



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales

Estudio anatómico del sistema nervioso central del cerdo y aislamiento de sinaptosomas de corteza: práctica de laboratorio

Clara Ortega de San Luis

2024

Asignatura: Principios de experimentación animal



CREA

Principios de Experimentación Animal
Grado en Biología

Práctica de Laboratorio: Estudio Anatómico del Sistema Nervioso Central de Cerdo y Aislamiento de Sinaptosomas de Corteza

- I. Anatomía y disección de cerebro de cerdo
- II. Homogenización de cortex de cerdo
- III. Fraccionamiento sub-celular

Clara Ortega de San Luis
Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad de Jaén

Índice

1. Objetivos de la Práctica	4
2. Introducción	4
Homogenización de Tejidos	4
Sub-fraccionamiento celular	5
Anatomía del cerebro de cerdo	6
3. Materiales, equipamiento y reactivos.....	8
4. Protocolos.....	9
Parte I – Disección del Cerebro de Cerdo	9
Parte II – Lavado y homogenización tisular	10
Parte III – Sub-fraccionamiento celular y aislamiento de sinaptosomas.....	12
5. Referencias	14

1. Objetivos de la Práctica

1. Identificar y distinguir las principales regiones del cerebro del cerdo.
2. Aprender los pasos básicos para la disección del tejido cerebral.
3. Comprender el proceso de sub-fraccionamiento celular y su importancia en la investigación de los procesos biológicos.
4. Aplicar un protocolo experimental utilizado para el aislamiento de componentes sub-celulares neuronales, como sinaptosomas y vesículas sinápticas.

2. Introducción

Homogenización de Tejidos

La homogenización de tejidos consiste en la rotura de la estructura tisular para formar una **suspensión o emulsión de los componentes del tejido**. El resultado de la homogenización de un tejido es una **mezcla semi-homogénea** que contiene diferentes componentes tisulares (porciones de tejido, agregados de células, células individualizadas o incluso componentes subcelulares como orgánulos o vesículas) en función del protocolo escogido (Takach, 2013).

La homogenización de tejidos es uno de los procedimientos experimentales **más utilizados** en experimentación animal. Se trata del **paso previo** a la separación y estudio de los componentes celulares o subcelulares de interés (enzimas, proteínas, diferentes compuestos intracelulares, DNA, RNA...etc). Por tanto, es un procedimiento común a una gran diversidad de técnicas (análisis de expresión génica, estudios de actividad enzimática, cuantificación de componentes bioquímicos presentes en una muestra...etc.).

Tipos de protocolos de homogenización.

Existen numerosos protocolos de homogenización adaptados al **tipo de tejido** (tejidos duros, medios o blandos) (Xue et al., 2012) y al **componente celular o subcelular** que se desee estudiar (células completas, proteínas de membrana, determinados orgánulos...etc) (Takach, 2013).

Atendiendo al fundamento del protocolo, los métodos de homogenización se clasifican en:

1. **Métodos mecánicos:** basados en la aplicación de fuerzas mecánicas que rompen el tejido y liberan sus componentes. Es el método que se va a llevar a cabo en esta práctica.
2. **Métodos enzimáticos:** basados en el uso de enzimas que descomponen los componentes tisulares, como colagenasas o proteasas, facilitando la rotura y separación de los componentes del tejido.
3. **Sonicación:** mediante el uso de ultrasonidos que agitan las partículas de la muestra e inducen su ruptura.
4. **Métodos basados en el uso de *beads*:** añadiendo a la muestra unas bolas de diferentes componentes (metálicas, vidrio...etc) y provocando que éstas se muevan por la muestra.

Tampones de homogenización

Para la homogenización del tejido se diseñan diferentes tampones de homogenización. De entre todos sus posibles componentes, los más importantes son:

1. **Sales de tampón (TRIS-HCl):** mantienen el pH de la muestra en el rango fisiológico (pH 7 – 8).
2. **Sucrosa:** aumenta la osmolaridad del medio.
3. **Inhibidores de enzimas:** inhiben la acción de proteasas o fosfatasa.
4. **EDTA:** quelante de cationes. Cada molécula de EDTA se une a un cation (Ca^{+2} , Mg^{+2}), secuestrándolo y evitando la acción de enzimas que degradan el tejido y que necesitan estos iones como co-factores (proteasas, DNAsas...etc).

Sub-fraccionamiento celular

El sub-fraccionamiento celular es una técnica biológica que permite **separar diferentes orgánulos celulares** en función de su velocidad de sedimentación, preservando su función (Ohlendieck and Harding, 2018).

Partiendo de un homogenado tisular (obtenido tras el paso preparatorio de la homogenización del tejido explicado en el apartado anterior), consiste en llevar a cabo una serie de centrifugaciones de menor a mayor fuerza gravitacional (**centrifugaciones**

diferenciales). Estas centrifugaciones separan las partículas biológicas en función de su tamaño y densidad (lo que determina su **tasa de sedimentación**).

De esta forma, un homogenado crudo que contiene diferentes componentes como vesículas, orgánulos y otros componentes estructurales, se divide en diferentes **fracciones**. Por último, para separar los componentes de menor tamaño de la muestra se utilizan **ultracentrifugaciones en gradientes de densidad** (Ohlendieck and Harding, 2018), una técnica de mayor poder de discriminación.

En esta práctica se va a llevar a cabo un sub-fraccionamiento celular de cerebro, optimizado para el **aislamiento de sinaptosomas y vesículas sinápticas menores**, adaptado de la literatura (Del Prete et al., 2014).

Anatomía del cerebro de cerdo

El uso del cerdo (*Sus scrofa domestica*) en investigación biomédica es cada vez más frecuente. Se utiliza como **modelo** en investigaciones cardiovasculares, metabólicas, trasplantes de órganos... etc. En el campo de la neurociencia se utiliza como modelo para el estudio de numerosos procesos: estudio de fármacos que regulan neurotransmisores, estudio de enfermedades neurodegenerativas, estudio de traumatismos craneoencefálicos...etc. (Lind et al., 2007). El gran **tamaño de su cerebro** es una ventaja para el estudio de neurocirugías o estudios basados en técnicas de imagen transcraneal como resonancia magnética o tomografía computerizada (Sauleau et al., 2009).

La **anatomía** del cerebro de cerdo es muy similar a la del cerebro humano. Se pueden distinguir las siguientes grandes áreas:

1.1 Corteza cerebral: La corteza del cerdo es girencéfala (presenta circunvoluciones), como la del humano, a diferencia de la de rata o ratón. Cada uno de sus surcos está mapeado y se identifica con un nombre (Figura 1).

1.2 Hipocampo: área responsable del aprendizaje y la memoria (Figura 2).

1.3 Núcleos basales: los núcleos **caudado y putamen**. Controlan el movimiento voluntario (Figura 2).

1.4 Tálamo e hipotálamo: conjunto de núcleos encargados de la homeostasis del organismo y de la gestión de la información sensorial (Figura 2)..

1.5 Mesencéfalo y tronco del encéfalo: conjunto de núcleos encargados del control de la función cerebral (neuromoduladores) (Figura 2).

1.6 Cerebelo: coordinación fina del movimiento y equilibrio (Figura 2).

1.7 Comienzo de la médula espinal (Figura 2).

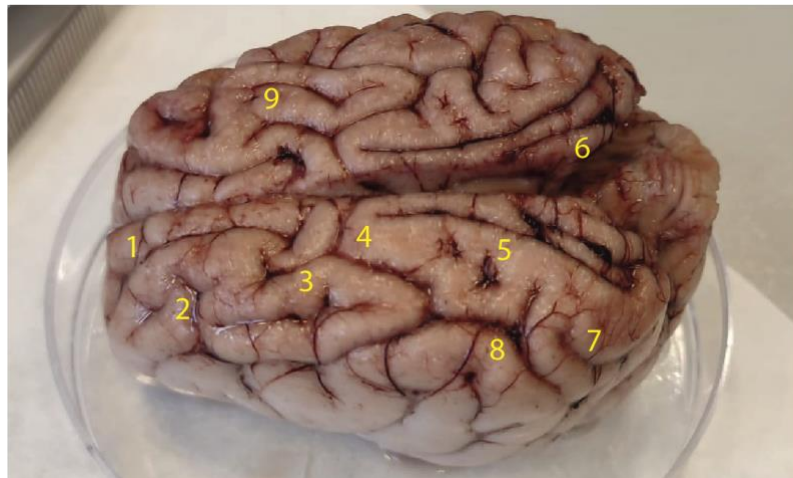


Figura 1. Principales surcos de la corteza del cerebro de cerdo. (1) *Cruciate sulcus*; (2) *diagonal sulcus*; (3) *coronal sulcus*; (4) *ansate sulcus*; (5) *lateral sulcus*; (6) *entolateral sulcus*; (7) *ectolateral sulcus*; (8) *suprasylvian sulcus*; (9) *sulcus naris*. Para más detalle, consultar Lind et al. (2007).

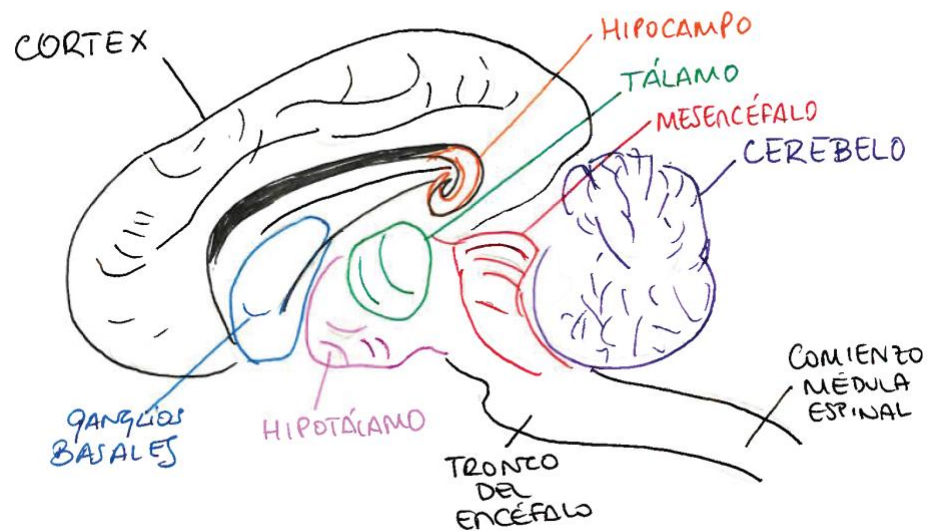


Figura 2. Sección sagital de cerebro de cerdo anotada. Para más detalle, consultar Félix et al., (1999).

3. Materiales, equipamiento y reactivos

Muestra de partida

- Cerebro de cerdo (de 4 a 6 meses de edad) fijado para la disección anatómica y observación de las áreas:
- Para la fijación, se parte de cerebros frescos (24-48h post-sacrificio), lavados en PBS, fijados por inmersión en Paraformaldehído 4% durante 64h y mantenidos en PBS (Figura 3).

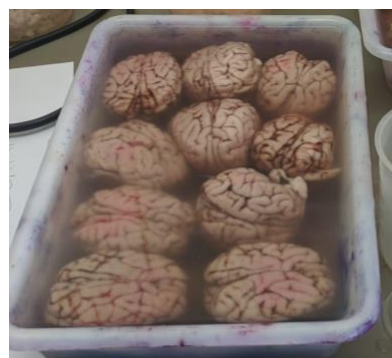


Figura 3. Fijación de cerebro de cerdo por inmersión en paraformaldehído 4% durante 64h. Izquierda: inmersión en serie en bandejas de plástico. Derecha: resultado de la fijación del órgano.

- Para la extracción de sinaptosomas, se parte de cerebros frescos (24-48h post-sacrificio), congelados. Se atemperan durante 3h a temperatura ambiente antes de comenzar la disección.

Reactivos

- Tampón Fosfato (*Phosphate-buffered saline*, PBS); 1X.
- Paraformaldehído 4% en PBS; aprox 4L.
- Tampón de Homogenización (*Homogenization Buffer*, HB):
 - 320 mM Sacarosa (*Sucrose*)
 - 20 mM Tris-base pH 7.1
 - 1 mM EDTA
 - Opcional:
 - Inhibidores de Proteasas (*Protease Inhibitors*)
 - Inhibidores de Fosfatasa (*Phosphatase Inhibitors*)

Instrumental

- Homogenizador Potter-Elvehjem de 5 mL.
- Centrífuga de tubos eppendorf, capaz de alcanzar 6000 xg.
- Centrífuga de tubos de ensayo refrigerada.

- Material de disección.
- Pizarra digital con capacidad de retransmisión de imagen. En este caso, se ha utilizado la pizarra digital Orbys instalada en el laboratorio de docencia del Área de Fisiología. Mediante la aplicación de interacción multipantalla EShare instalada en un teléfono móvil, se ha retransmitido una disección por parte del profesorado (Figura 4).

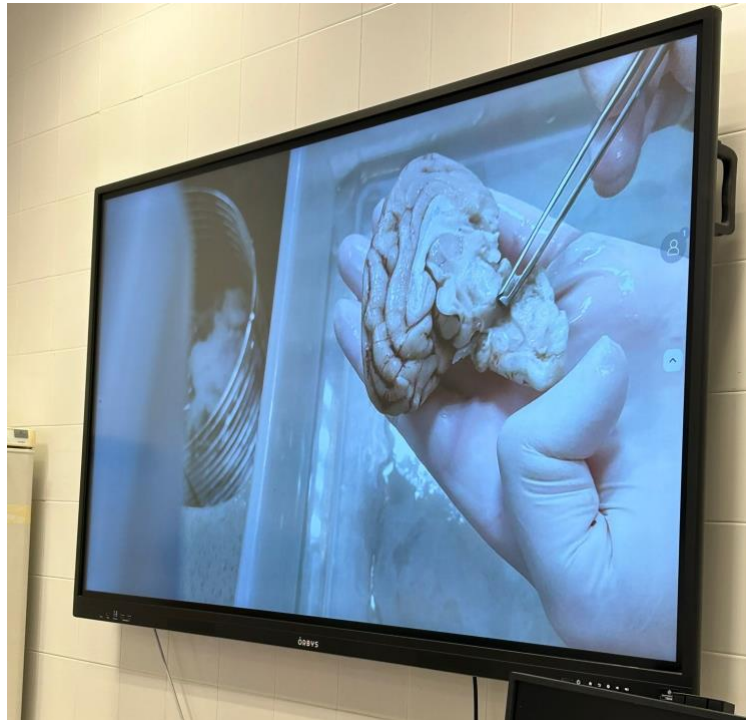


Figura 4. Retransmisión en directo de la disección de cerebro desde un teléfono móvil con cámara hasta la pizarra digital.

4. Protocolos

Parte I – Disección del Cerebro de Cerdo

1. Identificar Cerebro, Cerebelo y tronco del encéfalo. Si se conserva, identificar el comienzo de la médula espinal.
2. Identificar los principales surcos de la corteza y áreas funcionales de forma aproximada.
3. Levantar la corteza. Observar el ventrículo, hipocampo, ganglios basales.
4. Bajo la corteza, identificar el tálamo-hipotálamo y mesencéfalo.
5. Identificar el tronco del encéfalo.

Parte II – Lavado y homogenización tisular

Se resume el protocolo seguido en la Figura 5.

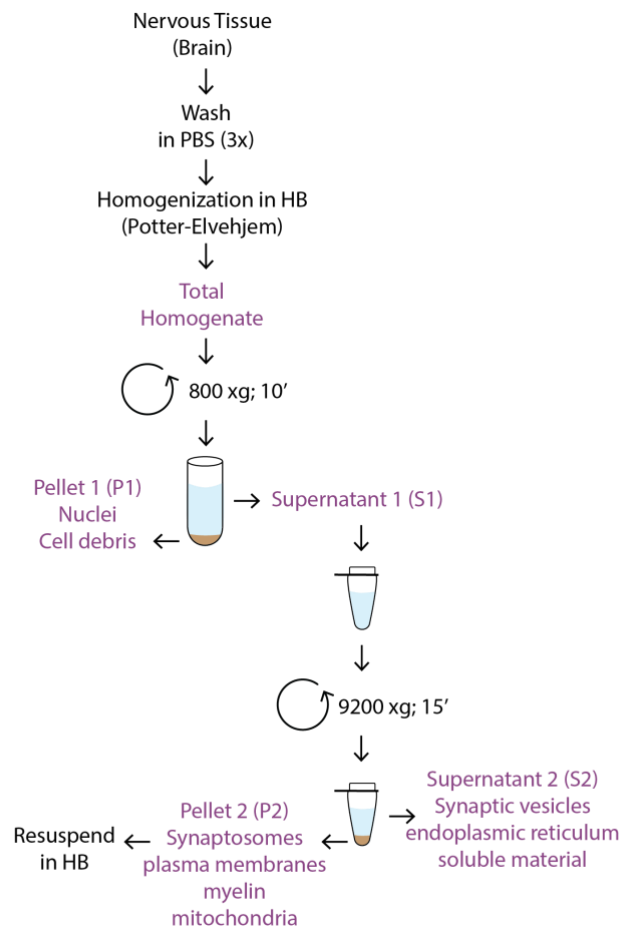


Figura 5. Esquema del protocolo de homogenización y sub-fraccionamiento celular. Adaptado de la literatura (Del Prete et al., 2014).

A. Lavado

1. Partiendo de un cerebro fresco de cerdo (no fijado, mantenido en hielo) diseccionar un **fragmento de cortex y/o estriado cerebral de cerdo de aproximadamente 150 – 350 mg**. Utilizar una balanza y una placa de Petri para pesar la muestra (Figura 6).

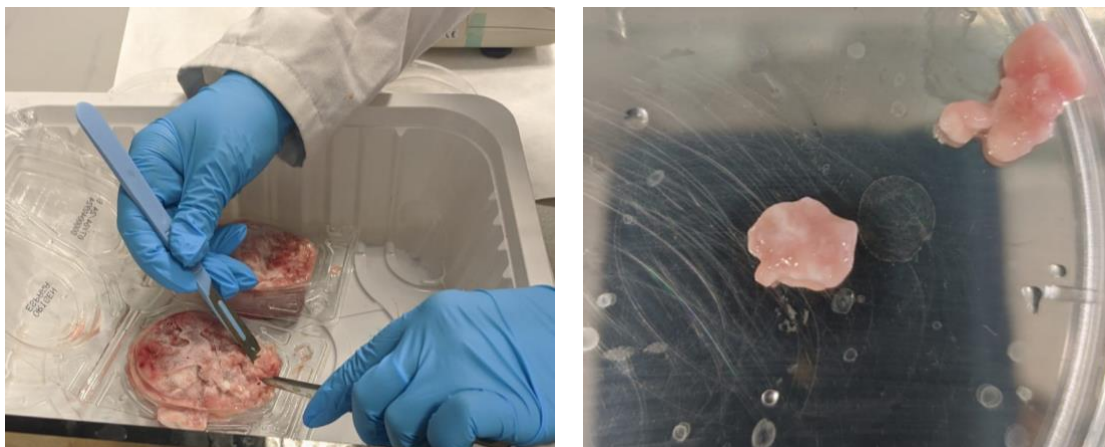


Figura 6. Disección de un fragmento de corteza para aislamiento de sinaptosomas. Izquierda: disección de un fragmento de corteza. Derecha: fragmentos diseccionados antes de ser homogenizados.

2. Colocar el fragmento de tejido en un **tubo de ensayo**.
3. Lavar restos de sangre añadiendo aprox. **1.5 mL de PBS** con una pipeta Pasteur. Cerrando el tubo de ensayo, voltear suavemente dos-tres veces hasta sumergir el tejido completamente.
4. **Descartar el PBS** volteando el tubo o con una pipeta Pasteur. Repetir los pasos 3 y 4 durante un total de 3 lavados.
5. Tras retirar el PBS restante tras el último lavado, **añadir 1.5mL de tampón de homogenización (HB)**.

B. Homogenización

6. Traspasar la muestra y el HB a un **homogenizador Potter-Elvehjem** de 5 mL situado en hielo (Figura 7).



Figura 7. Homogenización de tejido utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem.

7. **Homogeneizar** lentamente con precaución la muestra (Figura 7):

- Introducir el pistilo hasta el fondo del vaso de vidrio con precaución, evitando generar espuma.
- Con movimientos giratorios y de ascenso y descenso, **triturar el tejido** con suavidad hasta que no queden restos visibles. Evitar generar espuma en el proceso.

8. **Trasvasar el homogenado** a un tubo de ensayo limpio, volcando el Potter.

Parte III – Sub-fraccionamiento celular y aislamiento de sinaptosomas

9. Centrifugar el homogenado durante **10 min a 800 xg @ 4°C** (Figura 8).

10. Trasvasar el **sobrenadante (S1)** a un tubo eppendorf.



Figura 8. Sobrenadante S1 y pellet P1 resultantes tras la centrifugación de homogenado.

11. **Resuspender el pellet 1 (P1) en 1 mL de PBS** y conservar en hielo marcado como fracción P1. Esta fracción P1 contiene los núcleos celulares (neuronas y glía), así como otros debris resultantes de la lisis celular.

12. Centrifugar el **sobrenadante S1 durante 15 min a 6500 xg** (Figura 9)

13. **Trasvasar el sobrenadante (S2) a un nuevo tubo eppendorf.** La fracción S2 contiene las vesículas sinápticas, retículo endoplásmico y material soluble.



Figura 9. Sobrenadante S2 y pellet P2 resultantes tras la centrifugación del sobrenadante S1.

14. Resuspender el pellet (**fracción P2**) en **1mL de PBS**. La fracción P2 contiene los sinaptosomas, restos de membrana plasmática, restos de mielina y mitocondrias. Si se deseara aislar los sinaptosomas del resto de componentes, se utilizaría una ultracentrífuga y un gradiente de densidad de Percoll.

5. Referencias

- Félix, B., Léger, M.-E., Albe-Fessard, D., Marcilloux, J.-C., Rampin, O., Laplace, J.-P., Duclos, A., Fort, F., Gougis, S., Costa, M., et al. (1999). Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain Res. Bull.* 49, 1–137.
- Lind, N.M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., and Hansen, A.K. (2007). The use of pigs in neuroscience: Modeling brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 728–751.
- Ohlendieck, K., and Harding, S.E. (2018). Centrifugation and Ultracentrifugation. In *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, A. Hofmann, and S. Clokie, eds. (Cambridge University Press), pp. 424–453.
- Del Prete, D., Lombino, F., Liu, X., and D'Adamio, L. (2014). APP Is Cleaved by Bace1 in Pre-Synaptic Vesicles and Establishes a Pre-Synaptic Interactome, via Its Intracellular Domain, with Molecular Complexes that Regulate Pre-Synaptic Vesicles Functions. *PLoS One* 9, e108576.
- Sauleau, P., Lapouble, E., Val-Laillet, D., and Malbert, C.-H. (2009). The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal* 3, 1138–1151.
- Takach, E. (2013). Tissue homogenization. In *Tissue Analysis for Drug Development*, (Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Science Ltd), pp. 22–35.
- Xue, Y.-J., Gao, H., Ji, Q.C., Lam, Z., Fang, X., Lin, Z., Hoffman, M., Schulz-Jander, D., and Weng, N. (2012). Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges. *Bioanalysis* 4, 2637–2653.