

## **3. MATERIALS I MÈTODES**



### 3.- MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1.- Materials

##### *Material per a cultius*

Els ratolins NMRI per als cultius primaris van ser comprats a Iffa Credo (St. Germain-sur-l'Arbestre, França). Les plaques de cultiu es van obtenir de Costar (Corning Science Products, Acton, MA, EUA) i els portes de 8 pouets de Permanox de Nunc Ltd. (Roskilde, Dinamarca). El sèrum fetal boví es va obtenir de Gibco (Invitrogen, Barcelona, Espanya) i el medi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Biochrom KG (Berlín, Alemanya). La poli-L-lisina, la uridina, la 5-fluoro-2'-deoxiuridina, la penicil·lina G, la insulina, l'àcid p-aminobenzoic, la tripsina, l'inhibidor de la tripsina, la DNAsa i l'àcid kaínic van ser comprats a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

##### *Radioactivitat*

El D-[2,3-<sup>3</sup>H]-aspartat (27 Ci/mmol) era d'Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, Regne Unit), el <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> (13.5 - 16 mCi/g) de American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, EUA) i d'Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, Regne Unit). El [<sup>35</sup>S]-t-butilbiciclofosforotinat ([<sup>35</sup>S]TBPS) (85 Ci/mmol) i el [<sup>3</sup>H]MK-801 (12 Ci/mmol) eren de NEN-Perkin Elmer, Life Science, Inc (MA, EUA). El còctel líquid de centelleig Optiphase "Hisafe"2 era de Wallac Oy (Turku, Finlàndia).

##### *Fàrmacs*

La veratridina, l'àcid L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílic (L-tPDC), l'àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic (DIDS), l'àcid niflúmic, la bumetanida, el glutamat, l'àcid  $\gamma$ -amino-n-butíric (GABA), la glicina, l'àcid N-Metil-D-Aspàrtic (NMDA), la picrotoxinina, la bicucul·lina, el MK-801, el riluzole, el tamoxifèn, l'àcid 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoic (NPPB), el bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT), la 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina hidrocloreur (roig neutre), la glutamat-piruvat transaminasa (GPT), l'àcid pirúvic, el piridoxal fosfat, i el offtaldialdehid eren de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El DL-treo- $\beta$ -benziloxiaspartat (TBOA), l'àcid D-2-amino-5-fosfopentanoic (D-AP5) i l'àcid 9-antracecarboxílic eren de Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). El dieldrín era de LGC (Teddington Middlesex, Regne Unit).

### *Anticossos i sondes fluorescentes*

El Fluo-3 AM, el iodur de propidi, l'ionòfor A23187, i els anticossos conjugats anti-conill Alexa 488 i anti-ratolí Alexa 546 fets en cabra, van ser obtinguts de Molecular Probes (Leiden, Holanda). L'anticòs policlonal anti-GAD67 fet en conill era de Chemicon International Inc. (Temecula, CA, EUA) i l'anticòs monoclonal anti-VGLUT1 fet en ratolí era de Synaptic Systems (Göttingen, Alemanya).

La resta de reactius d'ús comú al laboratori foren obtinguts de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), Merk (Darmstaad, Alemanya) i Panreac (Barcelona, Espanya).

## **3.2.-Mètodes**

### **Ús d'animals d'experimentació**

Per tal de treballar amb animals d'experimentació, es va realitzar el curs de "Formació per a personal investigador usuari d'animals per a experimentació i altres finalitats científiques" d'acord amb el que marca el Decret 214/1997 de la Generalitat de Catalunya i les recomanacions de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Els ratolins NMRI es van manipular segons protocols DMA 1827 i 1852 d'acord amb les directrius de la Unió Europea i aprovats per la Generalitat de Catalunya.

#### **3.2.1.-Cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí**

El protocol per a l'elaboració d'aquests cultius va ser el descrit per Schousboe *et al.* (1989). S'utilitzaren per a cada cultiu els cerebels d'una ventrada de 10 ratolins NMRI de 7 dies post-natals sacrificats per decapitació. Els cerebels es dissociaren primer per tripsinització (0.25 g/l tripsina) durant 15 min a 37 °C amb agitació i posteriorment per trituració amb una cànula metàl·lica en una solució que contenia DNAsa (0.004 % pes/volum) i inhibidor de tripsina (0.05 % pes/volum). Les cèl·lules es resuspengueren en medi DMEM que contenia 25 mM KCl, 31 mM glucosa i 0.2 mM glutamina, suplementat amb p-aminobenzoat, insulina, penicil·lina i un 10 % de sèrum fetal boví (N-DMEM). Es sembrà a una densitat de  $1.6 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en plaques de 24 pous (0.5 ml/pou) que havien estat prèviament recobertes amb poli-L-lisina per a millorar l'adhesivitat de les cèl·lules. Els cultius s'incubaren a 36.8 °C en una atmosfera

humida amb 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire. Entre les 36 i 48 hores s'hi va afegir una barreja de 5 µM 5-fluoro-2'-desoxiuridina i 20 µM uridina per a aturar la proliferació glial. En els cultius tractats amb àcid kaïníc s'afegiren 50 µM de àcid kaïníc des de el dia 0 de cultiu. Els cultius s'utilitzaren de 8 a 13 dies in vitro.

### **3.2.2.- Cultius primaris de neurones corticals de ratolí**

El protocol utilitzat per a l'obtenció d'aquests cultius va ser el descrit per (Hertz *et al.* 1989). Per a cada cultiu s'utilitzaren els fetus de 17 dies d'una mare NMRI dels quals se'n va extreure el còrtex. El protocol utilitzat va ser pràcticament el mateix que per els cultius de cèl·lules granulars de cerebel excepte que la tripsinització es més suau (10 minuts amb 0.2 g/l 0.02 % pes /volum de tripsina).

### **3.2.3.- Tractament dels cultius neuronals**

#### **3.2.3.1.-Tractament amb veratridina**

Per a tractaments llargs amb veratridina (de fins a 24 hores) es va afegir una solució concentrada de veratridina en DMSO en el medi de cultiu essent la concentració final de DMSO del 1%. Els controls van ser tractats amb la mateixa concentració de DMSO.

Per als tractaments amb veratridina de 5 minuts els cultius es van incubar amb una solució salina tamponada amb HEPES (HBS) (136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 9 mM glucosa i 5 µM glicina, ajustada a pH 7.4) pre-escalfada a 37 °C i contenint la veratridina i els altres fàrmacs. Després dels 5 minuts d'exposició es recollia la solució HBS de cada pou i es posava altre vegada el mateix medi de cultiu N-DMEM en què les cèl·lules havien crescut, és a dir el medi ja condicionat per les cèl·lules. Els cultius es mantenien per 24 hores més a l'incubador abans de ser analitzat l'efecte citotòxic. Les solucions de HBS es mantenien congelades fins al moment del seu anàlisi en la HPLC. La solució HBS control contenia un 1 % de DMSO a l'igual que la de veratridina. A aquesta concentració el DMSO no modificà els paràmetres d'estudi.

#### **3.2.3.2.-Tractament amb potassi**

Els cultius es van incubar durant 5 minuts en solució HBS pre-escalfada a 37 °C, sobre una placa a 37 °C. Quan s'utilitzaren solucions despolaritzants, la concentració de KCl s'augmentava i la de NaCl es disminuïa per tal de mantenir l'osmolaritat de la solució. La solució lliure de magnesi es preparava ometent el MgCl<sub>2</sub> i la lliure de calci ometent el CaCl<sub>2</sub> i afegint 3 mM d' EGTA. Quan hi havia fàrmacs presents durant l'exposició a potassi aquests s'afegien a la solució HBS previ contacte amb els cultius. Després dels 5 minuts d'exposició es recollia la solució HBS de cada pou i es posava altre vegada el mateix medi de cultiu N-DMEM en què les cèl·lules havien crescut, és a dir el medi ja condicionat per les cèl·lules. Els cultius es mantenien per 24 hores més a l'incubador abans de ser analitzat l'efecte citotòxic. Les solucions de HBS es mantenien congelades fins al moment del seu anàlisi per cromatografia líquida. L'àcid niflúmic, el DIDS, la bumetanida, el NPPB i el dieldrín es dissolien en DMSO, la concentració final de DMSO en la solució HBS era en aquests casos del 0.2 % i els respectius controls contenien la mateixa quantitat de DMSO.

#### 3.2.3.3.-Tractament amb dieldrín

Per al tractament de cada cultiu diferent, es preparava una solució mare nova de dieldrín en DMSO. La concentració final de DMSO en el medi de cultiu era 0.2 %. Les cèl·lules control eren tractades amb la mateixa concentració de DMSO. Els diferents tractaments (control i diferents concentracions de dieldrín) es realitzaren en plaques de cultiu independents per tal d'evitar la contaminació creuada entre pous en la mateixa placa de cultiu.

Es van realitzar dos tractaments diferents amb dieldrín: un tractament de 10 minuts de durada, al que ens referim com a "tractament agut", i un tractament més llarg que va consistir en tractar els cultius amb dieldrín als 2 dies *in vitro* i mantenir-los en el mateix medi de cultiu fins als 8 - 12 dies *in vitro* (de 6 a 10 dies de tractament). Anomenem aquest últim tractament com a "tractament perllongat".

#### 3.2.4.- Determinació de la concentració de plaguicides organoclorats en el medi de cultiu

Es va determinar la concentració dels plaguicides organoclorats dieldrín,  $\alpha$ -endosulfan i lindà en medi de cultiu després d'haver estat 24 hores i 8 dies a 37°C. Per això es van preparar solucions concentrades dels plaguicides en DMSO i es van posar al

medi de cultiu a una concentració de 6 µM (0.2 % de DMSO). Al temps descrits es va fer l'extracció dels plaguicides en hexà (volum d'hexà 1:1 amb el medi de cultiu). L'extracció va consistir en agitació durant 20 minuts, congelació a -80 ° C i centrifugació a 1520 g durant 10 minuts per a separar l'hexà del medi de cultiu. Les mostres van ser analitzades per cromatografia de gasos acoblada amb espectrometria de masses amb mode d'impacte electrònic al Departament de Química Ambiental del Centre d'Investigació i Desenvolupament (CSIC).

### 3.2.5.- Quantificació de glutamat i GABA alliberat

La quantificació de glutamat i de GABA es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció fluorimètrica (Waters, Milford, MA, EUA i Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). 100 µl de mostra eren derivatitzats amb 15 µl de o-ftaldialdehid i 80 µl d'aquests separats per fase reversa en una columna C18 (Tracer Nucleosil C18, tamany de partícula de 5 µm, 10 x 0.4 cm; Teknokroma, Espanya). La detecció fluorimètrica es va fer a 360 nm/450 nm (Suñol *et al.* 1988 amb modificacions). Per a la detecció de glutamat, la fase mòbil consistia en una solució de 0.1 M d'acetat sòdic i 5.5 mM de trietilamina portada a pH 5.5 amb àcid ortofosfòric i amb un 10 % d'acetonitril a flux 0.8 ml/min. El glutamat elueix als 8-10 minuts i al minut 17 es realitza un gradient d'acetonitril fins al 70 %. La fase mòbil per a la determinació de GABA consisteix en un tampó d'acetat sòdic 0.1 M, 5.5 mM de trietilamina ajustat a pH 3.15 amb àcid ortofosfòric i contenint un 26.8 % d'acetonitril a un flux de 0.8 ml/min. La concentració del neurotransmissor es va calcular mitjançant una recta patró feta amb estàndards de glutamat i de GABA.

### 3.2.6.-Degradació enzimàtica de glutamat

Per tal d'eliminar in situ el glutamat alliberat per les cèl·lules granulars de cerebel al ser exposades a concentracions de alt K<sup>+</sup>, es van afegir 5 U/ml GPT (glutamat piruvat transaminasa o alanina aminotransferasa), 10 mM de piruvat i 10 µM de piridoxal-L-fosfat a la solució HBS amb alt K<sup>+</sup> (41.4 mM NaCl, 100 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 9 mM glucosa i 5 µM glicina, ajustada a pH 7.4). La GPT catalitza la següent reacció que en les condicions utilitzades està fortament desplaçada cap a l'eliminació de glutamat: (Matthews *et al.* 2000a).



Després dels 5 minuts d'exposició la solució HBS es recollí amb àcid perclòric (concentració final 42 mM) per tal d'aturar la reacció. El glutamat present en aquesta solució es va analitzar posteriorment per HPLC després de neutralitzar la solució amb NaOH.

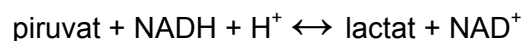
### **3.2.7.-Quantificació del glutamat, aspartat i GABA present en els cultius.**

Per a la quantificació dels aminoàcids intracel·lulars, es van rentar els cultius tres vegades amb solució HBS i es van rascar les cèl·lules amb 0.5 ml d'àcid perclòric 0.25 M. El disgregat cel·lular amb àcid perclòric es va recollir en tubs i es sonicà en fred al bany d'ultrasons durant 30 minuts. La suspensió obtinguda es centrifugà a 16100 g durant 10 minuts a 4 °C. El sobrenadant es congelà fins al moment de la quantificació dels aminoàcids per HPLC i el pel·let es resuspengué amb 250 µl de NaOH per a quantificar-ne les proteïnes. La solució d'àcid perclòric va ser neutralitzada amb NaOH abans de la seva quantificació en la HPLC.

### **3.2.8.-Anàlisi de la viabilitat cel·lular**

#### **3.2.8.1.-Assaig d'alliberament de LDH**

Aquest assaig consisteix en mesurar l'activitat de l'enzim citosòlic lactat deshidrogenasa (LDH). La seva presència al medi és indicativa de cèl·lules amb la membrana cel·lular danyada. L'activitat de l'enzim es mesura per la disminució d'absorbància a 340 nm, indicativa de l'oxidació del NADH en la següent reacció catalitzada per la LDH i que en les condicions utilitzades (0.19 mM piruvat i 34 µM NADH) està fortament desplaçada cap a la dreta:



Per a obtenir el % de LDH alliberat respecte el total, es mesurà la LDH en el medi de cultiu i en el llistat de cèl·lules, restant els blancs respectius, i es calculà com a la LDH del medi respecte el total. En el cas de la despolarització amb K<sup>+</sup> es mesurà també la LDH de la solució HBS amb K<sup>+</sup> i es sumà a la del medi.

#### **3.2.8.2.-Assaig de reducció del MTT**



Aquest és un assaig colorimètric basat en la incubació de les cèl·lules amb bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT). El MTT és captat per les cèl·lules per endocitosis i reduït a una salt de formazan insoluble. Si bé s'ha considerat que la reducció del MTT a formazan es dona en les mitocòndries, s'ha descrit també la seva reducció en d'altres compartiments cel·lulars (Liu *et al.* 1997).

Aquest assaig va ser fet seguint el protocol descrit per Vale *et al.* (1998). Els cultius es van rentar 3 vegades amb 0.5 ml per pou de solució HBS i s'incubaren a 37 °C durant 15 minuts amb una solució de MTT (250 µg/ml) dissolt en solució HBS. Posteriorment s'enretirà cuidadosament l'excés de MTT i es disgregaren les cèl·lules amb SDS al 5 %. El blanc es va fer incubant les cèl·lules amb la solució HBS sense el MTT. L'absorvència de la solució es mesurà en plaques de 96 pous amb 3 µl d'isopropanol a 560 nm en un lector de plaques (iEMS Reader MF; Labsystems; Hèlsinki, Finlàndia).

### 3.2.8.3.-Assaig del roig neutre

El roig neutre és un colorant catiònic feble que penetra la membrana cel·lular per difusió no-iònica i s'uneix a la matriu intracel·lular dels lisosomes. Les cèl·lules mortes o danyades no poden retenir el colorant després dels processos de rentat i de fixació.

Aquest assaig es va dur a terme seguint el protocol descrit per Babich i Borenfreund (1991). Els cultius es van rentar 3 vegades amb solució HBS i es van incubar amb una solució de 50 µg/ml de roig neutre dissolt en solució HBS durant 3 hores a 37 °C. Després de rentar les cèl·lules s'afegí una solució de 1% acètic i 50 % etanol per a extreure el colorant de dins les cèl·lules. L'absorvència d'aquesta solució es mesurà en plaques de 96 pous a 540 nm en un lector de plaques (iEMS Reader MF; Labsystems; Hèlsinki, Finlàndia).

### 3.2.9.- Determinació de peroxidació lipídica

La peroxidació lipídica es va determinar mesurant els nivells de 8-isoprostà en el medi de cultiu, utilitzant un kit d'ELISA (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA), després de l'exposició dels cultius durant 6-10 dies a DMSO o a dieldrín 3 µM. Les mostres es van recollir amb un 0.005 % de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol i es van congelar immediatament a -80°C fins al moment del seu anàlisi seguint les instruccions del fabricant.

### 3.2.10.-Quantificació de proteïnes dels cultius cel·lulars

Per a quantificar les proteïnes es va utilitzar el reactiu comercial de Bio-Rad basat en el mètode de Bradford. Es basa en què el màxim d'absorció d'una solució àcida de Comassie Brilliant Blue G-250 canvia de 465 (ataronjat) a 595 (blavós) nm quan s'uneix a proteïnes. Les mostres es diluïren en una placa de 96 pous i al addicionar el reactiu es formà un complex que es mesurà a 595 nm en un lector de plaques (iEMS Reader MF; Labsystems; Hèlsinki, Finlàndia). La concentració de proteïna s'obté per interpolació en una recta patró d'albumina de sèrum boví preparada en cada assaig.

### 3.2.11.-Flux de clorur

El flux de clorur es va determinar mitjançant l'assaig de captació de  $^{36}\text{Cl}^-$  en cèl·lules intactes.

Per a determinar l'entrada de  $\text{Cl}^-$  induïda per alta concentració de potassi extracel·lular ( $[\text{K}^+]_e$ ), es van rentar les cèl·lules amb solució HBS contenint 25 mM  $\text{K}^+$  i posteriorment es van incubar durant 5 minuts a 36 °C amb la solució HBS contenint 25 o 100 mM de  $\text{K}^+$  més  $^{36}\text{Cl}^-$  (0.7-3  $\mu\text{Ci/ml}$ ) en presència/absència dels bloquejants de canals de clorur.

L'entrada de  $\text{Cl}^-$  induïda per GABA es va determinar segons el protocol descrit per Vale *et al.* (2003) i García *et al.* (2005). Es va substituir el medi de cultiu per una solució salina tamponada contenint (en mM): 116 NaCl, 0.8  $\text{MgSO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{NaHPO}_4$ , 15.2  $\text{NaHCO}_3$  i 5.5 glucosa, ajustada a pH 7.4. Amb aquesta solució es van fer dues pre-incubacions de 30 i 15 minuts a 36.8 °C en una atmosfera humida amb 5 %  $\text{CO}_2/95$  %. L'assaig de captació es va fer incubant durant 7 segons amb solució HBS contenint 5.4 mM  $\text{K}^+$  i  $^{36}\text{Cl}^-$  (0.5 - 0.7  $\mu\text{Ci/ml}$ ) en absència/presència de GABA i bloquejants de canals de clorur.

En ambdós casos després de l'exposició es van rentar les cèl·lules amb solució HBS freda i es van disgregar durant la nit amb 0.2 M de NaOH. Es van utilitzar 200  $\mu\text{l}$  de disgregat per a mesurar la radioactivitat i 10-20  $\mu\text{l}$  per a mesurar la concentració de proteïna.

### 3.2.12.- Captació de [<sup>3</sup>H]-aspartat

Per a determinar la captació dels aminoàcids excitadors en els cultius de cèl·lules granulars de cerebel es va determinar la captació de D-[2,3-<sup>3</sup>H]aspartat. Després de rentar els cultius amb solució HBS es van incubar per 10 min a 36°C amb 4 nM de D-[2,3-<sup>3</sup>H]aspartat. Al finalitzar la incubació es van rentar els cultius amb solució HBS i es disgregaren les cèl·lules amb 250 µl de NaOH 0.2 M durant la nit. S'utilitzaren 200 µl del disgregat per a mesurar la radioactivitat i 10-20 µl per a quantificar les proteïnes.

### 3.2.13.- Tècniques d'unió a receptors

#### 3.2.13.1.- Unió de [<sup>35</sup>S]-t-butilbiciclofosforotinat ([<sup>35</sup>S]TBPS)

El TBPS s'uneix a l'interior del canal de clorur que forma el receptor GABA<sub>A</sub>, al mateix lloc on s'uneix la picrotoxinina i el dieldrín.

La unió de [<sup>35</sup>S]TBPS es va realitzar segons el descrit en Pomés *et al.* (1993) i Vale *et al.* (1997) amb modificacions. Les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb 0.5 ml de solució HBS i es van incubar amb solució HBS amb 4 nM de [<sup>35</sup>S]-TBPS durant 30 min a 25 °C, contenint de 4 a 250 nM de TBPS no marcat. La unió no específica es va determinar en presència de 100 µM de picrotoxinina. Després de la incubació es va aspirar el medi d'incubació i es van rentar les cèl·lules 3 vegades amb 1 ml de solució HBS freda. Les cèl·lules van ser disgregades amb 250 µl de NaOH 0.2 N. S'utilitzaren 200 µl del disgregat per a mesurar la radioactivitat i 10-20 µl per a quantificar les proteïnes.

#### 3.2.13.2.- Unió de [<sup>3</sup>H]MK-801

El protocol utilitzat va ser el descrit per Marcaida *et al.* (1995) amb petites modificacions. Breument, els cultius es van rentar 3 vegades amb solució salina tamponada amb fosfats (PBS) (136.9 mM NaCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 8.03 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajustat a pH 7.4) atemperada a 37 °C. Els cultius es van exposar a [<sup>3</sup>H]MK-801 (4 – 5 nM) en solució PBS contenint 100 µM de glutamat, 100 µM de glicina i de 0 a 10 µM de MK-801 fred. La unió no específica es va determinar en presència de 100 µM de MK-801 fred. Després de la incubació de 15 minuts a 37 °C es va aspirar el medi d'incubació i es van rentar les cèl·lules 3 vegades amb 1 ml de

PBS fred contenint 100  $\mu\text{M}$  de glutamat i 100  $\mu\text{M}$  de glicina. Les cèl·lules van ser disgregades amb 250  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2 N. S'utilitzaren 200  $\mu\text{l}$  del disgregat per a mesurar la radioactivitat i 10-20  $\mu\text{l}$  per a quantificar les proteïnes.

### **3.2.14.- Mesura de la radioactivitat unida/captada en els cultius**

La radioactivitat va ser determinada per comptatge líquid de centelleig (amb el còctel Optiphase "Hisafe 2"). S'utilitzaren 200  $\mu\text{l}$  del disgregat cel·lular i 4 ml del líquid de centelleig. Cada vial es va contar durant 5 minuts i en un comptador de centelleig líquid 1414 Winspectral de Wallac (Turku, Finlàndia).

### **3.2.15.-Determinació del calci intracel·lular**

Per a la determinació del calci intracel·lular s'ha utilitzat l'indicador sensible a calci Fluo-3/AM. L'acetoximetilester de fluo-3 (Fluo-3/AM) és un derivat éster del fluo-3 no fluorescent i permeable a la membrana cel·lular. Un cop a dins la cèl·lula és hidrolitzat per les esterases cel·lulars convertint-lo en un compost impermeable a la membrana plasmàtica i que donarà lloc a fluorescència en unir-se a ions de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Després de rentar les cèl·lules amb solució HBS 3 vegades, es van incubar amb Fluo-3 AM (concentració final 8.8  $\mu\text{M}$ , contenint 0.3% volum/volum de DMSO i 0.05% pes/volum d'àcid plurònic F-127) durant 1 hora a 36.8 ° C en solució HBS. Després de la incubació es van rentar les cèl·lules 3 vegades amb solució HBS sense  $\text{Mg}^{2+}$  per a treure l'excés de fluo-3/AM. Les cèl·lules s'exposaren a 200  $\mu\text{l}$  de solució HBS sense  $\text{Mg}^{2+}$  amb diferents concentracions de NMDA (de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ) i es mesurà la fluorescència immediatament (F) a les longitud d'ona 485 (excitació) i 530 nm (emissió) en un fluorímetre-lector de plaques (SpectraMax GeminisXS; Molecular Devices, EUA). Per a la mesura de la concentració de calci intracel·lular, després de buidar la placa s'afegiren 200  $\mu\text{l}$  per pou d'una solució del ionòfor A-23187 (10  $\mu\text{M}$  en solució HBS) que s'incubà per 15 minuts a temperatura ambient. La lectura a les mateixes longituds d'ona amb el ionòfor ens donà el valor de la fluorescència màxima (Fmax). La fluorescència mínima (Fmin) es va obtenir per incubació de les cèl·lules amb 5 mM de  $\text{CuSO}_4$  en 0.9 % (pes/volum) durant 2 minuts. La concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  lliure citosòlic s'obtingué del càlcul:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

on la  $K_D$  és la constant de dissociació del Fluo-3 (320 nm segons Weaver, Jr. *et al.* 1998)

Per a la mesura de la funció del receptor NMDA en presència de dieldrín, després de la incubació de les cèl·lules amb el Fluo-3/AM, es van rentar i es van pre-incubar durant 10 min amb solució HBS lliure de magnesi contenint dieldrín 3  $\mu\text{M}$  o 0.2 % de DMSO a temperatura ambient. Després es va procedir igual que en les plaques tractades de manera perllongada, amb la diferència que les diferents solucions amb NMDA contenien també 0.2 % de DMSO o 3  $\mu\text{M}$  de dieldrín.

### **3.2.16.-Fotografies dels cultius exposats a alta concentració de potassi**

L'aparença de les cèl·lules en cultiu al ser incubades durant 5 minuts amb alta  $[\text{K}^+]_e$  va ser visualitzada amb un microscopi amb contrast de fase Olympus IX 70 i fotografiat amb una càmera digital Colorview (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Alemanya).

### **3.2.17.-Immunocitoquímiques**

Per a les immunocitoquímiques les cèl·lules es van sembrar en portes de plàstic Permanox de 8 pouets que prèviament havien estat recoberts amb poli-L-lisina.

#### **3.2.17.1.-Anti-GAD<sub>67</sub> amb tinció de iodur de propidi en cèl·lules exposades a alta $[\text{K}^+]_e$**

Als 8 dies *in vitro* els cultius es van tractar per 5 minuts amb solució HBS despolaritzant i posteriorment es va afegir iodur de propidi sobre el medi de cultiu a una concentració final de 15  $\mu\text{g/ml}$ . El iodur de propidi és un compost que dóna fluorescència al intercalar-se amb el DNA; com que no és permeable a la membrana plasmàtica, només mostraran fluorescència aquelles cèl·lules amb la membrana plasmàtica danyada. Després de 30 minuts d'incubació amb el iodur de propidi es van rentar els cultius amb PBS i es van fixar amb paraformaldehyd al 4 % durant 30 min. Es van permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de 0.1 % de saponina i un 3% de sèrum de cabra. La incubació amb l'anticòs primari (GAD<sub>67</sub> dilució 1:750) es va fer a 4 °C durant la nit en una solució amb un 1% de sèrum de cabra. Després de rentar

l'anticòs primari les cèl·lules s'incubaren durant 1 hora amb l'anticòs secundari (anti-conill Alexa 488 1:1500) a temperatura ambient. Després dels rentats es va muntar el cubreobjectes amb Mowiol. Les cèl·lules es van visualitzar amb un microscopi de fluorescència equipat amb contrast de fase (Nikon E1000, Nikon, Tokio, Japó) i es van prendre fotografies amb una càmera digital Colorview (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Alemanya). El control de l'anticòs secundari (fet ometent el primari) no donava fluorescència.

#### 3.2.17.2.-Anti-GAD<sub>67</sub> en cultius tractats amb àcid kaínic

Es va fer la immunocitoquímica seguint el mateix protocol que per les cèl·lules tractades amb alt [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>. Les cèl·lules GAD<sub>67</sub>-positives es van contar en 5-9 camps del cultiu i es varen referir al número total de cèl·lules visualitzades per contrast de fase del mateix camp.

#### 3.2.18.3.-Doble immunocitoquímica de anti-GAD<sub>67</sub> i anti-VGLUT1

Després de rentar els cultius amb PBS, es van fixar amb paraformaldehid al 4 % durant 30 min i es van permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de 0,1 % de saponina i un 3% de sèrum de cabra. Es van incubar els cultius amb els anticossos primaris: anti-GAD<sub>67</sub> (1:750) i anti-VGLUT1 (1:2500) a 4 °C durant la nit amb un 1% de sèrum de cabra. Després de rentar els anticossos primaris s'incubà durant 1 hora amb els anticossos secundaris: anti-conill Alexa 488 (1:1500) i anti-ratolí Alexa 546 (1:1000) a temperatura ambient. Després dels rentats es va muntar el cubreobjectes amb Mowiol. Les cèl·lules es van visualitzar amb un microscopi de fluorescència equipat amb contrast de fase (Nikon E1000, Nikon, Tokio, Japó) i es van prendre fotografies amb una càmera digital Colorview (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Alemanya). Les mateixes preparacions també es van visualitzar amb un microscopi confocal Leica TCS-NT (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanya). El control de l'anticòs secundari (fet ometent el primari) no donava fluorescència.

#### 3.2.18.-Anàlisi de les dades

Les dades són expressades com a mitjanes ± SEM, de 3 experiments cada un en triplicat a no ser que s'especifiqui de manera diferent. L'ajust de corbes i les anàlisis estadístiques es van fer amb el programa GraphPad Software, Inc San Diego, CA,

EEUU). Per a les anàlisi estadístiques s'ha utilitzat el t-test i les anàlisi de la variança d'un o dos factors seguides del test de Bonferroni. L'anàlisi de comparació d'ajust de corbes es va realitzar mitjançant el test F.