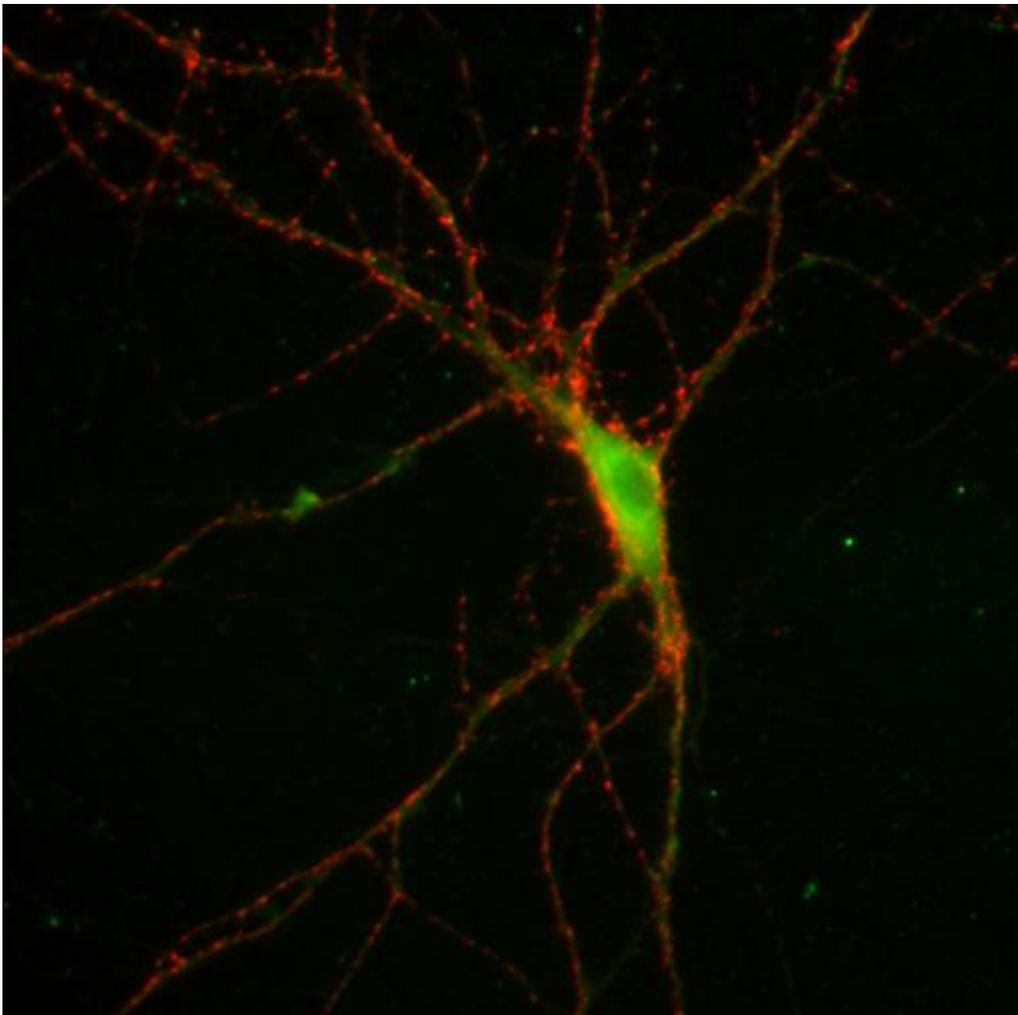




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

**Localización subcelular del transportador de nucleótidos vesicular
por inmunofluorescencia en cultivos neuronales**

**Subcellular localization of the vesicular nucleotide transporter
with immunofluorescence in neuronal cultures**



Trabajo de Fin de Grado

SANTIAGO YANES GUILLÉN

Tutorizado por Natalia Domínguez Reyes y Marcial Camacho Pérez
Grado en Biología. Julio 2022

Índice

1	Resumen.....	3
2	Abstract.....	3
3	Introducción.....	4
3.1	El ATP como mensajero.....	4
3.2	Transportador vesicular de nucleótidos (VNUT).....	5
3.3	VNUT en el Sistema Nervioso Central.....	6
3.4	VNUT en neuronas.....	6
3.5	VNUT en células gliales.....	7
3.6	Co-cultivos de neuronas y células gliales.....	7
4	Objetivos.....	8
5	Material y Métodos.....	8
5.1	Medios de cultivo y soluciones.....	8
5.2	Preparación de placas de cultivo.....	9
5.3	Obtención del encéfalo.....	11
5.4	Cultivo de astrocitos.....	11
5.5	Cultivo de neuronas de hipocampo.....	13
5.6	Inmunofluorescencia.....	14
5.6.1	Fijación de la muestra.....	14
5.6.2	Permeabilización y bloqueo de sitios inespecíficos.....	15
5.6.3	Marcaje con anticuerpos.....	15
5.6.4	Montaje.....	16
5.7	Microscopía.....	16
6	Resultados.....	16
6.1	Establecimiento con éxito de tres tipos de cultivos neuronales.....	16
6.2	Inmunofluorescencia de cultivos neuronales.....	18
6.3	Los astrocitos y la microglía en cultivo presentan VNUT.....	19
6.4	Localización subcelular de VNUT en neuronas de hipocampo.....	20
7	Discusión.....	24
8	Conclusiones:.....	26
9	Conclusions:.....	26
10	Agradecimientos.....	27
11	Bibliografía.....	28

1 Resumen

Este trabajo constituye uno de los primeros pasos de una línea de investigación emergente en el laboratorio, que pretende detectar la liberación por exocitosis de vesículas que contienen ATP en neuronas de hipocampo *in vitro*. Por ello, se han puesto a punto tres tipos de cultivos de neuronas: cultivos continentales, cultivos autápticos y cultivos por el método de Banker. Las muestras obtenidas de cultivos continentales y por el método de Banker se emplearon para marcar por inmunofluorescencia el Transportador Vesicular de Nucleótidos (VNUT) y otras proteínas neuronales y gliales. En co-cultivos, la presencia de VNUT en neuronas y células gliales hace que al analizar la fluorescencia sea complicado distinguir entre la señal de VNUT en neuronas y señal de VNUT en glía. Por ello, se proponen los cultivos por el método de Banker como modelo para el estudio de la localización subcelular de VNUT en neuronas de hipocampo. La fluorescencia detectada para VNUT se encuentra fundamentalmente en regiones neuronales correspondientes a dendritas y soma. Aunque con los métodos empleados no se detecte, no se descarta la presencia de VNUT en regiones neuronales como los axones y los terminales presinápticos,

Palabras clave: exocitosis, señalización purinérgica, cultivos por el método de Banker.

2 Abstract

This work is one of the firsts steps of an emerging line of research in the laboratory, which aims to detect the release by exocytosis of vesicles containing ATP in hippocampal neurons *in vitro*. Therefore, three types of neuronal cultures have been developed: continental cultures, autaptic cultures and Banker's method cultures. Samples obtained from continental and Banker cultures were used for immunofluorescence labeling of Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) and other neuronal and glial proteins. In co-cultures, when fluorescence is analysed, the presence of VNUT in neurons and glial cells makes it complicated to distinguish between VNUT signal in neurons and VNUT signal in glia. Therefore, Banker cultures are proposed as a model for studying the subcellular localization of VNUT in hippocampal neurons. The fluorescence detected for VNUT is found mainly in neuronal regions corresponding to dendrites and soma. Although it is not detected with the methods used, the presence of VNUT in neuronal regions such as axons and presynaptic terminals, is not ruled out.

Keywords: exocytosis, purinergic signalling, Banker's culture.

3 Introducción

3.1 El ATP como mensajero.

La función energética del ATP es la más conocida, sin embargo, la importancia de esta molécula en la comunicación celular se encuentra bastante documentada. Fue en 1962 cuando Geoffrey Burnstock, estudiando sistema nervioso autónomo, descubre que el ATP es la molécula que actúa como mensajero entre los nervios periféricos y el tejido muscular (Khakh & Burnstock, 2009). Además, hay evidencias que apuntan a que esta función del ATP como mensajero es filogenéticamente antigua, llegándose a plantear como los orígenes de la neurosecreción. Está demostrada su acumulación en vesículas de organismos protozoos como *Toxoplasma gondii* y *Giardia lamblia*, aunque su papel como molécula señal en estos casos no está claro (Borges, 2012).

Para cumplir el papel de mensajero extracelular, deben existir mecanismos que permitan la salida del ATP de la célula y tener receptores en células contiguas que desencadenen una respuesta celular. Se han descrito tres maneras por las que el ATP sale de la célula: por rotura celular, por canales en la membrana plasmática formados por panexinas y conexinas, y por exocitosis (Miras-Portugal et al., 2019). Sin embargo, los procesos celulares que desencadenan exocitosis de vesículas cargadas con ATP no son completamente conocidos, aunque, existen evidencias de liberación espontánea y dependiente de potenciales de acción en cultivos de neuronas de hipocampo y médula espinal (Jung et al., 2013; Pankratov et al., 2006).

La acumulación de neurotransmisores y otras moléculas señal en vesículas es un proceso fundamental para la comunicación celular por exocitosis, que es el mecanismo de secreción de interés en este trabajo. En el caso de la señalización purinérgica, la acumulación de ATP en vesículas sinápticas, gránulos cromafines y otros tipos vesiculares, es dependiente del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) (Sawada et al., 2008).

Se han descrito dos tipos de receptores de ATP a nivel de membrana celular. Los P2X son receptores ionotrópicos que al unirse al ATP sufren un cambio conformacional que permite la entrada de cationes (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) desde el espacio extracelular hacia el citosol. Por otro lado, los receptores P2Y son metabotrópicos, al unirse el ATP desencadena el aumento de calcio citosólico, que actúa como segundo mensajero desencadenando una cascada de señalización intracelular (Khakh & Burnstock, 2009; North, 2016).

3.2 Transportador vesicular de nucleótidos (VNUT).

Los transportadores de fosfato tipo I se clasifican en cuatro subfamilias. A una de ellas pertenece el gen *SLC17A9*, que codifica para el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Dicho gen está localizado en el cromosoma 20 en humanos (en el cromosoma 2 en *Mus musculus*), consta de 13 intrones y 14 exones, y codifica para una proteína de 430 aminoácidos (447 en *Mus musculus*) con 12 hélices transmembrana (Figura 1) (Sawada et al., 2008). Esta proteína es responsable de la acumulación de nucleótidos, como el ATP, en el interior de las vesículas. Su actividad es dependiente de un gradiente electroquímico generado por la ATP-asa vesicular (v-ATPasa), que introduce protones desde el citosol hacia el lumen vesicular (Sawada et al., 2008). Además, al igual que en otros miembros de la familia, como el transportador de glutamato (VGLUT), el anión Cl⁻ actúa como modulador alostérico (Moriyama & Nomura, 2018).

VNUT es capaz de transportar diferentes nucleótidos hacia el lumen vesicular. Aquellos con tres grupos fosfato en su estructura tienen una mayor eficacia de transporte, aunque no es la misma para los diferentes nucleótidos con tres grupos fosfato: ATP>UTP>GTP>ITP (ordenados de mayor a menor eficacia de transporte). Los nucleótidos con dos o menos grupos fosfato como ADP y AMP son transportados con menor eficacia, y por último la adenosina (carente de grupos fosfato) no puede ser transportada por VNUT (Miras-Portugal et al., 2019).

Se ha detectado VNUT, gracias a distintas técnicas como la microscopía confocal y la microscopía electrónica, en diferentes tipos vesiculares: vesículas sinápticas, vesículas de núcleo denso (como los gránulos cromafines) y en lisosomas de astrocitos y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Estévez-Herrera et al., 2016; Jung et al., 2013; Larsson et al., 2012; Oya et al., 2013). El gen se expresa en distintos órganos y tejidos, principalmente en encéfalo, tiroides y glándula adrenal (Sawada et al., 2008).

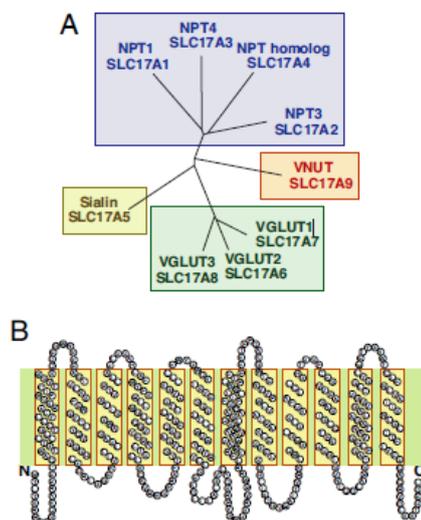
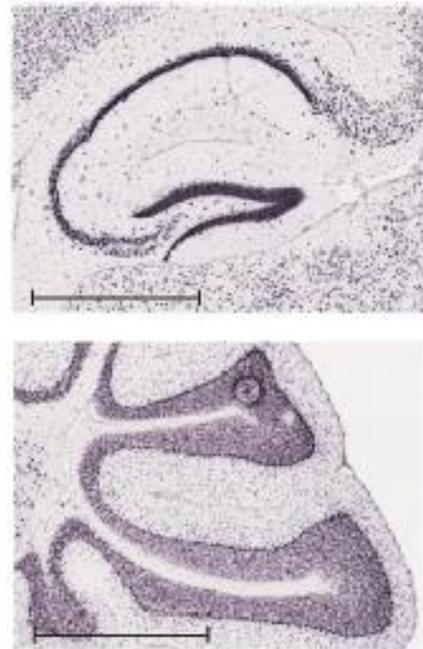


Figura 1. Relaciones filogenéticas y predicción de la estructura secundaria de VNUT. (Sawada et al., 2008)

3.3 VNUT en el Sistema Nervioso Central.

Por hibridación *in situ* del ARNm, se ha observado que el gen *SLC17A9* se expresa de manera amplia en el encéfalo de ratón, siendo el hipocampo y el cerebelo las regiones con mayores niveles de expresión (Miras-Portugal et al., 2019; Sreedharan et al., 2010). Destacan, dentro del hipocampo, zonas de alta expresión como el giro dentado, en las que se ha visto que la señalización purinérgica cumple un papel importante en aspectos como la neurogénesis y la proliferación celular (Lin et al., 2000; Sreedharan et al., 2010).

Figura 2. Análisis de la expresión del transportador por hibridación *in situ* del ARN mensajero en cerebro de ratón. Arriba; hipocampo. Abajo; cerebelo. Escala de 850 μm . (Miras-Portugal et al., 2019)



3.4 VNUT en neuronas

A nivel celular, se ha visto por colocalización con proteínas dendríticas y axonales que VNUT se encuentra en estos dos compartimentos neuronales (Menéndez-Méndez et al., 2017). El transportador se encuentra asociado a vesículas sinápticas en terminales excitatorios e inhibitorios de hipocampo. Además, se detecta en vesículas en el axoplasma, esto indica un posible transporte axonal de la proteína por medio de vesículas (Larsson et al., 2012).

En terminales presinápticos de hipocampo, sólo una parte de la población de vesículas sinápticas excitatorias e inhibitorias, que contienen sus respectivos transportadores VGLUT y VGAT, portan también VNUT. Mientras que la mayor parte de vesículas de esta región en las que se ha detectado VNUT, contienen también el transportador correspondiente para glutamato o GABA (Larsson et al., 2012). Esto podría apuntar a una posible coliberación y/o cotransmisión de ATP con otros neurotransmisores (Larsson et al., 2012), aunque son necesarios más estudios experimentales para confirmarlo.

A parte de en terminales presinápticos, donde presenta colocalización con proteínas como la sinaptofisina o la sinaptotagmina I en vesículas sinápticas, se ha detectado VNUT en espinas dendríticas de hipocampo, que equivalen a regiones postsinápticas (Larsson et al., 2012). En base a estas observaciones se propone, como hipótesis, que el ATP liberado desde las regiones postsinápticas actuaría como modulador retrógrado de la transmisión sináptica. A pesar de la información que se tiene en la actualidad, todavía son necesarios estudios sobre el

tipo de vesículas en el que se encuentra VNUT y la manera en la que se libera el ATP que actúa como molécula señal.

3.5 VNUT en células gliales

La relevancia del papel de los astrocitos en la transmisión nerviosa ha ido cobrando mayor interés por parte de la comunidad científica, ya que son capaces de secretar moléculas relacionadas con la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal, estas moléculas se denominan gliotransmisores (Chen et al., 2013; Petrelli & Bezzi, 2015). El ATP se propone como uno de estos gliotransmisores, ya que se ha observado en astrocitos liberación dependiente de Ca^{2+} por exocitosis (Lalo et al., 2014) y liberación no vesicular (Liu et al., 2008). Se proponen los lisosomas como el tipo vesicular responsable de la exocitosis de ATP en astrocitos, puesto que se ha observado colocalización entre VNUT y proteínas lisosomales como LAMP-1 (Oya et al., 2013). Los lisosomas de los astrocitos se fusionan con la membrana en respuesta a un aumento de calcio citosólico, liberando así su contenido de ATP (Verderio et al., 2012).

En la microglía, otro de los tipos de células gliales del Sistema Nervioso Central (SNC), también se expresa *SLC17A9*. Además, se ha detectado liberación de ATP por exocitosis desde este tipo celular, sin embargo, no se ha encontrado colocalización con marcadores lisosomales, apuntando a que el ATP se encuentra en otro tipo de vesícula secretora (Imura et al., 2013).

La expresión de *SLC17A9* en diferentes células gliales y neuronas, es un indicativo de la importancia de la señalización purinérgica mediada por exocitosis de ATP en el SNC (Pietrowski et al., 2021).

3.6 Co-cultivos de neuronas y células gliales

Entre todos los tipos celulares del sistema nervioso, las neuronas son las responsables de la transmisión nerviosa, sin embargo, la transmisión nerviosa *in vivo* y el correcto desarrollo de las neuronas dependen de otros tipos celulares que se agrupan bajo el nombre de células gliales (Jessen, 2004). Entre las diferentes células gliales del SNC se distinguen astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Hirbec et al., 2020). Los astrocitos tienen gran cantidad de funciones dentro del sistema nervioso y son capaces de establecer conexiones con neuronas y otros tipos celulares (Yu et al., 2020). Entre sus muchas funciones, los astrocitos desempeñan un papel clave en el desarrollo neuronal, influyendo por medio de contacto directo con las neuronas o a través de factores humorales (Markiewicz & Lukomska, 2006).

Aunque la presencia de astrocitos es fundamental para el desarrollo de neuronas *in vitro*, hay ciertos tipos neuronales en los que los cultivos puros están bien establecidos y los medios tienen los factores necesarios para su desarrollo con éxito. No obstante, para el cultivo de neuronas de hipocampo aún son necesarios factores de crecimiento secretados por la glía que es cultivada junto a las neuronas (Banker & Kaech, 2006).

4 Objetivos

Este trabajo constituye uno de los primeros pasos dentro de una línea de investigación emergente en el laboratorio, que pretende detectar liberación por exocitosis de vesículas purinérgicas en neuronas de hipocampo en cultivo.

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es aportar datos descriptivos acerca de la localización subcelular de VNUT en neuronas de hipocampo, la región del Sistema Nervioso Central con mayor expresión de *SLC17A9*. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Establecer tres tipos de cultivo de neuronas de hipocampo en el laboratorio: cultivos continentales, cultivos con el método de Banker y cultivos autópticos. Además de realizar los cultivos de astrocitos necesarios para los cultivos neuronales.
- Detectar por inmunofluorescencia la presencia de VNUT en los diferentes tipos de cultivo neuronales.
- Estudiar de manera descriptiva la localización subcelular de VNUT en neuronas de hipocampo, utilizando el método de cultivo más apropiado.

5 Material y Métodos

5.1 Medios de cultivo y soluciones

Soluciones y medios de cultivo utilizados en cultivo de astrocitos y neuronas de hipocampo	
DMEM-FBS. Medio de astrocitos.	10% de FBS (Suero Fetal Bovino) inactivado; 0.1% de suplemento MITO; 0.2% de Penicilina/Estreptomicina (10000 U/ml y 10000 µg/ml); 90% de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con Glutamax.
NBA (Neurobasal A). Medio de neuronas	90% medio NBA; 2% suplemento B27; 1% de Glutamax; 0.2% de Penicilina/Estreptomicina.
Tripsina-EDTA (0,05% p/v)	Solución enzimática para el cultivo de astrocitos en placas.
Solución de papaína	DMEM suplementado con 1 mM CaCl ₂ , 0.5 mM de EDTA, 1.65mM de L-cisteína y 25 U/ml de Papaína.

Solución “STOP”	DMEM suplementado con 10% FBS inactivado, 2.5 mg/ml de albúmina y 2.5 mg/ml de inhibidor de tripsina.
Hank’s Balanced Saline Solution (HBSS)	Solución salina con rojo fenol.
Phosphate Saline Buffer 1X (PBS)	137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O y 1.8 mM de KH ₂ PO ₄ en ddH ₂ O.

Tabla 1. Soluciones y medios de cultivo utilizados en cultivo de astrocitos y neuronas de hipocampo.

5.2 Preparación de placas de cultivo

Los tres tipos diferentes de cultivo que se realizaron durante este trabajo difieren en la preparación de los cubreobjetos y las placas de cultivo en las que las células, tanto gliales como neuronales, serán sembradas. En todos los tipos de cultivo se utilizaron placas de 12 pocillos con un cubreobjetos en cada pocillo. Se usaron cubreobjetos de 18 mm de diámetro, previamente lavados con HCl 1M durante una noche en agitación y conservados, posteriormente, en etanol al 100%.

Cultivos continentales. Los astrocitos se siembran sobre un cubreobjetos y se dejan crecer durante unos 10 días hasta que formen una monocapa. Luego, sobre esa monocapa se siembran neuronas que se desarrollarán y formarán redes a lo largo del cubreobjetos. Los cubreobjetos son tratados, antes de sembrar las células, con una mezcla de 0,1 mg/ml Poli-D-lisina (PDL) y 0,2 mg/ml de colágeno, y se esterilizan con luz ultravioleta durante no más de 15 minutos.

Cultivos autópticos. Este tipo de cultivo se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito por Bekkers (2020). En estos cultivos se busca generar un patrón de pequeñas áreas en el cubreobjetos, donde las células puedan adherirse y crecer, de manera que quede una neurona por cada microárea. En estas condiciones de aislamiento, las neuronas se desarrollan y tienden a formar sinapsis consigo mismas, este tipo de sinapsis se denominan autapsis. En este caso, los cubreobjetos necesitan dos pasos de preparación, la aplicación del sustrato no permisivo (agarosa 0,15 % p/v) y el estampado con sustrato permisivo (PDL y colágeno, a 0,1 mg/ml y 0,2 mg/ml respectivamente).

Primero se tratan los cubreobjetos con la solución de agarosa, creando una superficie sobre la que las células no pueden adherirse y crecer. Bajo una campana de flujo laminar, con el cubre dentro del pocillo se añade 1 ml de la agarosa líquida (precalentada a 55°C) y se deja durante 45 segundos, después se succiona la agarosa. De esta manera se busca crear una fina capa de agarosa en el cubreobjetos. A continuación, se esteriliza con luz ultravioleta durante 15 minutos y se guardan durante 2 días para que la agarosa termine de polimerizar.

Posteriormente, se procede a formar las microáreas con sustrato permisivo, para ello se utiliza una herramienta de estampado que posee el patrón de microáreas con el tamaño adecuado (200 μm de diámetro. Figura 3). En una placa Petri de 35 mm de diámetro se coloca un trozo de papel de filtro y se impregna con 250 μl de sustrato permisivo, se carga la superficie de la herramienta de estampado mojándola en el papel y se stampa ejerciendo una ligera presión sobre el cubreobjetos con agarosa. Se esperan 10 minutos a que se seque el sustrato permisivo y luego se esterilizan las placas de cultivo con luz UV durante un máximo de 5 minutos.

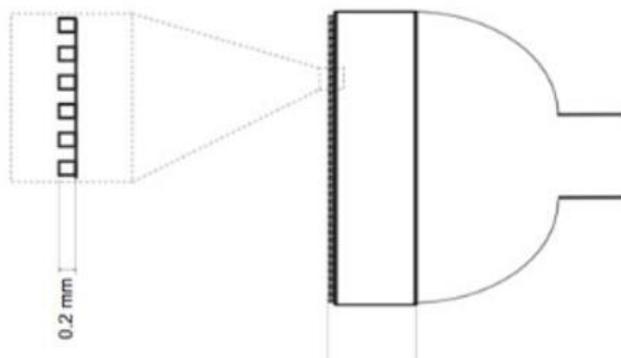


Figura 3. Esquema y proporciones de una herramienta de estampado. (Burgalossi et al., 2012).

Método de Banker: con el objetivo de separar el cubreobjetos donde crecerán las neuronas, del fondo de la placa donde se siembran los astrocitos, las placas de cultivo necesitan un tratamiento previo. En el fondo de la placa se crean unos soportes de parafina para mantener el cubreobjetos separado de los astrocitos. Para esto, se calienta la parafina hasta que se encuentre líquida y con ayuda de un capilar de vidrio se colocan 4 gotas uniformes y equidistantes en el fondo de la placa. Después de esterilizar con luz ultravioleta, se pueden sembrar astrocitos en el fondo de la placa.

Cuando los astrocitos hayan alcanzado un 80% de confluencia, se cambia el medio de cultivo de astrocitos (DMEM-FBS) por medio de neuronas (NBA) y se coloca un cubreobjetos sobre los soportes de parafina. Sobre ese cubreobjetos se siembran las neuronas, como se muestra en la figura 4.

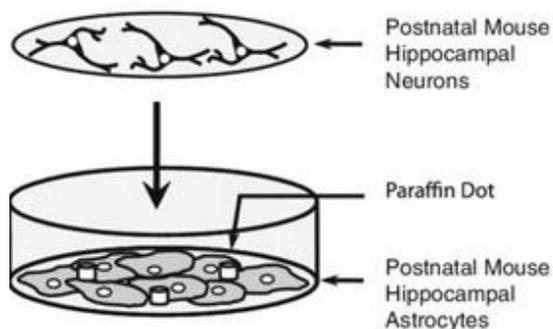


Figura 4. Esquema del método de cultivo de Banker. (Jones et al., 2011)

5.3 Obtención del encéfalo

Tanto las neuronas como las células gliales se obtuvieron a partir de ratones p0 (postnatal de 0 días). La extracción del encéfalo se realiza fuera de campana de flujo laminar manteniendo unas mínimas condiciones de limpieza. Para la disección se utiliza una lupa y diferentes instrumentos de material quirúrgico. Los animales se sacrifican por decapitación, para extraer el encéfalo se usan unas pinzas de disección curva para sostener y unas rectas para retirar la piel. A continuación, se realiza un corte en el cráneo desde la parte frontal hasta la occipital que permita separarlo del resto del tejido. Por último, introduciendo una legra quirúrgica entre la base del cráneo y el encéfalo, desde la parte posterior (cerebelo), se separa el encéfalo que se deposita en una placa con HBSS (Tabla 1) a 4°C (Burgalossi et al., 2012). El procedimiento continúa bajo la lupa, se deben eliminar las meninges y restos de tejido vascular.

El encéfalo extraído puede usarse para obtener astrocitos, neuronas u otros tipos celulares, según lo que se desee cultivar. Los siguientes pasos deben realizarse en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.

5.4 Cultivo de astrocitos

En este trabajo, para obtener los astrocitos se separan los bulbos olfatorios y el cerebelo del resto del tejido y se usan los hemisferios completos. El tejido se somete a una digestión enzimática que contiene tripsina-EDTA (0,05% p/v) (Tabla 1) y mecánica para obtener una suspensión de células individualizadas, que se mantendrá en frascos de cultivo durante 7-10 días hasta que alcancen una confluencia del 80% (Burgalossi et al., 2012).

Antes de empezar la disección del animal, se preparan dos frascos de cultivo con medio para los astrocitos DMEM-FBS (Tabla 1) y se colocan en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂ para que la temperatura y el pH sean los correctos a la hora de depositar las células en los frascos. También se debe atemperar a 37°C la solución enzimática tripsina-EDTA con la que se va a digerir el tejido.

Después de la extracción de tejido, se deposita cada hemisferio en un tubo Eppendorf con 1 ml de la solución enzimática. Se colocan en un bloque térmico con agitación a 37°C y 450 rpm durante 15 minutos. Para detener la acción de la enzima y evitar daños celulares, se retira el sobrenadante con una micropipeta p1000 (sin descartar el tejido), y se lava dos veces con 500 µl de DMEM-FBS. Después del segundo lavado se añaden 300 µl de DMEM-FBS a cada tubo, con ese volumen se disgrega el tejido pipeteando entre 30 y 40 veces hasta obtener una suspensión homogénea. Por último, la suspensión celular se siembra en los frascos

previamente preparados con DMEM-FBS y se mantienen en el incubador. A los dos días de la obtención de astrocitos, se cambia el medio en los frascos por medio fresco y se mantienen 10 días en crecimiento hasta que alcancen una confluencia del 80%.

El cultivo de astrocitos no es puro, como se parte de un tejido primario; habrá astrocitos, otras células gliales y neuronas. Sin embargo, el tratamiento con tripsina y la digestión mecánica favorece la supervivencia de astrocitos frente a otros tipos celulares más sensibles. Además, el medio utilizado está enriquecido con FBS, otro factor que condiciona el crecimiento de otros tipos celulares como las neuronas, pero es favorable para los astrocitos (Bekkers, 2020).

Cuando los astrocitos en el frasco hayan proliferado y alcanzado un 80% de confluencia, deben pasarse del frasco a placas de cultivo. En primer lugar, se preparan las placas que se desean sembrar con 1,5 ml de medio DMEM-FBS por pocillo y se colocan en el incubador. Los astrocitos crecen en el frasco formando una monocapa. Además, sobre estos astrocitos se depositan restos de tejido y otros tipos celulares que se mantienen indiferenciados y de forma esférica, para retirarlos; se somete al frasco a agitación en un vórtex durante 3 minutos. Después de este paso se trabaja en la campana de flujo laminar.

Se succiona el medio con todos los restos celulares, que se desprenden tras la agitación, y se lava la monocapa con 5 ml de PBS (Tabla 1). Se retira la solución de lavado y se añaden al frasco 5 ml de solución enzimática Tripsina-EDTA previamente atemperada a 37°C, se deja actuar durante 1 minuto en el incubador. Pasado ese tiempo se succiona la solución enzimática y se vuelve a depositar el frasco en el incubador, se mantienen durante 5 minutos y al sacarlos se observa bajo un microscopio invertido de campo claro si la monocapa de células se ha levantado del fondo (puede que unos golpes secos con la mano en el frasco de cultivo sean necesarios para terminar de despegar la monocapa del fondo del frasco).

A continuación, se añaden 5 ml de medio DMEM-FBS para detener la acción de la tripsina. Con una pipeta serológica de plástico, se pipetea unas 5 veces por la pared del frasco donde están las células para intentar obtener una suspensión celular. Finalmente, se recoge el medio con las células y se pasa a un tubo Falcon de 15 ml, se individualizan las células pipeteado 30 veces con una pipeta Pasteur de vidrio. Se extraen 10 µl de la suspensión celular y se realiza el conteo celular con ayuda de una cámara de Neubauer. Finalmente, se siembra la cantidad adecuada de astrocitos según el tipo de cultivo:

- Placas para cultivos continentales: 20.000 células por pocillo.
- Placas para cultivos con el método de Banker: 20.000 células por pocillo.
- Placas para cultivos autápticos: 10.000 células por pocillo.

Estos astrocitos se mantienen en las placas hasta que alcancen un 80% de confluencia, que se da tras aproximadamente 7 días desde que son sembrados. Una vez hayan alcanzado ese estado de confluencia, las neuronas pueden ser sembradas tras su extracción.

5.5 Cultivo de neuronas de hipocampo

En este caso, para aumentar la tasa de supervivencia de las neuronas la disgregación se realiza con una solución enzimática menos severa que la tripsina, en concreto con papaína. La solución con papaína se debe preparar fresca antes de la disección. Se añaden 20-25 U/ml de papaína ([#LK003176, Worthington Biochemical Corporation](#)) a la “Solución para papaína” (Tabla 1). Para favorecer la disolución de la enzima se coloca la muestra a 37°C durante 10 minutos y luego otros 10 minutos con burbujeo constante de carbógeno. Este paso no se realiza en condiciones de esterilidad, por lo que posteriormente la solución enzimática se filtra con un filtro de 0,22 µm en una campana de flujo laminar.

En este trabajo se cultivan neuronas de hipocampo de ratón, para ello se extraen los hipocampos de cada uno de los hemisferios utilizando materiales quirúrgicos (pinzas rectas finas). Se hace un corte en la parte dorsal entre los dos hemisferios y se levanta la parte de la corteza dejando los hipocampos al descubierto. Por último, se separan los hipocampos del resto del tejido.

Cuando los dos hipocampos hayan sido extraídos se pasa a trabajar en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. Se colocan los dos hipocampos en un tubo Eppendorf con 500 µl de la solución de papaína previamente preparada, se coloca en una placa térmica a 37°C y agitación (450 rpm) durante 45 minutos. Terminado el tiempo de incubación con la enzima se retira la solución y se añaden 500 µl de solución “STOP” (Tabla 1) para detener la actividad enzimática y no dañar el tejido, se mantienen 15 minutos a 37°C. Se descarta la solución STOP y se incorporan 200 µl de NBA (Tabla 1). En esos 200 µl se pipetea 10 veces para disgregar los hipocampos, después de la disgregación se espera a que sedimenten los fragmentos de tejido y se pasa el sobrenadante a un Eppendorf nuevo. Se añaden otros 200 µl al Eppendorf con el sedimento y se vuelve a pipetear 10 veces, se deja que sedimente y se transfiere el sobrenadante al mismo Eppendorf que el sobrenadante anterior, este proceso se repite unas 5 veces. Al terminar habrá aproximadamente 1 ml de suspensión celular, se realiza el conteo de células en una cámara de Neubauer. Generalmente se obtienen por cada hipocampo alrededor de 1 millón de células por mililitro. Según el tipo de cultivo se siembran las siguientes cantidades de neuronas:

- Continentales: 25.000 células/pocillo

- Autápticos: 3.000 células/pocillo
- Método de Banker: 100.000 células/pocillo

Las neuronas se siembran en las placas de astrocitos que hayan llegado a un 80% de confluencia. Antes de empezar la extracción de neuronas se cambia el medio DMEM-FBS de esas placas por medio NBA apropiado para las neuronas. En placas de cultivo continental y autápticos se añaden 1.5 ml por pocillo de NBA, luego se siembra la cantidad adecuada de neuronas. Sin embargo, en las placas para cultivo con el método de Banker, se añaden primero 0.5 ml de NBA y se colocan los cubreobjetos sobre los soportes de parafina. Se siembran las neuronas sobre los cubres y se esperan 2 horas a que se adhieran, luego se completa con 1 ml de NBA.

5.6 Inmunofluorescencia

Se realizaron marcajes de inmunofluorescencia en los diferentes tipos de cultivo realizados. La proteína de principal interés en el trabajo es VNUT, para su detección se utilizó el anticuerpo [#ABN83, Millipore®](#). Además, se utilizó en combinación con diferentes anticuerpos para detectar proteínas que se indican a continuación, que permiten identificar diferentes compartimentos neuronales y distinguir células gliales:

- MAP2 (Proteína Asociada a Microtúbulos): marcador de soma y dendritas.
- Proteínas axonales (SMI 312): marcador de axones.
- VGAT (Transportador vesicular de GABA): marcador de terminales presinápticos inhibitorios.
- VGLUT (Transportador vesicular de Glutamato): marcador de terminales presinápticos excitatorios.
- Iba-1 (Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado): marcador de microglía.
- GFAP (Proteína ácida fibrilar glial): marcador de astrocitos

5.6.1 Fijación de la muestra

Una vez que las neuronas han crecido durante 12-15 DIV (días *in vitro*), se procede con la fijación de la muestra. Se succiona el medio en el que se encuentran creciendo las neuronas y se añaden 500 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, se mantiene durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS, para su conservación se almacenan a 4°C.

5.6.2 Permeabilización y bloqueo de sitios inespecíficos

Se succiona por completo el PFA 4% y se permeabiliza la muestra realizando tres lavados con agitación de 15 minutos con PBS-T (con 0,1% de Tween-20). Seguido de 3 lavados de 5 minutos con 100 mM de glicina en PBS. Para bloquear sitios inespecíficos de unión a los anticuerpos, se utilizó una solución al 5% de NDS (Normal Donkey Serum) en PBS-T durante 1h en agitación y a temperatura ambiente.

5.6.3 Marcaje con anticuerpos

Se retira la solución de bloqueo y se incuba con los anticuerpos primarios a las concentraciones adecuadas en solución de bloqueo durante toda la noche en agitación y a 4°C. Las concentraciones utilizadas para los primarios utilizados fueron las siguientes:

- Chicken Anti MAP2 - 1:2000 [#AB5543, Millipore®](#)
- Guinea pig Anti VNUT - 1:200 [#ABN83, Millipore®](#)
- Mouse Anti SMI 312 - 1:500 [#837904, BioLegend®](#)
- Rabbit Anti VGAT - 1: 1000 [#131 003, Synaptic Systems](#)
- Rabbit Anti VGLUT -1:2000 [#131 303, Synaptic Systems](#)
- Rabbit Anti Iba-1 – 1: 1000 [#019-19741, FUJIFILM Wako Chemicals](#)
- Rabbit Anti GFAP – 1:500 [#ab7260, abcam](#)

Tras una noche de incubación con el anticuerpo primario, se retira la solución y se realiza un lavado rápido con PBS-T, seguido de, 4 lavados de 15 minutos en agitación con PBS-T. Después, se incuba con los correspondientes anticuerpos secundarios a una concentración de 1:500 en PBS-T durante 1 h en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para lavar el anticuerpo secundario, se realizan cuatro lavados de 15 minutos con PBS-T a temperatura ambiente y en agitación, por último, dos lavados de 10 minutos con PBS 1X (estos lavados de lavado también se realizan en oscuridad).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron:

- Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Guinea Pig. [#706-545-148](#)
- Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit. [#711-545-152](#)
- Rhodamine Red™ Donkey Anti-Chicken. [#703-295-155](#)
- Alexa Fluor™ 405 Goat Anti-Mouse. [#715-475-150](#)

5.6.4 Montaje

Los medios de montaje utilizados fueron; MOWIOL o MOWIOL-DAPI, según el caso. Para ambos casos, se prepara el portaobjetos con una gota de medio de montaje en el centro. El cubreobjetos que se quiere montar se pasa por agua, para quitar posibles restos salinos, y se coloca con la cara donde se encuentran las células sobre la gota de medio de montaje. Finalmente, se deja secar la preparación durante toda la noche en oscuridad antes de observarla con el microscopio de epifluorescencia.

5.7 Microscopía

Las muestras se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss Axiovert 200M), que es controlado desde el ordenador por medio del software AxioVision. Se utilizó un objetivo de 40x para obtener una visión general del campo y uno de 100x de inmersión con mayor capacidad de resolución, necesario para estudiar estructuras vesiculares.

Para la excitación de los fluoróforos se empleó la lámpara Zeiss FluoArc. El microscopio tiene incorporados distintos filtros, cuyas longitudes de onda de excitación/emisión son los siguientes: 488/525 ([488052-0000](#)) de Carl Zeiss, para 514/575 ([488053-0000](#)) de Carl Zeiss y para ultravioleta con excitación a 377/447 (DAPI filter set, Semrock).

Para obtener las imágenes se utilizó la cámara EM-CCD Camera C9100-13 acoplada al microscopio. Se disponía también de un software para el manejo de la cámara y la adquisición de imágenes, HImage. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ.

6 Resultados

6.1 Establecimiento con éxito de tres tipos de cultivos neuronales

Durante el periodo de realización de este trabajo, se pretendía poner a punto tres tipos diferentes de cultivos neuronales en el laboratorio: cultivos continentales, cultivos autópticos y cultivos por el método de Banker. Se ha logrado mantener neuronas *in vitro* en estos tres tipos de cultivo, como se puede observar en las imágenes de campo claro (Figuras 5, 6 y 7) y de inmunofluorescencia (Figuras 5 y 6) de cultivos tras 15 DIV. Para identificar neuronas en estos cultivos primarios y distinguirlas de otros tipos celulares (no sólo a nivel morfológico), se utilizó como marcador neuronal específico de soma y dendritas, la Proteína Asociada a

Microtúbulos-2 (MAP2), fluorescencia en rojo en las figuras 5 y 6, y como marcador axonal el cóctel de anticuerpos contra neurofilamentos (SMI 312), fluorescencia en azul en las figuras 5 y 6. Para este trabajo, no se realizaron inmunofluorescencias en cultivos autápticos.

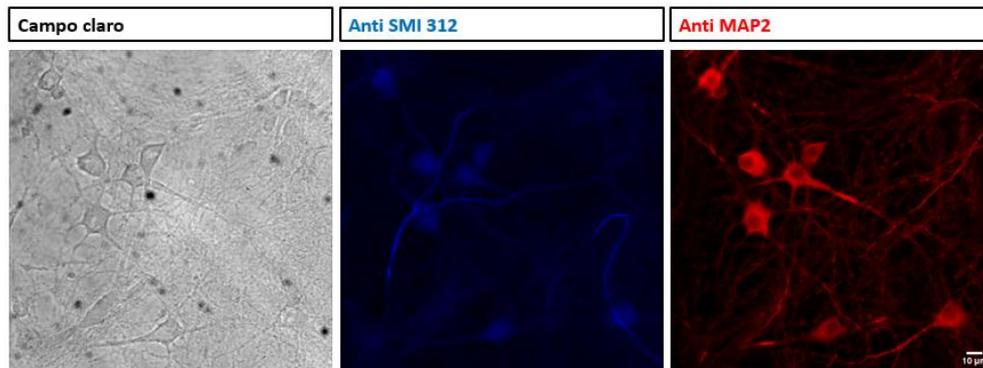


Figura 5. Imágenes representativas de un cultivo continental de neuronas de hipocampo 15 DIV. Objetivo: 40x. Escala: 10 μ m.

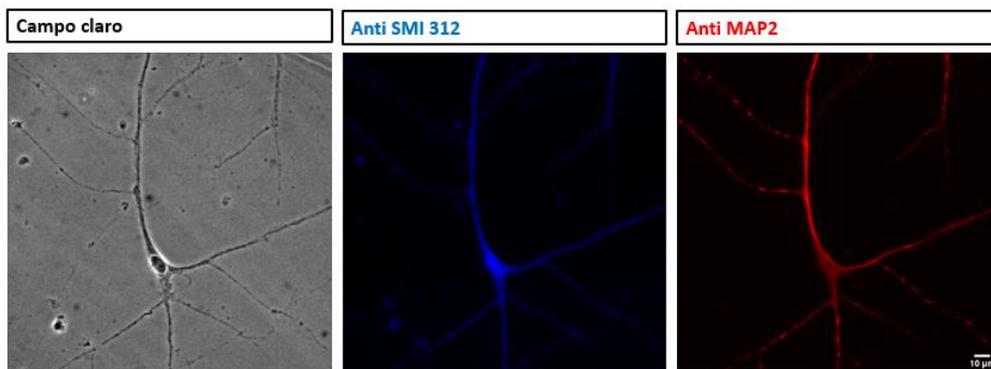


Figura 6. Imagen representativas de un cultivo de neuronas de hipocampo con el método de Banker de 15 DIV. Objetivo: 40x. Escala: 10 μ m.

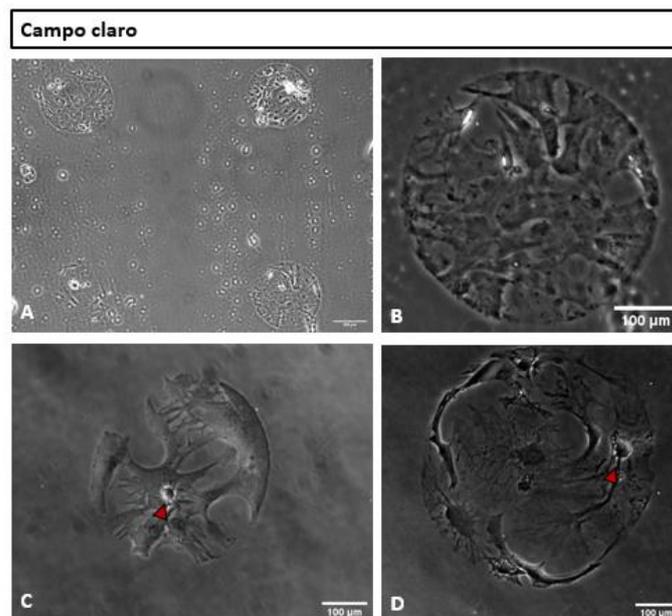


Figura 7. Imagen de patrón de microáreas de células gliales en un cultivo autáptico. A) Cuatro microáreas de células gliales sin neuronas. Objetivo: 10x. Escala: 100 μ m. B) Microárea de células gliales individual sin neurona. Objetivo: 10x. Escala: 100 μ m. C y D) Ejemplos de microárea de células gliales individual con una neurona señaladas por un triángulo rojo. Objetivo: 10x. Escala: 100 μ m.

Estas imágenes demuestran que se han conseguido establecer tres tipos de cultivos neuronales por primera vez en el laboratorio siguiendo los procedimientos presentados en el apartado de *Material y Métodos*.

6.2 Inmunofluorescencia de cultivos neuronales

Antes de llevar a cabo los distintos marcajes de inmunofluorescencia con Anti-VNUT (Gp) y anti-MAP2 (Ch), anti-SMI312 (Mo), se realizaron controles negativos en los que las muestras de cultivos primarios se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-Mouse 405, anti-Guinea Pig 488 y anti-Chicken Rhodamine Red, siguiendo el procedimiento indicado en material y métodos. Para poder localizar el plano focal en el que se encuentran las células de los controles negativos, los cubreobjetos se montaron con MOWIOL-DAPI. En paralelo, se realizó una inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo con los anticuerpos primarios y secundarios mencionados anteriormente.



Figura 8. Control de anticuerpo secundario en neuronas de hipocampo en cultivo por el método de Banker. Objetivo: 40x. Escala: 10 µm. Las condiciones de análisis de estas imágenes fueron las mismas que las establecidas en las imágenes de la figura 9. El montaje de la muestra se realizó en presencia de DAPI.

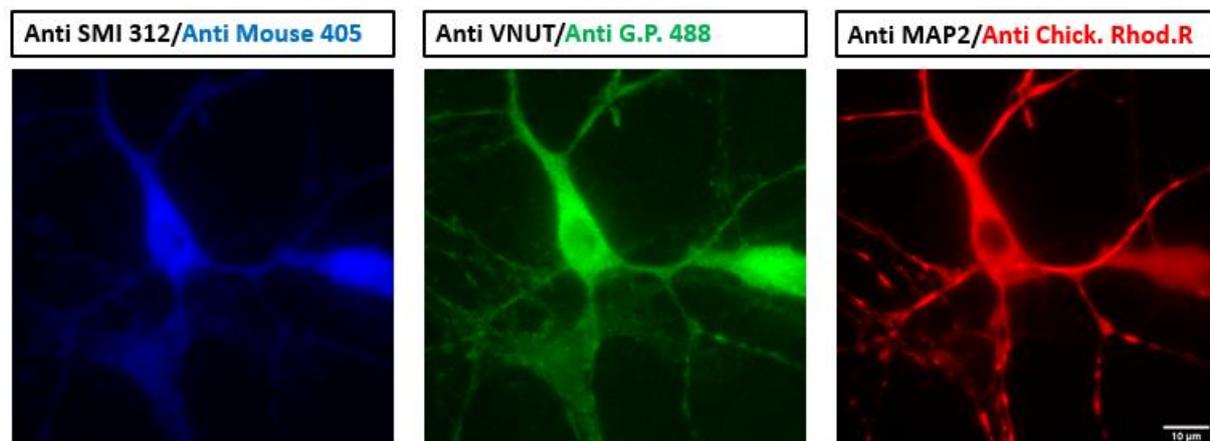


Figura 9. Imágenes de inmunofluorescencia realizada en neuronas de hipocampo en cultivo por el método de Banker. Objetivo: 100x. Escala: 10 µm. Las condiciones de análisis de estas imágenes fueron las mismas que las establecidas en la figura 8.

La comparativa entre las figura 8 y 9, indica que no se detecta señal de fluorescencia en cultivos neuronales incubando sólo con anticuerpos secundarios. Prueba de que la señal analizada en las imágenes de este trabajo es específica del marcaje de cada anticuerpo primario. Este control negativo de las inmunofluorescencias se realizó también para el marcaje con anti-VGLUT (Rb) y anti-VGAT (Rb), tampoco se detectó señal inespecífica.

6.3 Los astrocitos y la microglía en cultivo presentan VNUT

Para el estudio de la localización subcelular de VNUT en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, hay que tener en cuenta que en dichos cultivos existen otros tipos celulares como astrocitos y microglía que expresan *SLC17A9*. Para comprobarlo, se realizaron comarques para VNUT y proteínas establecidas como marcadores moleculares de astrocitos y microglía: la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba-1), respectivamente. Como se observa en las figuras 10 y 11, tanto para microglía como para astrocitos se detectó presencia de VNUT. Sin embargo, como se ve en la figura 10, hay ciertas células con señal para VNUT, pero no para GFAP, puede que se trate de otro tipo de célula glial, que la presencia de GFAP no sea homogénea en la población de astrocitos, o que se trate de otros tipos celulares como células vasculares. Para el marcaje con Iba-1, se detectó señal en células que morfológicamente correspondían a microglía, además de otras células con menor señal que morfológicamente no se correspondían con microglía.

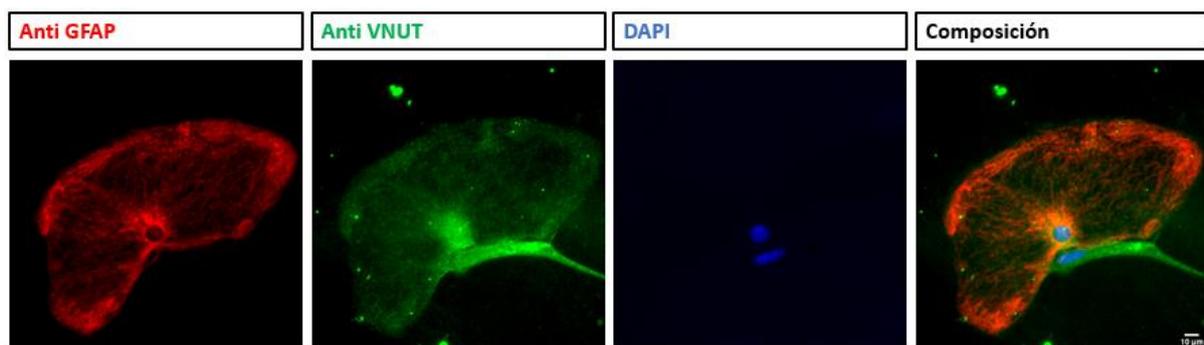


Figura 10. Imágenes de inmunofluorescencia de astrocitos corticales en cultivo. Objetivo 40x. Escala: 10 µm. En rojo GFAP como marcador de astrocitos, en verde VNUT y en azul DAPI.

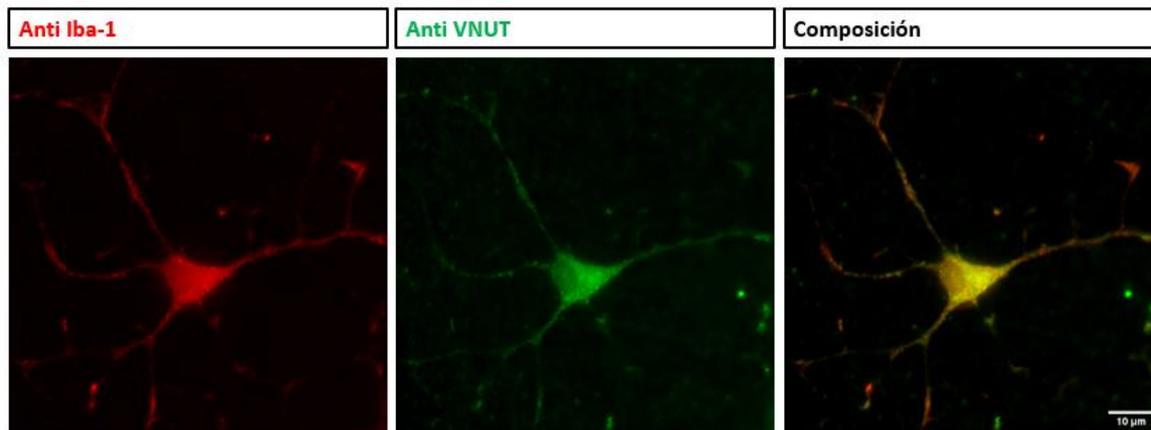


Figura 11. Imágenes de inmunofluorescencia de microglía en cultivo. Objetivo 100x. Escala: 10 µm. En rojo Iba-1 como marcador de astrocitos y en verde VNUT.

6.4 Localización subcelular de VNUT en neuronas de hipocampo

Para conocer la localización a nivel neuronal el transportador VNUT, se realizaron principalmente marcajes de inmunofluorescencia en cultivos continentales y método de Banker. Las imágenes obtenidas en los cultivos continentales presentaron una gran señal de fluorescencia que proviene del marcaje de VNUT de las células gliales que crecen bajo las neuronas, como se puede ver en la figuras anteriores 10 y 11. Debido a esto, se realizó un estudio comparativo entre imágenes obtenidas de cultivos continentales y con el método de Banker. En total se analizaron 75 imágenes: 31 campos de cultivos continentales (22 de ellos estudiados con un objetivo de 40x y 9 con uno de 100x) y 44 campos de cultivos por el método de Banker (22 con un objetivo de 40x y 23 con uno de 100x). Estas imágenes analizados pertenecen a, al menos, tres cultivos Banker y tres continentales. Como ejemplo representativo, en la figura 12.A. (continental) se puede observar la señal de fondo debido al marcaje de VNUT en células gliales, mientras que en la figura 12.B. (método de Banker) no se detecta fluorescencia de fondo y toda la señal detectada se puede asegurar que es de origen neuronal debido la ausencia de células gliales en el campo. Como los cultivos autópticos requieren células gliales para formar las microáreas, no se emplearán como modelo para el estudio por inmunofluorescencia de la localización subcelular de VNUT, pero serán de utilidad para otros objetivos del proyecto.

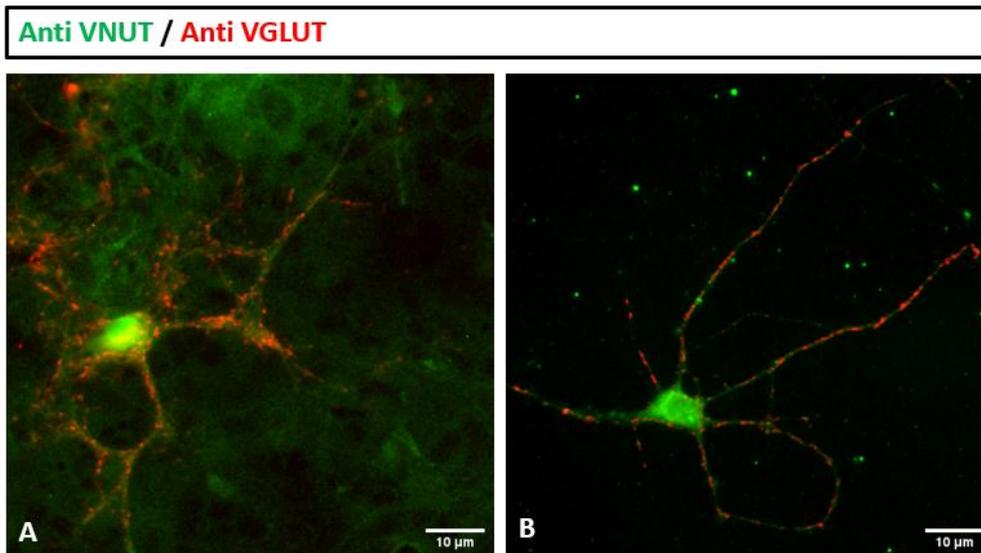


Figura 12. Imágenes de inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo 15 DIV. A) Neurona en cultivo continental. B) Neurona en cultivo con el método de Banker. Objetivo: 100x. Escala: 10 μm. En verde VNUT y en rojo VGLUT como marcador de terminales presinápticos excitatorios.

Tras estas observaciones, se optó por utilizar preferentemente los cultivos con el método de Banker, para obtener imágenes sin ruido de fondo que permitan estudiar la localización celular de VNUT, sin la señal proveniente de las células gliales.

El total de imágenes obtenidas para inmunofluorescencias realizadas en neuronas cultivadas por el método de Banker fue de 23 a 100x en las que había al menos una neurona. Las imágenes que se muestran a continuación son representativas de los campos analizados, que se emplearon para un análisis descriptivo.

Por medio de comarcajes de VNUT y otras proteínas que son propias de diferentes compartimentos neuronales, se analizó la distribución del transportador a nivel neuronal en todas las imágenes obtenidas de inmunofluorescencias en cultivos por el método de Banker.

La proteína asociada a microtúbulos, MAP2, se encuentra restringida a la región somato-dendrítica de las neuronas, y sirve como marcador de estos compartimentos celulares. En el 100% de las imágenes analizadas (9 en total) para este marcaje, se aprecia señal positiva de VNUT, en verde, en zonas correspondientes a dendritas y somas, marcadas con MAP2 en rojo (Figura 13).

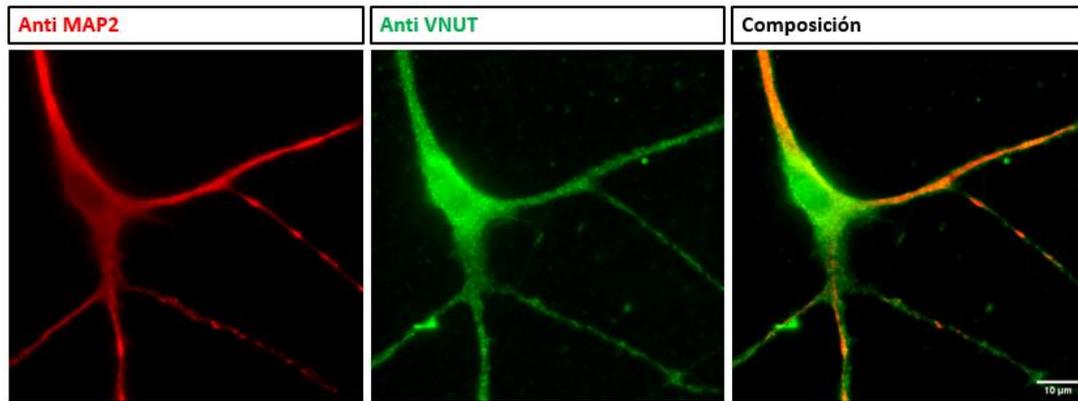


Figura 13. Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo 15 DIV. Objetivo: 100x. Escala 10µm. En verde VNUT y en rojo MAP2, que marca las regiones somáticas y dendríticas.

Además, se realizaron marcajes de proteínas axonales, utilizando anti-SMI 312, para estudiar la localización de VNUT en estas regiones de la neurona. Se detectó señal para el marcaje con anti-SMI 312. Sin embargo, los marcajes obtenidos para proteínas axonales no fueron los esperados. En la mayor parte de los casos, la fluorescencia obtenida para Anti-SMI 312 presenta el mismo patrón que la fluorescencia para Anti-MAP2, impidiendo la distinción entre dendritas y axones. Como ejemplo de esta situación se muestra en la figura 14 una neurona en cultivo de Banker, en la que se realizó un triple marcaje de MAP2, SMI 312 y VNUT. Con estas imágenes no se puede asegurar la presencia de VNUT en axones, debido a que la señal de fluorescencia detectada para MAP2 y SMI 312 se asemeja más a un patrón dendrítico que axonal.



Figura 14. Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de 15 DIV. Objetivo: 100x. Escala 10µm. En rojo MAP2 (marcador dendrítico y somático), en azul SMI 312 (marcador axonal) y en verde VNUT.

Aunque no se hayan conseguido marcar axones que no coincidan con marcaje dendrítico, el marcaje de otras regiones presinápticas como terminales excitatorio e inhibitorios, sí ha sido el esperado. Se realizaron también marcajes de proteínas propias de compartimentos presinápticos, como el transportador vesicular de glutamato (VGLUT) en terminales

excitatorios y el transportador vesicular de GABA (VGAT) en terminales inhibitorios.. Los terminales marcados con VGLUT (7 neuronas analizadas) o VGAT (6 neuronas analizadas) se encuentran en zonas adyacentes a las dendritas y el soma de las neuronas estudiadas. Mientras el marcaje de VNUT en dendritas y soma es evidente, no se ha encontrado señal de fluorescencia clara de VNUT que coincida con los terminales presinápticos en ninguna de las 13 imágenes obtenidas con un objetivo 100x.

En dichas imágenes se puede observar el marcaje esperado para los terminales presinápticos excitatorios (Figura 15) e inhibitorios (Figura 16). La mayoría de la señal fluorescente para estos terminales presinápticos se localizó adyacente a estructuras dendríticas y algunos sobre el soma. Mientras tanto, VNUT presenta una amplia distribución tanto somática como dendrítica (Figuras 15 y 16), sugiriendo que existen vesículas con este transportador que se encuentran en estos compartimentos neuronales, aunque a este nivel de resolución no sea posible distinguir un patrón vesicular claro.

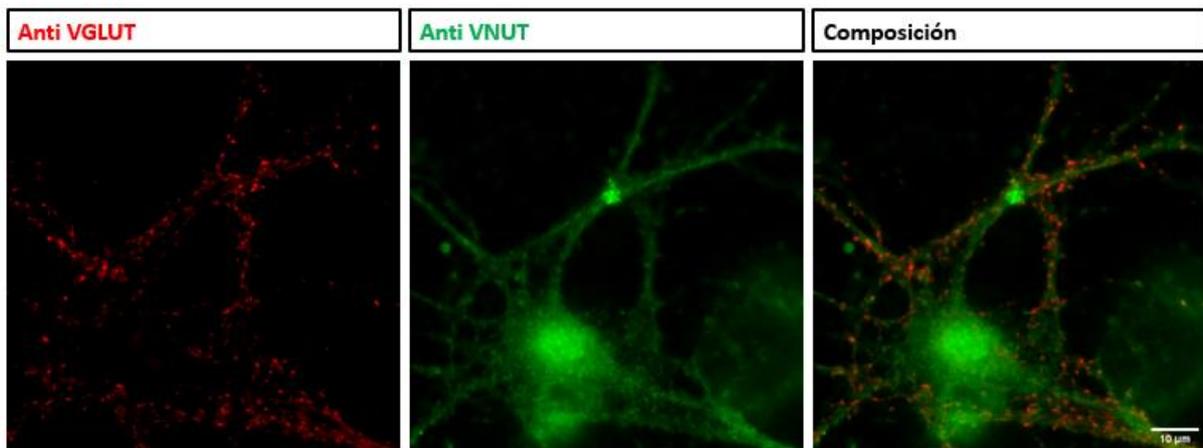


Figura 15. Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de 15 DIV. Objetivo: 100x. Escala 10μm. En rojo marcado VGLUT y en verde VNUT.

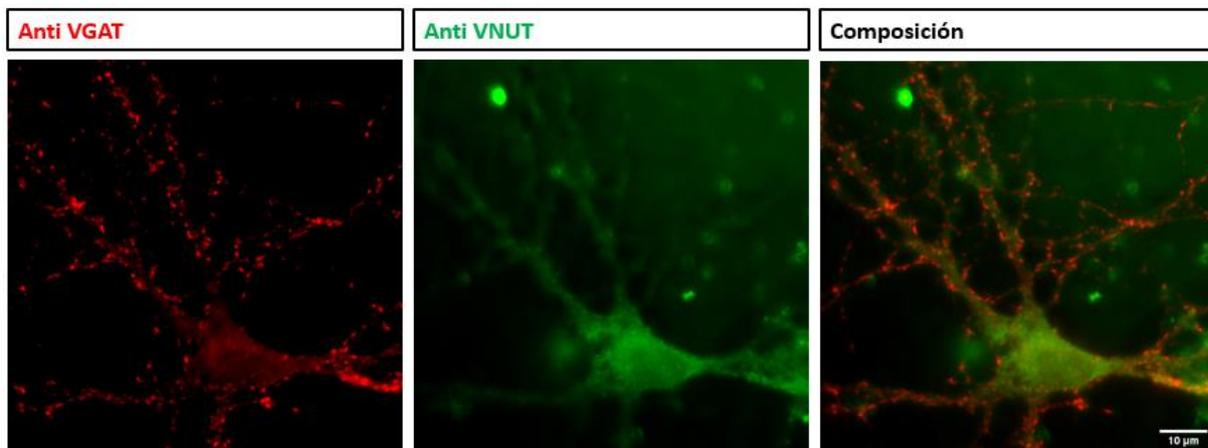


Figura 16. Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo de 15 DIV. Objetivo: 100x de inmersión. Escala 10μm. En rojo marcado VGAT y en verde VNUT.

Como resumen, los marcajes realizados en este trabajo muestran que VNUT es una proteína presente en diferentes tipos celulares del sistema nervioso central de ratón, como astrocitos, microglía y neuronas. Además, a nivel neuronal, este análisis descriptivo de las imágenes apunta a que la abundancia de este transportador vesicular es mayor en regiones dendríticas y somáticas, que en regiones axonales y terminales presinápticos.

7 Discusión

Los tres tipos de cultivo han sido establecidos con éxito por primera vez en el laboratorio. No obstante, por las diferencias de complejidad entre ellos, la inversión en material y tiempo no ha sido la misma. Los más sencillos de poner a punto fueron los cultivos continentales. En el caso de los cultivos con el método de Banker, los varios pasos de manejo para lograr colocar cubreobjetos en pocillos con astrocitos ya sembrados han sido una fuente de contaminaciones microbianas frecuentes. Estos pasos se fueron corrigiendo y actualmente se han solventado los problemas de contaminación. Los cultivos autópticos fueron los últimos en establecerse, por un bajo rendimiento en la formación de microáreas de sustrato permisivo en los primeros intentos. Finalmente se consiguió mejorar dicho rendimiento reduciendo el tiempo a 5 minutos de exposición a luz ultravioleta durante la esterilización de los cubreobjetos.

Las células gliales, y sobre todo astrocitos, son esenciales para el mantenimiento de neuronas en cultivo. Sin embargo, para la localización a nivel neuronal de una proteína presente tanto en neuronas como en células gliales, como VNUT, es un inconveniente. Los cultivos con el método de Banker son una herramienta clave en esta situación, ya que permiten el desarrollo de neuronas sin que haya un fondo de células gliales en las que también se detecta la presencia de VNUT por microscopía de epifluorescencia. En la literatura se había mostrado la presencia de VNUT por medio de imágenes de inmunofluorescencias, tanto en microglía (Imura et al., 2013) como en astrocitos (Oya et al., 2013). Esto se ha observado también en las inmunofluorescencias realizadas en este trabajo. El desarrollo de cultivos por el método de Banker se realizó en paralelo con el de cultivos continentales desde el principio de este trabajo, para poder comparar y decidir cuál de ellos era el más adecuado para responder a los objetivos planteados.

Una vez establecidos los cultivos por el método de Banker como herramienta para la obtención de imágenes, el análisis de la señal de fluorescencia recogida en estas imágenes muestra una clara localización del transportador en regiones como somas y dendritas. En este trabajo no se ha indagado sobre el tipo de vesícula en la que se encuentra VNUT en neuronas de hipocampo. Aunque en otros estudios se ha conseguido marcar VNUT en vesículas

sinápticas (Larsson et al., 2012), VNUT parece estar también en otros tipos vesiculares. Un de los compartimentos posibles son los lisosomas, ya que se ha encontrado colocación de proteínas lisosomales con VNUT tanto en astrocitos (Beckel et al., 2018), como en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Jung et al., 2015). Una de las posibilidades para continuar con esta línea de trabajo sería realizar comarques de VNUT con otros marcadores vesiculares como LAMP-1 (Proteína Lisosomal Asociada a Membrana) o NPY (Neuropéptido Y), como marcador de vesículas secretoras de núcleo denso.

A pesar de las complicaciones a la hora de detectar VNUT en axones, y no haber encontrado una localización clara de VNUT en terminales presinápticos, estos resultados no excluyen al transportador de estos compartimentos neuronales. Larsson (2012), por medio de inmunomarcaje con partículas de oro y microscopía electrónica en rodajas de tejido, consiguió detectar VNUT en vesículas sinápticas en axones y terminales inhibitorios y excitatorios de neuronas de hipocampo. Posiblemente, los métodos utilizados en este trabajo no tienen la resolución suficiente para distinguir y detectar la señal de VNUT en terminales presinápticos en los que transportadores para otros neurotransmisores (GABA y glutamato) son más abundantes. Para futuros experimentos, se podrían mantener los cultivos con el método de Banker como modelo para el estudio *in vitro* de VNUT, pero utilizando mejores métodos para el estudio de proteínas a nivel vesicular, como la microscopía de superresolución.

Por último, aunque no se emplearon los cultivos autópticos para realizar inmunofluorescencias, serán de utilidad en el proyecto como modelo de estudio de la señalización purinérgica en neuronas excitatorias e inhibitorias de hipocampo. En cultivos autópticos es posible distinguir si una neurona es excitatoria o inhibitoria en función de si en los terminales se detecta VGAT o VGLUT, debido a que esa neurona establece sinapsis consigo misma (Bekkers, 2020). Esta cualidad los hace una herramienta idónea para estudios comparativos entre la señalización por exocitosis de ATP en neuronas excitatorias e inhibitorias de hipocampo.

Se ha conseguido registrar liberación por exocitosis de ATP en neuronas (Tompkins & Parsons, 2006), sin embargo, VNUT en comparación con otros transportadores de neurotransmisores no está bien caracterizado (Upmanyu et al., 2021). Esto resulta ser un inconveniente a la hora de encontrar bibliografía, pero una oportunidad como línea de investigación. En este caso se ha aprovechado la puesta a punto en laboratorio de los tres métodos de cultivo mencionados para obtener muestras neuronales y gliales en las que poder realizar marcaje por inmunofluorescencia de VNUT. Aunque las técnicas de detección no hayan sido las más adecuadas, ha permitido la recopilación de diversas imágenes de

inmunofluorescencia que aportan información valiosa en el estudio de la localización de VNUT a nivel neuronal, una línea de trabajo emergente en el laboratorio.

8 Conclusiones:

1. De los tres tipos de cultivos establecidos en el laboratorio, el más idóneo para estudiar el transportador de nucleótidos vesicular (VNUT) en neuronas de hipocampo es el cultivo por el método de Banker. Permite estudiar el marcaje de VNUT en neuronas, sin señal procedente de VNUT en células gliales.
2. Los resultados obtenidos muestran presencia de VNUT en neuronas, astrocitos y microglía. Indicativo de la importancia de la señalización purinérgica en el tejido nervioso, aunque supone una dificultad si se quiere estudiar VNUT sólo a nivel neuronal.
3. El total de las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias en las que se marcaron proteínas dendríticas-somáticas (MAP2) y VNUT, muestran la presencia del transportador en estos compartimentos. Sin embargo, el tipo de vesícula en el que se encuentra el transportador aún no está clara y es necesario continuar con el estudio.
4. El marcaje de los axones no fue el esperado, lo que dificultó determinar la presencia y distribución de VNUT en estos compartimentos. Sin embargo, la detección de compartimentos presinápticos como los terminales son indicadores de que en estos cultivos las neuronas llegan a desarrollar sinapsis, y por tanto axones.
5. En los terminales presinápticos no se ha detectado un marcaje claro de VNUT. Posiblemente debido a un límite resolutivo de los métodos de detección empleados y no a la ausencia del transportador en estos compartimentos. Probablemente, la diferencia de cantidad en los terminales de VNUT frente a transportadores para neurotransmisores como GABA o glutamato, supone un límite para los métodos de detección empleados.

9 Conclusiones:

1. Of the three types of cultures established in the laboratory, the most suitable for studying the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in hippocampal neurons is the Banker culture

method. It allows the study of VNUT labelled in neurons, without signal from VNUT in glial cells.

2. The results obtained show the presence of VNUT in neurons, astrocytes and microglia. This indicates the importance of purinergic signaling in nervous tissue, but it is a difficulty for the study of VNUT at the neuronal level.
3. The total of the images obtained from immunofluorescence in which dendritic-somatic proteins (MAP2) and VNUT were labeled, show the presence of the transporter in these compartments. However, the type of vesicle in which the transporter is located is still unclear and further studies are necessary.
4. Axon labeling was not as expected, making it difficult to distinguish the presence and distribution of VNUTs in these compartments. However, the detection of other presynaptic regions such as VGAT-positive and VNUT-positive terminals is indicative of neurons forming synapses in culture, and therefore axons.
5. No clear labeling of VNUT was detected in the presynaptic terminals, possibly due to a resolution limit of the detection methods used and not to the absence of the transporter in these compartments. Probably, the difference in the amount of VNUT in the terminals versus transporters for neurotransmitters such as GABA or glutamate, is a limit to the detection methods used.

10 Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis tutores Natalia y Marcial, que me han guiado en la realización de este trabajo que tanto he disfrutado. A mi familia y a mis amigos, en especial a Luis y a Carla. A la gente del departamento de Farmacología por su hospitalidad. Por último, quería agradecer al Departamento de Biología Celular, al Departamento de Anatomía y al Departamento de Fisiología, por la cesión de anticuerpos que han sido claves en la realización de este trabajo.

11 Bibliografía

- Banker, G., & Kaech, S. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406-2415. 10.1038/nprot.2006.356
- Beckel, J. M., Gómez, N. M., Lu, W., Campagno, K. E., Nabet, B., Albalawi, F., Lim, J. C., Boesze-Battaglia, K., & Mitchell, C. H. (2018). *Stimulation of TLR3 triggers release of lysosomal ATP in astrocytes and epithelial cells that requires TRPML1 channels*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/s41598-018-23877-3
- Bekkers, J. M. (2020). Autaptic Cultures: Methods and Applications. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 18. 10.3389/fnsyn.2020.00018
- Borges, R. (2012). The ATP or the natural history of neurotransmission. *Purinergic Signalling*, 9(1), 5-6. 10.1007/s11302-012-9330-7
- Burgalossi, A., Jung, S., Mimi Man Kwun-nok, Nair, R., Jockusch, W. J., Wojcik, S. M., Brose Nils, & Rhee, J. (2012). Analysis of neurotransmitter release mechanisms by photolysis of caged Ca²⁺ in an autaptic neuron culture system. *Nature Protocols*, 7, 1351-1365.
- Chen, J., Tan, Z., Zeng, L., Zhang, X., He, Y., Gao, W., Wu, X., Li, Y., Bu, B., Wang, W., & Duan, S. (2013). Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia*, 61(2), 178-191. 10.1002/glia.22425
- Estévez-Herrera, J., Domínguez, N., Pardo, M. R., González-Santana, A., Westhead, E. W., Borges, R., & Machado, J. D. (2016). *ATP: The crucial component of secretory vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 10.1073/pnas.1600690113
- Hirbec, H., Déglon, N., Foo, L. C., Goshen, I., Grutzendler, J. J., Hangen, E., Kreisel, T., Linck, N., Muffat, J., Regio, S. S., Rion, S., & Escartin, C. (2020). *Emerging technologies to study glial cells*. Wiley. 10.1002/glia.23780
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., & Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia*, 61(8), 1320-1330. 10.1002/glia.22517
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861-1867. 10.1016/j.biocel.2004.02.023
- Jones, E. V., Cook, D., & Murai, K. K. (2011). A Neuron-Astrocyte Co-Culture System to Investigate Astrocyte-Secreted Factors in Mouse Neuronal Development. *Astrocytes* (pp. 341-352). Humana Press. 10.1007/978-1-61779-452-0_22
- Jung, J., Shin, Y. H., Konishi, H., Lee, S. J., & Kiyama, H. (2013). Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(2), 488-493. 10.1016/j.bbrc.2012.12.009
- Jung, J., Uesugi, N., Jeong, N. Y., Park, B. S., Konishi, H., & Kiyama, H. (2015). Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury. *Neuroscience*, 313, 10-22. 10.1016/j.neuroscience.2015.11.028
- Khakh, B. S., & Burnstock, G. (2009, Dec 01,). THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Scientific American*, 301, 84-93. 10.1038/scientificamerican1209-84

- Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P. G., & Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP From Astrocytes Modulates Phasic and Tonic Inhibition in the Neocortex. *PLoS Biology*, *12*(1), e1001747. 10.1371/journal.pbio.1001747
- Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., & Gundersen, V. (2012). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex*, *22*(5), 1203-1214. 10.1093/cercor/bhr203
- Lin, J. H. C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A., Nedergaard, M., Nedergaard, M., & Author, D. B. (2000). *Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis NIH Public Access Author Manuscript*. McKay.
- Liu, H., Toychiev, A. H., Takahashi, N., Sabirov, R. Z., & Okada, Y. (2008). Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Research*, *18*(5), 558-565. 10.1038/cr.2008.49
- Markiewicz, I., & Lukomska, B. (2006). The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *66*(4), 343-358.
- Menéndez-Méndez, A., Díaz-Hernández, J. I., Ortega, F., Gualix, J., Gómez-Villafuertes, R., & Miras-Portugal, M. T. (2017). *Specific Temporal Distribution and Subcellular Localization of a Functional Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Cerebellar Granule Neurons*. *Frontiers Media SA*. 10.3389/fphar.2017.00951
- Miras-Portugal, M. T., Menéndez-Méndez, A., Gómez-Villafuertes, R., Ortega, F., Delicado, E. G., Pérez-Sen, R., & Gualix, J. (2019). *Physiopathological Role of the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in the Central Nervous System: Relevance of the Vesicular Nucleotide Release as a Potential Therapeutic Target*. *Frontiers Media SA*. 10.3389/fncel.2019.00224
- Moriyama, Y., & Nomura, M. (2018). Clodronate: A Vesicular ATP Release Blocker. *Trends in Pharmacological Sciences (Regular Ed.)*, *39*(1), 13-23. 10.1016/j.tips.2017.10.007
- North, R. A. (2016). P2X receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1700), 20150427. 10.1098/rstb.2015.0427
- Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K., & Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *438*(1), 145-151. 10.1016/j.bbrc.2013.07.043
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv*, *452*(5), 589-597. 10.1007/s00424-006-0061-x
- Petrelli, F., & Bezzi, P. (2015). Novel insights into gliotransmitters. *Current Opinion in Pharmacology*, *26*, 138-145. 10.1016/j.coph.2015.11.010
- Pietrowski, M. J., Gabr, A. A., Kozlov, S., Blum, D., Halle, A., & Carvalho, K. (2021). Glial Purinergic Signaling in Neurodegeneration. *Frontiers in Neurology*, *12*, 654850. 10.3389/fneur.2021.654850
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008). Identification of a Vesicular Nucleotide Transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, *105*(15), 5683-5686. 10.1073/pnas.0800141105

- Sreedharan, S., Shaik, J. H. A., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2010). Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics*, *11*(1), 17. 10.1186/1471-2164-11-17
- Tompkins, J. D., & Parsons, R. L. (2006). Exocytotic release of ATP and activation of P2X receptors in dissociated guinea pig stellate neurons. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *291*(5), 1062-1071. 10.1152/ajpcell.00472.2005
- Upmanyu, N., Jin, J., Von Der Emde, H., Ganzella, M., Bösche, L., Malviya, V. N., Zhuleku, E., Politi, A., Ninov, M., Silber, I., Leutenegger, M., Urlaub, H., Riedel, D., Preobraschenski, J., Milosevic, I., Hell, S. W., Jahn, R., & Sambandan, S. (2021). *Co-localization of different neurotransmitter transporters on synaptic vesicles is sparse except of VGLUT1 and ZnT3*. Cold Spring Harbor Laboratory. 10.1101/2021.06.30.449903
- Verderio, C., Cagnoli, C., Bergami, M., Francolini, M., Schenk, U., Colombo, A., Riganti, L., Frassoni, C., Zuccaro, E., Danglot, L., Wilhelm, C., Galli, T., Canossa, M., & Matteoli, M. (2012). TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biology of the Cell*, *104*(4), 213-228. 10.1111/boc.201100070
- Yu, X., Nagai, J., & Khakh, B. S. (2020). *Improved tools to study astrocytes*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/s41583-020-0264-8