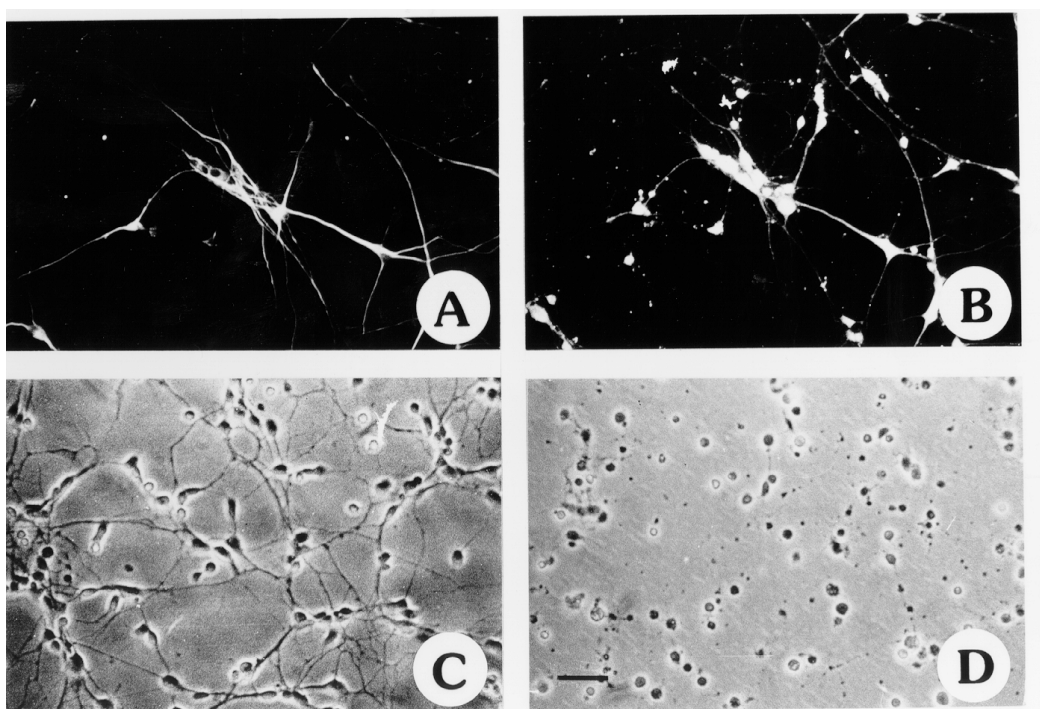


dorsal dado que estas células tienen una morfología fibroblastoide característica.

En conjunto, estos criterios demuestran que la técnica de purificación mediante gradiente de metrizamida permite obtener MTN's altamente purificadas (>95%) a partir de médulas espinales de embriones de pollo de 5,5 días de edad.



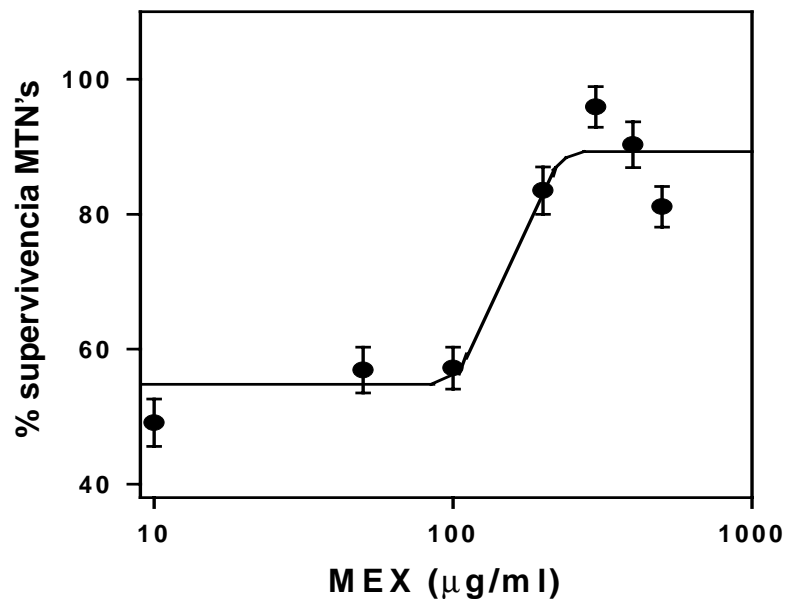
**Figura 8.3.** Aspectos morfológicos de las MTN's aisladas con la técnica de gradiente de metrizamida en cultivo. (A) y (B), MTN's cultivadas durante 7 días en presencia de 300 µg/ml MEX: doble inmunotinción con anticuerpos anti-proteína del neurofilamento de 68 kDa (A) y anti-ChAT (B). Todas las células en la fotografía aparecen marcadas por los dos anticuerpos. (C) MTN's cultivadas durante 2 días en presencia de 300 µg/ml MEX. (D) MTN's cultivadas 2 días sin MEX. Barra de escala, 50 µm (A-D).

De acuerdo con lo que han descrito previamente diversos laboratorios, las MTN's son estrictamente dependientes del MEX para su supervivencia (Figura 8.3C,D). Las MTN's purificadas cultivadas en medio L15H sin MEX mueren en un plazo de 2-3 días (Figura 8.3D), de forma que menos del 5% de las neuronas sembradas inicialmente sobreviven

después de 1 semana. Estas neuronas, que inicialmente emiten elongaciones neuríticas de corta longitud que se fragmentan rápidamente, acaban desprendiéndose de la placa de cultivo. Durante las primeras 36 hr en cultivo, muere una significativa proporción de las MTN's que puede alcanzar hasta el 40% incluso en presencia de concentraciones saturantes de MEX (>300 µg/ml) en el medio de cultivo.

Posteriormente, el número de MTN's en el cultivo se estabiliza. Las neuronas supervivientes emiten largos procesos neuríticos con positividad a la inmunodetección de la proteína del neurofilamento de 68 kDa (Figura 8.3A) así como de la ChAT (Figura 8.3B), indicativos de su naturaleza neuronal colinérgica. El MEX no tiene efectos tóxicos incluso a elevadas concentraciones (500 µg/ml), estableciéndose ~175 µg/ml como la concentración media-máxima promotora del 50% de supervivencia para el extracto P10D5 (Figura 8.4).

Habitualmente, cultivamos las MTN's en presencia de una concentración saturante de MEX (300 µg/ml) durante 2 días (para permitir la muerte de las neuronas lesionadas) para, a continuación, substituir el medio de cultivo con los correspondientes medios a analizar. Tras la privación de MEX, las neuronas comienzan a morir de forma que después de 48 hr más del 70% de ellas han degenerado. Por contra, en cultivos paralelos mantenidos de forma continuada en presencia de MEX la supervivencia alcanza más del 90%. En cultivos a largo plazo, el MEX no es capaz de mantener la supervivencia de las MTN's (la supervivencia tras 7 días en presencia de MEX fue de ~20%; datos no mostrados), incluso cuando se recambió el medio de cultivo cada 2 días.



**Figura 8.4.** Curva de dosis de dependencia del efecto promotor de la supervivencia del MEX sobre las MTN's espinales *in vitro*. Los cultivos fueron mantenidos durante 24 hr en presencia de concentraciones crecientes de MEX. 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).

## 8.2 La muerte de las motoneuronas por privación de extracto muscular es apoptótica

Se realizaron experimentos con el colorante Hoechst 33258 para cuantificar el porcentaje de MTN's apoptóticas tras la privación de MEX. Este colorante interacciona de forma específica con el ADN de doble cadena, emitiendo fluorescencia a 490-500 nm cuando se excita a 360 nm. Las células apoptóticas muestran un ADN altamente condensado y normalmente fragmentado en dos o más agregados cromatínicos (Figura 8.5G). En cultivos de MTN's mantenidas de forma continuada en presencia de MEX, el porcentaje de células que muestran esta morfología es del  $2,15 \pm 0,15\%$  de las neuronas. Sin embargo, tras la privación de MEX este porcentaje aumenta considerablemente. Tras 12

hr de privación de MEX, encontramos que el  $5,03 \pm 0,6\%$  de las células muestran núcleos apoptóticos mientras que este porcentaje es del  $3,92 \pm 0,53\%$  a las 24 hr y del  $3,2 \pm 0,2\%$  a las 48 hr de la privación de MEX. La adición de CHX al medio de cultivo a una concentración de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  es capaz de bloquear el aumento en el porcentaje de núcleos apoptóticos en relación con la privación de MEX.

### **8.3 Análisis ultraestructural de la muerte de las motoneuronas *in vitro***

La morfología de las neuronas purificadas con la técnica de gradiente de metrizamida y mantenidas en presencia de MEX durante 48 hr es parecida a la de las MTN's localizadas en la columna motora lateral de embriones de pollo de 8-10 días de edad (Figura 8.5A,B). Muestran un núcleo grande con cromatina fina dispersa y uno o dos nucleolos. Su citoplasma contiene grandes cantidades de polirribosomas libres, un retículo endoplasmático rugoso moderadamente desarrollado y abundantes mitocondrias. Los complejos de Golgi son muy prominentes y a veces se encuentran alrededor de un centriolo. Se observa la presencia de estructuras túbulovesiculares por todo el citoplasma, haciéndose más llamativas en la vecindad de las regiones Golgi. Existe una red de citoesqueleto compuesta de microtúbulos y filamentos, dispersa en el citoplasma neuronal, aunque también forma acúmulos muy densamente empaquetados. Múltiples neuritas que nacen de los somas neuronales forman una red que ocupa el espacio intercelular. Las neuritas presentan un citoesqueleto prominente, vesículas y túbulos unidos a la membrana y algunas mitocondrias. Las neuritas crecen habitualmente a lo largo de la superficie de los cuerpos celulares. Asimismo, los terminales neuríticos esféricos establecen frecuentemente contactos de tipo sináptico sobre la superficie de los somas celulares.

Esta descripción morfológica se modifica considerablemente en los cultivos de MTN's deprivados de MEX. Aunque algunas neuronas tienen un aspecto saludable incluso después de 48 hr de deprivación de MEX, muchas células muestran grados variables de alteraciones ultraestructurales (Figura 8.5E,F). Algunas neuronas presentan un perfil redondeado y contienen un núcleo muy circunvolucionado (Figura 8.5F) con un amplio grado de condensación cromatínica. Su citoplasma contiene acúmulos lipídicos (Figura 8.5E), vacuolas unidas a la membrana y filamentos del citoesqueleto, sin signos de degeneración organular. Algunas otras neuronas presentan una intensa condensación citoplasmática en asociación con la desintegración de la envoltura nuclear y la dispersión de la cromatina por todo el citoplasma. La cromatina, altamente condensada, forma estructuras filiformes y masas compactas redondeadas (Figura 8.5D). Los orgánulos citoplasmáticos, como las mitocondrias, no presentan alteraciones estructurales groseras. Sin embargo, ocasionalmente se observa la presencia en estas células de estructuras con aspecto de vacuolas autofágicas con mitocondrias en proceso de degeneración y cuerpos membranosos lamelares concéntricos (Figura 8.5D).

Las neuritas de las MTN's deprivadas de MEX presentan un amplio espectro de cambios degenerativos. La mayoría de ellas están muy dilatadas, con un aspecto electrón-lucido, y fragmentadas en estructuras esféricas que contienen mitocondrias en proceso de degeneración, gránulos densos de gran tamaño, vesículas pequeñas y material amorfo