



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

IDI BAPS



RESPUESTA DE LAS CÉLULAS GLIALES AL DAÑO NEURONAL *IN VITRO*

Tesis doctoral presentada por
Kamil Pérez Capote
Barcelona, febrero 2006

MATERIALES Y MÉTODOS

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Cultivos primarios de células de cerebelo.

Los cultivos primarios de células de cerebelo fueron obtenidos según el procedimiento descrito por Novelli y cols. (1988) a partir de cerebelos de ratas de 7 días, momento en el que la mayoría de las neuronas granulares indiferenciadas se encuentran en la capa germinal externa de la corteza cerebelar y sólo unas pocas comienzan a migrar hacia las capas más internas (Hatten y Heintz, 1995). Estos cultivos están constituidos principalmente por neuronas granulares. Se ha demostrado que las neuronas granulares continúan su diferenciación morfológica *in vitro* y requieren unas condiciones despolarizantes en el medio de cultivo para su supervivencia (Thangnipon y cols., 1983; Balázs y cols., 1988a). Estas condiciones son indispensables a partir de los 3 días *in vitro* (DIV) y se pueden conseguir mediante una concentración mínima de 25 mM de KCl en el medio de cultivo o con agonistas del receptor de glutamato tipo NMDA (Gallo y cols., 1987; Balázs y cols., 1988b). Las condiciones despolarizantes del medio de cultivo son fundamentales para poder permitir la liberación de neurotransmisores cuya acción favorece la diferenciación, maduración y supervivencia neuronal, así como el desarrollo de la capacidad de respuesta a NMDA a partir de los 8 DIV (Balázs y cols., 1988a, Balázs y cols., 1988b, Pearson y cols., 1992). La liberación de ácido glutámico sintetizado endógenamente a partir de glutamina por estas neuronas, en respuesta a un estímulo despolarizante, se hace dependiente de calcio extracelular a partir de los 4 DIV por un mecanismo similar al que tiene lugar *in vivo*. Paralelamente, hay un progresivo aumento en la síntesis de la enzima glutaminasa, en la formación de neuritas, de vesículas sinápticas y de sinapsis (Gallo y cols., 1982; Thomas y cols., 1989; Peng y cols., 1991). La formación de neuritas se produce al poco tiempo de sembradas las neuronas, incluso antes de finalizar las divisiones mitóticas (Wolf y cols., 1997), y durante el primer DIV hay un máximo en los niveles de ARNm de GAP-43 (*Growth Associated Protein-43*), proteína implicada en neuritogénesis y relacionada con exocitosis, que van disminuyendo paulatinamente hasta que se establecen las sinapsis alrededor del séptimo DIV (Przyborski y Cambray-Deakin, 1994). Los niveles de GAP-43 pueden ser modulados por la acción de neurotransmisores (Console-Bram y cols.,

1998) y, por consiguiente, por las condiciones despolarizantes. Manteniendo las neuronas en cultivo en estas condiciones se estimula la entrada de calcio a través de canales sensibles a voltaje tipo L y N (Becherer y cols., 1997) y se simula la estimulación glutamatérgica que *in vivo* proporcionan las fibras musgosas a las células granulares de cerebelo a partir de los 12 días de edad (Balázs y Hack, 1990).

Materiales

- Soluciones madre

- Solución KREBS: 1 mM NaCl, 54 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄·H₂O, 266 mM rojo fenol, 250 mM HEPES (forma ácida), 144 mM glucosa. La solución se prepara con agua destilada (H₂O dest.) y se equilibra a pH 7.4 con NaOH 10 M.
- Solución MgSO₄: Preparar una solución 4% con H₂O dest., a partir de la cual se obtienen las concentraciones referidas en las soluciones I, III, IV y V.
- Solución CaCl₂: Preparar una solución 1% con H₂O dest., a partir de la cual se obtiene la concentración referida en la solución V.

Todas las soluciones se filtran con membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro en condiciones estériles bajo la campana de cultivos.

- Soluciones para la obtención del cultivo

- Solución I: Solución KREBS suplementada con 3 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) y 2.5 mM de MgSO₄. La solución se prepara con H₂O dest. y se equilibra a pH 7.4 con NaOH 10 M.
- Solución II: Solución I suplementada con 0.25 mg/ml de tripsina.
- Solución III: Solución I suplementada con 80 μg/ml de desoxirribonucleasa, 0.52 mg/ml de inhibidor de tripsina y 3 mM de MgSO₄.
- Solución IV: 17 ml de Solución I suplementada con 8 ml de Solución III.
- Solución V: Solución I suplementada con 2.5 mM de MgSO₄ y 0.1 mM de CaCl₂.

Todas las soluciones se filtran con membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro en condiciones estériles bajo la campana de cultivos.

- Medios de cultivo

- Medio de neuronas: medio basal EAGLE (BME) (GIBCO-BRL, Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con 20 mM de KCl, 100 μg/ml de gentamicina, 2 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS)

previamente inactivado a 56°C durante 1 h (GIBCO-BRL, Life Technologies, Paisley, UK).

- Medio de células gliales: BME suplementado con 100 µg/ml de gentamicina, 2 mM de L-glutamina y 10% de FBS previamente inactivado.

- Poli-L-lisina (PLL)

Preparar una solución madre de 500 µg/ml en H₂O dest. estéril, a partir de la cual se obtienen las diferentes concentraciones de trabajo: 5 µg/ml PLL para las placas de cultivo y 10 µg/ml PLL para los cubreobjetos.

La PLL es un polímero que favorece la adherencia de las células. Las placas se incuban con PLL a temperatura ambiente (TA) durante 5 h.

Procedimiento

Se extrajeron los cerebelos de 8-10 crías de rata (Wistar, Iffa Credo, Lyon, France) y se lavaron en solución I. Tras la disección de las meninges y vasos sanguíneos con pinzas estériles en solución I, los cerebelos se trocearon con ayuda de un bisturí estéril. El tejido troceado se depositó en 30 ml de solución I, se recogió por centrifugación a 800 rpm durante 45 s, se resuspendió en 30 ml de solución II y se incubó a 37°C durante 10 min con agitación. Durante la tripsinización con solución II, algunas células se lisaron y liberaron su ADN, aumentando la viscosidad de la solución y formándose grumos. La reacción de tripsinización se detuvo con la adición de 15 ml de solución IV. Se agitó con vortex hasta deshacer los grumos. Las células se recogieron por centrifugación a 800 rpm durante 45 s y se resuspendieron en 2 ml de solución III. El tejido se sometió a una disgregación mecánica en la solución III aproximadamente unas 60 veces con pipetas Pasteur de diferente diámetro. Se añadieron 5 ml de solución V a la suspensión celular obtenida, que se dejó reposar durante 2-3 min con el fin de sedimentar los grumos aún presentes y separarlos de la suspensión. Las células en suspensión se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 50 ml de medio de neuronas. Se procedió al conteo de células con la ayuda de la cámara de Neubauer. Las células se sembraron en placas previamente recubiertas con PLL a las densidades correspondientes para cada tipo de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 100%.

3.1.1- Cultivo de neuronas granulares.

A partir de la suspensión celular obtenida se preparó otra conteniendo 1.2×10^6 céls/ml. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 céls/cm² en placas o cubreobjetos según el experimento. A las 17 h se añadió al cultivo $10 \mu\text{M}$ de arabinofuranósido de citosina (Ara-C), agente citostático que impide la proliferación de las células no neuronales. A los 4 DIV se añadió al cultivo 5.6 mM de glucosa para favorecer la supervivencia y compensar las pérdidas de H₂O. A los 8 DIV alrededor del 95% de las células en el cultivo eran neuronas (véase el apartado 3.6, marcador neuronal NeuN) y la proporción de células gliales no superó el 5% (véase el apartado 3.6, marcadores gliales GFAP, lectina y CD68). Al cultivo neuronal no se le cambió nunca el medio.

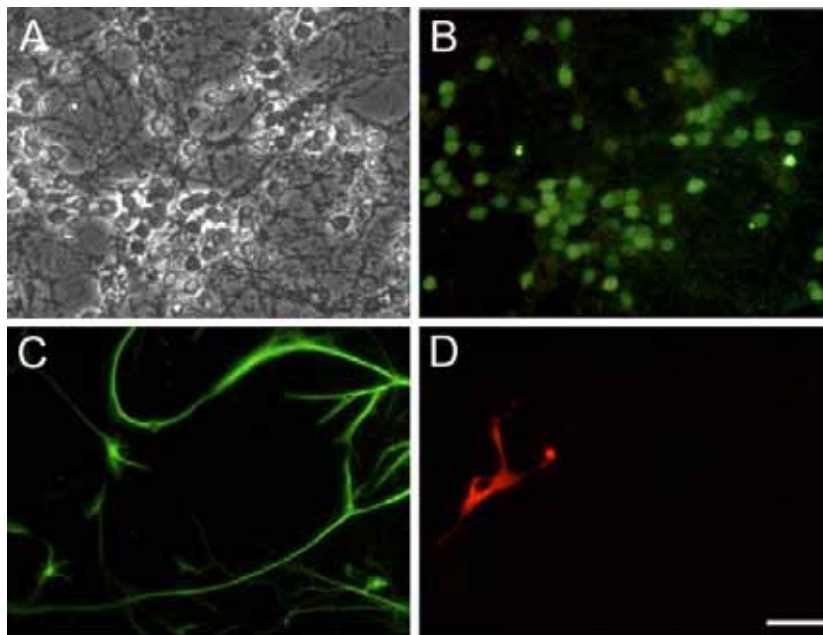


Figura 18. Cultivos de neuronas granulares de cerebelo. A: imagen del cultivo en contraste de fases. B: inmunotinción de los núcleos de las neuronas con el anticuerpo NeuN del mismo campo mostrado en A. C: inmunotinción de astrocitos con el anticuerpo GFAP, de un campo vecino al mostrado en A. D: inmunotinción de microglía con el anticuerpo CD68 del mismo campo mostrado

3.1.2- Cultivo mixto de neuronas granulares y de células gliales.

A partir de la suspensión celular obtenida se preparó otra conteniendo 1.2×10^6 céls/ml. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 céls/cm² en placas o cubreobjetos según el experimento. A diferencia del cultivo neuronal, se omitió la

adición de 10 μM Ara-C a este cultivo, para permitir la proliferación de las células no neuronales. A los 4 DIV se añadió al cultivo 5.6 mM de glucosa para favorecer la supervivencia y compensar las pérdidas de H_2O . A los 8 DIV el cultivo contenía alrededor de un 15% de células gliales (véase el apartado 3.6, marcadores gliales GFAP, lectina y CD68). A este cultivo neurona-glía no se le cambió nunca el medio.

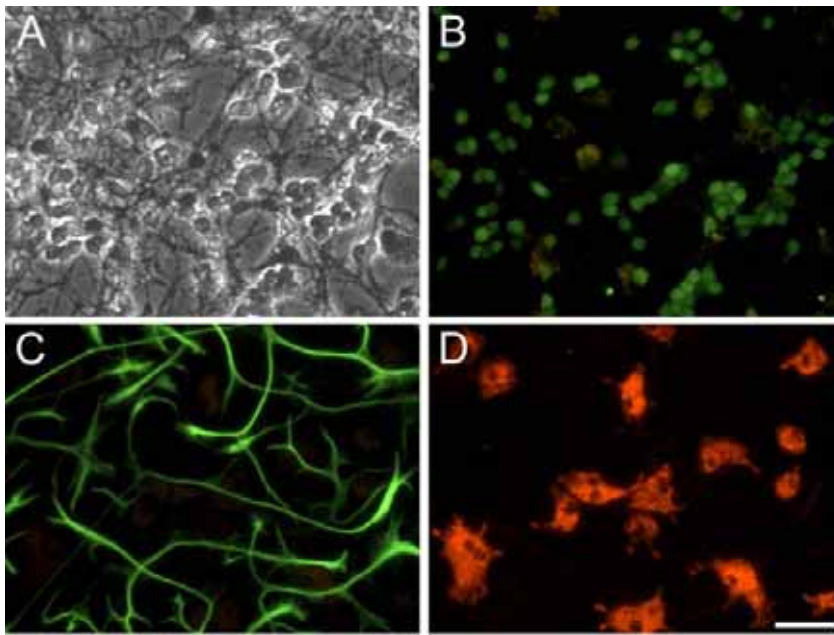


Figura 19. Cultivos mixtos de neurona-glía de cerebelo. A: imagen del cultivo en contraste de fases. B: inmunotinción de los núcleos de las neuronas con el anticuerpo NeuN del mismo campo mostrado en A. C: inmunotinción de astrocitos con el anticuerpo GFAP, de un campo vecino al mostrado en A. D: inmunotinción de microglía con el anticuerpo CD68 del mismo campo mostrado en C. Barra= 30 μm .

3.1.3- Cultivo mixto de células gliales.

A partir de la suspensión celular de 1.2×10^6 céls/ml se preparó otra conteniendo 0.9×10^6 céls/ml. Las células se sembraron a una densidad de 2.25×10^5 céls/ cm^2 en placas o cubreobjetos según el experimento. Pasadas 24 h se sustituyó el medio de las células por uno sin KCl adicional (ver página 65). Cada 3 días se hicieron cambios de medio utilizando este medio para células gliales y a los 8 DIV se obtuvo un cultivo mixto de células gliales constituido fundamentalmente por astrocitos y microglía (véase el apartado 3.6, marcadores gliales GFAP, lectina y CD68).

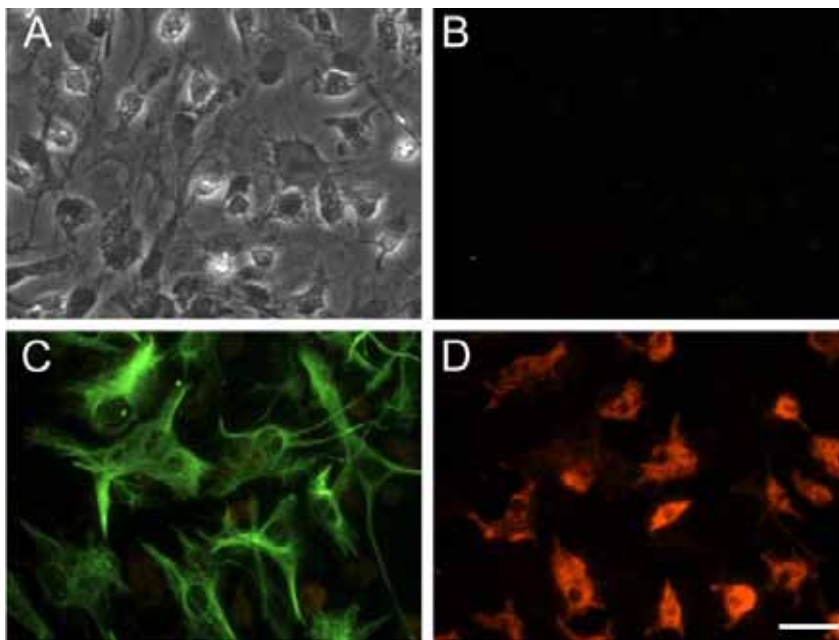


Figura 20. Cultivos mixtos de células gliales de cerebelo. A: imagen del cultivo en contraste de fases. B: inmunotinción de los núcleos de las neuronas con el anticuerpo NeuN del mismo campo mostrado en A. C: inmunotinción de astrocitos con el anticuerpo GFAP, de un campo vecino al mostrado en A. D: inmunotinción de microglía con el anticuerpo CD68 del mismo campo mostrado en C. Barra= 30 μ m.

3.1.4- Identificación de los tipos celulares presentes en los cultivos.

La caracterización de los distintos tipos celulares presentes en los cultivos de cerebelo que se han utilizado a lo largo de esta tesis se ha realizado mediante tinciones específicas y técnicas de inmunocitoquímica utilizando marcadores específicos (lectina y anticuerpos mono y policlonales). A continuación detallamos los marcadores utilizados en cada caso:

- a) Neuronas. Han sido identificadas utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína nuclear neuronal (NeuN) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6.1 y tabla 1.
- b) Astrocitos. Para su identificación se ha utilizado un anticuerpo policlonal que reconoce la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), su marcador por excelencia, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6.1 y tabla 1.
- c) Microglía. Se ha identificado utilizando distintos marcadores: por una parte, se ha utilizado la lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*), glicoproteína que interacciona específicamente con glúcidos de las caras interna

y externa de la membrana celular microglial; por otra parte, se han utilizado dos anticuerpos monoclonales, OX-42 (también denominado CD11b o MAC-1) y CD68 (o ED1) que reconocen el receptor de membrana celular CR3 o una glicoproteína de la membrana de los lisosomas, respectivamente. En el apartado 3.6.1 y tabla 1 se indica el protocolo que se ha seguido.

3.2- Tratamientos de los cultivos

Los tratamientos se llevaron a cabo a los 8-9 DIV. Existen estudios que señalan que a estos DIV los receptores de glutamato son funcionales y, por consiguiente, los cultivos son maduros (Pearson y cols., 1992; Vallano y cols., 1996; Condorelli y cols., 1993).

En la mayoría de las situaciones experimentales los cultivos neuronales y los cultivos mixtos neurona-glía se mantuvieron en su medio condicionado. Está establecido que un cambio de medio (medio fresco con un 10% de FBS, véase el apartado 3.1) provoca muerte de las neuronas granulares por excitotoxicidad, como consecuencia de las concentraciones de glutamato presentes en el suero (Ye y Sontheimer, 1998a). Cuando fue necesario realizar un cambio de medio de cultivo se utilizó un medio sin FBS.

3.2.1- Tratamiento con glutamato.

La excitación neuronal por aminoácidos excitatorios puede en ocasiones ser excesiva y resultar tóxica para la neurona. Este fenómeno fue descrito por Olney (1969), quién demostró por primera vez el efecto neurotóxico del glutamato y lo denominó excitotoxicidad.

Materiales

- Solución de Locke completa: 155 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 8.4 mM HEPES, 5.6 mM glucosa y 1 mM MgCl₂. La solución se prepara con H₂O bidestilada y se equilibra a pH 7.4.
- Solución de Locke sin Mg²⁺: 155 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 8.4 mM HEPES y 5.6 mM glucosa. La solución se prepara con H₂O bidestilada y se equilibra a pH 7.4.

- Solución de glutamato: el día del tratamiento se preparó una solución madre de 5 mM de glutamato en solución de Locke sin Mg^{2+} .

Las diferentes concentraciones de trabajo se obtuvieron a partir de diluciones de la solución madre 5 mM de glutamato.

Procedimiento

Se recogió por separado el medio condicionado de cada tipo de cultivo celular y se guardó a 37 °C. Las células se lavaron dos veces, primero con solución de Locke completa y luego con solución de Locke sin Mg^{2+} . Seguidamente se incubaron a TA durante 20 min en solución de Locke sin Mg^{2+} conteniendo la concentración de glutamato indicada en cada experimento. En paralelo se procesaron las células controles, que se incubaron en solución de Locke sin Mg^{2+} pero sin adición de glutamato. La exposición a glutamato se detuvo con dos lavados con solución de Locke completa. Seguidamente se devolvió a los cultivos su correspondiente medio condicionado y se incubaron nuevamente a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5 % y una humedad del 100% el tiempo indicado en cada situación experimental.

3.2.2- Tratamiento con LPS.

El LPS, componente de la pared de las bacterias Gram (-), es un agente ampliamente utilizado para inducir la activación glial *in vitro* (Nakamura y cols., 1999; Possel y cols., 2000). En ciertos grupos experimentales se utilizó el tratamiento con LPS de *Escherichia coli* para producir activación glial.

Materiales

- LPS (*E. coli* 026:B6): se reconstituye en PBS a una concentración de 1 mg/ml (conservar a -20°C).

Las diferentes concentraciones de trabajo se obtuvieron a partir de diluciones de la solución madre.

Procedimiento

En el caso de los cultivos neuronales y de los cultivos mixtos neurona-glía, se añadió 1 µg/ml de LPS directamente al medio de cultivo. A los cultivos mixtos de células gliales se les realizó un cambio de medio (véase materiales en el apartado 3.1)

previamente a la adición del LPS. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 100% el tiempo indicado en cada situación experimental.

3.2.3- Tratamiento de privación de potasio.

Cuando a las neuronas granulares de cerebelo cultivadas durante 6-8 días en un medio con 25 mM de KCl se les cambia el medio de cultivo a uno que contiene bajas concentraciones de potasio (5 mM KCl) y sin FBS, muchas de estas neuronas mueren por un mecanismo de apoptosis (D'Mello y cols., 1993; Schultz y cols., 1996; Armstrong y cols., 1997; Alavez y cols., 2003).

Materiales

- Medio 25 mM KCl: BME suplementado con 20 mM de KCl, 100 µg/ml de gentamicina y 2 mM de L-glutamina.
- Medio 5 mM KCl: BME suplementado con 100 µg/ml de gentamicina y 2 mM de L-glutamina.

Procedimiento

Se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron con solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1). Se procedió entonces a la privación de potasio añadiendo a las células medio con 5 mM de KCl. En paralelo se añadió un medio con 25 mM de KCl a las células controles. Los cultivos se incubaron de nuevo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 100%, el tiempo indicado en cada situación experimental.

3.2.4- Tratamiento con estaurosporina.

Está establecido que la estaurosporina a ciertas dosis puede provocar muerte por apoptosis. En ciertos grupos experimentales se utilizó el tratamiento con estaurosporina como control positivo de la activación de la caspasa-3.

Materiales

- Estaurosporina: se prepara una solución madre de 1 mM en tampón fosfato salino (PBS) (conservar a -20 °C).

La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/1000 de la solución madre en PBS.

Procedimiento

Los cultivos mixtos neurona-glía se trataron con 1 μ M de estaurosporina. Los cultivos se mantuvieron durante 3h en el incubador a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 100%.

3.3- Determinación de la viabilidad celular.

La cuantificación del número de neuronas vivas en los cultivos neuronales y en los cultivos mixtos neurona-glía se llevó a cabo mediante el uso del colorante fluorescente diacetato de fluoresceína (FDA) (Jones y Senft, 1985). Las células vivas poseen en su interior unas esterasas capaces de hidrolizar el FDA a fluoresceína, que excitada mediante una longitud de onda adecuada emite fluorescencia de un color verde brillante. Los cultivos fueron observados en un microscopio invertido de contraste de fases dotado de epifluorescencia usando los filtros apropiados. Las neuronas vivas, y por lo tanto FDA positivas, mostraron un color verde brillante en sus pequeños cuerpos celulares y neuritas (morfología claramente diferente a la de las células no neuronales).

Materiales

- FDA: se prepara una solución madre de 1.5 mg/ml de FDA en acetona (conservar a 4°C).

La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/100 de la solución madre de FDA en solución de Locke completa.

Procedimiento

Se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células con solución de Locke completa. Seguidamente se incubaron a TA durante 5 min en solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) conteniendo una concentración de 15 μ g/ml de FDA. Tras un par de lavados con solución de Locke completa, se examinaron las células al microscopio de fluorescencia. Se fotografiaron 2-4 campos representativos en cada pozo con un objetivo de 20 aumentos. En cada situación experimental se procesaron un par de pozos de al menos tres experimentos diferentes para cada tipo de

cultivo celular. Se procedió al recuento de las células vivas y los valores de viabilidad neuronal se expresaron como porcentaje respecto al control.

3.4- Evaluación de la activación glial.

Hay muchos estudios *in vitro* que demuestran que la activación glial está asociada con la producción de factores de crecimiento, citocinas, ROS y NO, entre otros. Además, se ha descrito que la glía reactiva también adquiere la capacidad de proliferar y fagocitar (véase el apartado 1.1.3 de la Introducción). En esta tesis se han determinado distintos parámetros para evaluar la activación glial en distintas situaciones experimentales, que se describen a continuación.

3.4.1- Producción de NO.

Una de las maneras de detectar la formación de NO es evaluando la acumulación de nitrito (NO_2^-) en el medio de cultivo. Se trata de un producto estable y no volátil resultado de la reacción del NO con el oxígeno molecular. Otra forma de estimar un incremento en la producción de NO es detectar la presencia de iNOS, enzima que prácticamente es indetectable en la glia quiescente (véase el apartado 1.1.3.2 de la Introducción).

3.4.1.1- Determinación de nitrito liberado al medio de cultivo.

El acúmulo de nitrito liberado al medio de cultivo se determinó por colorimetría mediante la reacción de Griess.

Materiales

- Placas NUNC de 96 pozos.
- Reactivo de Griess A: 1% sulfanilamida y 5% ácido fosfórico en H_2O milli-Q (se puede conservar a 4°C durante 1-2 meses).
- Reactivo de Griess B: 0.1% dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina en H_2O milli-Q (se puede conservar a 4°C durante 1-2 meses).
- Solución de NaNO_2 : se prepara una solución madre 100 μM en H_2O milli-Q (conservar a TA).

La curva de patrón se prepara a partir de esta solución madre.

Procedimiento

A las 24 h del tratamiento con glutamato o de la deprivación de K^+ , así como a las 24 y 48 h del tratamiento con LPS, se recogieron 300-500 μ l de medio de cultivo por pozo (se conservaron a $-20^{\circ}C$ hasta su procesamiento). Una vez descongeladas, las muestras se centrifugaron a 11000 rpm durante 5 min. Alícuotas de 100 μ l de cada muestra se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos. Paralelamente se preparó una curva de patrones con $NaNO_2$ (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50 μ M) y alícuotas de 100 μ l de cada muestra patrón se añadieron por duplicado a la placa. Se procedió a la preparación del reactivo de Griess, mezclando a partes iguales el reactivo A y el B, y se añadieron 100 μ l a todos los pozos (muestras y patrones). Se esperó un mínimo de 10 min y seguidamente se cuantificó la absorbancia de las muestras a 540 nm de longitud de onda con un lector de placas (iEMS Reader MF, Labsystems, Espoo, Finland).

3.4.1.2- Expresión de la iNOS.

La enzima iNOS es la responsable de la producción de NO en las células gliales activadas por diversos estímulos. En aquellos cultivos en los que los tratamientos habían inducido la producción de NO y para identificar las células en las que se había producido esta inducción, a las 48 h de los tratamientos se realizaron inmunocitoquímicas dobles incubando con anticuerpos que reconocen la iNOS (monoclonales o policlonales) conjuntamente con marcadores de células gliales, según el protocolo descrito en el apartado 3.6.1 y tabla 2.

3.4.2- Determinación de la activación de factores de transcripción: NF κ B y C/EBPs.

3.4.2.1- Translocación nuclear de NF κ B.

Como ya se ha comentado en la introducción (véase el apartado 1.1.3.3), las células gliales tienen niveles constitutivos bajos del factor de transcripción NF κ B en el citoplasma, mientras que determinados estímulos que producen activación glial dan lugar a su translocación al núcleo. En esta tesis se ha evaluado la activación de NF κ B a partir de la detección de la translocación nuclear de la subunidad p65 mediante técnicas inmunocitoquímicas (véase protocolo en el apartado 3.6.1 y las tablas 1 y 3). La

translocación nuclear de p65 se evaluó a 1, 4, 8, 10 y 12 h del tratamiento con LPS o glutamato o de la deprivación de K^+ .

3.4.2.2- Activación de C/EBPs.

Está descrito que las células gliales expresan diferentes C/EBPs *in vitro*, cuya expresión puede modificarse por diversos estímulos que inducen activación glial (véase el apartado 1.1.3.3 de la Introducción). La activación de dos miembros de la familia de los C/EBPs, C/EBP α y C/EBP β , se evaluó por técnicas inmunocitoquímicas a las 24 h del tratamiento con LPS, con glutamato, o de la deprivación de K^+ , según los procedimientos que se describen en el apartado 3.6.2 y la tabla 4.

3.4.3- Producción de TNF- α .

El TNF- α es el principal mediador de las respuestas inflamatorias y frente a bacterias gram-negativas en el organismo. Aunque los macrófagos activados son la mayor fuente de síntesis de TNF- α , se sabe que otros tipos celulares como los linfocitos T, la astrogliá y la microgliá son capaces de liberarlo cuando se activan (véase el apartado 1.1.3.1 de la Introducción). En esta tesis se estimó la producción de TNF- α a partir de la determinación de la liberación de esta citocina al medio de cultivo. Esta determinación se realizó mediante ELISA a las 6 h de efectuar los distintos tratamientos.

Materiales

- Placas NUNC de 96 pozos.
 - Kit de ELISA para determinar TNF- α de rata (Diacclone, Besançon, France):
 - Anticuerpo de captura: Anti-TNF- α policlonal de rata.
 - Anticuerpo de detección marcado: Anti-TNF- α policlonal de rata biotilado.
 - Estándar de TNF- α .
 - Estreptavidina-HRP.
 - TMB: sustrato de la peroxidasa unida a la estreptavidina.
- (Conservar a 4°C)
- Tampón de recubrimiento: PBS, pH 7.2-7.4.
 - Tampón de lavados: PBS-0.05% Tween 20 (PBSTw).
 - Tampón de saturación: PBS-5% BSA.

- Tampón de dilución del anticuerpo de detección: PBS-1% BSA.
- Tampón de dilución del estándar de TNF- α : PBS-1% BSA.
- Tampón de dilución de la estreptavidina-HRP: PBS-1% BSA-0.1% Tween 20.
- Ácido sulfúrico 1 M.

Procedimiento

A las 6 h del tratamiento con LPS, con glutamato o de la deprivación de K^+ se recogieron 300 μ l de medio de cultivo por pozo (conservado a $-80^{\circ}C$ hasta su procesamiento). Se siguieron las instrucciones proporcionadas en el Kit de ELISA. En primer lugar, se procedió al recubrimiento de los pozos de una placa de 96 pozos con 100 μ l del anticuerpo de captura (diluido 1/100 en PBS) durante 24 h a $4^{\circ}C$. Después de un par de lavados con PBSTw se realizó el bloqueo de los posibles lugares de unión inespecífica con 250 μ l de PBS-5% BSA a TA durante 2 h. Seguidamente, se vació la placa y se dejó secar sobre papel de filtro a TA durante 24 h. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se añadieron por duplicado 100 μ l de cada muestra a la placa. Paralelamente se preparó una curva patrón con el estándar de TNF- α en PBS-1% BSA (7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml) y se añadieron 100 μ l de cada patrón por duplicado a la placa. Como blanco se añadieron 100 μ l de PBS-1 % BSA a un par de pozos de la placa. Seguidamente se incubaron todos los pozos con 50 μ l del anticuerpo de detección (diluido 1/50 en PBS-1% BSA) durante 3 h a TA. Después de 3 lavados con PBSTw, los pozos se incubaron con estreptavidina-HRP (diluida 1/100 en su tampón de dilución) durante 20 min a TA. Tras otros 3 lavados con PBSTw, se añadieron 100 μ l de TMB a cada pozo y la placa se dejó a oscuras durante 15 min a TA para que tuviera lugar la reacción que da color, que se detuvo con H_2SO_4 1 M. Finalmente, se cuantificó la absorbancia de las muestras a 450 nm de longitud de onda con un lector de placas (iEMS Reader MF, Labsystems, Espoo, Finland).

3.4.4- Determinación del índice de proliferación de las células gliales.

En muchos de los estudios de proliferación celular se utiliza la incorporación de timidina radiactiva como evidencia de la replicación del DNA. Una técnica alternativa

no radiactiva es la utilización de la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina capaz de incorporarse al núcleo de las células que están en la fase S del ciclo celular y por tanto están proliferando. Una vez la BrdU se ha incorporado, puede detectarse por técnicas inmunocitoquímicas.

Materiales

- 5'-bromo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato: se prepara una solución madre 5 mM en PBS (conservada a -20°C).

La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/1000 de la solución madre en PBS.

- 2 M HCl.
- 15 mM Borato, pH 8.
- PBS-0.1% Tritón X-100 (PBST).
- Anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal anti-BrdU de Developmental Studies Hybridoma Bank-University of Iowa, IA, USA.
- Anticuerpo secundario: anticuerpo anti-ratón biotinilado obtenido en caballo de Vector Laboratories, Peterborough, UK.
- Complejo avidina-biotina (ABC) de Vector Laboratories, Peterborough, UK.
- Diaminobencidina (DAB) de Sigma: se preparó una solución madre de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS.

Procedimiento

A las 22 h del tratamiento con glutamato o de la deprivación de K^+ de los cultivos mixtos neurona-glia, se añadieron 5 μl de una solución 500 μM de BrdU a cada pozo con 500 μl de medio. Las células se incubaron con la BrdU durante 2 h, se lavaron con solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% durante 20 min. Seguidamente, se permeabilizaron las células con metanol frío durante 30 min y, transcurrido este tiempo, se incubaron con 2 M HCl durante 30 min. La acción del HCl se neutralizó mediante lavados con 15 mM de Borato durante 15 min. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con 0.6% de H_2O_2 en metanol durante 10 min a TA. El bloqueo de las uniones inespecíficas se llevó a cabo añadiendo PBST con 10% de suero de caballo durante 30 min a TA. Seguidamente, las células se incubaron durante 24 h a 4°C con el anticuerpo primario

(diluido 1/1000 en PBST). Después de lavar las células con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (diluido 1/200 en PBST) durante 1 h a TA. Tras lavar con PBS se añadió el reactivo ABC (1/100) en PBST durante 1h a TA. La reacción de color se obtuvo con DAB (diluida 1/100 en PBS) y se detuvo añadiendo PBS. Se fotografiaron 9 campos de microscopio representativos de cada pozo con un objetivo 10 X. En cada situación experimental se procesaron un par de pozos de al menos cinco experimentos diferentes. Se procedió al recuento del número de células proliferantes por campo de microscopio. También se contó el número total de células gliales por campo, que se determinó calculando la cantidad de astrogliá (GFAP positivas) y de microglía (células CD68 positivas) presentes en 5 campos microscópicos equivalentes. El índice de células proliferantes se expresó como porcentaje a partir del cociente entre las células BrdU positivas y el total de células gliales.

Para identificar las células BrdU positivas se realizaron inmunocitoquímicas dobles con anticuerpos anti-BrdU conjuntamente con anticuerpos específicos para neuronas (NeuN) o para células gliales (GFAP y CD68) siguiendo los protocolos indicados en el apartado 3.6.2.

3.4.5- Determinación de la actividad de fagocítica microglial.

Otro de los indicadores de la activación glial que hemos considerado en esta tesis es la actividad fagocítica. Esta actividad fue evaluada en nuestros cultivos a partir de la capacidad de incorporación, por parte de las células microgliales, de microesferas fluorescentes añadidas al medio de cultivo.

Materiales

- Microesferas fluorescentes: *FluoSpheres, carboxylate-modified microspheres*, de 2 μm de diámetro; Molecular Probes Europe BV, Breda, the Netherlands.

La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/300 de las microesferas en medio sin suero (véase en el apartado 3.2.2, medio 25 mM KCl).

- Anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal anti-CD68 de Serotec, Oxford, UK.
- Anticuerpo secundario: anticuerpo anti-ratón obtenido en cabra (ALEXA 488) de Molecular Probes Europe BV, Breda, the Netherlands.

Procedimiento

La actividad fagocítica de las células microgliales se determinó en los cultivos mixtos neurona-glía a las 4 y 8 h del tratamiento con glutamato o de la deprivación de K^+ . Las células fueron incubadas a $37^{\circ}C$ en presencia de las microesferas fluorescentes (previamente sonicadas unos 3 min) durante 1-2 h. Después de varios lavados con solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) las células se fijaron con metanol frío durante 8 min. Se hicieron lavados con PBS y se procedió a realizar una inmunocitoquímica (véase protocolo en el apartado 3.6.1) utilizando como anticuerpo primario el marcador específico de células microgliales CD68 (1/200) y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón obtenido en cabra (ALEXA 488, 1/1000). Se fotografiaron 9 campos de microscopio representativos de cada pozo con un objetivo 40 X. En cada situación experimental se procesaron un par de pozos de al menos cuatro experimentos diferentes. Se procedió al recuento de las microesferas fluorescentes presentes en cada célula microglial. Por una parte se determinó el porcentaje de células microgliales que habían incorporado microesferas en cada situación experimental. Por otra parte, en el caso de las células que habían incorporado microesferas, se calculó el promedio de microesferas incorporadas en cada situación experimental.

3.5- Evaluación del tipo de muerte celular.

El tipo de muerte neuronal presente en los cultivos mixtos neurona-glía se caracterizó durante las 24 h posteriores al tratamiento con glutamato o de la deprivación de K^+ . Además de la observación en contraste de fases con microscopía óptica, se caracterizaron cambios en la morfología nuclear y se determinó la presencia de enzimas apoptóticos.

3.5.1- Evaluación de la morfología nuclear: tinción de Hoechst.

El Hoechst o bisbenzimidida es un compuesto que se une a los ácidos nucleicos. Utilizando los filtros apropiados, el Hoechst se puede visualizar con luz ultravioleta emitiendo fluorescencia azul. Las células apoptóticas pueden distinguirse por la

característica condensación de la cromatina nuclear o por la presencia de fragmentación nuclear.

Materiales

- Solución de Hoechst 33258: se prepara una solución madre de 1 mg/ml en H₂O milli-Q (conservar a 4°C).

La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/800 de la solución madre en H₂O milli-Q.

Procedimiento

Las células se fijaron con PFA 4% a TA durante 20 min. Después de lavar con PBS, se permeabilizaron las células con metanol frío durante 8 min y se incubaron con 1.25 µg/ml de Hoechst. Después de unos 15 min las células se lavaron con PBS y se examinaron al microscopio con luz ultravioleta.

3.5.2- Determinación de la caspasa-3 activada.

La enzima caspasa-3 es uno de los ejecutores claves de la maquinaria apoptótica. La activación de la caspasa-3 requiere el procesamiento proteolítico de su zimógeno o forma inactiva en las subunidades p17 y p12 activadas. En esta tesis la activación de la caspasa-3 se determinó por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo que reconoce la subunidad p17, siguiendo el protocolo del fabricante.

Materiales

- Tampón Tris salino (TBS): 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl.
- TBS-0.1 % Tritón X-100 (TBST).
- Anticuerpo primario: anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 (subunidad p17), Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA.
- Anticuerpo secundario: anticuerpo biotinilado anti-conejo obtenido en cabra, Vector Laboratories, Peterborough, UK.
- ABC de Vector Laboratories, Peterborough, UK.
- DAB de Sigma: se preparó una solución madre de 25 µg/ml en PBS.

Procedimiento

La activación de la caspasa-3 se analizó a las 4 y 8 h del tratamiento con glutamato o de la deprivación de K^+ . Las células se lavaron en solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) y se fijaron con PFA 3% durante 20 min a 4°C. Se lavaron las células con TBST y se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con TBST conteniendo un 5% de suero durante 1 h a TA. Seguidamente las células se incubaron durante 24 h a 4°C con el anticuerpo primario (1/100 en TBST conteniendo un 5% de suero). Tras lavar con TBST, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (1/500 en TBST conteniendo un 5% de suero) durante 1 h a TA. Después de lavar las células primero con TBST y luego con TBS, se llevó a cabo el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con 0.6% de H_2O_2 en TBS durante 30 min a TA. Tras lavar con TBST las células se incubaron con el reactivo ABC (1/100 en TBST) 1 h a TA. Finalmente, se reveló la reacción con DAB (1/100) y se detuvo añadiendo PBS.

Para identificar las células caspasa-3 positivas se realizó una inmunocitoquímica doble secuencial. Una vez finalizada la inmunocitoquímica para el anticuerpo caspasa-3 se incubaron las células con un marcador neuronal (NeuN) o con marcadores de células gliales (GFAP y CD68), cuya inmunoreactividad se visualizó por fluorescencia (véase protocolo en el apartado 3.6.1 y tabla 3).

3.6- Inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica es la técnica que permite la localización de antígenos en células mediante el empleo de anticuerpos para la posterior observación al microscopio. En esta tesis se han utilizado las modalidades que se detallan a continuación.

3.6.1- Inmunofluorescencia.

Materiales

- Metanol frío (a $-20^{\circ}C$).
- PFA 4%.
- PBS-1% BSA.
- PBS-Timerosal (agente bactericida y antifúngica) 0.4 mg/ml (conservar a $4^{\circ}C$).

- Anticuerpos primarios:
 - Anti-CD11b monoclonal: Serotec, Oxford, UK.
 - Anti-CD68 monoclonal: Serotec, Oxford, UK.
 - Anti-GFAP policlonal de conejo: Dako, Glostrup, Denmark.
 - Anti-iNOS monoclonal: Transduction Laboratories, Lexington, KY.
 - Anti-iNOS policlonal de conejo: Chemicon International, Temecula, CA, USA.
 - Anti-NeuN monoclonal: Chemicon International, Temecula, CA, USA.
 - Anti-p65 monoclonal: Santa Cruz, Heidelberg, Germany.
- Anticuerpos secundarios:
 - Anti-ratón obtenido en cabra marcado con ALEXA 488 o ALEXA 546: Molecular Probes Europe BV, Breda, the Netherlands.
 - Anti-conejo obtenido en cabra marcado con ALEXA 488 o ALEXA 546: Molecular Probes Europe BV, Breda, the Netherlands.
 - Anti-conejo obtenido en cabra marcado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC): Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA.
 - Anti-ratón obtenido en oveja marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC): Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA.

Procedimiento

Las células se lavaron con solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) para eliminar restos de medio de cultivo. Se procedió a fijar y permeabilizar las células con metanol frío durante 8 min. Después de 3 lavados con PBS de 5 min se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con PBS-1% BSA conteniendo un 5% de suero (de la especie donde se obtiene el anticuerpo secundario) durante 20 min. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS-1% BSA conteniendo un 1% de suero, a 4°C durante 24 h en agitación. Después de 3 lavados con PBS de 5 min se añadió el anticuerpo secundario, también diluido en PBS-1% BSA conteniendo un 1% de suero, durante 1 h a TA en agitación. Transcurrido este tiempo se realizaron otros 3 lavados con PBS. A las placas se les añadió PBS-Timerosal y se guardaron a 4°C hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia.

A continuación se exponen todos los tipos de inmunocitoquímicas que se hicieron:

Tabla 1. Inmunocitoquímica sencilla

Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)
NeuN (1/150)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)
GFAP (1/2000)	anti-conejo de cabra ALEXA 488 (1/1000)
CD68 (1/500)	anti-ratón de cabra ALEXA 546 (1/1000)
OX-42 (1/50)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)
p65 (1/50)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)

Tabla 2. Inmunocitoquímica doble

Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)
NeuN (1/150) + GFAP (1/2000)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1500) + anti-conejo de cabra ALEXA 546 (1/1500)
GFAP (1/2000) + CD68 (1/500)	anti-conejo de cabra ALEXA 488 (1/1500) + anti-ratón de cabra ALEXA 546 (1/1500)
GFAP (1/500) + iNOS monoclonal (1/200)	anti-conejo de cabra TRITC (1/400) + anti-ratón de oveja FITC (1/50)
OX42 (1/50) + iNOS policlonal (1/200)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1500) + anti-conejo de cabra ALEXA 546 (1/1500)

En determinados experimentos fue necesario realizar la inmunocitoquímica doble de manera secuencial. En estos casos, se hizo una inmunocitoquímica con un primer anticuerpo primario, se visualizó la inmunoreactividad y se fotografiaron distintos campos tomando coordenadas. A continuación se realizó la inmunocitoquímica con el otro anticuerpo primario, se visualizó la inmunoreactividad y se fotografiaron los mismos campos que en el caso anterior.

Tabla 3. Inmunocitoquímica doble secuencial

Inmunocitoquímica # 1		Inmunocitoquímica # 2	
Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
p65 (1/50)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)	GFAP (1/2000)	anti-conejo de cabra ALEXA 546 (1/1500)
p65 (1/50)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)	CD68 (1/500)	anti-ratón de cabra ALEXA 546 (1/1500)
NeuN (1/150)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)	BrdU (1/200) (**)	anti-ratón de cabra ALEXA 546 (1/1000)
Caspasa-3 (1/100) (*) (ver apartado 3.5.2)	anti-conejo de cabra ALEXA 546 (1/1000)	NeuN (1/150)	anti-ratón de cabra ALEXA 488 (1/1000)
		GFAP (1/2000)	anti-conejo de cabra ALEXA 488 (1/1500)
		CD68 (1/500)	anti-ratón de cabra ALEXA 546 (1/1500)

(*) Como las placas estaban fijadas con PFA 3% se hizo una permeabilización con metanol durante 8 min y después se llevó a cabo un procedimiento similar al expuesto en el apartado 3.5.2, hasta el paso de la incubación con el anticuerpo secundario.

(**) Se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito en el apartado 3.4.4, hasta el paso de la incubación con el anticuerpo secundario.

3.6.2- Inmunoperoxidasa y tinción con lectina.

Materiales

- PFA 4%.
- H₂O₂.
- Metanol.
- PBS-1% BSA.
- PBS-Timerosal 0.4 mg/ml (conservar a 4°C).
- Extravidina: Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA.

- ABC: ABC kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK.
- DAB: Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA.
- Anticuerpos primarios:
 - Anti-Caspasa-3 activada policlonal de conejo: Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA.
 - Anti-GFAP policlonal de conejo: Dako, Glostrup, Denmark.
 - Anti-CD68 monoclonal: Serotec, Oxford, UK.
 - C/EBP α policlonal de conejo: Santa Cruz, Heidelberg, Germany.
 - C/EBP β policlonal de conejo: Santa Cruz, Heidelberg, Germany.
- Otro marcador:
 - Lectina de tomate biotilada: Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA.
- Anticuerpos secundarios:
 - anticuerpo biotilado anti-conejo obtenido en cabra: Vector Laboratories, Peterborough, UK.
 - anticuerpo biotilado anti-ratón obtenido en caballo: Vector Laboratories, Peterborough, UK.

Procedimiento

Las células se lavaron en solución de Locke completa (véase materiales en el apartado 3.2.1) y se fijaron con PFA 4% durante 20 min a TA. Después de lavar con PBS, se llevó a cabo el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con 0.6% de H₂O₂ en metanol durante 10 min a TA. Tras lavar nuevamente con PBS, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con PBS-1% BSA conteniendo un 5% de suero durante 20 min a TA. Seguidamente se incubaron las células con el anticuerpo primario en PBS-1% BSA conteniendo un 1% de suero durante 24 h a 4°C. Después de 3 lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario en PBS-1% BSA con un 1% de suero durante 1 h a TA. Tras lavar con PBS se incubó con ABC (1/100) o extravidina (1/500) en PBS-1% BSA con un 1% de suero, 1 h a TA. La reacción de color se obtuvo con DAB y se detuvo añadiendo PBS. Las placas se guardaron a 4°C en PBS-Timerosal (véase materiales en el apartado 3.6.1) hasta su visualización al microscopio.

Tabla 4. Inmunocitoquímica sencilla

Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)	ABC o Extravidina
GFAP (1/500)	anti-conejo de cabra biotinilado (1/200)	ABC
CD68 (1/200)	anti-ratón de caballo biotinilado (1/200)	ABC
Lectina biotinilada	—	Extravidina
C/EBP α (1/1000)	anti-conejo de cabra biotinilado (1/200)	Extravidina
C/EBP β (1/1000)	anti-conejo de cabra biotinilado (1/200)	Extravidina

3.6.3- Contratación con hematoxilina.

La hematoxilina se une a los ácidos nucleicos y tiñe de color azul los núcleos de las células. En algunos experimentos en que se habían realizado inmunoperoxidasas utilizando un marcador para una determinada población celular, los núcleos fueron teñidos con hematoxilina para visualizar todas las células presentes en el cultivo.

Materiales

- Hematoxilina QS (fórmula de Mayer modificada, H-3404): Vector Laboratories, Peterborough, UK.

Procedimiento

Después de lavar las células con H₂O destilada, se procedió a la tinción de los núcleos con hematoxilina durante unos 20 s. Seguidamente se hicieron varios lavados con H₂O destilada. Las placas se guardaron a 4°C en PBS-Timerosal (véase materiales en el apartado 3.6.1) hasta la posterior visualización de la inmunoreactividad al microscopio.

3.7- Captura y análisis de imágenes.

Las imágenes de microscopía se obtuvieron con un microscopio invertido Olympus IX70 (Okoya, Japan) o con un microscopio Nikon Eclipse E1000 (Tokyo, Japan) y una cámara digital ColorView-12 (Soft Imaging System GmbH, Munich, Germany). El recuento de las células en los ensayos de viabilidad, proliferación y fagocitosis, así como el de microesferas fluorescentes en el ensayo de fagocitosis, se efectuó mediante el programa de análisis de imagen *analySIS* (Soft Imaging System GmbH, Munich, Germany).

3.8- Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados han sido expresados como la media \pm SEM. Para analizar posibles diferencias entre los efectos de los diferentes tratamientos sobre una determinada variable se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para uno o dos factores. Para comparar los valores obtenidos para una variable en un determinado grupo experimental respecto a su control, se utilizó el test de la *t* de Student (para datos apareados o no apareados). Cuando se compararon dos o más grupos experimentales respecto a un único grupo control, se utilizó el test de Dunnett. Se consideraron como significativos los valores de $p \leq 0.05$.