica de la LDH estableix el % de cèl·lules mortes. Amb les dues tècniques però, es

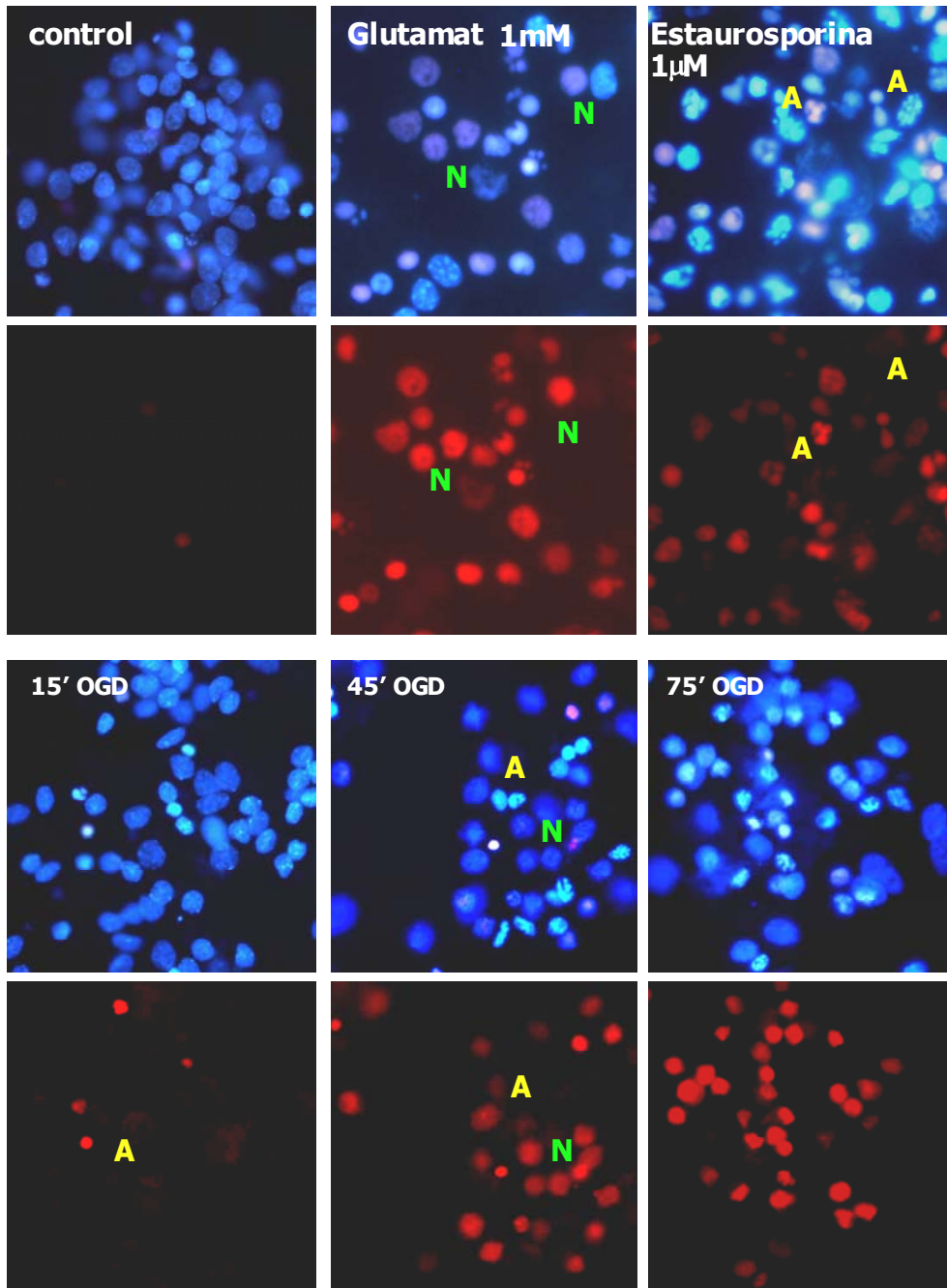


Figura 4.4. Quantificació *in situ* de la necrosi i l'apoptosi induïda per diferents períodes d'OGD. Les micrografies per a cada condició de Hoechst 33258 (blau) i PI (vermell) corresponen a un mateix camp i són representatives dels resultats de sis experiments. En el pannell superior es mostren el control normòxic, el control de necrosi, corresponent al tractament durant 24h amb 1mM glutamat, i el control d'apoptosi amb el tractament durant 24h amb 1µ M d'estaurosporina. El pannell inferior mostra les tincions amb hoechst 33258 i PI, 24 hores després d'exposar els cultius a 15, 45 o 75 minuts d'OGD. Les cèl·lules viables mostren la cromatina laxa, exclusivament tenyida amb Hoechst 33258. Les cèl·lules apoptòtiques (A) presenten la cromatina condensada o fragmentada tenyida d'un color blau brillant. Les cèl·lules necròtiques (N) mostren la cromatina laxa i tenyida per PI i Hoechst 33258 (veure materials i mètodes).

Els cultius sotmesos als tres períodes diferents d'OGD mostren un nombre de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques creixent a mida que s'allarga el període d'OGD.

A partir de les fotografies es van comptar el nombre de cèl·lules necròtiques i el nombre de nuclis apoptòtics (vegeu figura 4.5)

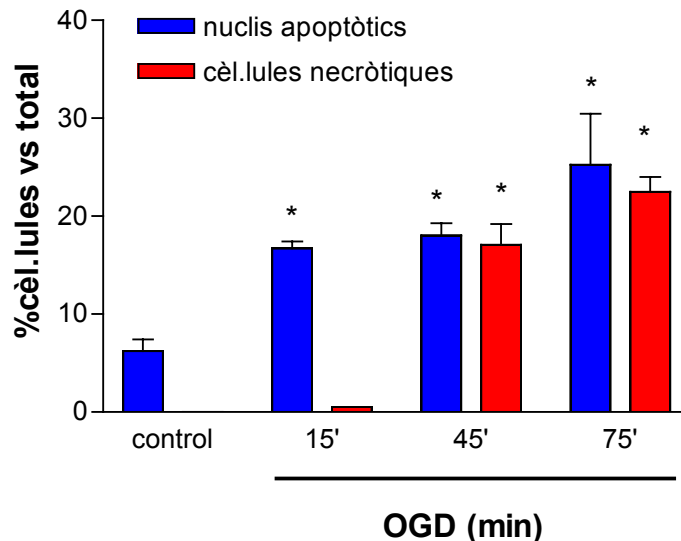


Figura 4.5. Contribució de la necrosi i l'apoptosi en funció de la durada de l'OGD. A partir de les micrografies de les tincions fluorescents de Hoechst 33258 i PI es van realitzar els recomptes de les cèl·lules apoptòtiques de les cèl·lules necròtiques en funció de la durada del període d'OGD. Els resultats són la mitja \pm SEM de 6 experiments diferents expressats com a % de cèl·lules necròtiques o apoptòtiques vers el total de cèl·lules (vegeu materials i mètodes) * $p < 0.05$ vs control

Tal com s'expressa en la figura 4.5, els recomptes confirmaren els indicis observats en les micrografies de fluorescència. El nombre de cèl·lules necròtiques (vermelles amb la cromatina relaxada) i el nombre de cèl·lules apoptòtiques (blaves amb la cromatina condensada) augmentaven de manera significativa amb la durada de l'OGD.

4.1.5. La caspasa 3 media la condensació de la cromatina en cèl·lules sotmeses a 75'OGD:

La condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA són característiques de processos apoptòtics, però no en són proves suficients. Un dels marcadors apoptòtics

més acceptats és l'activació de la caspasa 3. La caspasa 3 és sintetitzada en forma de proenzim, d'uns 31/33 KDa i s'activa quan és proteolitzada per altres caspases, com la 8 o la 9, en la seva forma de 17/20 KDa. Per determinar l'activació de la caspasa 3 i confirmar els indicis d'apoptosi, es va realitzar una immunocitoquímica en cèl·lules sotmeses a 75' d'OGD o de normòxia.

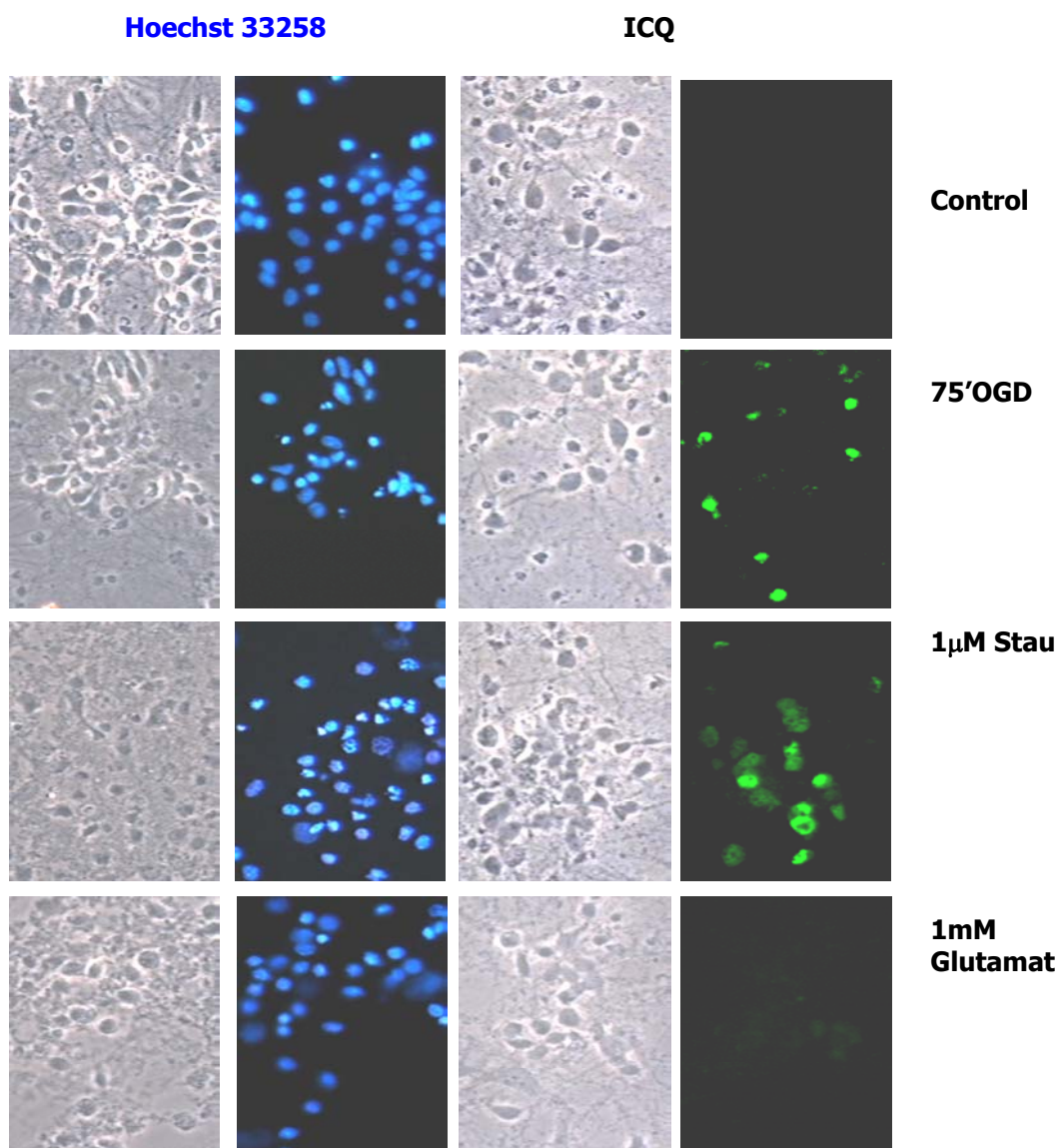


Figura 4.6. L'exposició a l'OGD activa la caspasa 3. Sis hores després d'exposar els cultius a 75 minuts d'OGD o bé de tractar-los amb 1µM estaurosporina (Stau), l'activació de la caspasa 3 es va demostrar mitjançant tècniques d'immunocitoquímica(ICQ) (pannell dret). L'anticòs reconeix exclusivament la forma processada de 20KDa. El control normòxic i el control de necrosi amb glutamat no presenten cèl·lules amb marcatge positiu per a caspasa 3 activa. El pannel de la dreta mostra les tincions de Hoechst 33258 de cultius paral·lels tractats amb les mateixes condicions que la immunocitoquímica. Fotografies representatives d'un mínim de tres experiments.

Sis hores després de l'exposició, les cèl·lules es van fixar amb paraformaldèhid i es van incubar amb un anticòs primari específic per la caspasa 3 activa, que no reconeixia la proforma de 31/33 KDa.

També es van tractar cultius amb $1\mu\text{M}$ d'estaurosporina com a control positiu d'activació de la caspasa 3. Es va comprovar que el cultiu tractat amb 1mM de glutamat, com a control de necrosi, no mostrava activació de la caspasa 3. Per tal de correlacionar condensació de cromatina induïda per OGD i activació de caspasa 3, part dels cultius anteriors es varen fixar al cap de 24 hores de d'haver rebut els mateixos tractaments que els seus homòlegs i es tenyiren amb Hoechst 33258 (vegeu figura 4.6). La immunocitoquímica dels cultius tractats amb estaurosporina presentava moltes cèl·lules caspasa 3 positives (en verd). A més, les cèl·lules presentaven una condensació de cromatina evident en les fotografies de la tinció amb Hoechst 33258. En canvi, el control de normòxia o el tractament amb glutamat no mostraven signes d'activació de caspasa 3 o de condensació de cromatina. Pel que fa als cultius sotmesos a 75'd'OGD es va detectar activació significativa de caspasa 3 i aquesta activació també correlacionava amb la condensació de cromatina. De fet, per demostrar aquesta relació directe, es van realitzar exposicions a l'OGD en presència o absència d'un inhibidor general de les caspases anomenat Z.VAD.FMK, a una concentració de $100\mu\text{M}$ (vegeu figura 4.7). Es van fer els corresponents controls negatius d'activació de la proteasa (el control de normòxia i el control amb Z.VAD.FMK), i els controls positius de cèl·lules tractades per una banda amb $1\mu\text{M}$ d'estaurosporina i per l'altra, tractades primer amb $100\mu\text{M}$ Z.VAD.FMK i posteriorment incubades amb $1\mu\text{M}$ d'estaurosporina .

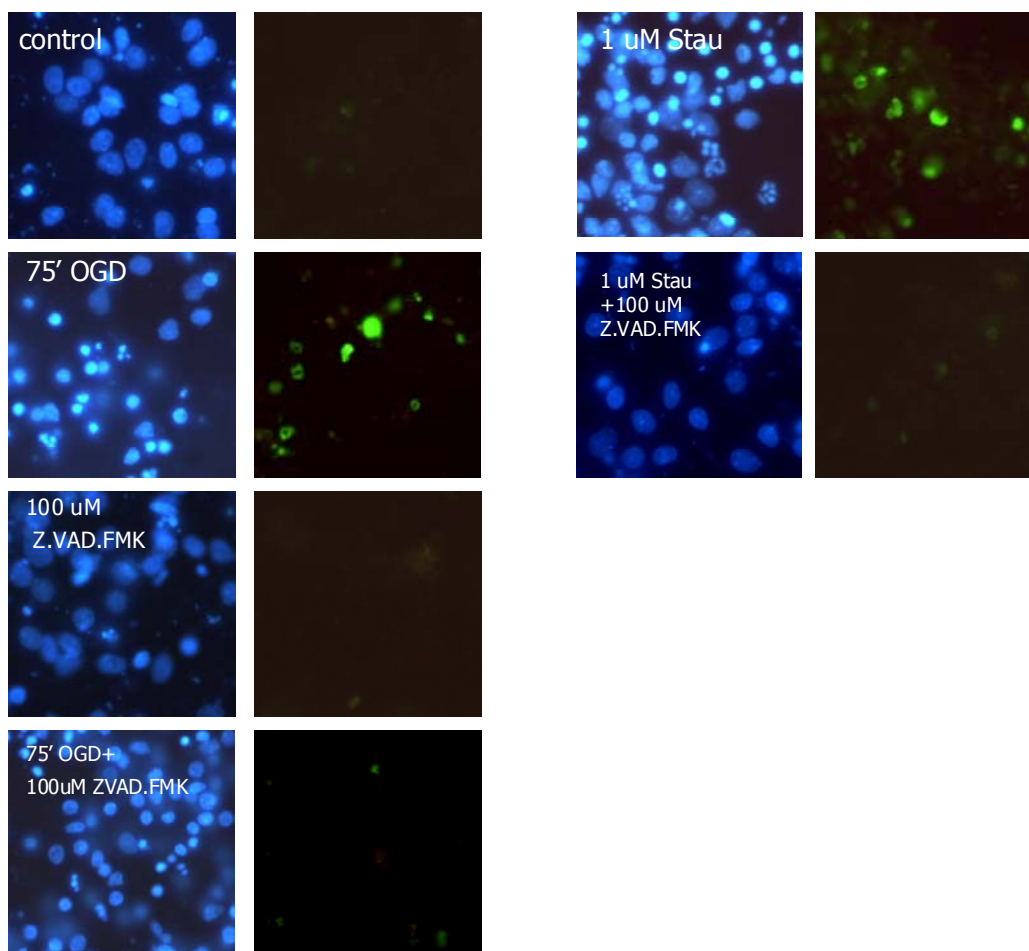


Figura 4.7. Efecte del Z.VAD.FMK en l'apoptosi induïda per OGD. Si els cultius es tracten durant una hora amb 100 μ M Z.VAD.FMK abans d'exposar-los a una OGD, l'activació de la caspasa 3 i la condensació de cromatina es bloquegen. El Z.VAD.FMK també bloqueja l'activació de la caspasa 3 i la condensació de cromatina induïda pel tractament d'estaurosporina (Stau). L'activació de la caspasa 3 es va realitzar per immunocitoquímica contra el fragment actiu de 20Kda després de 6 hores de l'agressió o els tractaments. La tinció per hoechst 33258 es va realitzar en cultius paral·lels al cap de 24 hores de l'agressió o dels tractaments.

A les fotografies de les cèl·lules sotmeses a l'OGD, es pot observar com el tractament amb Z.VAD.FMK bloqueja l'activació de la caspasa 3 i, en conseqüència, la condensació de cromatina (pannell de l'esquerra). Els controls d'apoptosi amb estaurosporina recolzen la funcionalitat del citat inhibidor (panells de la dreta).

Per demostrar la simultaneïtat de la necrosi i l'apoptosi caracteritzada per l'activació de la caspasa 3, sis hores després de sotmetre les cèl·lules a 75' d'OGD, es va combinar la

tinció amb Iodur de Propidi amb la immunocitoquímica descrita anteriorment (vegeu figura 4.8).

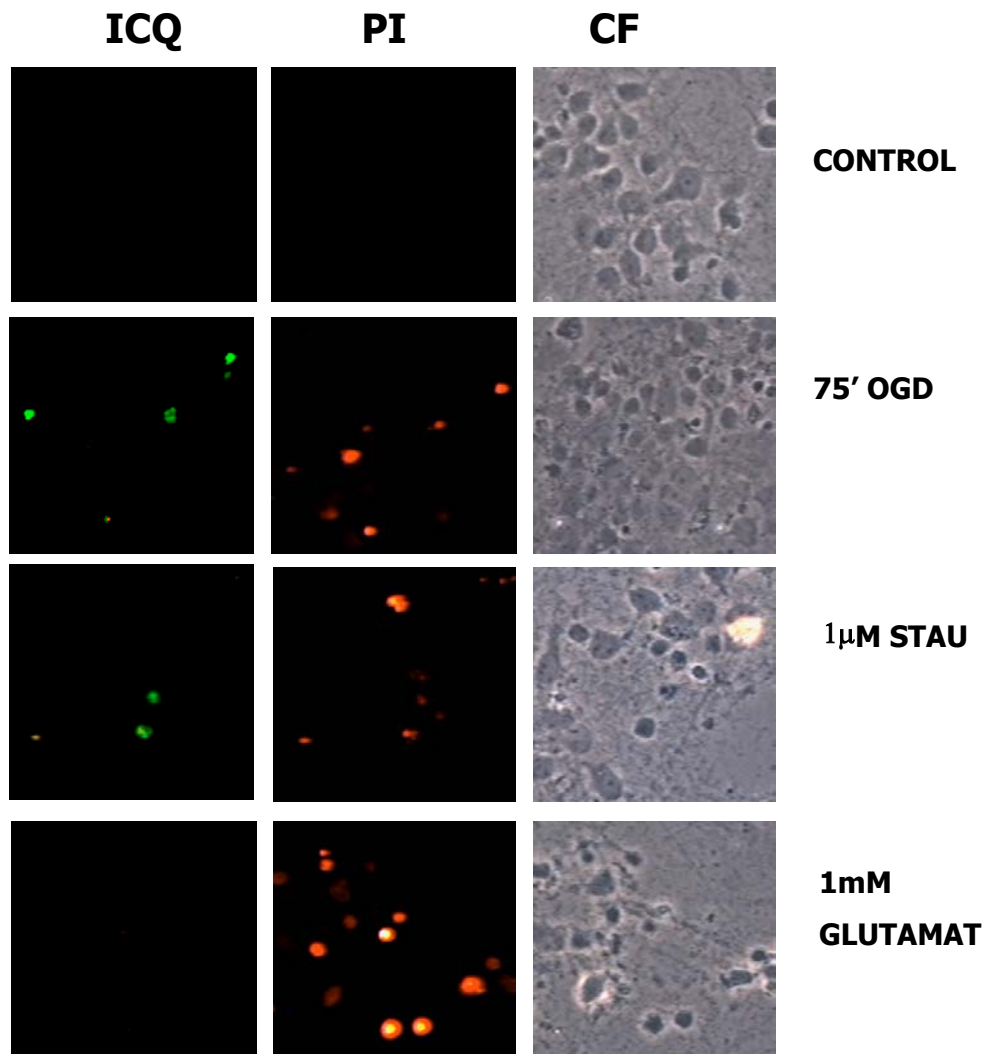


Figura 4.8. La necrosi i l'apoptosi induïdes per OGD es donen de manera simultània però en cèl·lules diferents. Els cultius es van sotmetre a 75'OGD o es van tractar amb 1mM glutamat o 1µM estaurosporina. Posteriorment es tenyiren amb PI i, al cap de sis hores, es fixaren amb 4%paraformaldèhid en TBS per a la detecció de la caspasa 3 per immunocitoquímica (ICQ). Tant en els cultius sotmesos a l'OGD com els tractats amb estaurosporina, es poden apreciar cèl·lules positives per caspasa 3 (en verd) que no col.localitzen amb les cèl·lules positives per PI (en vermell) Els cultius tractats amb glutamat només presenten cèl·lules positives per PI. Les micrografies de la dreta en contrast de fase (CF) corresponen als mateixos camps de les micrografies fluorescentes.

Es van mantenir els controls de necrosi i apoptosi: es va comprovar la tinció positiva per PI (vermell), en el cas del tractament amb glutamat i la tinció per caspasa 3 activa (verd) en el cas del tractament amb estaurosporina. En els dos tractaments, les dues senyals fluorescents no col.localitzaven. Els cultius exposats a l'OGD mostraven cèl.lules amb activació de la caspasa 3 i, en paral·lel, cèl.lules amb els nuclis PI positius amb la cromatina laxa. Aquestes proves demostraven que el model d'isquèmia *in vitro* produïa una mort per necrosi i, en paral·lel, induïa apoptosi. A més, ambdós mecanismes es podien discriminar *in situ*.

Per estudiar l'activació de la caspasa 3, es van analitzar per western blot extractes cel.lulars isquèmics o normòxics, recollits una i tres hores després de 75' d'OGD. La membrana es va incubar amb un anticòs primari que reconeixia la proforma i la forma activa de la caspasa 3. L'activació de la caspasa 3 es feia evident a partir de les tres hores posteriors a l'OGD (vegeu figura 4.9).

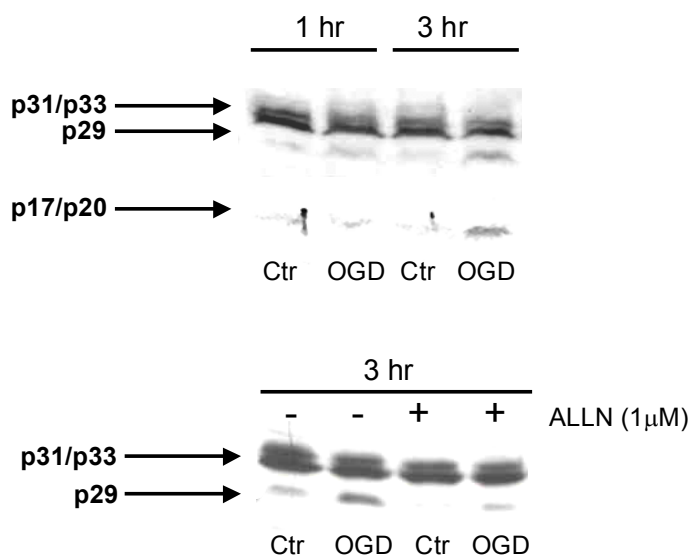


Figura 4.9. Curs temporal d'activació de la Caspasa 3. En el pannel superior s'observa el processament de la procaspasa 3 (31/33Kda) en funció del temps. Tres hores després de l'OGD, s'aprecia l'aparició del fragment actiu de 17/20KDa de la caspasa 3. Al pannel inferior, la figura mostra la desaparició del fragment de 29KDa en presència de 1μM ALLN durant una OGD. Western representatiu dels resultats de, com a mínim, tres experiments independents.

A l'alçada de 29 KDa es va poder observar l'aparició d'una banda que augmentava d'intensitat en els extractes isquèmics, en funció del temps transcorregut després de l'OGD. Aquesta banda correspon al fragment resultant del processament de la caspasa 3 per part de la calpaïna i la seva aparició es pot bloquejar en preincubar les cèl.lules amb un inhibidor de la calpaïna com l'ALLN (vegeu pannel inferior figura 4.9) abans de l'OGD.

4.1.6. Localització cel.lular de l'activació de la caspasa 3:

Les immunocitoquímiques anteriors havien demostrat que hi havia una activació de la caspasa 3 evident en els cultius exposats a l'OGD. Els cultius corticals eren preparacions mixtes de cèl·lules neurals on teòricament coexistien neurones, astròcits i microglia. Per aquests raó es va estudiar en quines espècies cel.lulars es donava l'activació de la caspasa 3. Així doncs, es van realitzar immunocitoquímiques mixtes amb dos anticossos primaris, un que detectés el fragment actiu de la caspasa 3, i l'altre que fos específic per a cada tipus cel.lular.

La MAP2 (en vermell) marca majoritàriament el soma i les dendrites de les neurones (vegeu figura 4.10). Aquesta proteïna també és utilitzada com a marcador de l'abast d'una lesió cerebral perquè és substrat de diferents proteases que s'activen en els mecanismes de lesió isquèmica. Això explica per què després d'una OGD hi ha una pèrdua del marcatge MAP2 i una desorganització de la xarxa dendrítica. El control mostra un marcatge de MAP 2 en vermell d'una xarxa neurítica organitzada i els somes amb un volum convencional. No s'observen neurones caspasa 3 positives (en verd). Les neurones exposades a l'OGD la integritat de la xarxa neurítica es perd i el marcatge MAP2 es concentra als somes de les cèl·lules. A més, hi ha una col.localització cel.lular del marcador MAP2 i del marcatge corresponent a la caspasa 3 activa (en verd). Com ja s'ha dit anteriorment, el marcador MAP2 és diana de les proteases que s'activen en els processos de mort cel.lular. Per demostrar la degradació de la MAP2, es van analitzar per western blot, extractes cel.lulars de cultius exposats o no a l'OGD. Es van recollir els extractes a diferents temps després de l'OGD o la normòxia.

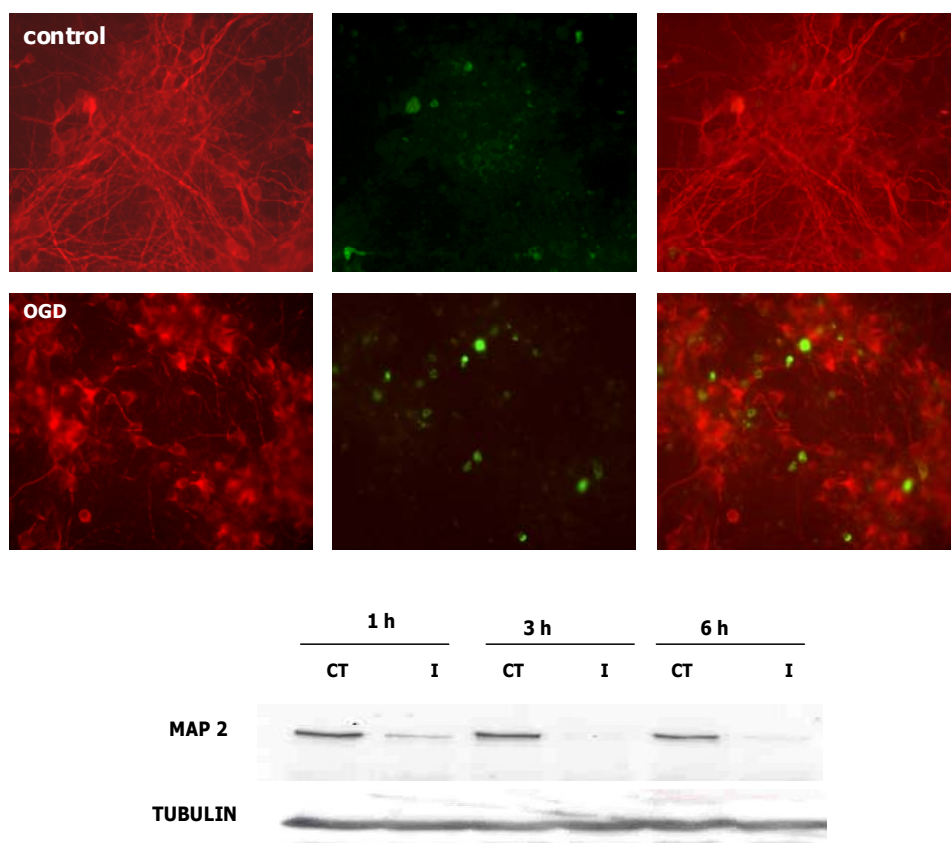


Figura 4.10. L'OGD activa la caspasa 3 en neurones. Les micrografies mostren el resultat de la immunocitoquímica amb doble marcatge contra la MAP2 (vermell) i contra el fragment actiu de la caspasa 3 (verd). Els cultius sotmesos a normòxia no presenten activació de caspasa 3 i la xarxa neurítica es troba intacta. Les neurones exposades a l'OGD mostren activació de caspasa 3 i el marcatge MAP 2 es concentra al seu soma. En el pannel inferior s'observa que la proteïna MAP2 sofreix una degradació progressiva al llarg del temps, després de l'OGD, vers els extractes dels cultius normòxics. Els resultats de la immunocitoquímica i del western blot són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents.

En els western blots s'observa una degradació gradual de la MAP2 en els extractes de cèl·lules isquèmiques. Per aquesta raó, es va fer una segona immunocitoquímica amb un altre marcador neuronal més resistent a l'acció de les proteases activades en els processos de mort.

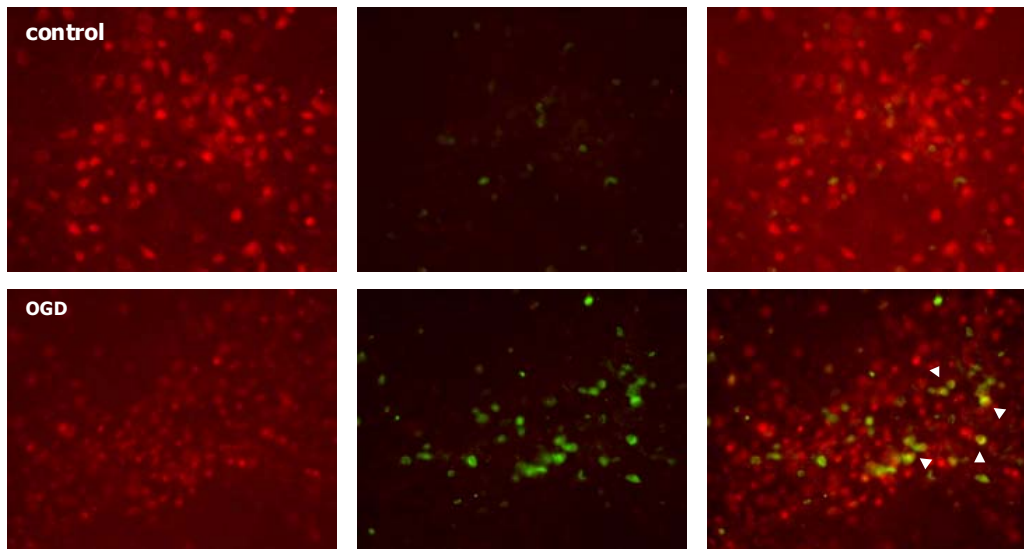


Figura 4.11. El marcador NeuN és més resistent a l'exposició de l'OGD. . Les micrografies mostren el resultat de la immunocitoquímica amb doble marcatge contra NeuN (vermell) i contra el fragment actiu de la caspasa 3 (verd). Els cultius sotmesos a normòxia no presenten activació de caspasa 3. En les cèl·lules exposades a l'OGD, el marcatge NeuN col·localitza amb el marcatge de la caspasa 3 activa. Els resultats de la immunocitoquímica són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents.

S'utilitzà el marcador neuronal NeuN, que es localitza principalment al nucli de les neurones tot i que *in vitro* també es pot observar en el citoplasma cel·lular.

En el cas del Neu N la col·localització de la caspasa 3 activa fou molt més clara perquè la desorganització del marcador era mínima. Per tant, les dues sèries d'immunocitoquímiques demostraven que hi havia una activació neuronal de caspasa 3, sis hores després de l'exposició a OGD.

Pel que fa les altres espècies cel·lulars presents en el cultiu, tal com són els astròcits i la microglia, es va estudiar si mostraven també activació de caspasa 3 i en conseqüència mort cel·lular. Estava descrit en la bibliografia que la mort dels astròcits implicava períodes d'exposició a l'OGD molt més llargs (Goldberg MP & Choi DW.,1993). En canvi, l'activació de la microglia era un esdeveniment palès.

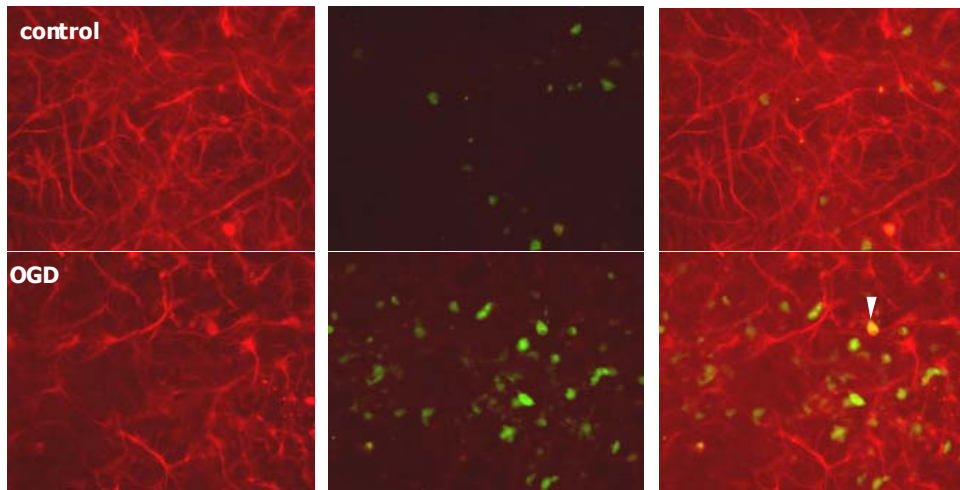


Figura 4.12. L'exposició a l'OGD no indueix una activació de la caspasa 3 en astròcits. Les micrografies corresponen a cultius normòxics i exposats a l'OGD analitzats per immunocitoquímica contra la GFAP (vermell), com a marcador astrocitari i contra la caspasa 3 activa (verd). Sis hores després de l'agressió, els astròcits dels cultius exposats a l'OGD no solen ser positius pel fragment actiu, tot i que a la fotografia se n'aprecia un (fletxa). Els resultats de la immunocitoquímica són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents

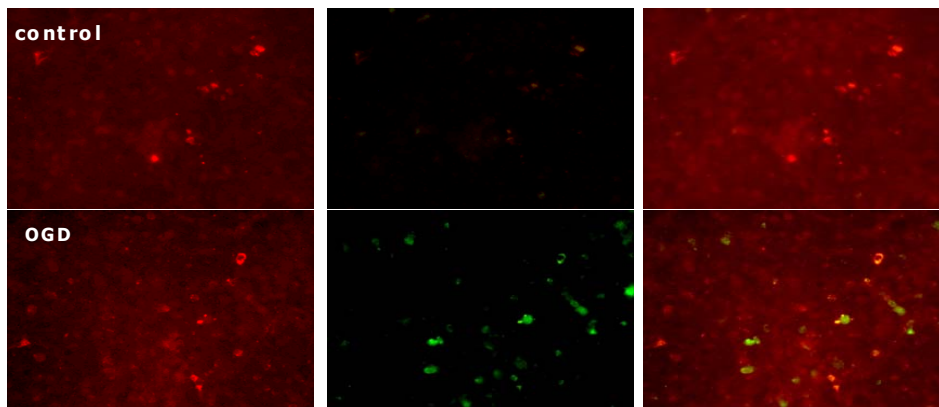


Figura 4.13. L'OGD indueix una activació de la caspasa 3 en microglia. Les micrografies mostren les immunocitoquímiques contra OX42 (vermell) com a marcador microglial i contra el fragment actiu de la caspasa 3 (verd). Sis hores després d'exposar els cultius a l'OGD es pot observar una activació microglial de la caspasa 3, a diferència dels cultius normòxics. Els resultats de la immunocitoquímica són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents

En general el nivell d'activació de caspasa 3 en astròcits es va mantenir molt baix, tot i observar algun astròcit positiu per caspasa 3. Cal destacar que l'exposició a l'OGD modificava la morfologia dels astròcits lleugerament (vegeu figura 4.12.).

La microglia del cultiu també presentava una activació de caspasa 3 després d'una OGD. Tot i que el percentatge de microglia en el cultiu respecte al percentatge de neurones era baix, la seva aportació a la mort neuronal no podia ser menyspreada (vegeu figura 4.13).

4.1.7. Activació d'altres caspases en cultius sotmesos a OGD:

La caspasa 7 és una cistein aspartat proteasa molt semblant a la caspasa 3, tant a nivell d'estructura com a nivell de funció. Ambdues comparteixen dianes i com a caspases executores, proteolitzen proteïnes clau en un procés apoptòtic. Fins fa poc temps, l'expressió de la caspasa 7 en el sistema nerviós central no havia estat descrita (Juan TS. et al.,1997) . Actualment però, existeixen dades controvertides sobre la implicació de la caspasa 7 en l'apoptosi neuronal .

L'activació de la caspasa 7 es va estudiar en preparacions de neurones corticals sotmeses a l'OGD. Sis hores després de 75' d'OGD, els cultius foren fixats i incubats amb un anticòs que reconeix la forma activa de 20/17 KDa de la caspasa 7. Aquest anticòs no reconeix la proforma de l'enzim. Simultàniament, es van afegir els anticòs dels marcadors cel.lulars per localitzar l'activació de la proteasa en les diferents espècies cel.lulars. De la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment, les immunocitoquímiques es van observar en un microscopi de fluorescència (vegeu figura 4.14) Les fotografies corresponen a cultius sotmesos a 75 minuts d'OGD i fixats sis hores després. S'aprecia una activació de la caspasa 7 en les preparacions i, a nivell d'espècies cel.lulars, les neurones i la microglia mostren una col.localització clara. No s'observa activació de caspasa 7 en les cèl.lules GFAP positives.

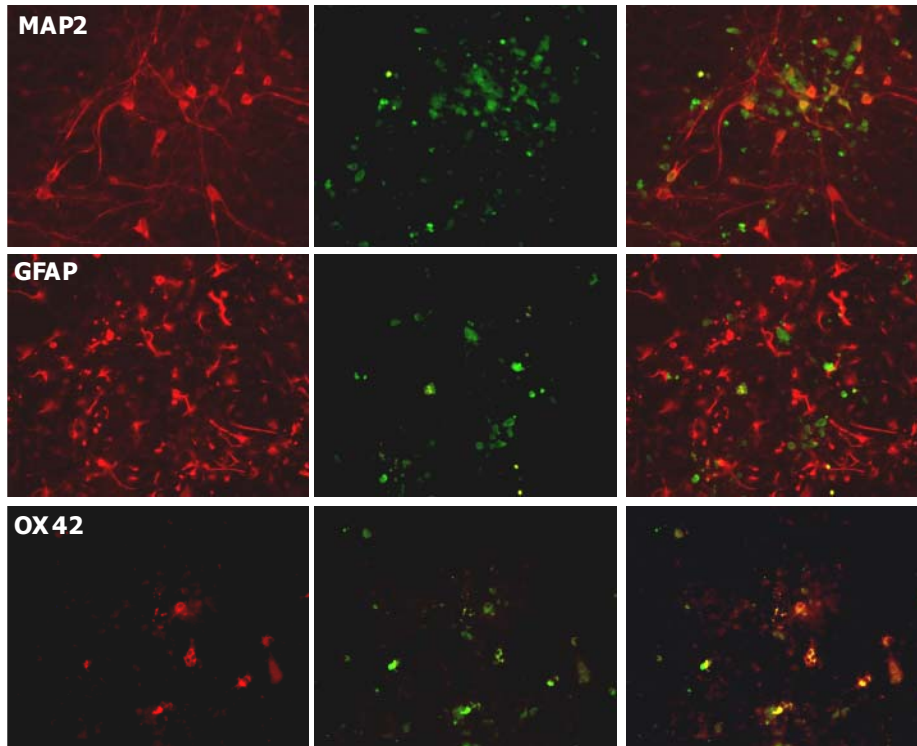


Figura 4.14. Activació de la caspasa 7 induïda per OGD en diferents espècies cel.lulars. Després de sis hores d'exposar els cultius a 75' d'OGD, s'observa activació de la caspasa 7 en neurones i microglia. No s'observa cap astròcit positiu per la caspasa 7. MAP 2 marcador neuronal; GFAP, marcador astrocitari; OX42, marcador microglial. Els resultats de la immunocitoquímica són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents

La caspasa 9 és una caspasa efectora que actua per sobre el nivell d'activació de la caspasa 3 o la caspasa 7. Dit en altres paraules, és la caspasa encarregada, juntament amb la caspasa 8, d'activar les caspases executores. Tal com s'ha dit en la introducció, la caspasa 9 forma part de l'apoptosoma (APAF1-CitC-Caspasa 9), que s'activa amb la sortida del citocrom C de la mitocondria. També està descrit que la caspasa 9 té setis fosforilables, els quals regularien la seva capacitat de formar part de l'apoptosoma. Les proves que evidenciaven l'activació de la caspasa 3 i de la caspasa 7 van portar a l'estudi de la caspasa 9 com a caspasa iniciadora del procés apoptòtic induït per OGD. Així, es va seguir el mateix procediment que amb les altres caspases i es van realitzar immunocitoquímiques contra la forma activa de la caspasa 9 en cultius sotmesos a

l'OGD. Es feren immunodeteccions amb els marcadors cel.lulars per tal de localitzar la caspasa 9 activa en neurones, astròcits o microglia.

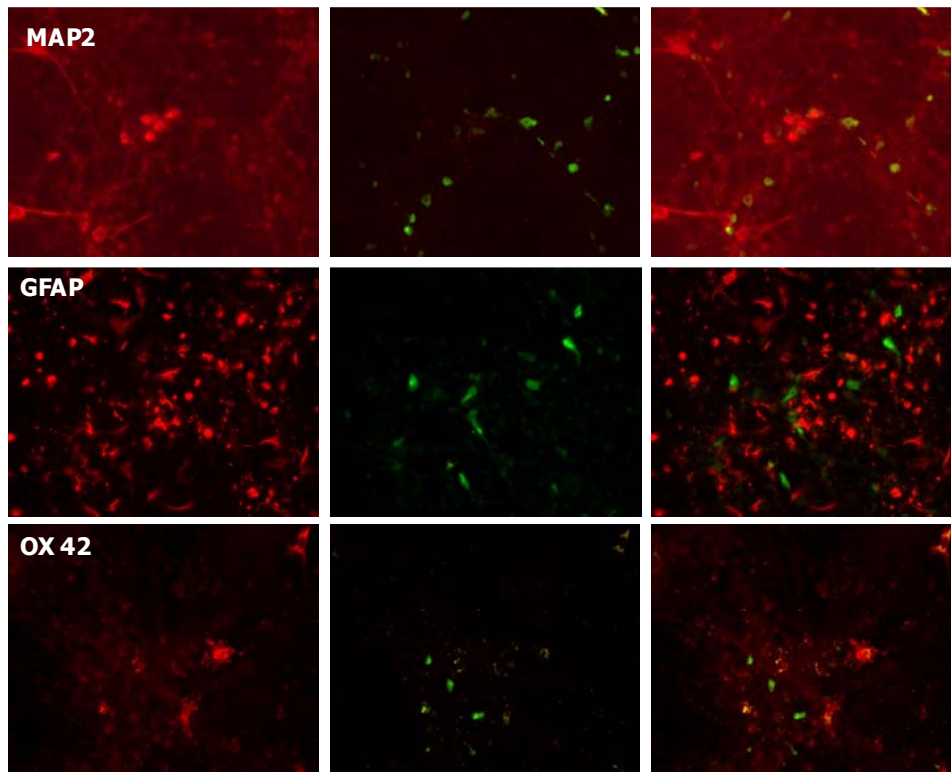


Figura 4.15. Activació de la caspasa 9 en neurones i microglia després de l'OGD. Després de sis hores d'exposar els cultius a 75' d'OGD, s'observa activació de la caspasa 9 en neurones i microglia. No s'observa cap astròcit positiu per la caspasa 9. MAP 2 marcador neuronal; GFAP, marcador astrocitari; OX42, marcador microglial. Els resultats de la immunocitoquímica són representatius d'un mínim de tres experiments realitzats en cultius independents

Igual que en el cas de la caspasa 7, la caspasa 9 s'activava en neurones i microglia (vegeu figura 4.15). Hi ha una col.localització evident de la caspasa 9 activa amb els marcadors MAP2 i OX42 . D'altra banda, no s'aprecia activació de caspasa 9 en cap cèl.lula GFAP positiva.En la taula 4.2, es resumeixen els resultats de les immunocitoquímiques. La taula mostra la freqüència d'activació de les diferents caspases segons les espècies cel.lulars del cultiu.Per tant, l'OGD indueix una mort neuronal i una activació de la microglia. La mort neuronal és necròtica i apoptòtica en paral·lel. La mort neuronal apoptòtica ve mediada per l'activació almenys de les

caspases 9,7 i 3, a l'igual que la mort de la microglia. L'astroglia necessitaria períodes d'OGD més llargs per veure's afectada.

	Neurones	Astròcits	Microglia
Caspasa-3	+++	+	++
Caspasa-9	++	-	+++
Caspasa-7	+ / ++	-	+++

Taula 4.2. Localització cel.lular de les caspases activades per OGD. Els signes (+) signifiquen la importància de l'activació caspàsica en cada espècie cel.lular. Els signes (-) es refereixen a la no activació de les caspases

CONCLUSIONS (I)

- La viabilitat fins al Div 12-15 dels cultius primaris de neurones corticals s'aconsegueix sembrant les cèl.lules amb BME suplementat amb 5% de FCS i 5% de HS i canviant el medi inicial per un medi BME suplementat amb un 10% de HS i amb 10 μ M d'AraC al 7 DIV.
- Els cultius obtinguts són mixts de neurones i glia, i són funcionals perquè responen alliberant [³H]-glutamat davant d'estímuls despolaritzants de potassi.
- El model d'isquèmia *in vitro* indueix una mort neuronal i que aquesta depèn de la durada de l'exposició. El model indueix necrosi i apoptosi i a més, permet la seva quantificació *in situ*, combinant dues tincions fluorescents, el iodur de propidi i el Hoechst 33258, respectivament .
- L'OGD indueix una activació de les caspases 3 7 i 9 en neurones i microglia principalment i aquesta activació es pot correlacionar amb l'aparició de la condensació de cromatina.