



Evaluación y desarrollo de modelos *in vitro* para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación proteómica a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio.

Tesis Doctoral presentada por

**Iolanda Vendrell Monell**

Barcelona, 2006

---

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- Elaboración de la base de datos de métodos no-animales en el campo de la neurotoxicología

El Centro Europeo para la Validación de Métodos alternativos (ECVAM, UE) propuso la elaboración de una base de datos de métodos alternativos al uso de animales de experimentación en el campo de la neurotoxicología con el objetivo de proponer métodos *in vitro* útiles para evaluar el daño neurotóxico de compuestos químicos y formulaciones sobre distintos sistemas. Esta base de datos se basó en la revisión bibliográfica de más de 20 años de literatura científica (1980 - 2002) tomando en consideración más de 60 revistas del área de neurociencias y toxicología, boletines de sociedades científicas, congresos, informes y bases de datos. La elaboración de la base de datos “métodos alternativos al uso de animales de experimentación en el campo de la neurotoxicología para evaluar el daño neurotóxico de compuestos químicos y formulaciones en métodos no animales” siguió el siguiente esquema: (1) revisión bibliográfica y selección de los resúmenes relevantes; (2) clasificación de los resúmenes en función de los marcadores neuronales y (3) descripción de los métodos.

##### 3.1.1.- Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de más de 60 revistas científicas del área de neurociencia y de toxicología (tabla 3.1) y también de boletines de sociedades científicas, congresos, informes y bases de datos conocidos como “grey literature” de (tabla 3.2), entre los años 1980 – 2002. El objetivo de esta revisión fue escoger resúmenes y toda la información presente en la “grey literature” sobre compuestos químicos de todo tipo (plaguicidas, insecticidas, fármacos, agentes ocupacionales entre otros) y sobre sus efectos en sistemas neurales *in vitro*. En la tabla 3.1 se muestran las revistas científicas revisadas indicando el periodo de tiempo y volúmenes revisados así como el número de resúmenes preseleccionados en una primera etapa. En azul se marcan aquellas revistas que fueron más relevantes por la aportación de artículos para la elaboración de los métodos y que se proponen para ser revisadas en futuras actualizaciones de la base de datos.

**Tabla 3.1.-** Revistas científicas revisadas entre 1980 y 2002. En azul se indican las revistas más relevantes para la posterior actualización de la base de datos.<sup>1</sup>

Revistas científicas	Años revisados	Volúmenes revisados	Nº de resúmenes preseleccionados
Alternative Methods in Toxicology =Alternative Methods in Toxicology and Life Sciences (since 1995)	1994-1985	3 to 10	8
Alternative Methods in Toxicology and Life Sciences (=continuation of Alt. Meth. Toxicol.)	1995	11	3
<b>Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)</b>	<b>2002-1983</b>	<b>11 to 30</b>	<b>207</b>
ALTEX - Alternativen Zu Tierexperimenten	2002-1984	1 to 19	28
<b>Archives of Environmental Contamination and Toxicology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>9 to 43</b>	<b>9</b>
<b>Archives of Toxicology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>43 to 76</b>	<b>79</b>
<b>Biochemical Pharmacology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>29 to 64</b>	<b>158</b>
<b>Brain Research</b>	<b>2002-1980</b>	<b>181 to 958</b>	<b>424</b>
<b>Brain Research Protocols</b>	<b>2002-1997</b>	<b>1 to 10</b>	<b>38</b>
Brain research. Brain research reviews	2002-1986	11 to 40	15
Brain research. Developmental brain research	2002-1988	44 to 139	35
Cell and Tissue Research	2002-1980	205 to 310	22
<b>Cell Biology and Toxicology</b>	<b>2002-1984</b>	<b>1 to 18</b>	<b>37</b>
<b>Chemical Research in Toxicology</b>	<b>2002-1988</b>	<b>1 to 15</b>	<b>70</b>
<b>Chemico-Biological Interactions</b>	<b>2002-1980</b>	<b>29 to 142</b>	<b>74</b>
<b>Critical Reviews in Toxicology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>7 to 32</b>	<b>31</b>
Current advances in Pharmacology and Toxicology (1984-1991) = Currents Advances in Toxicology(since 1992)	See Page 10		
Developmental Neuroscience	2002-1980	3 to 24	30
<b>Drug and Chemical Toxicology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>3 to 25</b>	<b>31</b>
<b>Environmental Health Perspectives</b>	<b>2002-1980</b>	<b>34 to 110</b>	<b>76</b>
<b>Environmental Toxicology and Chemistry</b>	<b>2002-1986</b>	<b>5 to 21</b>	<b>46</b>
<b>Environmental Toxicology and Pharmacology</b>	<b>2002-1996</b>	<b>1 to 12</b>	<b>20</b>
Epilepsia	2002-1980	21 to 43	14
<b>European Journal of Neuroscience</b>	<b>2002-1993</b>	<b>5 to 16</b>	<b>20</b>
<b>European Journal of Pharmacology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>61 to 457</b>	<b>111</b>
Experimental Cell Research	2002-1980	125 to 281	8
Experimental Neurology	2002-1980	67 to 178	46
<b>Fundamental and Applied Toxicology =Toxicol. Sci. (since 1998)</b>	<b>1997-1981</b>	<b>1 to 40</b>	<b>73</b>
<b>Human &amp; Experimental Toxicology</b>	<b>2002-1990</b>	<b>9 to 21</b>	<b>55</b>
ILAR journal	2002-1980	23 to 43	10
International Journal of Toxicology (=continuation of J. Am. Coll. Toxicol.)	2002-1997	16 to 21	6
<b>In vitro Toxicology = In vitro and Molecular Toxicology (1998 - 2001)</b>	<b>1997-1987</b>	<b>1 to 10</b>	<b>18</b>
<b>In vitro and Molecular Toxicology (= continuation of In vitro Toxicol.)</b>	<b>2001-1998</b>	<b>11 to 14</b>	<b>11</b>
<b>In vitro Cellular and Developmental Biology</b>	<b>2002-1985</b>	<b>21 to 38</b>	<b>25</b>
<b>Journal of the American College of Toxicology = International Journal of Toxicology (since 1997)</b>	<b>1996-1986</b>	<b>5 to 15</b>	<b>20</b>
Journal of Applied Animal Welfare Sciences (JAAWS)	2002-1998	1 to 5	3
<b>Journal of Applied Toxicology</b>	<b>2002-1981</b>	<b>1 to 22</b>	<b>66</b>
<b>Journal of Biological Chemistry</b>	<b>2002-1999</b>	<b>273 to 277</b>	
Journal of Neurobiology	2002-1980	11 to 53	21
<b>Journal of Neurochemistry</b>	<b>2002-1980</b>	<b>34 to 83</b>	<b>296</b>
<b>Journal of Neuroimmunology</b>	<b>2002-1981</b>	<b>1 to 113</b>	<b>21</b>
Journal of Neurophysiology	2002-1980	43 to 88	35
<b>Journal of Neuroscience</b>	<b>2002-1981</b>	<b>1 to 22</b>	<b>95</b>

Continuación de la tabla 3.1

Revistas científicas	Años revisados	Volúmenes revisados	Nº de resúmenes preseleccionados
<b>Journal of Neuroscience Research</b>	<b>2002-1980</b>	<b>5 to 15</b>	<b>58</b>
<b>Journal of Pharmacological and Toxicological Methods</b>	<b>2002-1992</b>	<b>27 to 48</b>	<b>49</b>
<b>Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics</b>	<b>2002-1980</b>	<b>212 to 303</b>	<b>154</b>
Journal of the Neurological Sciences	2002-1980	44 to 205	11
<b>Journal of Toxicology and Environmental Health</b>	<b>2002-1980</b>	<b>6 to 65</b>	<b>62</b>
Journal of Tissue Culture Methods =Methods in Cell Sciences (since 1995)	1988-1986	10 to 11	0
Laboratory Animal Science	1999-1980	30 to 49	11
Methods in Cell Science (= continuation of J.Tissue Cult. Meth.)	2000-1995	17 to 24	2
Molecular and Cellular Biochemistry	2002-1980	29 to 241	11
Molecular and Cellular Neuroscience	2002-90	1 to 21	8
<b>Neurochemical Research</b>	<b>2002-1980</b>	<b>5 to 27</b>	<b>110</b>
<b>Neurochemistry international</b>	<b>2002-1987</b>	<b>10 to 41</b>	<b>68</b>
Neurology	2002-1980	30 to 59	42
<b>Neuropharmacology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>19 to 43</b>	<b>75</b>
Neuroreport	2002-1990	1 to 13	51
Neuroscience	2002-1980	5 to 115	62
Neuroscience Letters	2002-1980	16 to 334	117
<b>Neurotoxicology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>1 to 23</b>	<b>526</b>
<b>Neurotoxicology and Teratology</b>	<b>2002-1987</b>	<b>9 to 24</b>	<b>133</b>
<b>Pharmacology &amp; Toxicology</b>	<b>2002-1987</b>	<b>60 to 91</b>	<b>68</b>
Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.	2002-1999	96 to 99	9
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,	2001-1986	10 to 25	16
<b>Regulatory Toxicology and Pharmacology</b>	<b>2002-1981</b>	<b>1 to 36</b>	<b>77</b>
Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science	2002-2000	27 to 29	1
<b>The Journal of Toxicological Sciences</b>	<b>2002-1980</b>	<b>5 to 27</b>	<b>25</b>
<b>Toxicological Sciences (=continuation of Fund. Appl. Toxicol.)</b>	<b>2002-1998</b>	<b>41 to 70</b>	<b>39</b>
Toxicology	2002-1980	15 to 180	133
<b>Toxicology and Applied Pharmacology</b>	<b>2002-1980</b>	<b>52 to 185</b>	<b>211</b>
Toxicology and Ecotoxicology News/ reviews	1997-1994	1 to 4	6
<b>Toxicology In vitro</b>	<b>2002-1987</b>	<b>1 to 16</b>	<b>179</b>
<b>Toxicology Letters</b>	<b>2002-1980</b>	<b>5 to 36</b>	<b>178</b>
<b>Toxicology Methods =Toxicology Mechanisms and Methods (since 2002)</b>	<b>2001-1991</b>	<b>1 to 11</b>	<b>16</b>
<b>Toxicology Mechanisms and Methods (=continuation of Toxicol. Meth.)</b>	<b>2002-</b>	<b>12</b>	<b>0</b>
<b>Xenobiotica</b>	<b>2002-1980</b>	<b>10 to 32</b>	<b>16</b>

1) Extraído del informe final del proyecto 17132-2000-11 F1SC ISP ES

**Tabla 3.2.-** Boletines de sociedades científicas, de congresos, de informes y de bases de datos revisados.<sup>1</sup>

Grey Literature	Fuente	Años disponibles On line	Años revisados
Altweb	<a href="http://altweb.jhsph.edu/">http://altweb.jhsph.edu/</a>	2003-1997	2003-1997
ANZCCART	<a href="http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/index.html">http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/index.html</a>	2003-1999	2003-1997
Bibra bulletin	<a href="http://www.bibra.co.uk/">http://www.bibra.co.uk/</a>	2003-2000	2003-2000
CAATT- Newsletter	<a href="http://caat.jhsph.edu/">http://caat.jhsph.edu/</a>	1998 to 1987. Newsletter follow at ALTWEB	1997-1990
CAATT- Research Grants:	<a href="http://caat.jhsph.edu/">http://caat.jhsph.edu/</a>	1982-2002	2002-1982
FRAME	<a href="http://www.frame.org.uk/">http://www.frame.org.uk/</a>	2001-2002	2002-1996
Mutation Research forum			
NCA Newsletters: Latest news	<a href="http://prex.las.vet.uu.nl/nca">http://prex.las.vet.uu.nl/nca</a> or <a href="http://www.nca-nl.org">www.nca-nl.org</a>	2002-2001	2002-2001
NCA Newsletters: News letters	<a href="http://prex.las.vet.uu.nl/nca/English/Newsletters/newsletters.html">http://prex.las.vet.uu.nl/nca/English/Newsletters/newsletters.html</a>	2003-1998	2003-1998
SIGLE			
American College of Toxicology	<a href="http://www.actox.org/newsltr.htm">http://www.actox.org/newsltr.htm</a>	2003-1996	2003-1996
European Society of Toxicology <i>in vitro</i>	<a href="http://www.xs4all.nl/~shorbach/es tiv/">http://www.xs4all.nl/~shorbach/es tiv/</a>	2002	2002
EUROTOX	<a href="http://www.eurotox.com/">http://www.eurotox.com/</a>	2002-2000	2002-2000
AltNews	<a href="http://altweb.jhsph.edu/news/news.s.htm">http://altweb.jhsph.edu/news/news.s.htm</a>	2003-1997	2003-1997
ECVAM-SIS Newsletters	<a href="http://ecvam.jrc.it">http://ecvam.jrc.it</a>	2003-2002	2003-2002

1) Extraído del informe final del proyecto 17132-2000-11 F1SC ISP ES

### 3.1.2.- Clasificación de los resúmenes en función de los marcadores neurales

Los resúmenes preseleccionados se clasificaron en función de las dianas y efectos neurotóxicos producidos.

La tabla 3.3 muestra los marcadores estructurales y funcionales que permiten distinguir entre neuronopatía, mielinopatía, axonopatía o alteración en la transmisión nerviosa (Klaassen 2001) y contribuyen en la valoración del potencial neurotóxico de los agentes químicos. Los marcadores considerados son algunas de las dianas afectadas cuando se producen alteraciones en la morfología, estructura y/o función debidas a la neurotoxicidad.

**Tabla 3.3** Marcadores biológicos para la detección de neuropatías, axonopatías, mielinopatías y alteración en la transmisión nerviosa.

<b>Para detectar neurotoxicidad general</b>	
<b>Marcador</b>	<b>Ensayo</b>
Daño en la membrana	Liberación de la enzima lactato dehidrogenasa (LDH)
Viabilidad celular	Pérdida de la enolasa específica de neurona (NSE)
Excitotoxicidad	Incorporación de colorantes vitales Reducción de la viabilidad mitocondrial
Morfología celular	Longitud y número de neuritas (microscopía óptica) Formación de vacuolas en el citoplasma
Identificación celular	Enzimas específicos de neurona y glía; proteínas de citoesqueleto y de sinapsis; niveles de neurotransmisores
Diferenciación celular	Longitud y número de neuritas por microscopía óptica
Homeostasis celular	Inducción de la expresión de genes tempranos (p.ej. c-fos) Colorantes fluorescentes selectivos de voltaje e iones Contractibilidad de la membrana utilizando miotúbulos
<b>Para detectar axonopatía</b>	
<b>Marcador</b>	<b>Ensayo</b>
Transporte axonal	Fosforilación del neurofilamento del citoesqueleto NF-H por ELISA Observación del movimiento de las organelas por video-“enhanced” microscopía de contraste
Crecimiento de las neuritas	Longitud y número de neuritas por microscopía óptica
Neuropatía retardada inducida por compuestos organofosforados (OPIDN)	Determinación por ensayo colorimétrico de la actividad de la esterasa diana de neuropatía (NTE)  Longitud y número de neuritas por microscopía óptica  Fosforilación del neurofilamento del citoesqueleto NF-H por ELISA
<b>Para detectar mielinopatías</b>	
<b>Marcador</b>	<b>Ensayo</b>
Formación y /o degradación de la mielina	Expresión de la proteína básica de la mielina
<b>Para detectar toxicidad en la neurotransmisión</b>	
<b>Marcador</b>	<b>Ensayo</b>
Enzimas implicados en la síntesis y degradación de neurotransmisores (NT)	Actividad enzimática y expresión (AChE, ChAT, GAD, GS, tirosina hidroxilasa, monoamino oxidasa)
Receptores	Ensayos de unión a receptor por radioligando  Ensayos funcionales de receptor determinando las corrientes y flujos de iones (para receptores ionotrópicos)
Canales iónicos	Corrientes iónicas por electrofisiología  Flujos de iones (sondas fluorescentes; captación de iones marcados radioactivamente)



### **3.1.3.- Desarrollo de los métodos alternativos**

A partir de toda la información clasificada por temas, se procedió a la redacción de los métodos propuestos para ser incluidos en la base de datos de métodos alternativos no animales para la evaluación del potencial neurotóxico de compuestos y formulaciones químicas. Cada método propuesto fue elaborado a partir de la información extraída de los artículos, previamente seleccionados, referentes a los temas de clasificación. Cada método va acompañado de sus respectivas hojas de resultados. En ellas se recoge la información referente a un determinado compuesto químico junto con el laboratorio que realizó el estudio, información general del compuesto, marcadores ensayados, modelos *in vitro* empleados, condiciones del ensayo, resultados y conclusiones.

La base de datos contiene 7 métodos alternativos cada uno con sus respectivas hojas de resultados, un estudio de evaluación y un protocolo estándar de trabajo (SOP). Además se incluyen más de 400 referencias bibliográficas.

## **3.2.- Cultivo primario de células granulares del cerebelo de ratón**

### **3.2.1- Material**

Los ratones NMRI de 7 días post-natales fueron servidos por Iffa Credo (St. Germain-sur-Arbreste, Francia). Las placas de cultivos estériles de 24 / 96 pozos y las de 6 pozos fueron suministradas por Costar (Corning Science Products, Acton, MA, Estados Unidos) y Nunc Nunclon (Roskilde, Dinamarca), respectivamente. El suero fetal bovino fue proporcionado por Gibco (Invitrogen, Barcelona, España) y el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) por Biochrom KG (Berlín, Alemania). La poli-lisina (L o D), la uridina, la 5-fluoro-2'-deoxiuridina, la penicilina G, la insulina, el ácido p-amino benzoico, la tripsina, el inhibidor de la tripsina y la DNAasa se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### **3.2.2.- Cultivo primario de células granulares de cerebelo**

La manipulación de los animales tuvo lugar siguiendo el protocolo DMA 1852 aprobado por la Generalitat de Catalunya según las directrices establecidas por la Unión Europea. El cultivo primario de células granulares de cerebelo se obtiene a partir de una camada natural de ratones NMRI de 7 días post-natales según el protocolo descrito por

Schousboe et al. 1989. Los cerebelos, extraídos de ratones sacrificados por decapitación, se sometieron a un proceso de tripsinización durante 15 minutos en agitación a 37°C seguido de una trituración con una solución de DNAasa (0.004%) que contiene un inhibidor de la tripsina (0.05%). A continuación, las células se resuspendieron con el medio DMEM (medio Dulbecco modificado, 25 mM KCl, 31 mM glucosa y 0.2 mM glutamina) complementado con 7.3  $\mu$ M p-amino benzoato, 0.175  $\mu$ M insulina, 66  $\mu$ M penicilina y un 10% de suero fetal bovino. Las células se sembraron a una densidad de  $1.5 - 1.6 \times 10^6$  células / ml en placas de 6, 24, 96 pozos, previamente recubiertas con poli-L- o poli-D-lisina para mejorar la adhesión de las células a las placas de cultivo (ver 3.2.2.1). Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>/95% de aire a 37 °C. Entre las 36 y 48 horas de cultivo se añadió una mezcla de 5  $\mu$ M de 5-fluoro-2'-deoxiuridina y 20  $\mu$ M uridina para evitar la proliferación glial. Las células se mantuvieron en cultivo durante varios días (6 – 20 días) según la finalidad del cultivo.

#### 3.2.2.1.- Pretratamiento de las placas con poli-lisina

Para facilitar la adhesión de las neuronas a las placas de cultivo, éstas fueron pretratadas con una solución de poli-L-lisina (10mg/ml) o poli-D-lisina (50mg/ml) a 37 °C durante un período de 16 – 18 horas. A continuación, las placas se lavaron con una solución salina estéril (135 mM NaCl, 7.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7.4 ). La poli-L-lisina fue usada en los primeros estudios de toxicidad del MeHg realizados mediante las técnicas de proteómica. Ya que la poli-L-lisina producía señales inespecíficas en las zonas de alto peso molecular de geles de 2DE que la poli-D-lisina, se decidió usar la poli-D-lisina en todos los futuros experimentos independientemente de la técnica utilizada. La principal diferencia entre la poli-L y la poli-D lisina se halla en la resistencia de la poli-D-lisina a la acción de las proteasas liberadas en el medio de cultivo (Higgins y Banker 1998).

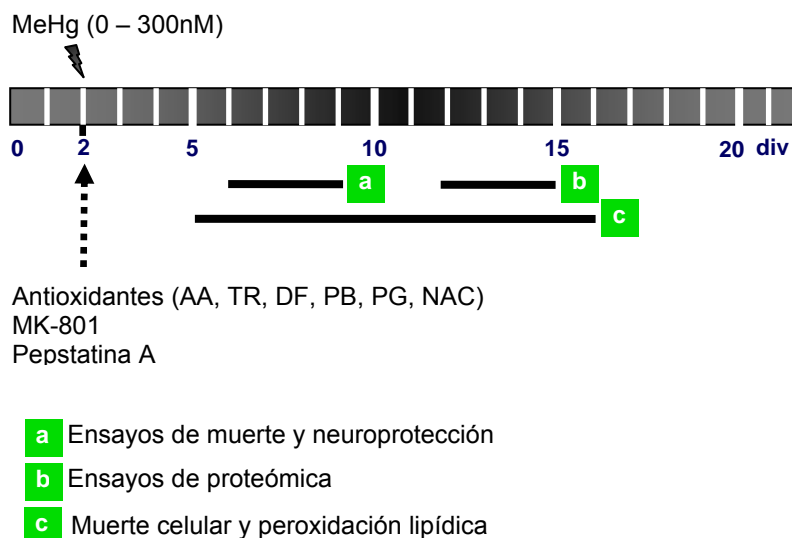
### 3.3.- Tratamiento de los cultivos neuronales

#### 3.3.1.-Material

El cloruro de metilmercurio (MeHg) se obtuvo de ICN (Cleveland, Ohio, USA). Los compuestos usados en los ensayos de protección de muerte neuronal como el probucol, el propil gallato, el trolox, la N-acetil-cisteína, la deferoxamina y el MK-801 fueron

obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); el ácido ascórbico y la pepstatina A de Merck (Darmstadt, Alemania).

### 3.3.2.- Diseño experimental



### 3.3.3.- Exposición continua a MeHg

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo fueron expuestos de forma continua a concentraciones submicromolares de MeHg (0 – 300 nM), añadidas al cultivo a los 2 días *in vitro* (div). El MeHg se añadió, una sola vez, directamente al medio de cultivo, en forma de una solución acuosa concentrada del agente tóxico, permaneciendo en el medio hasta el momento de recogida y análisis de las células. Las células controles fueron expuestas a la misma cantidad de agua (0.5%).

### 3.3.4.- Exposición continua a antioxidantes

El término antioxidante define a cualquier sustancia que, usada a concentraciones bajas, es capaz de retardar o prevenir el daño oxidante. Para los estudios de prevención de muerte neuronal inducida por MeHg, los cultivos fueron expuestos a soluciones concentradas de antioxidantes desde los 2 div hasta los 7 – 9 div. Los compuestos ensayados fueron el ácido ascórbico (AA), la deferoxamina (DF), la N-acetil-cisteína (NAC), el propil gallato (PG), el trólox (análogo de la vitamina E; TR) y el probucol (PB).

Mientras que los compuestos solubles en agua (AA, DF, NAC, PG) fueron añadidos directamente al medio de cultivo en forma de soluciones acuosas concentradas (0.5% concentración final de agua), los compuestos insolubles en agua (TR y PB) fueron disueltos en DMSO. Las soluciones concentradas de los compuestos disueltos con DMSO fueron solubilizadas con 250  $\mu$ l del medio condicionado, previamente extraído del pozo, y devuelto al mismo en condiciones de esterilidad. Las concentraciones finales de los antioxidantes utilizados fueron: 10  $\mu$ M trolox y propil gallato; 3  $\mu$ M probucol y deferoxamina; 200  $\mu$ M ácido ascórbico y 100  $\mu$ M N-acetil-cisteína. Las células controles fueron expuestas a la misma concentración de agua (0.5% final), de DMSO (0.1% final). Las células coexpuestas a compuestos antioxidantes y a MeHg fueron tratadas primero con el agente antioxidante y posteriormente con el MeHg.

### **3.3.5.- Exposición continua a pepstatina A**

La catepsina D es una aspartato proteasa localizada en los lisosomas cuya participación en la muerte apoptótica ha sido descrita recientemente (Leist y Jaattela 2001, Guicciardi et al. 2004, Harwood et al. 2005). Para determinar si la catepsina D participa en la muerte neuronal inducida por MeHg procedimos a la inhibición farmacológica de la catepsina D por pepstatina A. Para ello, los cultivos fueron expuestos a una solución concentrada de pepstatina A en DMSO a los 2 div (0.1% DMSO final) y recogidas a los 5 – 7 días. La solución concentrada de pepstatina A fue disuelta con 250  $\mu$ l del medio de cultivo precondicionado y devuelto al pozo en condiciones estériles siendo la concentración final de 50  $\mu$ M. A continuación, se procedió al tratamiento con MeHg tal y como se describió en el apartado 3.3.3.

### **3.3.6.- Exposición continua a MK-801**

El MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor de glutamato NMDA que protege de la muerte excitotóxica. Para determinar si la exposición prolongada a MeHg induce muerte neuronal por excitotoxicidad, los cultivos primarios fueron expuestos a una solución acuosa concentrada de MK-801 (0.5 % concentración final de agua) añadida directamente al medio de cultivo, siendo la concentración final de MK-801 de 5  $\mu$ M.

### **3.4.- Métodos de evaluación de la muerte neuronal**

#### **3.4.1.- Material**

El bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT), el ácido pirúvico, el NADH, Hoechst 33252, ditioneitol (DTT), EGTA, EDTA, fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), dodecasil sulfato sódico (SDS), leupeptina, digitonina y la aprotinina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El yoduro de propidio y el conjugado Pepstatin A BODIPY FL se obtuvieron de Molecular Probes (Leiden, Holanda) y el Ac-DEVD-AMC de Alexis (Laufelfingen, Suiza).

#### **3.4.2.- Determinación de la viabilidad celular**

##### **3.4.2.1.- Ensayo del MTT**

Es un ensayo colorimétrico basado en la incubación de las células con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El MTT es captado por las células mediante el proceso de endocitosis y reducido por las mitocondrias de células vivas a una sal de formazán insoluble. Esta sal, acumulada en los lisosomas, es transportada a la superficie celular mediante el proceso de exocitosis. Si bien se considera que la reducción del MTT se produce en la mitocondria, se ha descrito también la reducción de este compuesto en otros compartimientos celulares (Liu et al. 1997). El ensayo de MTT se utiliza como indicador de la viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad neuronal mediante el ensayo del MTT se realizó según el protocolo descrito por Vale et al. 1998. Los cultivos se lavaron 3 veces con una solución salina tamponada con HEPES (135 mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES y 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3, HBSS) y se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos a 37 °C con una solución de MTT (250 µg/ml) disuelta con HBSS. A continuación, se eliminó el exceso de MTT y se incubaron las células toda la noche a 37°C con SDS al 5% para facilitar la disgregación de las células. Posteriormente, se transfirieron 200 µl del disgregado celular a una placa de 96 pozos y se añadió 5 µl de isopropanol. Los blancos se realizaron incubando las células con HBSS en lugar de la solución de MTT. La absorbancia de la solución se midió a 560 nM en placas de 96 pocillos en un lector de placas (iEMS Reader MF; Labsystems;

Helsinki, Finlandia). La viabilidad neuronal se expresó como porcentaje del control tras restar los blancos.

#### 3.4.2.2.- Incorporación de yoduro de propidio (IP)

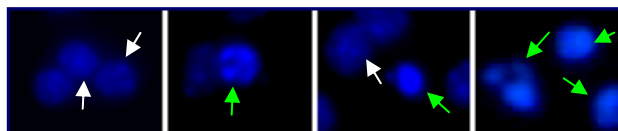
El yoduro de propidio (IP) es un fluoróforo capaz de incorporarse en las células con la membrana dañada marcando así los núcleos de las células, y emitiendo fluorescencia tras ser excitados con la longitud de onda adecuada.

Antes de incubar las células con IP, las células utilizadas como control total de muerte se incubaron con un 0.2% de tritón (concentración final) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadió 25 µl de IP (0.147 mg/ml) a cada pozo de 0.5ml volumen final y las células se incubaron en la oscuridad durante 1h a 37°C. El IP emite fluorescencia a 617 nm después de ser excitado a 535nm. La fluorescencia emitida por el IP fue cuantificada con el fluorímetro Spectramax Gemini XS (Molecular Devices, Wokingham, UK) en la modalidad de escaneado de pozo en cruz con una densidad de 3. Los resultados se expresaron como porcentaje de muerte respecto la muerte total. La incorporación del IP en las células se observó, también, mediante el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Tokio, Japón) acoplado al programa Analysis Color View (Olympus, Tokio, Japón).

#### **3.4.3.- Determinación de la apoptosis**

##### 3.4.3.1.- Tinción con Hoechst 33252

Hoechst 33252 es un colorante fluorescente con afinidad específica para los nucleótidos de adenina y timina por lo que es utilizado para marcar los núcleos, el ADN y los cromosomas. El Hoechst 33252 se utilizó para identificar los núcleos apoptóticos. Los núcleos de células no apoptóticas pueden diferenciarse morfológicamente de los apoptóticos según el tamaño del núcleo, la intensidad de la tinción y la presencia de la fragmentación del ADN. Así pues, un núcleo se considera apoptótico cuando presenta una reducción del tamaño del núcleo, una mayor intensidad de tinción y/o la aparición de cuerpos apoptóticos (ver figura 3.1). En contraposición, un núcleo no apoptótico es más grande y presenta una tinción más difusa y punteada correspondiendo a la tinción de los nucleolos.



**Figura 3.1.-** Fotomicrografías de fluorescencia de núcleos teñidos con el colorante Hoechst 33252 representativas de núcleos no apoptóticos (flechas blancas) y apoptóticos (flechas verdes).

La tinción con Hoechst 33252 se realizó en cultivos neuronales tratados con MeHg y /o pepstatina A durante 5 – 7 días. Después de lavar las células con una solución salina de PBS con calcio y magnesio (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> a pH 7.2 – 7.4), las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con una solución de PBS con tritón al 0.25% durante 5 min a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados de 5 min con PBS, las células fueron incubadas en la oscuridad con una solución 5  $\mu$ M de Hoechst 33252 durante 15 min. A continuación, las células fueron analizadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Tokio, Japón) acoplado al programa Analysis Color View (Olympus, Tokio, Japón). Se contaron las células de 5 campos/pozo de 3 pozos por tratamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de células apoptóticas.

#### 3.4.3.2.- Determinación de la actividad caspasa 3

La caspasa 3 es una proteasa clave en la cascada de transmisión de la señal apoptótica de la vía intrínseca de apoptosis dependiente de la activación de caspasas. La presencia de actividad caspasa 3 es indicativa de la participación de las caspasas en la apoptosis.

La actividad caspasa 3 se cuantificó mediante un ensayo fluorimétrico (Petegnief et al. 2003). Al final de la exposición a MeHg durante 4 - 5 div, las células se lavaron con una solución fría de PBS y se incubaron con un tampón de lisis (0.03% de digitonina en una solución 100nM de HEPES, 1mM EDTA, 100  $\mu$ M EGTA, 10 mM DTT, 2 mg/ml CHAPS, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 2  $\mu$ g/ml pepstatina, 10  $\mu$ g/ml leupeptina, 1mM PMSF, 1mM fluoruro de sodio y un 10% sacarosa a pH 7.5) durante 15 min a 4 °C. Los lisados celulares se guardaron a -80°C. Posteriormente, los lisados se sonicaron y centrifugaron a 9000 rpm durante 3 min a 4 °C. Los extractos de proteína celular fueron incubados con 25  $\mu$ M del sustrato de caspasa 3 Ac-DEVD-AMC y la formación del producto AMC se midió mediante el fluorímetro Spectramax Gemini XS (Molecular Devices, Wokingham, UK). Se realizaron lecturas de la fluorescencia emitida a 460 nm después de excitar a 360 nm

cada 5 min durante 1 hora. Como control positivo de muerte apoptótica se usaron células de 6 - 7 div expuestas durante 6 h con 200 nM del agente apoptótico staurosporina.

#### 3.4.3.3.- Tinción de la catepsina D con el conjugado BODIPY - pepstatina A

La catepsina D es una proteasa lisosomal inhibida farmacológicamente por el inhibidor específico pepstatina A. El marcaje de la catepsina D se realizó mediante el conjugado formado por la pepstatina A unida al fluorocromo BODIPY (Chen et al. 2000, Yin et al. 2005). La interacción de la catepsina D de lisosomas intactos con el conjugado BODIPY-Pepstatin A emite fluorescencia. Cuando, por una ruptura lisosomal, la catepsina D es liberada en el citosol se produce una pérdida de la fluorescencia ya que la actividad del conjugado, al igual que la de la catepsina D, es dependiente del pH ácido presente en el lisosoma.

Los cultivos expuestos a 300 nM MeHg en presencia o ausencia de antioxidantes (200  $\mu$ M AA, 10  $\mu$ M TR y 3  $\mu$ M PB) a los 2 div y recogidos a los 7-9 div fueron lavados con HBSS e incubados con 250nM del conjugado BODIPY-pepstatina A durante 1 h a 37 °C en la oscuridad. A continuación las células se lavaron con HBSS y se visualizaron con a) microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Tokio, Japón) equipado con contraste de fase y una cámara digital Colorview (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Alemania) y b) microscopio confocal Leica TCS-NT (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania). Las muestras que fueron visualizadas con microscopio confocal se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 6 min a 22 °C en la oscuridad y tras ser lavadas con PBS se montaron e un cubreobjetos con Mowiol.

### 3.5.- Peroxidación lipídica

#### 3.5.1.- *Material*

El antioxidante 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, EEUU). El kit de ELISA para la determinación de los niveles de 8-isoprostano fue suministrado por Cayman Chemicals (Ann, Arbor, MI, EEUU).



### **3.5.2.- Cuantificación de los niveles de 8-isoprostano**

Los isoprostanos son ecosanoides de origen no enzimático originados a partir de la oxidación de forma aleatoria de los fosfolípidos por radicales de oxígeno. El 8-isoprostano es un ecosanoide que es considerado marcador de estrés oxidativo, determinando el grado de peroxidación lipídica. Los niveles de 8-isoprostano en el medio de cultivo se cuantificaron mediante el kit de ELISA basado en la competición por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo específico contra 8-isoprostano entre el 8-isoprostano y el conjugado de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (AChE) (trazador). La cantidad de trazador unido es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano en el medio de cultivo. La incubación con el reactivo de Ellman's (que contiene el sustrato de la AChE) produce un producto amarillo que absorbe a 412nm. La intensidad de color, determinada espectrofotométricamente, es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano.

La peroxidación lipídica se determinó en el medio de cultivo de células granulares de cerebelo expuestas a 0, 30, 60, 80, 100, 200 y 300 nM de MeHg a los 2 div. Se recogieron 25 µl del medio de cultivo a los 5, 9, 12 y 16 div y se congelaron inmediatamente a -80°C en presencia de un 0.005% BHT hasta su procesado. El ensayo se realizó según hemos descrito anteriormente de forma resumida.

### **3.6.- Cuantificación de las proteínas**

#### **3.6.1.- Materiales**

Reactivo de Bradford suministrado por Bio-Rad. (Hercules, CA, USA).

#### **3.6.2.- Ensayo de cuantificación**

La cuantificación de las proteínas se realizó con el kit comercial de la Bio-Rad basado en el método de Bradford. Una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 cambia su máximo de absorción de 465 (solución anaranjada) a 595 nm (solución azul) al unirse a las proteínas. Las muestras se diluyeron en una placa de 96 pozos según protocolo estándar. Al añadir la solución de Bradford se forma un complejo (estable entre 15 y 60 minutos) cuantificable a 595 nm en un lector de placas (iEMS Reader MF; Labsystems;

Helsinki, Finlandia). La concentración de proteínas se obtiene tras intrapolar los valores de absorbancia en una recta patrón de albúmina de suero bovino con concentraciones comprendidas entre 1 y 7 µg de proteína.

### **3.7.- Análisis de los efectos del MeHg en neuronas granulares de cerebelo mediante técnicas de proteómica**

#### **3.7.1.- Material**

El cóctel inhibidor de proteasas, el EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , el acetato de sodio y el carbonato sódico ( $\text{NaCO}_3$ ), la iodoacetamida (IAA), el ditioneitol (DTT) y el Nonidet NP-40 fueron suministrados por Sigma Co (St. Louis, MO, USA). Las tiras de acrilamida inmovilizada de 18 cm de pH 3-10 (Immobiline drystrips), PlusOne Drystrip cover fluid (aceite vegetal), la urea PlusOne, la tiourea PlusOne, 2DE clean up kit, el persulfato de amoníaco, el N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), el glicerol al 87%, el Destreak, el dodecasil sulfato sódico (SDS), la agarosa y el sulfonato de 3-[(3-Cholamidopropyl)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) fueron suministrados por Amersham Biosciences AB (Uppsala, Suecia). El nitrato de plata, el etanol, el metanol, el ácido acético glacial, el sulfato disódico ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) y el formaldehído al 37% fueron obtenidos de Merck (Lutterworth, UK), el Duracril 30% de Electroforesis (Ann Arbor, MI, USA). El marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standard) y el kit de cuantificación de proteínas DC RC fueron proporcionado por BioRad (Hercules, CA, USA).

##### 3.7.1.1.- Soluciones

Las soluciones utilizadas en este proceso se describen en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4.-** Descripción de las soluciones usadas en la obtención de los extractos proteicos, en la separación por 2DE y en la visualización de las manchas en los geles bidimensionales

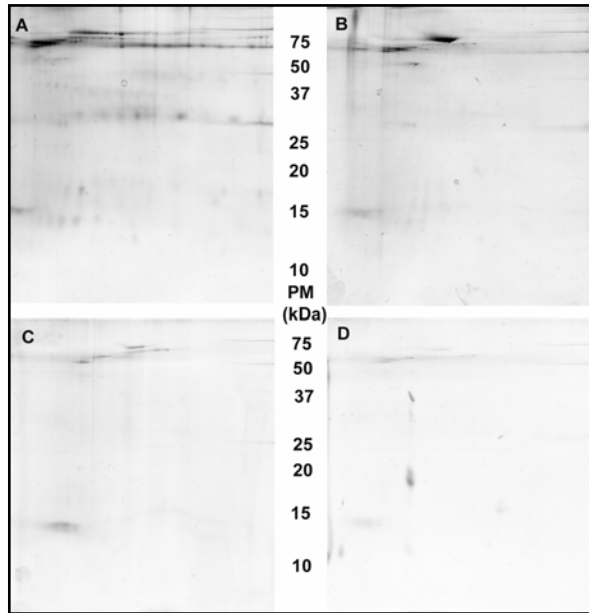
<b>TAMPÓN</b>	<b>COMPOSICIÓN</b>
PBS	138 mM NaCl 2.7 mM KCl 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Tampón homogeneización	20mM HEPES 320 mM sucrose 1mM EGTA 5mM Ditioteitrol (DTT) 1% cocktail inhidor de proteasas
Tampón de lisis	7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-base
Ácido tricloroacético	10% (p/v)
Tampón de rehidratación	8M de urea 2M de tiourea 2% de CHAPS 0.5 % anfólitos (rango de pH 3-10 o 6-11) trazas de azul de bromofenol 1.2% DeStreak (agente reductor)
Tampón de equilibrado	50mM Tris-HCl a pH 8.8 6 M urea 30% (v/v) glicerol 2% (v/v) SDS azul de bromofenol
Tampón de separación 4x Acrilamida al 12%	1.5 M Tris-Base a pH 8.8 <u>Para 450 ml (6 geles) (25x20x0.1cm)</u> 180 IDuracryl 30%/0.8% 112.5 ml resolving buffer 4x 4.5 ml SDS al 10% H2O miliQ 400 µl persulfato amóniaco (APS) al 10% 60 µl TEMED
Tampón de carrera 10X	25 mM Tris-base 192 mM glicina 0.1% de SDS
Agarosa al 0.5%	0.1g de agarosa en 20 ml de tampón de carrera 1X 0.5 % de azul de bromofenol
<b>Tinción</b>	
Solución de fijación	40% etanol (v/v) 10% ácido acético (v/v)
Solución de sensibilización	30% etanol (v/v) 0.2% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (p/v) 6.8% acetato sódico (p/v)
Solución de tinción	2.5 g/L Ag <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Solución de revelado	2.5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (p/v) 0.015% de formaldehído
Solución de parada	1.46 % (p/v) EDTA-Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O

### **3.7.2.- Obtención de los extractos de proteína total**

Los extractos de proteína total se obtuvieron a partir de  $4.5 \times 10^6$  células granulares de cerebelo cultivadas en placas recubiertas con poli-L-lisina. Las células, tratadas a los 2 días *in vitro* (div) con MeHg (30, 60 y 100 nM) y recogidas a los 12 div, fueron lavadas con una solución salina PBS a 37°C (138mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O y 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y rascadas en frío con PBS con 1% de un cóctel inhibidor de proteasas. Los rascados celulares se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

⇒ *Optimización del proceso de obtención de los extractos de proteína total*

Las neuronas cultivadas en placas crecen adheridas al plástico recubierto con poli-lisina (poli-L o poli-D lisina) para facilitar su adhesión. De los cultivos realizados en placas pretratadas con poli-L-lisina y recogidas con una solución salina (PBS), los geles resultantes mostraron señales inespecíficas en las zonas de alto peso molecular debido, probablemente, a residuos de sales de fosfato y fragmentos de poli-L-lisina (figura 3.2 A). La sustitución de la poli-L-lisina por la poli-D-lisina (resistente a la acción de las proteasas) y del tampón fosfato por un tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-base) disminuyó significativamente estas señales inespecíficas. En la figura 3.2 se muestran geles bidimensionales del extracto rascado teñidos con solución de plata, correspondientes al recubrimiento de las placas de cultivo con poli-L-lisina (figura 3.2 A y B) y con poli-D-lisina (figura 3.2 C y D), en ausencia de células cultivadas. Se observa también la influencia de la solución de recogida de las células en el gel bidimensional (A y C, tampón fosfato; B y D, tampón de lisis).



**Figura 3.2.-** Análisis 2DE del extracto del recubrimiento con poli-L (A y B) o poli-D (C y D) lisina de las placas de cultivo rascadas con el tampón fosfato (A y C) o con el tampón de lisis (B y D).

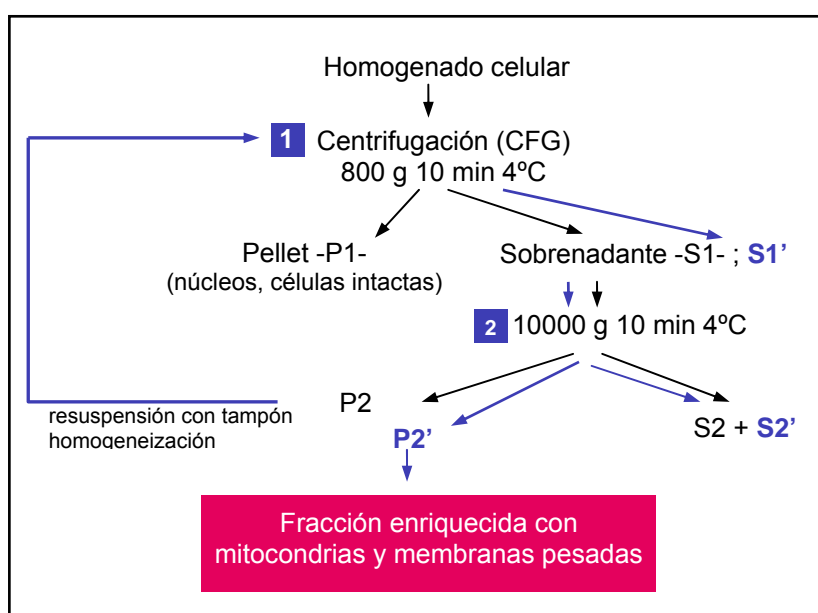
#### 3.7.2.1.- Precipitación de las proteínas

Los extractos se descongelaron, se les añadió un 0.5% de nonidet P-40 (NP-40) y se sonicaron en frío 3 veces durante 30 segundos con intervalos de 1 min. A continuación las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de añadir a las muestras el mismo volumen de TCA al 10%, éstas fueron agitadas durante 30 min a 4°C y centrifugadas a 11000 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes y los pellets proteicos se lavaron con acetona fría. Los pellets proteicos secos se resuspendieron con el tampón de rehidratación (ver composición tabla 3.4) adecuado para el isoelectroenfoque de las proteínas.

#### 3.7.3.- Obtención de las fracciones enriquecidas con mitocondrias

Las fracciones enriquecidas con mitocondrias se obtuvieron a partir de  $18 \times 10^6$  células granulares de cerebelo cultivadas en placas de 6 pozos recubiertas con poli-D-lisina y tratadas con 60 nM MeHg durante 13 div. Al final del tratamiento, las células se lavaron con solución HBSS atemperada y se rascaron, tras un periodo de incubación de 10 min con el tampón de homogeneización (composición ver tabla 3.4). A continuación las células se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce Teflón-vidrio (10 “pulsos” a 450 revoluciones). Posteriormente y por un proceso de centrifugaciones diferenciales

procedimos a la obtención de las fracciones enriquecidas en mitocondrias (figura 3.3). Así pues, el pellet enriquecido en mitocondrias resultante de la repetición del ciclo de centrifugaciones a 800g durante 10 min a 4°C (eliminación de núcleos y restos de células intactas) seguido de la centrifugación del sobrenadante a 10000g durante 10 min a 4°C (pellet corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias) se congeló a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Finalmente el extracto de proteínas mitocondriales se obtuvo como resultado de la lisis del pellet enriquecido en mitocondrias con un tampón de lisis (tabla 3.1) y de la precipitación de las proteínas con un kit comercial “2D clean up kit” (Amersham) y resuspensión de las mismas en el tampón de rehidratación.



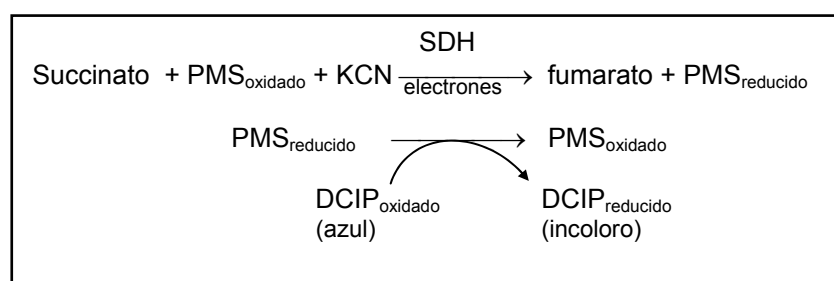
**Figura 3.3.-** Protocolo de obtención de fracciones enriquecidas con mitocondrias mediante la utilización de centrifugaciones diferenciales. En azul se indica la repetición de las centrifugaciones 1 y 2 con el objetivo de lavar y obtener una fracción enriquecida con mitocondrias más limpia.

### 3.7.3.1.- Validación de la pureza de las fracciones enriquecidas con mitocondrias

Para valorar la pureza de las fracciones enriquecidas con mitocondrias se determinó la presencia de actividad succinato deshidrogenasa (SDH, enzima mitocondrial localizada en el complejo II de la cadena respiratoria) y la ausencia de actividad lactato deshidrogenasa (enzima citosólica). La actividad LDH se determinó espectrofotométricamente (García et al. 2006).

La actividad SDH se determinó mediante el ensayo espectrofotométrico descrito por Hatefi y Stigall (1978), con modificaciones, basado en la reacción descrita en la figura 3.4.

La oxidación del succinato, catalizada por la SDH, genera electrones que reducen el compuesto metosulfato de fenazina (PMS) que posteriormente reducirá al 2,6-dicloroindofenol (DCIP). La función del cianuro de potasio (KCN) es bloquear la enzima terminal de la cadena respiratoria asegurando la transferencia de los electrones hacia la reducción del PMS. Previamente a la determinación de la actividad SDH, la muestra mitocondrial fue lisada con tritón 0.1% para facilitar el acceso a los sustratos. Las soluciones utilizadas y el espectrofotómetro se pre-calentaron a 37° C. Justo antes del ensayo, la muestra fue añadida a una solución formada por 40 mM de succinato disódico, 32 µM DCIP, 1.2 mM KCN y 1.5 mM PMS. A continuación se realizó una cinética enzimática durante 1 minuto con lecturas cada 1.5 segundos a 500 nm.



**Figura 3.4.-** Esquema del método utilizado para la determinación de la actividad SDH

La actividad SDH determinada en muestras enriquecidas con mitocondrias y en fracciones totales de proteína fue de 0.038 y 0.007 unidades absorbancia/min/µg de proteína, respectivamente, mostrando un enriquecimiento ~ 6 veces. Por otro lado, la actividad LDH total en fracciones enriquecidas con mitocondrias fue del 0.01% respecto a la actividad del extracto total.

### **3.7.4.- Cuantificación de las proteínas**

Las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford (anteriormente descrito) o con el kit de cuantificación RC DC de Bio-Rad (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) compatible con los reactivos CHAPS, urea y tiourea presentes en los tampones de resuspensión de las proteínas.

### **3.7.5.- Separación de las proteínas por electroforesis bidimensional (2DE)**

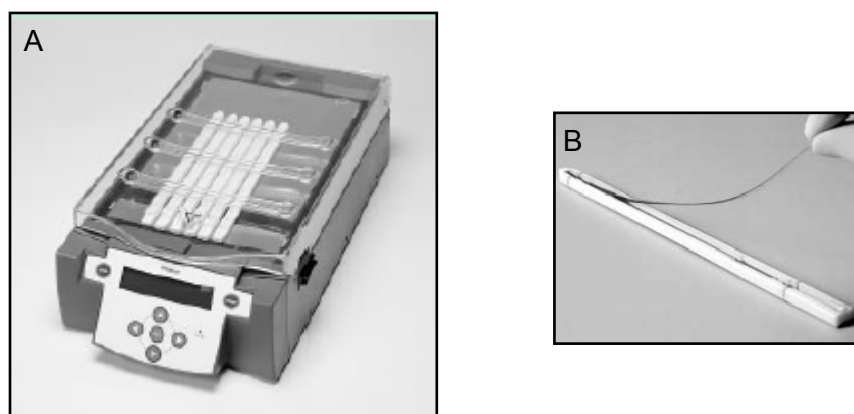
#### 3.7.5.1.- Isoelectroenfoque (IEF, primera dimensión)

Las proteínas son moléculas anfóteras que en función del pH pueden tener carga neta positiva o negativa. El punto isoeléctrico (pI) se define como el valor de pH en el cuál la carga neta de la proteína es nula. Al aplicar un campo eléctrico a un extracto de proteínas, éstas se mueven hacia el electrodo con carga opuesta a la carga neta de la proteína. Si las proteínas están disueltas en un soporte con un gradiente de pH entre los electrodos, las proteínas se moverán hasta el punto dónde su carga neta sea cero, es decir se pararán en el punto donde su pH = pI. El isoelectroenfoque (IEF) aprovecha el carácter anfótero de las proteínas para separarlas en función de su pI en un gradiente de pH. Para el IEF se utilizó el sistema IPGPhor de Amersham Biosciences (figura 3.5 A) y tiras de plástico de 7 o 18 cm con una capa de poliacrilamida y anfólitos enlazados de forma covalente en un gradiente de pH 6–11 o 3–10, respectivamente.

##### *3.7.5.1.1- Isoelectroenfoque de los extractos de proteína total*

El IEF de los extractos totales de proteínas se realizó en tiras de 18cm de longitud con un rango de pH 3-10. La separación se realizó tras aplicar 100 µg del extracto de proteína total (contenido en 350 µl del tampón de rehidratación) en los sarcófagos de IEF dónde posteriormente se colocó la tira de acrilamida (figura 3.5B). A continuación se añadió unas gotas de aceite mineral sobre las tiras para evitar la precipitación de la urea y la tiourea y se inició el proceso de isoelectroenfoque de las proteínas según el programa descrito en la tabla 3.5. En este caso, la carga de la muestra se realizó junto con la rehidratación de las tiras. Una vez finalizado el proceso de IEF, las tiras se congelaron a -80 °C hasta el momento de la separación de las proteínas en función de su peso molecular (PM).





**Figura 3.5.-** Unidad de isoelectroenfoque Ettan IPGphor Isoelectric Focusing (Amersham Biosciences). (A) Aparato de isoelectroenfoque; (B) ejemplo de la colocación de una tira de acrilamida en los sarcófagos de isoelectroenfoque.

**Tabla 3.5.-** Programa de isoelectroenfoque de extractos de proteína total

Paso	Voltaje(V)	Tipo de gradiente	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	50	n-step-hold	10	—
2	500	Gradiente	1:30	—
3	1000	Gradiente	1:30	—
4	2000	Gradiente	1:30	—
5	4000	Gradiente	1:30	—
6	8000	Gradiente	2	—
7	8000	n-step-hold	—	65000

\* 50  $\mu$ A/tira, 20°C

### 3.7.5.1.2.- Isoelectroenfoque de las fracciones enriquecidas con mitocondrias

En este caso, las fracciones enriquecidas con mitocondrias se separaron en tiras de 7 cm de longitud y rango de pH 6-11. Para mejorar la separación de las proteínas de la zona básica, el IEF se realizó por *cup-loading*. Esta técnica consiste en la aplicación de la muestra directamente sobre el extremo básico de la tira previamente hidratada. Así pues, las tiras fueron hidratadas con 125  $\mu$ l del tampón de rehidratación (tabla 3.4) durante un periodo de 12 – 18h a 22 °C y posteriormente se congelaron a -80°C hasta su utilización. Tras aplicar 15  $\mu$ g de extracto de proteína en la zona básica y recubrir la tira con aceite mineral para evitar la evaporación y precipitación de la urea y tiourea, las muestras se enfocaron siguiendo el programa descrito en la tabla 3.6. Una vez finalizado el proceso

de IEF, las tiras se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la separación por SDS-PAGE.

**Tabla 3.6-** Programa para el IEF de las proteínas de fracciones enriquecidas con mitocondrias.

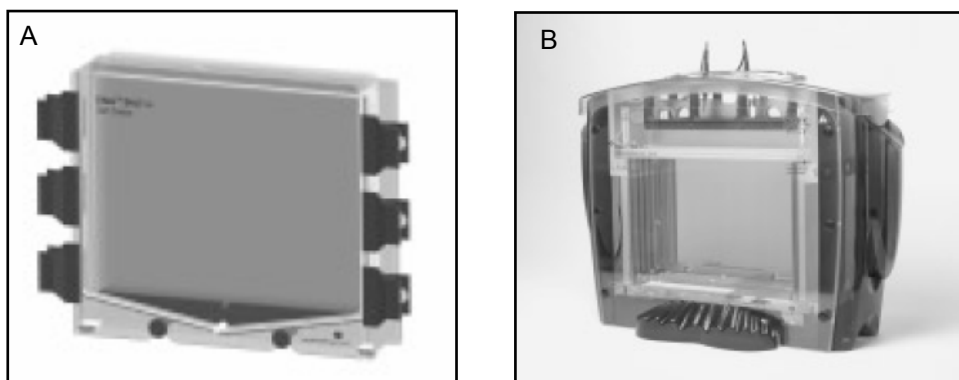
Paso	Voltaje (V)	Tipo de gradiente	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	300	Gradiente	0:30	—
1	300	n-step-hold	4:00	—
2	1000	Gradiente	1:00	—
3	2000	Gradiente	1:00	—
4	3500	Gradiente	1:30	4000
5	3500	n-step-hold	-	30000

### 3.7.5.2.- Segunda dimensión o electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Después del IEF, las proteínas se separan en función de su peso molecular (PM) mediante el SDS-PAGE, en lo que se denomina la segunda dimensión. Este proceso requiere de: la polimerización de geles, el equilibrado de las tiras isoelectroenfocadas y de la separación electroforética.

#### 3.7.5.2.1.- Polimerización de los geles

La polimerización de los geles se realizó en el recipiente de polimerización de la unidad Ettan Dalt VI de Amersham Biosciences AB (figura 3.6A). Se preparó una solución de poliacrilamida al 12 % (ver tabla 3.4) a la que se le añadió los catalizadores TEMED y persulfato amónico para iniciar la polimerización de la acrilamida. A continuación, la mezcla de poliacrilamida se vertió en el interior del recipiente de polimerización, dónde previamente se habían colocado los casetes de vidrio de 20 x 25 x 0.1 cm, en el interior de los cuáles se formarían los geles. Para mantener el gel humedecido y obtener un frente recto se añadió 2 ml de agua miliQ durante 1h a cada gel (tiempo aproximado de polimerización de los geles). El proceso de polimerización se realizó en la cámara fría durante 1 hora. Los geles polimerizados se pueden guardar hasta un máximo de 2 días.



**Figura 3.6:** Unidad de electroforesis Ettan Dalt VI (Amersham Biosciences). (A) Unidad de polimerización de los geles, (B) cubeta de electroforesis.

#### *3.7.5.2.2.- Equilibrado de las tiras isoelectroenfocadas*

Para una buena separación de las proteínas según su peso molecular (PM) es necesario tratar las proteínas isoelectroenfocadas (1) con agentes desnaturizantes como el SDS, que al mismo tiempo que desnaturaliza y despliega las proteínas se une a ellas de forma proporcional a su PM dotándolas de carga negativa, (2) con agentes reductores como el DTT que se encarga de reducir los puentes disulfuro y (3) con agentes alquilantes como la iodoacetamida (IAA) que alquilará los grupos SH reducidos anteriormente y evitará su posterior oxidación. Estos tratamientos constituyen la fase de equilibrado de las muestras (Thongboonkerd y Klein 2004).

Después de descongelar las tiras isoelectroenfocadas, éstas se equilibraron primero con 5 ml de un tampón de equilibrado (50mM Tris-HCl a pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (v/v) SDS y azul de bromofenol) conteniendo 10 mg/ml DTT durante 15 min en agitación y a continuación se equilibraron durante 15 min en agitación con 5 ml del mismo tampón de equilibrado pero sustituyendo el DTT por 25 mg/ml IAA.

#### *3.7.5.2.3.- Separación electroforética*

La separación de las proteínas en función de su PM se realizó en el sistema de EttanDalt VI de Amersham Biosciences (figura 3.6 B). La aplicación del voltaje se realizó con la fuente de alimentación PowerPac 1000 (BioRad) y la temperatura se mantuvo a 20° C utilizando un refrigerador Hetofrig CB (Heto).

Las tiras equilibradas se lavaron con agua miliQ y se situaron sobre la superficie de los geles. A continuación, en el extremo básico de la tira se colocó un aplicador impregnado con 5 µl de una mezcla de marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Standard, BioRad) que se usó como referencia para determinar la movilidad electroforética de las proteínas en el gel, y el conjunto se selló con agarosa al 0.5%. Posteriormente, se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis y se añadió el tampón de "carrera" al 1X en la cubeta inferior y al 2X en la superior (ver tabla de soluciones). La separación electroforética se realizó en una etapa de 30 min a 2.5 W/gel seguida de otra etapa de 5 horas a 12 - 17W/gel.

### **3.7.6.- Tinción con nitrato de plata**

La visualización de la proteínas en los geles se realizó mediante la tinción con nitrato de plata descrita por Mortz (Mortz et al. 2001). Este proceso consiste en la saturación de los geles con iones de plata que interaccionan con las proteínas. La reducción de los iones de plata a plata metálica, responsable de la visualización de las proteínas en los geles, se realiza en una solución de carbonato sódico en presencia de formaldehído. En estas condiciones se puede detectar hasta 1 ng de proteína en el gel.

El proceso de tinción de los geles consiste en una primera etapa de fijación con una solución del 40% etanol y 10% ácido acético glacial durante un período mínimo de 30 minutos en la cual se inmovilizan las proteínas en los geles y se eliminan la glicina, el Tris, el SDS y los anfólitos que podrían interferir en el proceso de tinción. A continuación los geles se sensibilizan con una solución del 30% etanol, 0.2 % (p/v) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y 6.8 % (p/v) de acetato sódico durante 30min, y tras tres lavados de 5 min con agua miliQ, los geles fueron sumergidos en una solución de nitrato de plata (2.5 g/L) durante 20 min. Posteriormente, y después de 2 lavados con abundante agua miliQ durante 1 min para eliminar los iones de plata no enlazados, los geles fueron expuestos a la solución de revelado (2.5 % (p/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) con 0.015 % de formaldehído hasta la aparición de las manchas (aproximadamente 4 - 6 min). La reacción de revelado fue detenida con una solución al 1.46 % (p/v) de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación. Todas las etapas del proceso de tinción se realizaron a temperatura ambiente y en constante agitación.

### **3.7.7.- Análisis de imagen**

Una vez revelados los geles, las imágenes se digitalizaron utilizando un escáner Agfa DueScan y el programa 3.60.00. Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 300 ppi y se almacenaron en formato tiff. Los geles se guardaron en agua miliQ a 4°C dentro de un recipiente cerrado para su posterior uso. Para el análisis de imagen se utilizó el software ImageMaster 2DE v.4.01.c (Amersham Biosciences). Las imágenes obtenidas se normalizaron respecto todas las manchas detectadas en todos los geles analizados. Para la identificación de proteínas con expresión diferencial se compararon los volúmenes normalizado ( $V_N$ ) de las manchas detectadas (Quero et al. 2004).

### **3.7.8.- Determinación de las proteínas separadas en geles de poliacrilamida mediante técnicas de espectrometría de masas**

La determinación de las proteínas fue realizada por el laboratorio de proteómica de nuestro instituto (LP-CSIC-UAB) (Carrascal et al. 2002). La identificación de proteínas separadas en geles de poliacrilamida consta de varios pasos. En primer lugar las proteínas se digieren *in situ* y a continuación los péptidos de digestión se extraen y se analizan mediante MALDI-TOF para determinar su peso molecular. Esta información permite en muchos casos identificar la proteína problema mediante la utilización de programas de búsqueda que comparan la información experimental con la existente en las bases de datos. Esta técnica se denomina mapeo peptídico o PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*).

#### **3.7.8.1.- Digestión en gel**

En el caso de determinar la proteína por PMF, los péptidos de digestión se analizaron mediante espectrometría de masas. Para la digestión semiautomática de las muestras se utilizó el sistema de Millipore "*Multiscreen vacuum manifold*" y placas para digestión de 96 pocillos (MSD-Proteomics). Las manchas se recortaron de los geles en una campana de flujo laminar vertical utilizando un bisturí y se introdujeron en la placa de digestión. Los fragmentos de gel recortados se lavaron 3 veces con 50  $\mu$ l de un tampón de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (25 mM, pH 8) y se deshidrataron lavándolos tres veces más con acetonitrilo. Las proteínas de los geles recortados se redujeron añadiendo 50  $\mu$ l de 10 mM DTT en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubando durante 1 hora a 25 °C. Posteriormente, las cisteínas reducidas se carbamidometilaron añadiendo el mismo volumen de iodoacetamida (55

mM) en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubando durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad. Los fragmentos de gel recortados se lavaron una vez con 50  $\mu\text{l}$  de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y se deshidrataron lavándolos tres veces con acetonitrilo. Seguidamente, se añadieron 5-15  $\mu\text{l}$  de tripsina (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) (dependiendo del volumen del gel se añadía más o menos volumen, intentando que todo el gel se rehidratara con esta solución) y se incubó durante 45 minutos a 4 °C. La tripsina no absorbida se eliminó y los fragmentos de gel se cubrieron con el volumen necesario de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . La digestión se realizó a 30 °C durante 16 horas (Carrascal et al. 2002). La extracción de los péptidos de digestión se realizó utilizando 3 lavados con ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  1/1 v/v 0.25% ácido trifluoroacético seguidos de 3 lavados con acetonitrilo. Una fracción de 0.5  $\mu\text{l}$  del extracto obtenido en el primer lavado se cargó directamente en la placa de MALDI-TOF. El resto del extracto (aprox. 80-120  $\mu\text{l}$ ) se almacenó a -80°C para análisis posteriores. En los casos en los que no se pudo identificar ninguna proteína en este primer análisis se llevó a cabo un segundo análisis del extracto concentrado a partir del total del material disponible. Para ello, el correspondiente extracto (80-120  $\mu\text{l}$ ) se evaporó a sequedad y se redisolvió en 5  $\mu\text{l}$  de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  1 / 2 v/v 0.1% TFA, cargándose en la placa de MALDI 0.5  $\mu\text{l}$  de esta disolución.

### 3.7.8.2.- Análisis mediante MALDI-TOF

Para la identificación de las muestras mediante mapeo peptídico se utilizó un MALDI-TOF Voyager DE PRO (Applied Biosystems, Barcelona) trabajando en modo reflectrón positivo. Una fracción de 0.5  $\mu\text{l}$  del extracto se cargó en una placa de 96 x 2 pocillos, se mezcló con 0.5  $\mu\text{l}$  de la matriz (3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico en ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  2/1 0.1% TFA) y se dejó secar. Los análisis se realizaron en modo automático utilizando un valor de láser de 1800-1900 V y promediando los espectros obtenidos a partir de 450 disparos en el rango de m/z de 750 a 4500. Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla estándar de 5 péptidos (des-Arg1-bradiquinina (Mr 904.46), Glu1-fibrinopéptido B (Mr 1570.68), angiotensina-1, (Mr 1296.69), ACTH 1-17 (Mr 2093.09), ACTH 18-39 (Mr 2465.20) , ACTH 7-38 (Mr 3657.93 ) y, si era posible, internamente utilizando los iones derivados de los péptidos de autodigestión de la tripsina (Mr 842.5100, 1045.5642, 2011.1046, 2807.3145 y 3337.7577).

### 3.7.8.3.- Análisis mediante MALDI-TOF -TOF

Las muestras que no pudieron ser caracterizadas mediante PMF-MALDI-TOF, se analizaron mediante MALDI-TOF-TOF. Esta técnica permite determinar la secuencia de los péptidos obtenidos tras el proceso de digestión en gel. El instrumento utilizado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF modelo AB4700 (Applied Biosystems; PCB, Barcelona) trabajando en modo reflectrón positivo. Se cargaron en la placa 0.4 µl de muestra y 0.4 µl de matriz de la misma forma que en el análisis por MALDI-TOF. Se programó el instrumento para realizar un espectro de barrido completo en el rango de m/z de 900 a 5000 seguido de 4 espectros de MS/MS (*CID on*) de las 4 señales más abundantes en la zona de m/z 1100-3500 del espectro de barrido completo. Posteriormente se seleccionaron iones intensos no fragmentados en modo automático y se obtuvo el espectro de MS/MS de forma manual. Los análisis se realizaron en modo automático utilizando un valor de láser de 6000 para los espectros de MS y de 7200 para los de MS/MS. Se promediaron 1000 disparos en los espectros de MS y 1500 en los de MS/MS. Para los experimentos de MS/MS se utilizó una energía de colisión de 1 kV y como gas de colisión aire a una presión de  $1-2 \times 10^7$  torr. Los espectros se calibraron externamente utilizando la misma mezcla que en el análisis por MALDI-TOF.

### 3.7.9.- Herramientas bioinformáticas para la identificación de proteínas

Para la identificación de proteínas mediante PMF los espectros obtenidos en el análisis por MALDI-TOF se trataron ajustando la línea de base, eliminando el ruido y realizando un *deisotopado* de los picos para generar un listado de valores que correspondían con los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Posteriormente se realizó la búsqueda en bases de datos utilizando los programas Protein Prospector y MASCOT. Para realizar estas búsquedas se eligió mamíferos como grupo taxonómico, tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal.

En los análisis mediante MALDI-TOF/TOF de los repertorios peptídicos la identificación de las secuencias a partir de los espectros de fragmentación se realizó utilizando el programa MASCOT. Para realizar las búsquedas no se restringió ni el tamaño ni el pI de las proteínas, se eligió mamíferos como grupo taxonómico, tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron sin modificar y se tuvieron en cuenta

modificaciones como la oxidación de metioninas, la presencia de piroglutámico, la fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas y la acetilación del extremo N-terminal. Las bases de datos de proteínas utilizadas fueron SwissProt (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Germany), NCBI y GenPept (National Center for Biotechnology Information, WA).

### **3.8.- Western blot de la cofilina y de la actina**

#### **3.8.1.- Material**

El anticuerpo policlonal contra la cofilina hecho en conejo fue suministrado por Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA), el anticuerpo contra la actina (residuos 22-33) hecho en conejo y la albúmina de suero bovino (BSA) por Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) y el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano A/G hecho en conejo por Pierce Biotechnology (Rockford, USA). El kit Immun-Star HRP Chemiluminescent y el marcador de peso molecular "Precision Plus Protein Standards dual color" fueron obtenidos de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). El leche para el bloqueo de membranas fue obtenida de Sweltesse. El resto de material común se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, EEUU), Merck (Darmstaad, Alemania) y Panreac (Barcelona, España).



### 3.8.1.1.- Soluciones

Las soluciones utilizadas en este proceso se describen en la tabla 3.7.

**Tabla 3.7.-** Soluciones para la realización del Western-blot contra la cofilina y la actina

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Solución de carga	62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 2% SDS (p/v) 10% glicerol 50mM DTT azul de bromofenol
Gel poliacrilamida al 15%	Para 20ml: 0.8 ml H <sub>2</sub> O 10 ml 30%/0.8% acrilamida/bisacrilamida 5 ml Tris 1.5M pH 8.8 0.200 ml 10% SDS 4 ml glicerol 50% 10 µl temed 100 µl APS al 10%
Gel concentrador al 4%	Para 15 ml: 9.15 ml H <sub>2</sub> O 1.95ml 30%/0.8% acrilamida/bisacrilamida 3.75 ml Tris 0.5M pH 6.8 0.15 ml 10% SDS 10 µl temed 100 µl APS al 10%
Tampón de carrera 10X	0,25M Tris-Base 1.92 M Glicina 1% SDS
Tampón de transferencia 1X	26 mM Tris base 192 mM glicina 0.1% SDS 20% Metanol
Solución de lavado (TBS-T)	TBS 1X 0.1% Tween-20
Solución de bloqueo	TBS 1X 5% (p/v) leche no-grasa 0.1% (v/v) Tween-20 (al 100%)
Tampón de dilución del anticuerpo primario	TBS1X 5% (p/v) BSA 0.1% (v/v) Tween-20 (al 100%)

### 3.8.2.- Western blot

La determinación de los niveles de cofilina y actina mediante western blot se realizó en células granulares de cerebelo cultivadas en placas de 6 pozos pretratadas con poli-L-lisina y expuestas durante 10 días a concentraciones subcitotóxicas de MeHg.

#### 3.8.2.1.- Obtención de la muestra

A los 12 div las células se rascaron en frío con 100 µl del tampón de carga (tabla 3.7). A continuación, el raspado celular fue sonicado (con la finalidad de romper el ADN y

disminuir la viscosidad de la muestra), desnaturalizado tras hervir durante 5 min y enfriado inmediatamente en hielo. Los extractos celulares se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min a 4°C.

#### 3.8.2.2.- Electroforesis (SDS-PAGE) y transferencia

Para la separación de las proteínas, se cargaron 40 µg de la muestra en geles de poliacrilamida (al 4% el gel concentrador y al 15 % el gel de separación). La electroforesis se desarrolló aplicando una intensidad de 20 mA durante aproximadamente 1h 30 min a 4 °C en cubetas MiniProtean de Biorad. La transferencia de las proteína a las membranas de nitrocelulosa se realizó con una corriente constante a 300 mA durante 1h con el tampón de transferencia (tabla 3.7).

#### 3.8.2.3.- Incubación con el anticuerpo contra la cofilina

A continuación, las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo al 5% de leche no-grasa y un 0.1 % Tween-20. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario contra la cofilina diluida 1/1000 en la solución de dilución del anticuerpo conteniendo un 5% de BSA y 0.1% de Tween 20 (tabla 3.7). Después de lavar las membranas, éstas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con A/G de la peroxidasa de rábano diluido 1/20000 hecho en conejo en la solución tampón TBS conteniendo Tween-20 (TBS-T, ver tabla 3.7). Finalmente, las membranas se lavaron con el tampón de lavado y se revelaron por quimioluminiscencia tras añadir 2.5 ml de la mezcla luminol/potenciador y 2.5 ml del tampón de peroxidasa e incubar durante 4 minutos en la oscuridad. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa informático Quantity one 1D-analysis de BioRad.

#### 3.8.2.4.- Incubación con el anticuerpo contra la actina

La incubación con el anticuerpo primario contra la actina tuvo lugar después de lavar y bloquear las membranas, previamente reveladas para las cofilina, durante 1 h (tal y como se describió para la cofilina). Seguidamente, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo contra la actina diluido 1/2000 en el tampón de TBS-T. A continuación las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario

conjugado con la peroxidasa de rábano diluido 1/40000 durante 1 h a temperatura ambiente y se revelaron con el kit de quimiolumiscencia (descrito en el apartado 3.8.2.3).

### **3.9.- Análisis de los datos**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD del número de experimentos indicado en el texto. El error estándar de la media (SEM) se ha utilizado en las representaciones gráficas. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad 4.0 para Windows, Graphpad Software, Inc. San Diego, CA, EEUU). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la t-Student y el análisis de la varianza de una o dos vías utilizando el test de Dunnett o Bonferroni para posteriores comparaciones de los diferentes grupos de tratamientos.