

## ESTUDIO DE LA CASPASA-3 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO NEURONAL EN CULTIVO

### *Study of Caspase-3 in an Experimental Model of Ischemic Preconditioning in Neuronal Culture*

Victoria LÓPEZ TEJERO; Juan P. BOLAÑOS

Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)/Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG/CSIC-USAL) C/ Zacarías González 2

María DELGADO-ESTEBAN

Funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Miguel Servet I CP0014/00010;RD12/0014/0007); FEDER (European regional development fund).  
Correo electrónico: mdesteban@usal.es (619021929)

**RESUMEN:** En los seres humanos, los ataques isquémicos transitorios (AIT) son el correlato clínico de preconditionamiento isquémico cerebral (IPC) que conduce a la resistencia transitoria llamada tolerancia isquémica (TI). Los mecanismos moleculares subyacentes todavía no se entienden completamente. Recientemente, se ha demostrado que la activación de las proteasas llamadas caspasas desempeñan un papel importante en la muerte apoptótica asociada a la isquemia.

En el presente trabajo estudiamos la caspasa-3 en la neuroprotección inducida por el IPC. Para ello, las neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a una concentración subtóxica moderada de N-metil-D-aspartato (NMDA; 20 $\mu$ M NMDA; condición IPC) durante 2 horas, seguido de incubación durante otros 90 min en normoxia (presencia de oxígeno y glucosa) o isquémica (oxígeno y privación de glucosa; OGD). En paralelo, las neuronas control no fueron estimuladas con NMDA. Después de 4

horas de incubación en medio de cultivo, se analizó la apoptosis neuronal (Anexina-V-tinción) por citometría de flujo. Además, se determinó la actividad de la caspasa-3 y la expresión de la caspasa-3 activa usando el ensayo de fluorimetría e Inmunofluorescencia, respectivamente.

Previamente, los resultados obtenidos en el grupo demostraron que el IPC previno la apoptosis inducida por la OGD en las neuronas. En este trabajo mostramos que el IPC impidió la activación de la caspasa-3 inducida por la OGD. Estos hallazgos demuestran el papel clave de la vía de señalización de la apoptosis en la neuroprotección inducida por IPC contra un daño isquémico posterior y señala a la caspasa-3 como diana esencial asociada a la tolerancia isquémica.

*Palabras clave:* Supervivencia neuronal; preconditionamiento isquémico; tolerancia isquémica; apoptosis; caspasa-3; neuroprotección.

**ABSTRACT:** In humans, tansitory ischemic attacks (TIAs) are the clinical correlate of cerebral ischemic preconditioning (IPC) leading to transient resistance called ischemic tolerance (IT). The underlying molecular mechanisms are still not fully understood. Recently, the activation of proteases called caspases has been shown to play an important role in apoptotic death associated with ischemia.

Here, we study the Caspase-3 on IPC-induced neuroprotection. Primary cortical neurons were exposed to a moderate subtoxic concentration of N-methyl-Daspartate (NMDA; 20 $\mu$ M NMDA; IPC condition) for 2 hours, followed by incubation for further 90 min in normoxic (presence of oxygen and glucose) or ischemic (oxygen and glucose deprivation; OGD). In parallel, control neurons were not stimulated with NMDA. After 4 hours of incubation in culture médium, neuronal apoptosis (Annexin-V-staining) was analyzed by flow cytometry. Further, the activity and expression of active caspase-3 were determined using Fluorometric assay and Immunofluorescence, respectively.

Previously, the results of the lab group showed that IPC prevented apoptosis induced by OGD in neurons. In this work we show that the IPC prevented OGD induced caspase-3 activation. These finding demonstrate the key role of the apoptosis signalling pathway in neuroprotection induced by IPC against a subsequent ischemic insult and poses caspase-3 as an essential target in ischemic tolerance.

*Key words:* Neuronal survival; ischemic preconditioning; ischemic tolerance; apoptosis; Caspase-3; neuroprotection.

## INTRODUCCIÓN

El ictus es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. Su aparición se incrementa a partir de los 55 años y constituye la primera causa de invalidez en adultos, siendo la demencia subsiguiente un problema de salud importante. Además, alrededor de un 10% de muertes son debidas a esta patología en países industrializados. El 80% de ictus son isquémicos y, por tanto, derivan de la falta de aporte sanguíneo adecuado a un área cerebral; el 20% restante son hemorrágicos.

Se ha demostrado que pequeños ataques isquémicos transitorios (AIT) conducen a una resistencia llamada tolerancia isquémica, la cual produce un mejor pronóstico funcional de las neuronas del paciente. La tolerancia isquémica cerebral es un fenotipo de protección transitorio provocado por la aplicación de estímulos subletales (hipoxia, productos químicos, etc.) que pueden aumentar la resistencia de células o tejidos frente a un evento isquémico posterior más riguroso. Este estado de adaptación inducido por preconditionamiento es un fenómeno conservado que se observa en todos los tipos celulares y gracias a él se asegura la adaptación y supervivencia frente a factores de estrés perjudiciales.

El mecanismo molecular por el cual se induce esta tolerancia ha sido extensamente estudiado en varios modelos animales, pero aún no es del todo conocido. Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis mitocondrial desempeña un papel importante en los procesos patológicos del SNC y, más concretamente, se ha demostrado que la activación de la familia de proteasas denominadas caspasas está implicada en la muerte celular y es importante para el proceso apoptótico asociado a la isquemia. Entre ellas se encuentra la Caspasa-3, miembro de la sub-familia CED-3 de las caspasas, que interviene en la mediación nuclear de la apoptosis, incluyendo la condensación cromática y la fragmentación de DNA.

## OBJETIVO

Estudiar la proteína Caspasa-3 en un modelo de preconditionamiento isquémico en cultivo primario de neuronas corticales de ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cultivos primarios de neuronas corticales de ratón*

Para la realización de los cultivos celulares se utilizó un protocolo puesto a punto en el grupo de investigación donde se desarrolló el TFG presente y que consiste, en primer lugar, en la extracción de los cerebros de embriones de ratón

de 14,5 días de gestación. Posteriormente el tejido se tripsiniza y se procesa para la obtención de los neuroblastos, que se mantienen en un medio de cultivo específico para crecimiento y diferenciación neuronal denominado Neurobasal (GIBCO, Invitrogen).

La suspensión de células disociadas se sembró a una densidad de 180.000 células/cm<sup>2</sup> en Placas de cultivo previamente tratadas con Poli-D-Lisina, con objeto de favorecer la adhesión celular. Además, el medio de cultivo Neurobasal se enriqueció con el suplemento B27 al 2%, 2mM de glutamina y en presencia de glucosa de 5 mM.

Las células se incuban a 37 °C en atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub> y cada tres días se cambia la mitad del medio de cultivo. Los neuroblastos se diferencian a neuronas funcionales durante los siguientes nueve o diez días in vitro.

#### *Modelo de preconditionamiento isquémico cerebral (IPC) e isquemia experimental (OGD)*

Tras 9-10 días en cultivo, las neuronas se incubaron en cuatro condiciones diferentes:

- 1) Normoxia: las neuronas se incubaron en tampón Hanks a 37 °C en presencia de glucosa.
- 2) IPC: las neuronas se expusieron a concentraciones subtóxicas de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) 20mM en presencia de glicina 2mM durante dos horas. El experimento se realiza en medio Hanks con glucosa a 37 °C.
- 3) OGD: en este caso, las neuronas se incubaron en tampón Hanks en ausencia de glucosa, a 37 °C y previamente gaseada con 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> durante 5 minutos, lo que produce una concentración del 1% de O<sub>2</sub> en el medio. Las neuronas se incuban en condiciones de OGD durante 90 minutos; tal y como se describió previamente.
- 4) IPC+OGD: las neuronas se incuban como en la condición de IPC y posteriormente se someten a isquemia experimental.

Tras 24 horas de reoxigenación en medio Neurobasal, se analizó la actividad de caspasa-3 y los niveles de expresión de esta proteína en su forma activa, mediante ensayos fluorimétricos y de inmunofluorescencia respectivamente.

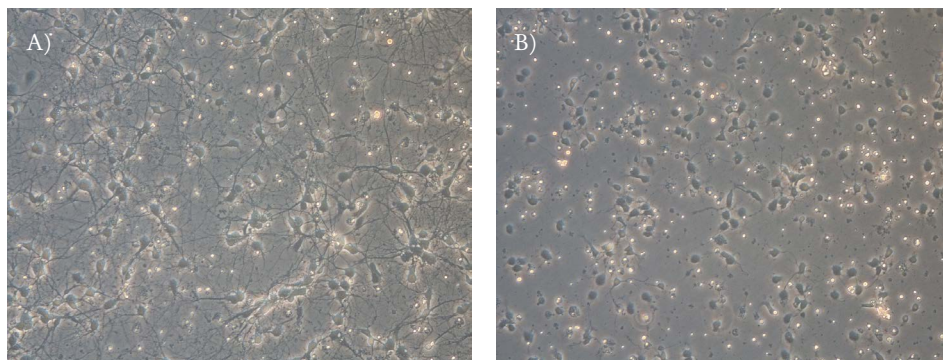
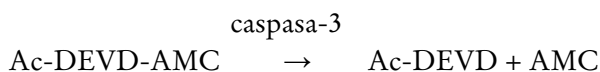


FIGURA 1: Microfotografías de campo claro correspondientes en A) a neuroblastos de 3 días en cultivo y en B) neuronas de 9 días en cultivo donde se aprecian las neuritas características de neuronas diferenciadas. Imágenes realizadas en un microscopio invertido Nikon Eclipse.

#### *Determinación de la actividad de la proteína Caspasa-3 mediante fluorimetría*

El ensayo fluorimétrico de Caspasa-3 (SIGMA) se basa en la hidrólisis del péptido substrato «acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metil-cumarina» (Ac-DEVD-AMC) por caspasa-3, liberándose una sustancia fluorescente llamada 7-amino-4-metilcumarina (AMC).



Las longitudes de onda de excitación y emisión son 360nm y 460nm respectivamente.

Para realizar la medida de la actividad de la Caspasa-3 mediante el kit de ensayo fluorimétrico se:

- Retiró el medio de cultivo.
- Lavó una vez con PBS.
- Anadió EDTA durante 1 minuto para despegar las células y se recogieron en *tubos limpios*.
- Añadió *buffer* de lisis.
- Incubó en hielo durante 20 minutos.
- Centrifugó y transfirió el sobrenadante a tubos limpios.
- En total se prepararon los siguientes pocillos y se leyó la fluorescencia cada 10 minutos durante un total de 50 minutos a 37 °C:

- Muestra (sobrenadante con sustrato).
- Blanco (*Assay Buffer* con sustrato).
- Caspasa-3 (*Assay buffer* con sustrato y Caspasa-3).
- Caspasa-3 con inhibidor (*Assay buffer* con sustrato, Caspasa-3 e inhibidor).
- Paralelamente a las cuatro condiciones descritas anteriormente (Nx, IPC, OGD e IPC+OGD), las neuronas se incubaron en presencia de 1mM de etopósido durante 24 h (inductor del proceso apoptótico), como control positivo de activación de Caspasa-3.
- Recta patrón con concentraciones conocidas de AMC en *Assay Buffer*
- Posteriormente, se extrapolaron los resultados de fluorescencia obtenidos en base a la recta patrón que se realizó usando concentraciones conocidas de AMC *versus* fluorescencia y se calcularon las concentraciones de AMC.

Los cálculos de la actividad de Caspasa-3 se expresaron en:

$$\text{nmol AMC/min/ml generados} = \frac{\text{nmol} \times \text{D}}{\text{T} \times \text{V}}$$

Donde:

- D: factor de dilución
- T: tiempo
- V: volumen

### *Determinación de la expresión de Caspasa-3 activa mediante inmunofluorescencia*

La inmunofluorescencia es una técnica empleada para localizar antígenos celulares mediante anticuerpos marcados con fluorocromos. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas antigénicas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de antígenos, debido a que estos fluorocromos emiten radiación cuando se les excita con energía electromagnética de una determinada longitud de onda.

Previamente a la realización del cultivo destinado para el ensayo, las placas se trataron con una solución de Fibronectina y Poli-L-Ornitina sobre cristales estériles.

Tras la incubación de las neuronas bajo las cuatro condiciones descritas anteriormente, se prepararon las muestras sobre portaobjetos como se explica a continuación:

- Retirar el medio de cultivo.
- Lavar con PBS.
- Fijar las células con Paraformaldehído.
- Incubar con glicina para eliminar la autofluorescencia causada por las uniones inespecíficas de los anticuerpos marcados (señal de fondo o *background*).
- Permeabilizar las células con PBS y Tritón para permitir que penetren los anticuerpos y la solución de bloqueo.
- Incubar en Solución de Bloqueo para saturar los posibles sitios de unión inespecífica.
- Incubar con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C.
- Lavar e incubar con los anticuerpos secundarios.
- Incubar con DAPI, fluorocromo con alta afinidad por el DNA.

La utilización de varios tipos de anticuerpos marcados en una misma preparación se denomina inmunodetección múltiple y tiene el objetivo de detectar varias moléculas de un mismo tipo celular [8]. En este caso las moléculas a detectar fueron las proteínas Caspasa-3 y Map-2 (proteína del citoesqueleto utilizada como marcador neuronal específico). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Caspasa-3 (conejo) y anti-Map-2 (ratón), ambos de la casa comercial Sigma. Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-conejo marcados con el fluorocromo Cy3 (emiten radiación de color rojo) y anti-ratón, marcados con el fluorocromo Cy2 (emiten radiación de color verde), ambos de la casa comercial Jackson.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *El preconditionamiento isquémico previene del aumento en la actividad de la Caspasa-3 inducida tras la isquemia experimental*

La determinación de la actividad de Caspasa-3 se realizó en muestras procedentes de 4 cultivos neuronales y, cada muestra procedente de las cuatro condiciones descritas anteriormente y se analizó por triplicado cada una de ellas.

Los valores se expresaron como medias  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.). La significatividad se determinó mediante el test «t de Student» y en todos los casos un valor de p menor de 0,05 se considera estadísticamente significativo.

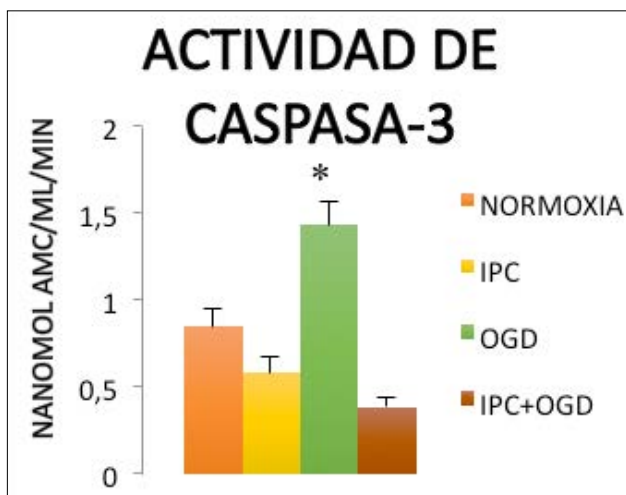


FIGURA 2 Actividad de la Caspasa-3 analizada mediante fluorimetría.

Como se observa en la figura correspondiente a la actividad de Caspasa-3, la isquemia experimental produce un aumento significativo en la actividad de la Caspasa-3 respecto a la condición de normoxia con un  $*p < 0,05$ .

Además, el IPC previene el aumento en la actividad de Caspasa-3 inducida por la isquemia, ya que hay diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de Caspasa-3 de la condición de IPC+OGD *versus* OGD con un  $\#p < 0,05$ .

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el preconditionamiento isquémico genera una respuesta endógena que previene del aumento en la actividad de Caspasa-3 inducida por un daño isquémico posterior.

*El preconditionamiento isquémico previene del aumento en la expresión de la Caspasa-3 activa*

Una vez se comprobó que la actividad de Caspasa-3 está implicada en el mecanismo de preconditionamiento isquémico utilizado en neuronas corticales de ratón, nos propusimos estudiar los niveles de expresión de dicha proteína bajo las 4 condiciones experimentales anteriormente descritas.

Así, las microfotografías de neuronas se obtuvieron con un microscopio confocal «Spinning Disk» Roper Scientific con microscopio Olympus IX81, cuyo cabezal confocal es CSU-X1 de Yokogawa. Las imágenes se analizaron mediante el programa Metamorph Premier en una escala de 50mm.



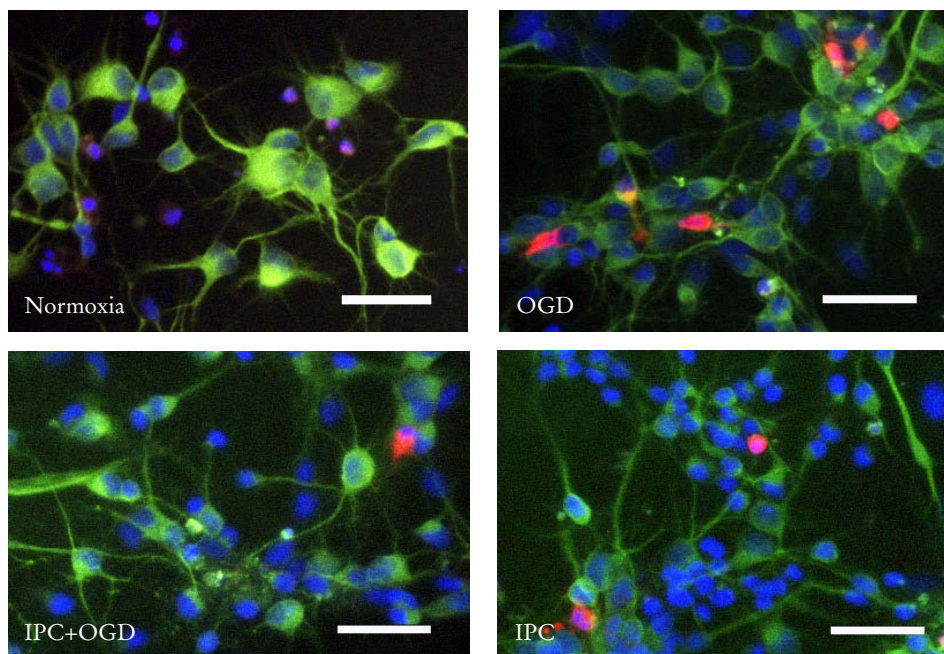


FIGURA 3 El preconditionamiento isquémico previene del aumento en la expresión de Caspasa-3 activa tras la isquemia experimental.

Las microfotografías de neuronas incubadas bajo las condiciones de normoxia, IPC, OGD e IPC+OGD muestran que la OGD aumenta los niveles de expresión de la proteína Caspasa-3 activa, hecho que corrobora que la proteína Caspasa-3 puede ser utilizada como marcador de daño neuronal.

Además, se observa que, en las neuronas, la condición de IPC+OGD previene del aumento de la expresión de Caspasa-3 activa tras la isquemia (OGD).

Estos resultados apoyan los obtenidos recientemente en el grupo de investigación donde se desarrolló el TFG, donde se observa que, realizando el mismo modelo de preconditionamiento isquémico neuronal y en las mismas condiciones descritas en la memoria presente, el preconditionamiento isquémico previene de la muerte por apoptosis inducida por la isquemia (Fig. 4).

Por lo tanto, el preconditionamiento isquémico es capaz de activar mecanismos endógenos que evitan la activación de la Caspasa-3 activa y, con ello, la muerte neuronal por apoptosis asociada al daño isquémico subsiguiente.

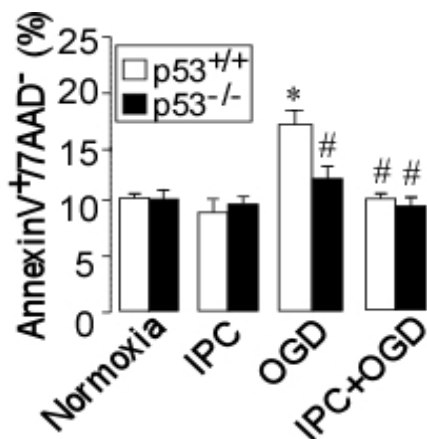


FIGURA 4. Análisis de la muerte neuronal por apoptosis mediante citometría de flujo.

Para la realización de este experimento, las neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratón *Wild Type* (p53<sup>+/+</sup>) o *Knockout* (p53<sup>-/-</sup>) para p53, se incuban en las cuatro condiciones experimentales anteriormente descritas (Normoxia, IPC, OGD e IPC+OGD). Se observa cómo en las neuronas p53<sup>+/+</sup> tras 4 horas de reoxigenación, la OGD induce un aumento en la muerte neuronal por apoptosis respecto a la condición control (Normoxia) y que el IPC previene de la apoptosis tras la isquemia (IPC+OGD). Sin embargo, las neuronas (p53<sup>-/-</sup>) son más resistentes a la OGD respecto a las neuronas control (\*p<0.05 respecto a la Normoxia; #p<0.05 respecto a la OGD en neuronas p53<sup>+/+</sup>).

## CONCLUSIÓN

El modelo de isquemia experimental (OGD) utilizado en el cultivo primario de neuronas corticales de ratón produce el aumento en la actividad de Caspasa-3 y en la expresión de esta respecto a las neuronas sometidas a normoxia. Estos resultados apoyan la posible utilización de la proteína Caspasa-3 activa como marcador de muerte neuronal asociado al daño isquémico.

El modelo de preconditionamiento isquémico utilizado en neuronas corticales de ratón previene el aumento en la actividad de la Caspasa-3 y en la expresión de Caspasa-3 activa inducida por la isquemia experimental; lo que apoya la idea de que la Caspasa-3 activa pueda ser considerada como diana molecular asociada a la tolerancia isquémica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolaños JP, Medina J. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 2002; 81(2):207-217.
- Fernández-Gómez F, Hernández F, Argandoña L, Galindo M, Segura T, Jordán J. Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Rev Neurol.* 2008; 47(5):253-260.
- Gomez-Sanchez J, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, Sobrino T, Perez de la Ossa N, Reverte S *et al.* The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *JEM.* 2011; 208(3):429-437.
- Kirino T. Ischemic Tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22(11):1283-1296.
- Sánchez-Pérez M, Álvarez Barrientos A. *Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas.* 1ª ed. Madrid: Síntesis; 1998.
- Soriano F. Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. *J. Neurosci.* 2006; 26(17):4509-4518.
- Técnicas Histológicas. 5-Tinción: inmunocitoquímicas. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Vigo: departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo; 2003 [actualizo 03 mar 2015; citado 03 may 2016]. Disponible en: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>
- Vasdekis S, Athanasiadis D, Lazaris A, Martikos G, Katsanos A, Tsivgoulis G *et al.* The role of remote ischemic preconditioning in the treatment of atherosclerotic diseases. *Brain Behav.* 2013; 3(6):606-616.
- Vijayakumar T, Sangwan A, Sharma B, Majid A, GK R. Cerebral Ischemic Preconditioning: the Road So Far... *Mol Neurobiol.* 2015; 53(4):2579-2593.

