



ORIGINAL

Cambios celulares producidos por la citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica sobre cultivos de neuronas motoras

U. Gomez-Pinedo^{a,*}, M. Yáñez^b, J. Matías-Guiu^a, L. Galán^a, A. Guerrero-Sola^a, M.S. Benito-Martin^a, Á. Vela^a, J.A. Arranz-Tagarro^b y A.G. García^b

^a Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense, Madrid, España

^b Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 5 de agosto de 2013; aceptado el 20 de agosto de 2013

Accesible en línea el 19 de octubre de 2013

PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral amiotrófica;
Líquido cefalorraquídeo;
Neurotoxicidad;
Periferina;
Caspasa-3;
TNF α ;
Glutamato

Resumen

Introducción: Los efectos neurotóxicos del líquido cefalorraquídeo (LCR) procedentes de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) han sido descritos por varios autores que han atribuido esta neurotoxicidad al efecto de glutamato del LCR-ELA.

Material y métodos: Se han expuesto cultivos de neuronas embrionarias corticales de rata con un incubación de 24 h y el LCR procedente de pacientes con ELA, valorando las alteraciones celulares a través de microscopía óptica en comparación con aquellas que produce con 100 mM de glutamato y la inmunohistoquímica de caspasa-3, TNF y periferina a través de microscopía confocal.

Resultados: En el cultivo expuesto a LCR-ELA se observan células con fragmentación del núcleo con escasa o nula modificación estructural de los organelos citoplasmáticos y mantenimiento de la membrana plasmática, lo que no ocurre con la exposición a glutamato. Se observa un aumento de caspasa-3 y de TNF α y un incremento de periferina que co-localiza con caspasa-3 pero no con TNF α , lo hace sugerir que puede tener un papel precoz en el desarrollo de la apoptosis.

Conclusiones: La citotoxicidad por LCR-ELA no se relaciona con el glutamato, que provoca una afectación nuclear precoz sin alteración de la membrana citoplasmática produciendo una apoptosis citoplasmática que conlleva un incremento de caspasa-3 que co-localiza con sobre-expresión anómala de periferina.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: inc.hcsc@salud.madrid.org, u.gomez.pinedo@gmail.com, ulisesalfonso.gomez@salud.madrid.org (U. Gomez-Pinedo).

KEYWORDS

Amyotrophic lateral sclerosis;
Cerebrospinal fluid;
Neurotoxicity;
Peripherin;
Caspase-3;
TNF α ;
Glutamate

Cellular changes in motor neuron cell culture produced by cytotoxic cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis**Abstract**

Introduction: The neurotoxic effects of cerebrospinal fluid (CSF) from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have been reported by various authors who have attributed this neurotoxicity to the glutamate in CSF-ALS.

Material and methods: Cultures of rat embryonic cortical neurons were exposed to CSF from ALS patients during an incubation period of 24 hours. Optical microscopy was used to compare cellular changes to those elicited by exposure to 100 μ m glutamate, and confocal microscopy was used to evaluate immunohistochemistry for caspase-3, TNF α , and peripherin.

Results: In the culture exposed to CSF-ALS, we observed cells with nuclear fragmentation and scarce or null structural modifications to the cytoplasmic organelles or to plasma membrane maintenance. This did not occur in the culture exposed to glutamate. The culture exposed to CSF-ALS also demonstrated increases in caspase-3, TNF α , and in peripherin co-locating with caspase-3, but not with TNF α , suggesting that TNF α may play an early role in the process of apoptosis.

Conclusions: CFS-ALS cytotoxicity is not related to glutamate. It initially affects the nucleus without altering the cytoplasmic membrane. It causes cytoplasmic apoptosis that involves an increase in caspase-3 co-located with peripherin, which is also overexpressed.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El líquido cefalorraquídeo procedente de algunos pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (LCR-ELA) tiene una característica específica que es la posibilidad de provocar una reducción de la supervivencia celular en cultivos de neuronas motoras, en lo que se ha denominado como efecto citotóxico¹. Este efecto se limita al LCR²⁻⁸ y ha sido repetidamente demostrado⁹⁻¹³. En un estudio previo¹⁴, hemos observado efectivamente este mecanismo en cultivos de neuronas, y hemos comprobado que es independiente del glutamato a través de exponerlo a distintos antagonistas. El motivo del actual estudio es comprobar qué cambios celulares se producen en los cultivos neuronales expuestos al LCR-ELA.

Material y métodos

El LCR obtenido por punción lumbar de 3 pacientes con el diagnóstico de ELA, definida según los criterios del Escorial-Arlie Diagnostic Criteria¹⁵ obteniéndose entre 1,5-3 cc, centrifugado, alícuotado y almacenado a -80° hasta el momento de exposición al cultivo. De la misma forma, se extrajo el LCR de 3 pacientes controles, cuya punción lumbar se hizo formada parte del diagnóstico de cefalea o crisis epiléptica. Todos los pacientes y controles firmaron el consentimiento informado.

La extracción y el mantenimiento de los cultivos de neuronas embrionarias motoras de rata se realizaron bajo el protocolo descrito anteriormente por Yañez et al., 2011¹⁴. Los cultivos fueron expuestos inicialmente al LCR-ELA, LCR-control y a 100 mM de glutamato, así como el cultivo basal incubados durante 24 h y analizados mediante microscopía óptica e inmunohistoquímica.

Para la determinación de los estudios inmunohistoquímicos previa fijación de las células, se utilizaron

anticuerpos anti-caspase-3 (1:200, Millipore, 04-1090), anti-TNF α (1:100, Abcam ab66579), anti-peripherin (1:500, Millipore, AB9282), FluoroPan Neuronal Marker para marcar todas las células de origen neural (1:100, Millipore MAB2300 \times) seguido de las incubaciones con los anticuerpos secundarios pertinentes (Alexa 488, 555 o 647, 1:500, Invitrogen), posteriormente se contrastaron los núcleos con DRAQ5 (1:3000, Abcam, ab108410). Las imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia fueron adquiridas en un microscopio invertido Olympus acoplado a un sistema de microscopio confocal Olympus FV1000[®]. El análisis cuantitativo se efectuó a través de *analysis software* ImageJ (versión 1.42) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), realizando todas las cuantificaciones bajo doble ciego. Para el análisis estadístico utilizamos el *software* GraphPad Prism 5, y los valores se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM).

Resultados

Los cambios celulares observados por microscopía óptica que se producen en el cultivo de neuronas motoras tras la exposición con glutamato (100 mM) presentan signos de degeneración autofágica, caracterizadas por vacuolización autofágica del citoplasma, degeneración granulovacuolar, además de células picnóticas y una clara condensación de la cromatina. Contrariamente, en el cultivo expuesto al LCR-ELA se observan células con retracción de las proyecciones celulares, reducción del volumen celular, fragmentación del núcleo (cariorexis), condensación de la cromatina (picnosis), con escasa o nula modificación estructural de los organelos citoplasmáticos, burbujas de membrana plasmática y mantenimiento de la membrana plasmática (fig. 1). La comparación de ambas imágenes muestran como los cambios celulares producidos por el LCR-ELA y glutamato son distintos.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3075877>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3075877>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)