



Figura 8.5. La morfología ultraestructural de la muerte celular de las MTN's tras la privación trófica *in vitro* se parece parcialmente a la muerte fisiológica *in vivo*. (A) MTN's de la columna motora lateral lumbar de un embrión de pollo de 8 días de edad. (B) Neuronas de la interfase de metrizamida cultivadas durante 2 días en presencia de MEX. (C) MTN's de la columna motora lateral lumbar de un embrión de pollo de 8 días de edad durante el proceso de muerte fisiológica. (D-G) Neuronas de la interfase de metrizamida en proceso de degeneración tras 2 días de privación de MEX *in vitro*. (E) Neuronas moribundas con una gran cantidad de acúmulos lipídicos en su citoplasma. (G) Tinción cromatínica con colorante Hoechst 33258 de un cultivo de MTN's tras 2 días de privación de MEX. Se señalan con flechas dos MTN's con signos típicos de ADN condensado y fragmentado. Barras de escala: (A) y (B), 5 μm; (C-E), 1 μm; (F), 2,5 μm, (G), 25 μm.

disperso (Figura 8.5G). Otras neuritas están retraídas, con un aspecto oscuro y llenas de un material granular amorfo y condensado. En las células degeneradas, los terminales de tipo sináptico pericelulares están extremadamente dilatados y con signos evidentes de disrupción estructural de su contenido.

8.4 La inhibición de la función lisosómica no evita la muerte celular de las motoneuronas

Martin et al. (1988) han descrito que la función lisosómica no está implicada en la muerte de las neuronas simpáticas tras la privación trófica. Hemos analizado esta misma circunstancia en el proceso de muerte celular de las MTN's en relación con la privación de MEX, mediante el empleo de varios inhibidores de proteasas lisosómicas. Se adicionaron a los cultivos de MTN's privados previamente de factor trófico tras 48 hr de cultivo, los inhibidores PMSF, cloroquina y leupeptina a dosis de 1 μ M a 1 mM. La supervivencia 48 hr después fue similar a la de cultivos que no habían sido tratados con inhibidores de proteasas.

8.5 La muerte de las motoneuronas tras la privación trófica es un proceso activo

Se ha demostrado que el proceso de muerte neuronal tras la privación trófica precisa la síntesis *de novo* de ARNm y proteínas *in vitro* (revisado en Apartado 6.2). Con la intención de establecer si esta afirmación es también cierta para las MTN's que mueren como consecuencia de la privación de MEX, se trataron cultivos con inhibidores transcripcionales o traduccionales (Tablas 8.1 y 8.2). Se utilizaron tres drogas diferentes que inhiben la síntesis de proteínas (CHX, anisomicina y puromicina) y otras tres que inhiben la síntesis o el procesamiento de ARNm (actinomicina D (ActD), camptotecina (CAMP) y cordicepina (CORD)). Tras mantener las MTN's durante 48 hr en

presencia de MEX, se reemplazó el medio de cultivo por medio basal sin MEX con las concentraciones adecuadas de inhibidores transcripcionales o traduccionales. La eficiencia de la inhibición de la síntesis proteica por la CHX fue evaluada mediante la determinación de su capacidad de bloquear la incorporación de aminoácidos marcados con ^{35}S en proteínas precipitables con TCA.

Como se detalla en la Tabla 8.1, la CHX inhibe eficientemente la muerte neuronal que acontece tras la deprivación de MEX *in vitro*. La inhibición fue del 50% a una dosis de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (~175 nM) y del 100% a una dosis de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (~1,75 nM). Las dosis mayores de 5 $\mu\text{g/ml}$ resultaron tóxicas para las MTN's. La CHX inhibe la incorporación de aminoácidos marcados con ^{35}S en proteínas precipitables con TCA hasta en un 50% a una concentración de 0,05 $\mu\text{g/ml}$, y hasta un 90% a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Las neuritas de las MTN's tratadas con CHX se adelgazan progresivamente aunque se mantienen íntegras sin fragmentarse. No se observa degeneración de los somas celulares, aunque disminuyen de tamaño gradualmente. Cuando se adiciona CHX (0,5 $\mu\text{g/ml}$) al medio de cultivo coincidiendo con la siembra, las MTN's mantienen su brillo, su adhesión al substrato de cultivo y su apariencia saludable incluso en ausencia de MEX. Sin embargo, los somas celulares no emiten neuritas, probablemente como consecuencia de la inhibición altamente eficiente de la síntesis de proteínas. No detectamos toxicidad de la CHX sobre las MTN's cultivadas en presencia o ausencia de MEX hasta después de 4 días de tratamiento. En ese momento, las MTN's comienzan a fragmentarse y desprenderse de la superficie de la placa de cultivo.

Resultados similares a los obtenidos con CHX fueron observados con otros inhibidores de la síntesis de proteínas en el mismo grupo de experimentos (vease porcentajes de supervivencia en Tabla 8.1). La anisomicina fue capaz de evitar la muerte de MTN's a concentraciones en

el rango de 50-200 μM , aunque concentraciones mayores de 200 μM resultaron tóxicas. La dosis más eficaz fue 100 μM . La puromicina también inhibe la muerte de MTN's tras la privación de MEX. La dosis óptima fue 200 μM , aunque la puromicina resultó ser menos eficaz en relación con tiempos de cultivo más prolongados (48 hr).

En otra serie de experimentos intentamos examinar si la inhibición de la muerte celular a través del bloqueo de la síntesis proteica depende o no de la transcripción de nuevas moléculas de ARNm. Se estudió la acción de diversas drogas capaces de interferir con la transcripción o el procesamiento del ARNm sobre cultivos de MTN's privadas de MEX. Como se detalla en la Tabla 8.2, la ActD a dosis de 0,5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de rescatar las MTN's de la muerte celular resultante de la privación de MEX. Sin embargo, la ActD demostró ser muy tóxica para las MTN's cuando se mantiene en el medio de cultivo durante períodos de tiempo prolongados (48 hr). Esta toxicidad de la ActD fue observada incluso en presencia de MEX (datos no mostrados).

Otras drogas que alteran la transcripción o el procesamiento del ARNm (CAMP y CORD) también protegen a las MTN's de la muerte celular en relación con la privación de MEX (Tabla 8.2). La CAMP es eficaz a concentraciones en el rango de 50 nM a 1 μM , siendo 100 nM la dosis óptima. Dosis mayores de 5 μM resultan tóxicas para las MTN's. Los resultados con CORD fueron similares (rango de concentraciones eficaces, 5-100 μM ; dosis óptima, 25 μM). La CAMP resultó ser menos tóxica para las MTN's que la ActD (datos no mostrados). Sin embargo, todas las drogas estudiadas que inhiben la síntesis o procesamiento del ARNm mostraron mayor toxicidad que la CHX al ser mantenidas en el medio de cultivo durante períodos de tiempo prolongados (48 hr).

	Supervivencia	
	24 hr	48 hr
Con MEX (300 µg/ml)	105,4 ± 17,7	87,6 ± 7,6
Sin MEX	53,3 ± 7,3	37,0 ± 5,6
Sin MEX + cicloheximida (0.5 µg/ml)	105,0 ± 8,7	93,8 ± 9,7
Sin MEX + anisomicina (100 µM)	79,9 ± 12,9	72,1 ± 2,8
Sin MEX + puromicina (200 µM)	95,0 ± 13,5	33,4 ± 1,3

Tabla 8.1. Los inhibidores de la síntesis de proteínas inhiben la muerte de MTN's que acontece tras la deprivación de MEX. Los cultivos fueron mantenidos durante 48 hr en presencia de 300 µg/ml MEX. Seguidamente se deprivaron de MEX y se adicionó MEX, las diferentes drogas o nada. Se evaluó la supervivencia 24 y 48 hr después. Los valores mostrados de supervivencia son medias ± SEM de un único experimento que fue repetido dos veces más con resultados comparables a los aquí presentados (n = 6 para todos los grupos).

	Supervivencia	
	24 hr	48 hr
Con MEX (300 µg/ml)	93,1 ± 5,1	95,7 ± 5,4
Sin MEX	55,0 ± 4,9	12,3 ± 3,0
Sin MEX + actinomicina D (10 µg/ml)	76,3 ± 5,0	9,9 ± 2,2
Sin MEX + camptotecina (100 µM)	85,8 ± 6,9	77,4 ± 8,2
Sin MEX + cordicepina (25 µM)	74,9 ± 7,0	69,6 ± 4,7

Tabla 8.2. Los inhibidores de la síntesis o procesamiento de ARNm inhiben la muerte de MTN's que acontece tras la deprivación de MEX. Los cultivos fueron mantenidos durante 48 hr en presencia de 300 µg/ml MEX. Seguidamente se deprivaron de MEX y se adicionó MEX, las diferentes drogas o nada. Se evaluó la supervivencia 24 y 48 hr después. Los valores de supervivencia mostrados son medias ± SEM de un único experimento que fue repetido dos veces más con resultados comparables a los aquí presentados (n = 6 para todos los grupos).

El grado de inhibición de la transcripción producida por las drogas anteriormente mencionadas fue estimado mediante la medición de la incorporación de aminoácidos marcados con ³⁵S a las proteínas precipitables con TCA. Se expresaron los resultados como porcentajes respecto a la radioactividad incorporada por cultivos paralelos que no fueron tratados con los inhibidores. Cuando se incubaron los cultivos con ActD o CAMP desde 6 hr antes de la adición de la mezcla de aminoácidos marcados con ³⁵S, encontramos un efecto de inhibición sobre la incorporación de radioactividad precipitable con TCA superior al 90%.

8.6 Patrón escalonado de degradación del ADN en las motoneuronas en proceso de degeneración tras la privación trófica

Una de las características más definitorias de la muerte celular programada o apoptosis es la degradación del ADN en fragmentos de tamaño oligonucleosomal como consecuencia de la activación de una endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependiente (Arends et al., 1990). El análisis del ADN fragmentado por la actividad endonucleásica mediante electroforesis en gel de agarosa permite observar un típico patrón de bandas, normalmente conocido como patrón escalonado de degradación del ADN. Fuimos incapaces de detectar la degradación escalonada del ADN tras la privación de MEX de las MTN's mediante el análisis de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (datos no mostrados). Este hecho se debe probablemente al número relativamente reducido de MTN's (5×10^5) utilizado en los correspondientes experimentos, a su vez condicionado por el número de MTN's que pueden ser purificadas con la técnica de gradiente de metrizamida. Por tanto, utilizamos una estrategia similar a la descrita por Edwards et al. (1991). Este método se fundamenta en la elevada sensibilidad de las técnicas de *Southern blotting*, utilizando como sonda ADN genómico de pollo marcado con digoxigenina. La Figura 8.6 muestra, en el carril A, el ADN correspondiente a MTN's mantenidas en presencia de MEX. El carril B evidencia un patrón de escalonado de degradación del ADN en relación con la muerte de las MTN's tras la privación de MEX. El carril C corresponde a MTN's cultivadas sin MEX aunque en presencia de $0,5 \mu\text{g/ml}$ CHX, cuya capacidad para inhibir la muerte de las MTN's demostramos previamente. Parece claro, por tanto, que la inhibición de la síntesis proteica también evita la degradación del ADN.