



**FOSFODIESTERASAS DEL AMP_c Y DEL GMP_c EN EL
CEREBRO: EXPRESIÓN EN PROCESOS
NEUROINFLAMATORIOS Y NEURODEGENERATIVOS**

Elisabet Reyes Irisarri
Barcelona 2007

Métodos

1. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS

Los trabajos presentados en esta tesis se realizaron con cerebros de rata y de humano.

Para los diferentes estudios realizados con rata se trabajó con diferentes cepas y tejidos, utilizando el cerebro de ratas Wistar para los trabajos nº 1 y 3; o bien con cerebro y médula de ratas Lewis para el trabajo nº 4.

En todo momento los animales fueron manipulados respetando la legislación española de protección de animales usados en la experimentación y otros propósitos científicos de acuerdo con las normas de la unión europea de bienestar animal (O.J. de EC L358/1 18/12/1986), la normativa sobre el uso de animales de laboratorio de la unión europea (86/609/EU) y siguiendo los procedimientos aprobados por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Cataluña.

Las muestras de cerebro humano utilizadas para el trabajo nº 2 fueron proporcionadas por los Bancos de Tejidos Neurológicos de la Universitat de Barcelona-Hospital Clínic y del Instituto de Neuropatología del Hospital Universitari de Bellvitge. En el caso de las muestras de cerebro control, todas las regiones cerebrales utilizadas se obtuvieron de autopsias de individuos que no presentaban antecedentes patológicos de enfermedades psiquiátricas o neurológicas. En cambio, en el caso de los cerebros de enfermos de Alzheimer, las muestras pertenecían a pacientes diagnosticados clínica y/o histopatológicamente con la enfermedad de Alzheimer y clasificados según Braak y Braak (1991) dentro del estadio Braak III-VI. En el trabajo realizado con estas muestras se detalla la edad, sexo, diagnóstico neuropatológico y la causa de la muerte de todos los sujetos utilizados. Los bloques utilizados fueron disecados y congelados a -80° C hasta su uso.

1.1. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS

1.2.1 MODELO DE INFLAMACIÓN CON LPS.

Para la realización de los experimentos con el modelo de inflamación (trabajo nº 3) se utilizaron 24 ratas macho adultas (Wistar, Iffa Credo, Lyon, Francia) de peso comprendido entre 200-300g.

Las ratas fueron estabuladas durante una semana bajo ciclos de 12h luz/oscuridad con libre movilidad y agua y comida *ad libitum*.

Animales control se obtuvieron inyectando intraperitonealmente 8 ratas con 300µl de NaCl 0.9% estéril sacrificándose por decapitación 2h (n=4) y 3h (n=4) más tarde.

El resto de ratas (n=16) fueron inyectadas con 300µl de NaCl 0.9% estéril y 0.05% de LPS (de *Escherichia coli*, serotipo 055:B5, Sigma, St. Louis, MO, USA; 500 µg/kg peso). Se sacrificaron en grupos de cuatro ratas 1h, 2h, 3h y 4h después de la inyección.

1.2.2. MODELO DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

Este modelo se realizó en el laboratorio del doctor García-Merino de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid y en él se utilizaron 18 ratas Lewis (Charles River, Francia).

La EAE se indujo en 14 de estas ratas mediante la inoculación subcutánea en las patas traseras de 50 µg de la proteína básica de la mielina (*myelin basic protein*, MBP) de cobaya (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) mezclada con 500 µg de *M. tuberculosis* (cepa H37Ra, Difco, Detroit, MI, USA) en adyuvante de Freund incompleto (IFA, Difco). Siete de estas ratas fueron sacrificadas 10 días después de la inyección, y las restantes (n=7) se sacrificaron a los 13 días del inóculo. Los controles se realizaron inyectando la mezcla con *M. tuberculosis* en IFA de la misma manera. Las ratas se examinaron diariamente para la detección de signos neurológicos utilizando la siguiente escala: 0 = sin signos clínicos; 1 = pérdida parcial del tono de la cola; 2 = pérdida total del tono de la cola; 3 = andares inestables y paraparesis leve; 4 = parálisis miembro posterior; y 5 = muerte. Los grados 3 y 4 están a menudo acompañados por incontinencia fecal y urinaria.

1.2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajo rápidamente el cerebro y la médula espinal, se sumergieron durante aproximadamente un minuto en solución salina (NaCl 0.9%) a 4°C, y se congelaron en nieve carbónica guardándose a -20°C hasta su uso.

Los tejidos humanos fueron procesados en el Banco de Tejidos Neurológicos de la manera siguiente: después de un tiempo de *postmortem* variado según el caso (de 3 a 23h) se disecó el cerebro en dos, y cada mitad se procesó de manera diferente: un hemisferio y secciones tangenciales alternadas del cerebelo y del tronco del encéfalo se sumergieron en un tampón al 4% de formalina; el otro hemisferio y las secciones correspondientes de cerebelo y del tronco del encéfalo se congelaron rápidamente con nieve carbónica y se guardaron a -80°C hasta su uso.

De los bloques de tejido congelados se obtuvieron secciones histológicas de 14µm utilizando un microtomo-criostato (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany) en portaobjetos pretratados con APTS (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma, St Louis, MO, USA) por congelación-descongelación y se guardaron a -20°C hasta el momento de ser procesados. Esta forma de preparar las secciones es compatible con su utilización en paralelo en las diferentes técnicas: hibridación *in situ*, inmunohistoquímica o diferentes métodos de tinción (violeta de cresilo, hematoxilina-eosina).

2. TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.1. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La técnica de hibridación *in situ* permite observar directamente en secciones de tejido la distribución anatómica y celular del ARNm que codifica para una determinada proteína.

La detección de una cadena simple de ARNm en secciones de tejido requiere la síntesis y marcaje de una sonda apropiada (ribosonda u oligonucleótido), es decir, de una cadena de ácido nucleico cuya secuencia sea complementaria al ARNm objeto de estudio. El proceso de hibridación tiene lugar gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias: guanina y citosina (G y C, unidas por tres puentes de hidrógeno) y adenina y uracilo o timidina (A y U o T, unidas por dos puentes de hidrógeno).

En esta tesis se realizó hibridación *in situ* mediante ribosondas para el trabajo nº 2 y para el resto de trabajos utilizamos oligonucleótidos de DNA. Ambos procedimientos se detallan de forma separada. Se han realizado experimentos de hibridación *in situ* sencilla, con sondas marcadas radiactivamente, e hibridaciones *in situ* dobles con sondas marcadas con ³³P o con digoxigenina utilizadas simultáneamente. La hibridación *in situ* doble, nos permite distinguir células donde se expresan a la vez dos ARNm.

2.1.1. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON OLIGONUCLEÓTIDOS

2.1.1.1. Sondas de DNA

Las sondas de hibridación que se utilizaron fueron oligonucleótidos sintéticos (de 45 a 48 bases) complementarios a la secuencia de ARNm en estudio. Su diseño se realizó teniendo en cuenta la selectividad para hibridar exclusivamente un ARNm dado y el porcentaje de nucleótidos C y G. Antes de sintetizar los oligonucleótidos se comprobó que la secuencia de cada uno de ellos hibridaba "*in silico*" únicamente con el ARNm de interés, utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Este programa permite la comparación de la secuencia de un oligonucleótido con todas las secuencias contenidas en las bases de datos, entre otras las del EMBL y del *GenBank*, para asegurarnos de que nuestras sondas no presentaban similitudes con otros ARNm.

Los oligonucleótidos se sintetizaron y purificaron por HPLC por Isogen Bioscience BV (Maarsden, The Netherlands).

Tabla 2.1. Oligonucleótidos utilizados

ARNm	Oligonucleótido	Intervalo de secuencia de nucleótidos	Nº de acceso del Genbank
PDE7B	PDE7B/1	556-600	NM_080894
	PDE7B/2	1390-1434	NM_080894
vGluT1	vGluT1/1	127-172	U07609
	vGluT1/2	1756-1800	U07609
vGluT2	vGluT2/1	466-510	AF271235
	vGluT2/2	2156-2200	AF271235
GAD65	GAD65/1	159-213	NM_012563
	GAD65/2	514-558	NM_012563
GAD67	GAD67/1	191-235	NM_017007
	GAD67/2	1600-1653	NM_017007
ChAT	ChAT/1	880-927	XM_224626
	ChAT/2	1669-1716	XM_224626
GFAP	GFAP/1	233-279	NM_017009
	GFAP/2	1199-1248	NM_017009
MBP	MBP	179-223	M25889
PDE4B	PDE4B/3	2639-2687	NM_017031
	PDE4B/4	2537-2581	NM_017031
PDE4B1	PDE4B1/2	383-427	AF202732
	PDE4B1/4	506-550	AF202732
PDE4B2	PDE4B2/2	545-589	L27058
	PDE4B2/5	418-462	L27058
	PDE4B2/6	520-564	L27058
PDE4B3	PDE4B3/1	700-744	U95748
	PDE4B3/2	616-660	U95748
	PDE4B3/3	556-600	U95748
	PDE4B3/4	476-520	U95748
PDE4B4	PDE4B4/1	264-308	AF202733
	PDE4B4/2	216-260	AF202733
	PDE4B4/3	171-215	AF202733

2.1.1.2. Hibridación *in situ* radiactiva

2.1.1.2.1. Marcaje radiactivo de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se marcaron con ^{33}P que, por su alta energía, permite una detección rápida de la señal de hibridación con gran sensibilidad.

Las sondas se marcaron en su extremo 3' con [^{33}P] α -dATP ([^{33}P] α -deoxiadenosina trifosfato, 3000 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, USA) utilizando el enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, 5000U/ml, Calbiochem, La Joya, CA, USA). En la reacción de marcaje se incubaron 2 pmol de sonda, 17 pmol [^{33}P] α -dATP y 5 unidades de TdT en un tampón de cacodilato de potasio (1mM) y cloruro de cobalto (1.5mM) pH 7.2 a 37°C durante 1-2 h. La reacción se detuvo calentando a 65°C durante 5 minutos.

2.1.1.2.2. Purificación de las sondas marcadas

Los nucleótidos no incorporados en el ADN se eliminaron de la mezcla de reacción por purificación por cromatografía utilizando columnas QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) o ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

El principio de purificación de la sonda con las columnas QIAquick Nucleotide Removal Kit se basa en la adsorción del ADN a la membrana de sílica-gel que compone las columnas en condiciones de alta concentración de sales, mientras que los nucleótidos libres pasan a través de ella. La mezcla de la reacción de marcaje se diluye en un tampón salino que contiene isopropanolol y perclorato sódico y, una vez cargada en la columna, se centrifuga durante 30 segundos a 2.100x g para que se una la sonda a la columna. Seguidamente se lava la columna con un tampón que contiene etanol para eliminar el exceso de sales centrifugando durante 90 segundos a 6.000 rpm. Para finalizar se recupera la sonda marcada con un tampón de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) centrifugando a 11.600x g durante 60 segundos.

La purificación con columnas ProbeQuant G-50 Micro Columns sigue un protocolo más sencillo, en el que la mezcla de marcaje se diluye en tampón STE (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), se carga en la columna de SephadexTM G-50 DNA Grade F, que previamente se ha reconstituido mediante agitación y centrifugación durante 1 minuto a 735x g, y se centrifuga durante 2 minutos a esta velocidad para recoger el oligonucleótido marcado.

2.1.1.2.3. Preparación del tejido

En esta tesis únicamente se utilizó tejido congelado, a pesar de que la técnica permite utilizar también tejido congelado perfundido o incluido en parafina. Los tejidos se trataron siguiendo el protocolo descrito por Vilaró y colaboradores (1992).

Las secciones se descongelaron bajo una corriente de aire frío, y se fijaron por inmersión en una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato salino (1xPBS: 2.6 mM KCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 pH 7.5) a 4°C durante 20 minutos. Seguidamente se hizo un lavado en 3x PBS y dos en 1x PBS de 5

minutos cada uno. A continuación las secciones se incubaron a 20°C durante 2 minutos con pronasa predigerida (24 U/ml, Calbiochem) en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, y 5 mM EDTA. La actividad proteolítica se paró por inmersión durante unos 30 segundos en una solución salina de glicina (2 mg/ml en PBS). Finalmente se lavaron dos veces durante 30 segundos con 1x PBS, y se deshidrataron en etanol al 70 y 100%, 2 minutos cada uno.

2.1.1.2.4. Hibridación del tejido

Las sondas se utilizaron a una concentración final de $1,5-3 \times 10^7$ cpm/ml en un tampón que contenía formamida (50%), 4x SSC (1x SSC:150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico), 1x solución de Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina de suero bovino), 10% sulfato de dextrano, 1% sarkosil, 20 mM tampón de fosfato sódico pH 7.0, 250 µg/ml de ARNt de levadura y 500 µg/ml ADN de esperma de salmón (Cortés et al., 1993).

Para la hibridación las secciones de tejido se incubaron con 100 µl de esta solución y se recubrieron con Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japón) para evitar la evaporación de la mezcla de hibridación. La hibridación se realizó dentro de cajas en un ambiente húmedo durante 16-20 horas en un incubador a 42°C.

2.1.1.2.5. Lavados

Para la eliminación del exceso de sonda no hibridada o unida inespecíficamente al tejido se sumergieron los portaobjetos hibridados en tampón de lavado (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5). Se realizaron cuatro lavados de 45 minutos a 60°C en este mismo tampón. Finalmente los tejidos se deshidrataron en etanol 70 y 100% durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

2.1.1.2.6. Exposición y obtención de autorradiogramas

Los autorradiogramas se obtuvieron por exposición de las secciones de tejido hibridadas a una película fotográfica Biomax-MR (Kodak, Rochester, USA). La exposición se hizo a -80°C, temperatura necesaria para que tengan efecto las pantallas intensificadoras de la emisión radiactiva de ^{33}P , durante un tiempo variable (entre 2 y 4 semanas) en función de la intensidad de la señal generada por la sonda radiactiva hibridada. Al finalizar la exposición, las películas fotográficas se revelaron con LX24 (Kodak), se fijaron con AL4 (Kodak) durante 5 minutos cada uno a 21°C y se lavaron durante 10 minutos en agua corriente para finalmente aclararlas con agua destilada. Este método permite la visualización macroscópica de las regiones enriquecidas en el ARNm de interés.

Para la visualización microscópica del ARNm sobre cuerpos celulares, utilizamos la técnica de inmersión en emulsión fotográfica líquida (*dipping*). Este método consiste en sumergir los portaobjetos con las secciones hibridadas en una emulsión fotográfica de sales de plata (emulsión nuclear K5, Ilford, Mobberly, UK) previamente diluida 1:1 con agua destilada y fundida a 42°C. La exposición se hizo a 4°C durante un periodo variable de tiempo (entre 1-2 meses). Pasado este tiempo se revelaron con D-19 (Kodak) y se fijaron en Hypam (Ilford) durante 5 minutos cada una y posteriormente se

montaron en Mowiol (Calbiochem). Algunas de estas secciones se tiñeron con violeta de cresilo (0.25 %) para poder observar los cuerpos celulares por microscopía de campo claro a la vez que la señal autorradiográfica en forma de precipitados de plata.

2.1.1.2.7. Controles de especificidad

Los oligonucleótidos pueden unirse a otros componentes del tejido como lípidos, ARN o ADN no homólogos dando una señal no específica. Por este motivo se realizan diferentes controles de especificidad en el momento de optimizar las condiciones experimentales para la hibridación de las diferentes sondas.

1. Comprobación de la coincidencia del patrón de expresión de diferentes oligonucleótidos complementarios para distintas regiones del mismo ARNm hibridados por separado en secciones consecutivas. Para cada ARNm utilizado se probaron dos o más sondas diferentes que en todos los casos proporcionaban los mismos patrones de hibridación.

2. Cohibridación de la sonda marcada con un exceso del mismo oligonucleótido sin marcar (un exceso de 50-100 veces la concentración del oligonucleótido marcado). La señal autorradiográfica específica desaparece y nos proporciona el nivel del ruido de fondo.

3. Análisis de la estabilidad térmica de los híbridos formados. Se realiza lavando secciones consecutivas hibridadas a temperaturas crecientes entre 50 y 90°C. Cuando la hibridación es específica, se observa un descenso brusco de la intensidad de la señal de ésta a temperaturas cercanas a la T_m (temperatura en la que se disocian el 50% de los híbridos). Este control permite, a su vez, encontrar la temperatura óptima de lavado para cada sonda, que siempre es inferior a la T_m , y que para todas las sondas utilizadas en esta tesis fue de 60°C.

4. Verificación de que la señal obtenida proviene de cuerpos celulares utilizando la técnica de *dipping* o de métodos de hibridación *in situ* no isotópicos.

2.1.1.3. Hibridación *in situ* no radiactiva

Esta técnica permite, al igual que la hibridación *in situ* radiactiva, examinar la distribución anatómica de ARNm específicos utilizando en este caso anticuerpos para la detección de la sonda hibridada.

2.1.1.3.1. Marcaje de oligonucleótidos no radiactivos

Las sondas se marcaron en el extremo 3' con el enzima deoxinucleotidil transferasa terminal recombinante (TdTrec, 4×10^5 U/ml, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) y Digoxigenina (Dig)-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH). La reacción se realizó incubando 100 pmol de sonda, 1nM de Dig-11-dUTP y 400 unidades de TdT en un tampón con cacodilato de potasio (50 mM) y cloruro de cobalto (1.25 mM) pH 7.2 a 37°C durante 45 minutos y se detuvo con 2 μ l de EDTA 200 μ M pH 8.0.

2.1.1.3.2. Purificación, preparación del tejido, hibridación y lavados de oligonucleótidos no radiactivos

Los siguientes pasos de esta técnica se realizaron de la misma manera que para los oligonucleótidos marcados isotópicamente. Para la hibridación las sondas marcadas con digoxigenina se diluyeron a una concentración de 2 nM.

2.1.1.3.3. Revelado de la señal de hibridación no radiactiva

Una vez acabado el proceso de lavado de las secciones, se detectó por inmunohistoquímica la digoxigenina de los híbridos formados.

1. Bloqueo de los posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo incubando durante 30 minutos en un tampón que contiene 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl, 2 mM MgCl₂ y 0.5% albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich).
2. Incubación durante 24 horas a 4°C con un anticuerpo que reconoce la Dig-11-dUTP (fragmento F(ab) anti-digoxigenina, 1:5000, Roche Diagnostics GmbH) conjugado con el enzima fosfatasa alcalina y diluido en el tampón anterior.
3. Lavados del exceso de anticuerpo: 3 veces durante 10 minutos cada vez, con el tampón anterior, seguido por dos lavados más de 10 minutos cada uno con tampón alcalino que contiene 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl y 5 mM MgCl₂.
4. Revelado de la actividad enzimática incubando los tejidos en 10 ml de tampón alcalino junto a 3.3 mg de NBT (nitro blue tetrazolium chloride, Roche Diagnostics GmbH) y 1.65 mg de BCIP (fosfato de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, Roche Diagnostics GmbH).
5. Lavados finales con el tampón alcalino con 1 mM EDTA tres veces durante 10 minutos cada vez, seguido de un último lavado con 1x PBS y una deshidratación rápida en etanol (70 y 100%) de un minuto cada uno.

Los tejidos sometidos a este proceso proporcionan una señal de hibridación en forma de precipitado de color azulado sobre las células que expresan el ARNm de interés que se puede visualizar en el microscopio de campo claro.

2.1.1.3.4. Controles de especificidad

Los controles utilizados para determinar la señal específica de la hibridación *in situ* no radiactiva fueron los mismos que en el caso de las sondas radiactivas. En este caso la señal no específica (ruido de fondo) de la reacción inmunohistoquímica se obtiene eliminando la sonda no radiactiva de la mezcla de hibridación.

2.1.1.4. Combinación de hibridación *in situ* radiactiva y la no-radiactiva

Esta técnica de hibridación *in situ* doble, permite examinar y diferenciar la distribución anatómica de dos mRNA determinados en la misma sección de tejido y posibilita la visualización de células que contengan al mismo tiempo los híbridos de éstos.

Para ello el marcaje de cada sonda se realiza siguiendo el protocolo que le corresponde para posteriormente hibridarlas conjuntamente. Después de los lavados convencionales se prosigue con el revelado de las sondas marcadas con digoxigenina, seguidamente se sumergen las secciones en emulsión nuclear para observar el marcaje radiactivo pasado el tiempo de exposición necesario.

En esta tesis los oligonucleótidos para las PDE estudiadas se han marcado siempre con radiactividad y los de los marcadores celulares no isotópicamente.

2.1.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CON RIBOSONDAS

2.1.2.1. Sondas de ARN

Las sondas *sense* y *antisense* utilizadas en el trabajo nº 2 fueron sintetizadas *in vitro* en el Departamento de Psiquiatría y Neuropsicología de la Universidad de Maastricht a partir de un constructo con la secuencia determinada para cada PDE insertada en un plásmido y utilizando el enzima de restricción apropiado para obtener, en reacciones separadas, las ribosondas *sense* y *antisense*. Antes de sintetizar y marcar la sonda todos los constructos fueron analizados por secuenciación de DNA y se determinó su concentración con un espectrofotómetro.

En la siguiente tabla están resumidas las principales características de cada ribosonda:

Tabla 2.2. Características de las ribosondas

ARNm detectado	Bases complementarias (nº bp)	Plásmido	Sonda <i>sense</i>	Sonda <i>antisense</i>	Especie	Nº de acceso del Genbank
			ER (RNA polimerasa)	ER (RNA polimerasa)		
PDE2	1964-2314 (350 bp)	pBS+	HindIII (T7)	EcoRII (T3)	rata	NM_031079
PDE5	2206-2580 (374 bp)	pCRIITOPPO	BstXI (Sp6)	HindIII (T7)	rata	D89093
PDE9	10-828 (818 bp)	pCRIITOPPO	XhoI(Sp6)	BAMHI (T7)	ratón	AF31147

ER: enzima de restricción

2.1.2.2. Síntesis y marcaje radiactivo de ribosondas

Tanto la sonda *antisense* como la *sense* se sintetizaron y se marcaron a partir de 5 µg de ADN molde por transcripción *in vitro* de ARN utilizando el Kit de transcripción SP6/T7 (Roche Diagnostics GmbH) y [³³P]α-UTP ([³³P] α-Uridin trifosfato, 3000Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, USA)

2.1.2.3. Preparación del tejido

El protocolo de fijación utilizado para hibridar con ribosondas fue ligeramente diferente al de la hibridación *in situ* con oligonucleótidos.

Las secciones se descongelaron bajo una corriente de aire frío, y se fijaron por inmersión en una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato salino (1x PBS: 2.6 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄) a temperatura ambiente (20±2°C) durante 20 minutos. Seguidamente se realizaron tres lavados cortos en el mismo tampón y las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con una solución que contenía 0.1 M de Trietanolamina y 25 % (v/v) de anhídrido acético. A continuación se lavaron dos veces con 2x SSC durante 5 minutos cada una y por último se sumergieron en una solución de 2x SSC que contenía un 50 % (v/v) de formamida desionizada a 37°C hasta el inicio de la hibridación.

2.1.2.4. Hibridación del tejido

Tanto la sonda *antisense* como la *sense* se diluyeron separadamente a una concentración final de $1-2 \times 10^6$ cpm/ml en un tampón que contenía 50 % (v/v) formamida desionizada, 2x SSC, 1x solución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano, 1% sarkosil, 1mg/ml de ARNt y 250 µg/ml ADN de esperma de salmón.

Para la hibridación las secciones de tejido se incubaron con 100-200 µl de esta solución y se recubrieron con Parafilm para evitar la evaporación de la mezcla de hibridación. La hibridación se realizó en atmósfera húmeda durante toda la noche en un incubador a 55°C.

2.1.2.5. Lavados

Después de la hibridación las secciones fueron lavadas sucesivamente con diferentes concentraciones de SSC (2x SSC, 1x SSC y 0.1x SSC) al 50 % (v/v) de formamida desionizada durante 20 minutos a 55°C cada una. A continuación se trataron durante 15 minutos a 37°C con RNasa T1 (2 U/ml, Roche) en 2x SSC y 1 M EDTA para eliminar el exceso de sonda de cadena simple que no esté formando un híbrido. Para finalizar se realizó un lavado a 42° C durante 20 minutos en 1x SSC, un lavado de 10 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC y una deshidratación en etanol 70 y 100% durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

2.1.2.6. Exposición y revelado de autorradiogramas

El protocolo de exposición y revelado fue el mismo que el que se utilizó para la hibridación *in situ* radiactiva con oligonucleótidos (ver apartado 2.1.1.2.4). Y el tiempo de exposición de las películas fotográficas fue de 2-4 semanas.

2.1.2.7. Controles de especificidad

En la hibridación *in situ* con ribosondas el control de especificidad viene dado por la señal hibridación obtenida con la sonda *sense*. Toda señal que se visualice tras la hibridación con esta sonda se considera inespecífica, por lo que a la hora de hacer la medida de las densidades ópticas relativas de los autorradiogramas, se debe restar al valor de la señal de hibridación obtenida con la sonda *antisense*, el de la sonda *sense* de la misma región de un porta consecutivo. Cabe señalar que por lo general la señal de la sonda *sense* fue muy tenue.

2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Esta técnica permite conocer a nivel celular la localización de proteínas en tejido. La visualización de su localización depende de la especificidad del anticuerpo por la proteína a detectar mediante la reacción antígeno-anticuerpo y de las distintas técnicas de detección o revelado de dicha reacción. En esta tesis el revelado de la reacción se ha basado en la presencia de una molécula de biotina en el anticuerpo secundario que al formar un complejo avidina-biotina reacciona con la diaminobenzidina (DAB) para dar lugar a un precipitado en el lugar donde se ha unido el anticuerpo secundario.

Esta técnica se utilizó en el trabajo nº 4.

2.2.1. Preparación del tejido

El tejido utilizado se obtuvo de la misma manera que para la hibridación *in situ*. Las secciones para la inmunohistoquímica fueron secciones adyacentes o consecutivas a las que se hibridaron con cada una de las sondas de hibridación utilizadas en el trabajo nº 4.

2.2.2. Anticuerpos utilizados

Tabla 2.3. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Antígeno	Población celular	[Ac]	Casa comercial
mouse anti-rat CD11b	CD11b	Microglía, macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer, granulocitos	1:100	Serotec, Oxford UK
rabbit anti-human CD3	CD3	Linfocitos T, NK	1:100	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark

Tabla 2.4. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Antígeno	Anticuerpo detectado	primario	[Ac]	Casa comercial
biotinylated anti-mouse IgG (H+L) (secundario)	IgG de ratón	mouse anti-rat CD11b		1:300	Vector Laboratories, CA, USA
biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (secundario)	IgG de conejo	rabbit anti-human CD3		1:100	Vector Laboratories

2.2.3. Protocolo de inmunohistoquímica

Las secciones se descongelaron, se fijaron en 4% PFA durante 20 minutos a 4° C, se lavaron con 1x PBS durante 5 minutos y se incubaron 15 minutos en una solución de 0.3 % H₂O₂ (Sigma) en 1x PBS. Tras un lavado de 5 minutos en 1x PBS, se realizó la preincubación (15 minutos a temperatura ambiente) y la incubación (1 hora a 37° C) de los anticuerpos primarios en una solución de 1x PBS con 2 % de suero normal de cabra (NGS, Vector Laboratories), y posteriormente, la incubación con los anticuerpos secundarios (30 minutos a 37° C) en una solución de 1x PBS al 2 % de NGS para el anticuerpo biotinilado anti-conejo (usado en la detección de CD3), o bien una solución de 1x PBS al 2 % de NGS y 2 % de suero normal de rata para el biotinilado anti-ratón (utilizado en la detección de CD11b). El exceso de anticuerpo se lavó con 1x PBS a temperatura ambiente, y a continuación se incubaron las secciones con la solución ABC del kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) a 37° C durante 30 minutos. La reacción colorimétrica se realizó incubando las secciones en solución I de DAB (0.05 M Tris-HCl; 0.3 mg/ml DAB (diaminobenzidine tetra hydrochloride, Sigma); 10 µl/ml DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma); 0.64 mg/ml NaN₃ (Merck, Darmstadt, Germany) y en solución II de DAB (0.05 M Tris-HCl; 0.3 mg/ml DAB; 0.64 mg/ml NaN₃; 0.06 µl/ml H₂O₂) durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente. Para finalizar se realizaron lavados en 1X PBS y en agua destilada y se montaron las secciones en Mowiol para su observación en el microscopio.

2.3. TINCIONES HISTOLÓGICAS

La identificación precisa de las regiones cerebrales en las que se encontró hibridación de las sondas utilizadas (tanto para los autorradiogramas como para los *dippings*) se realizó mediante la tinción de las mismas secciones histológicas o de secciones próximas a las utilizadas en la hibridación *in situ* o en la inmunohistoquímica.

2.3.1. Violeta de cresilo (tinción de Nissl)

Existe una gran variedad de colorantes básicos que interactúan con los ácidos nucleicos marcando tanto el núcleo celular (ADN y ARN) como el citoplasma (ARN). El violeta de cresilo es uno de ellos y es el que hemos utilizado a la hora de determinar la localización de los grupos neuronales en las diferentes áreas del cerebro y de la médula espinal.

Para ello las secciones de tejido se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución al 0.25 % de violeta de cresilo (Sigma). Se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en concentraciones crecientes de ethanol; se incubaron 2 veces en Histoclear (National Diagnostics, Itlings Lane, Hessle Hull, Inglaterra) durante 5 minutos cada vez, y se montaron en Entellan (Merk). En el caso de la tinción de secciones sumergidas en emulsión nuclear se utilizó el violeta de cresilo diluido al 0.06 %.

2.3.2. Hematoxilina /Eosina

La hematoxilina no es un colorante básico en sentido estricto pero, al utilizarse con un intermediario (mordiente), da lugar a una coloración semejante a la producida por las anilinas básicas. Este colorante interacciona con los grupos fosfato del ADN y el ARN por lo que colorea heterocromatina y nucleolos del núcleo y regiones ácidas del citoplasma.

La eosina es una anilina ácida que reacciona con los grupos catiónicos, como los grupos amino ionizados de las proteínas tiñendo las regiones básicas del citoplasma, filamentos citoplasmáticos y fibras extracelulares.

Esta tinción nos permite visualizar los núcleos de color azul, teñidos con Hematoxilina, y los ribosomas (por lo tanto el citoplasma celular) teñido de color rosa.

Para ello las secciones se incubaron durante 5 minutos en Hematoxilina de Harris (Sigma) prefiltrada antes de cada uso, y se viraron en agua corriente. Se diferenciaron en alcohol/clorhídrico (EtOH al 1% de HCl) hasta que el tejido se volvió rojo, se sumergió en agua amoniacal (100 ml agua destilada con 6 gotas de NH₃) hasta recuperar el color azul, y se volvió a virar en agua corriente. A continuación se incubaron 2 minutos con eosina Y (Sigma), se deshidrataron en concentraciones crecientes de ethanol; se incubaron 2 veces en Histoclear durante 5 minutos cada vez, y se montaron en Entellan.

2.4. ANÁLISIS DE DATOS

2.4.1. Cuantificación de la colocalización del ARNm de PDE7B con marcadores celulares

En el trabajo nº1 se determinó el porcentaje de células glutamatérgicas, GABAérgicas o colinérgicas del total de las que expresaban el mensajero de la PDE7B en las diferentes regiones cerebrales estudiadas.

Utilizamos 3 ratas y de cada una de ellas contamos la totalidad de las células que expresaban la PDE7B de un campo del microscopio Zeiss Axioplan (con el objetivo de 20X) de cada hemisferio para cada región y en 2-3 secciones. Además, en cada campo contamos el total de células que coexpresaban ambos mensajeros, el de la PDE7B y el de uno de los marcadores celulares utilizados (vGluT1, vGluT2, GAD, ChAT) en función de la región.

2.4.2. Determinación de las densidades ópticas relativas de los autorradiogramas

La semicuantificación de las densidades ópticas relativas del trabajo nº 3 se realizó utilizando los programas de análisis de imagen MCID4 y AIS^R (Imaging Research Inc, St Catharines, Ontario, Canada).

Las estructuras anatómicas se verificaron examinando las secciones teñidas con el método de Nissl y comparándolas con un atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1998).

Para cada rata, los valores de las densidades ópticas relativas se calcularon como la media de 2 secciones adyacentes en ambos hemisferios (una media de 4 medidas por rata y región). Los datos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

2.4.3. Preparación de las imágenes

Las imágenes de los autorradiogramas se fotografiaron con una cámara digital (DXM1200 F, Nikon) y un programa ACT-1 Nikon Software acoplada a una lupa macroscópica (Wild 420 Leica, Heerbrugg, Alemania). Las imágenes de las secciones procesadas (por inmunohistoquímica o hibridación *in situ*) se captaron utilizando un microscopio Zeiss Axioplan (Oberkochen, Alemania) o Nikon Eclipse E1000 (Tokyo, Japón) de la misma manera que se acaba de describir.

Los fotomontajes de las figuras se prepararon utilizando el programa Adobe Photoshop (Adobe Software, San Jose, CA, USA). Los únicos parámetros que se modificaron digitalmente fueron el brillo y el contraste. Como referencia anatómica las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina o con violeta de cresilo.

