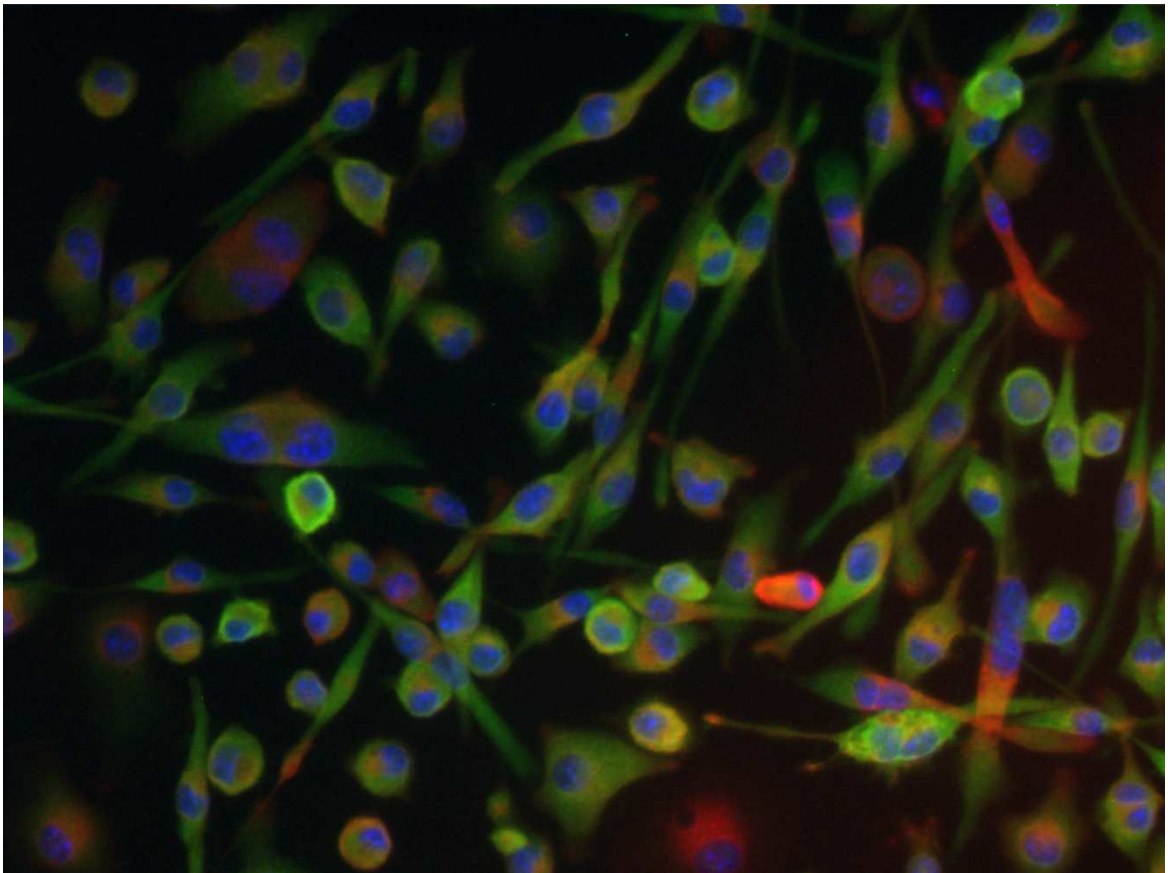


La micròglia, cèl·lules de defensa



2n Batxillerat B
Curs 2012-2013

AGRAÏMENTS

Voldria agrair aquest treball a totes aquelles persones que han dedicat part del seu temps en ajudar-me durant la seva realització ja que sense elles hauria estat molt més complicat poder dur-lo a terme.

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus pares i amics, per estar sempre al meu costat i ajudar-me quan ho he necessitat.

Voldria donar les gràcies també al Dr. Josep Saura Martí professor agregat de la Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona, qui es va oferir en un primer moment per ajudar-me en la realització del treball de recerca, però que finalment no va poder ser possible i va obrir-me les portes per seguir endavant amb el meu treball en el CSIC.

També voldria agrair aquest treball al meu tutor pel seu suport i ajuda.

Donar les gràcies també a tot l'equip del Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) per permetrem realitzar les pràctiques en els seus laboratoris i per la gran ajuda que em van oferir.

Finalment voldria donar especialment les meves sinceres gràcies al Dr. Joan Serratosa, investigador científic del Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC), per la seva gran disposició en tot moment a ajudar-me, tant en l'àmbit simplement acadèmic com en el personal, pel seu suport i interès, per la seva gran paciència i per totes les hores dedicades a aquest treball. Sense la seva col·laboració aquest treball hauria estat molt més difícil de dur a terme.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. PRESENTACIÓ DEL TEMA.....	3
1.1 Les cèl·lules glials al sistema nerviós central.....	4
1.1.1 Oligodendròcits.....	4
1.1.2 Astròcits.....	6
1.1.3 Micròglia	7
1.2 La comunicació entre neurones i micròglia	9
1.2.1. Senyalització mitjançant neurotransmissors.....	9
1.2.2. Senyalització mitjançant pèptids	10
1.2.3. Senyalització mitjançant contacte.....	10
1.3. L'activació microglial	11
1.3.1 Rol de l'activació microglial en les malalties neurodegeneratives	11
1.3.2. La resposta microglial a la mort neuronal.....	14
1.4. Estratègies per inhibir l'activació glial, utilitat terapèutica	16
1.4.1. Prevenició de l'activació glial	16
1.4.2. Inhibició de l'activació glial.....	17
1.5. Utilització de cultius cel·lulars per a l'estudi de l'activació glial:.....	18
1.5.1. Cultius primaris i línies cel·lulars.....	18
1.5.2. Línies cel·lulars en l'estudi de l'activació microglial.....	20
2. OBJECTIUS.....	22
3. MATERIALS I MÈTODES.....	24
3.1 Cultiu de la línia cel·lular microglial.....	25

3.1.1 Cultiu línia BV2.....	25
3.2 Immunocitoquímica.....	29
Marcatge amb fluorescència.....	29
3.3. Tincions	34
Hoescht.....	34
3.4. Determinació de nitrit	35
3.5. Microfotografia.....	37
4. RESULTATS.....	39
4.1 Caracterització de les cèl·lules de la línia microglial BV2.....	40
4.1.1 Contrast de fases.....	41
4.1.2 Fotografies en color.....	42
4.1.3 Expressió de l'iNOS i COX2 en cèl·lules tractades amb LPS i LPS/IFN γ	44
4.2 Producció d'òxid nítric (NO) en les BV2 activades	48
5. CONCLUSIÓ.....	49
6. BIBLIOGRAFIA.....	51
6.1 Tesis doctorals.....	51
6.2 Documents en línea.....	51
6.3 Fonts orals.....	54

INTRODUCCIÓ

La idea de fer aquest treball sorgeix de la meva primera voluntat de fer un treball de ciències que pogués tenir un alt contingut pràctic. A partir d'aquí em vaig posar a buscar com poder dur-ho a terme. La solució va arribar aviat quan el Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) em va oferir la oportunitat de poder fer les pràctiques en els seus laboratoris i ajudar-me en la realització del treball.

Vam plantejar des d'un inici la possibilitat de fer un treball sobre la inflamació microglial . Aquí però va sorgir un dilema, treballar amb cèl·lules animals o amb una línia cel·lular. Ràpidament ens vam decidir per la segona opció ja que aquesta permetia un major nombre d'experiments, ja que la disponibilitat de cèl·lules procedents d'una línia cel·lular és més alta i també, i un dels factors més importants, perquè vam creure que per fer aquest tipus de treball experimental no era per a res necessària i potser fins i tot injustificada la mort d'animals.

És veritat que treballar amb una línia cel·lular no és el mateix que amb un cultiu cel·lular directe d'un animal però, ens ofereix una gran quantitat de semblances amb les cèl·lules animals que permeten establir patrons d'estudi molt semblants.

Remarcar també que les línies cel·lulars són una molt bona alternativa i un pas previ molt interessant abans de treballar directament amb les cèl·lules animals i posteriorment amb els animals directament, ja que gràcies a la seva semblança ens permet anar fent passos sense la necessitat d'utilitzar animals.

Així doncs la línia cel·lular BV2 ens va permetre treballar molts dels aspectes de la inflamació glial i també ens va permetre la possibilitat de comparar-la amb les cèl·lules microglials.

1. PRESENTACIÓ DEL TEMA

1.1 LES CÈL·LULES GLIALS

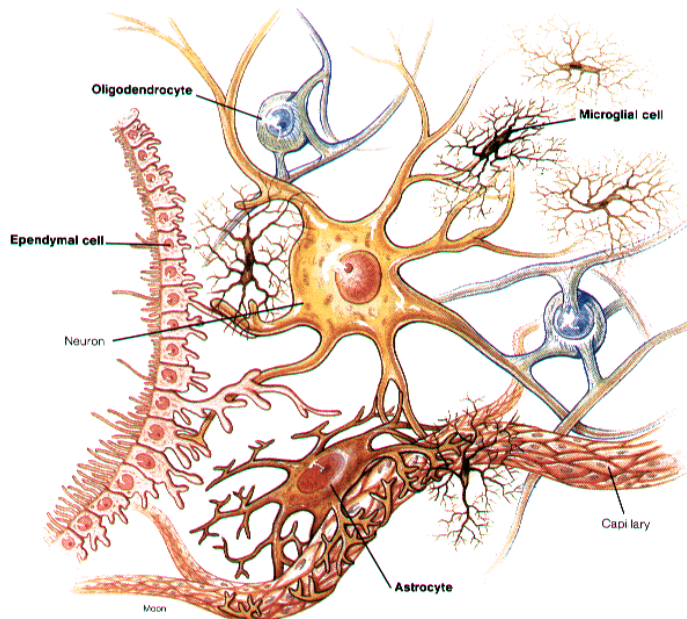


Figura 1. Neuroglia. Plana web celldiagram.net

Durant molts anys diversos estudis del sistema nerviós central (SNC) s'han centrat únicament en les neurones, donada la seva excitabilitat i el seu paper en la transmissió nerviosa, mentre que a les cèl·lules de la glia tenien un paper secundari i de suport a la funció neuronal. Gràcies als estudis realitzats durant els últims anys s'ha descobert la gran rellevància d'aquestes cèl·lules.

Les cèl·lules glials són generalment més petites que les neurones i constitueixen el 90% de les cèl·lules del SNC. El terme glia engloba principalment a 3 tipus cel·lulars: els astròcits i oligodendrocits (també anomenats macròglia) i la micròglia.

1.1.1 Astròcits

Característiques i classificació

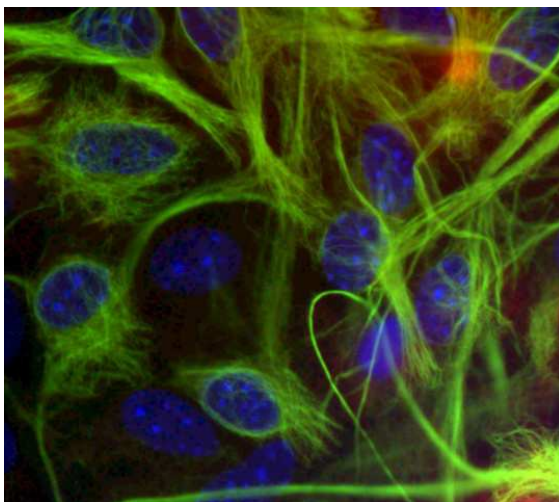


Figura 2. Cultiu primari d'astròcits marcats de color verd amb un anticòs contra GFAP. Laboratori de Neurobiologia CSIC.

Els astròcits (també anomenats astroglia), d'origen neuroectodèrmic, constitueixen la població principal i més nombrosa de cèl·lules glials.

Es tracta de cossos cel·lulars petits de forma estrellada amb prolongacions que es ramifiquen i s'estenen en totes direccions. La població d'astròcits és molt heterogènia però tot i així es pot classificar en dos grans grups segons la seva morfologia i localització: els fibrosos i els protoplasmàtics.

- Astròcits fibrosos: es caracteritzen per la seva morfologia allargada, processos (prolongacions) més llargs, rectes i menys ramificats. Conté una gran quantitat de gliofilaments i se sol trobar en la substància blanca.
- Astròcits protoplàsmics: es caracteritzen per una gran quantitat de prolongacions més curtes i robustes i molt ramificades des del cos cel·lular, menys gliofilaments i més lisosomes que no pas l'astròcit fibrós. Se sol trobar en la substància gris.

Malgrat aquesta classificació establerta per Cajal (1911) podem trobar poblacions d'astròcits sense classificar com les cèl·lules de Müller, presents en la retina o la glia de Bergmann, ubicada només al cerebel.

Funcions

Els astròcits són cèl·lules que intervenen en processos clau pel funcionament del cervell. Són els encarregats de mantenir l'homeòstasi del SNC per tal de facilitar la funció neuronal, realitzant funcions com per exemple tamponar l'excés de potassi i neurotransmissors, proveir a les neurones de nutrients i precursors energètics ja que aquestes no tenen les suficients vies metabòliques per a fer-ho i el seu consum energètic és molt alt, fer de suport estructural a les sinapsis i contribuir a la integritat de la barrera hematoencefàlica, una membrana que impedeix el pas de diverses molècules al SNC, segons la seva mida i polaritat. (Wang i Bordey, 2008).

És important destacar també la importància d'una comunicació astròcit-micròglia que pot regular la supervivència de la neurona gràcies a l'activació dels astròcits en processos inflamatoris. L'activació de l'astròcit consisteix en un conjunt de canvis en la morfologia cel·lular i l'expressió molecular que pateixen els astròcits en resposta a alteracions o danys al SNC. D'altra banda també produeixen i alliberen mediadors inflamatoris com l'òxid nítric (ON) el factor de necrosi tumoral- α , (TNF- α) o les interleucines (ILs) que poden ajudar a desencadenar una resposta en la micròglia activada.

En els últims anys s'ha començat a relacionar als astròcits també amb el control de la sinapsi neuronal. Tot i així, encara no se sap amb exactitud el paper real que hi juguen. Aquesta teoria es coneix amb el nom de sinapsi tripartida.

1.1.2. Oligodendròcits

Característiques i classificació

Els oligodendròcits són les cèl·lules glials encarregades de produir les beines de mielina que envolten els axons al SNC. Els oligodendròcits s'originen a partir de cèl·lules precursors provinents de diverses regions del SNC embrionari. Alguns resten indiferenciats en el cervell adult, per produir nous oligodendròcits quan sigui necessari, els altres migren a la matèria blanca i esdevenen oligodendròcits madurs, capaços de produir mielina.

Els oligodendròcits es poden subdividir en grups en funció de la seva localització, de la seva reactivitat amb diferents anticossos (diferents proteïnes específiques), i el seu recanvi de DNA (reflex de la divisió cel·lular).

Funcions

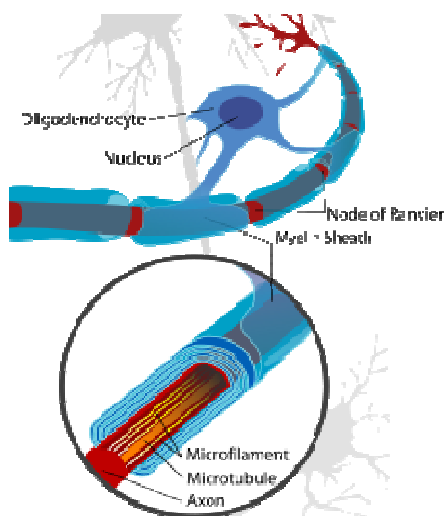


Figura 3. Oligodendròcits i beina de mielina envoltant un axó.

La seva principal funció és la mielogènesi: el procés de formació de la beina de mielina al voltant dels axons de les neurones del SNC. Aquesta beina està formada per l'enrotllament de les prolongacions dels oligodendròcits al voltant dels axons, la qual cosa proporciona un aïllant elèctric al SNC.

La mielinització és un procés altament regulat, que necessita una comunicació entre axons i oligodendròcits. Un mal comportament d'aquesta mielinització pot comportar l'aparició de diverses malalties al SNC.

Els oligodendròcits en la patologia del SNC

Els oligodendròcits són unes cèl·lules amb una taxa metabòlica molt alta i molt sensibles a l'estrés oxidatiu, i això fa que generin molts radicals lliures que després han de ser metabolitzats. S'ha observat com moltes malalties neurodegeneratives cursen amb un punt en comú: l'eliminació de oligodendròcits.

1.1.3. Micròglia

Característiques i classificació

Les cèl·lules de la micròglia formen el sistema immunitari resident del SNC, i tenen la funció de rastrejar el medi i respondre davant de patògens o alteracions al parènquima nerviós. Aquestes són les úniques cèl·lules glials d'origen mesodèrmic. Quan són adultes tenen una alta capacitat de migrar, auto renovar-se (fent que en situacions patològiques, la població de la micròglia augmenti), fagocitar i a més poden presentar antígens i produir mediadors pro o antiinflamatoris (Haas i cols. 2008; Hanisch, 2002).

L'activació de la micròglia provoca canvis fenotípics, morfològics i de síntesi de molècules. Podem trobar 3 estats d'activació:

-Micròglia quiescent: correspon a l'estat de "repòs" de la micròglia. En aquest estat la cèl·lula presenta una morfologia ramificada i la seva funció es preservar el teixit neuronal davant del dany o les malalties.

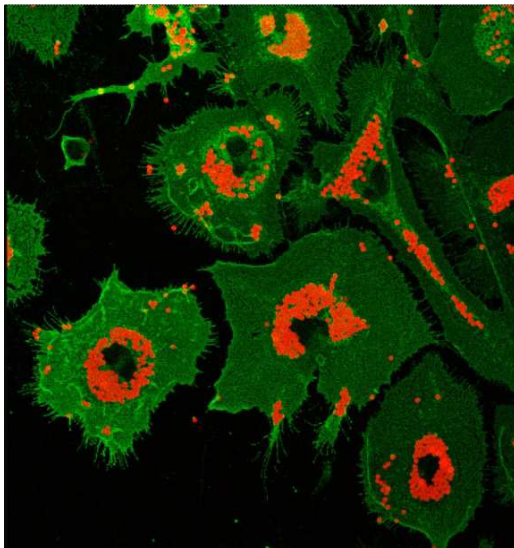


Figura 4. En verd, cèl·lules microgials cultivades. En vermell, boletes de làtex fagocitades. Laboratori de Neurobiologia del CSIC.

-Micròglia activada : aquest estat comença en resposta a qualsevol estímul pro inflamatori. La cèl·lula canvia la seva morfologia: les ramificacions es fan més curtes i gruixudes. En aquest estat es la micròglia sol produir secreció de molècules d'estrès oxidatiu o inflamatòries ON, TNF- α i IL-6.

- Micròglia ameboide: En aquest estat la cèl·lula adopta una morfologia més arrodonida i sense prolongacions. La seva principal funció és fagocitar.

Cal tenir en compte que aquesta classificació és oberta ja que per exemple, la micròglia activada també pot fagocitar i una cèl·lula pot passar d'un estadi d'activació a l'altre (Schwartz i cols. 2006; Hanish i Kettenmann, 2007).

Funcions

Les cèl·lules de la micròglia són junt amb la barrera hematoencefàlica la primera barrera de defensa del SNC, la seva principal funció per tant, és rastrejar el medi i activar-se en presència de patògens o dany neuronal causat per infeccions, lesions, etc. per tal d'eliminar-los. Tot i així una resposta inflamatòria excessiva o molt perllongada (crònica) podria ser perjudicial i portar greus conseqüències per al SNC. Per exemple, una inflamació crònica pot comportar l'acumulació de substàncies tòxiques per a les neurones, i fins i tot produir la seva mort i la seva fagocitosi.. A moltes malalties neurodegeneratives la inflamació microglial crònica contribueix a la neurodegeneració.

La micròglia en la patologia del SNC

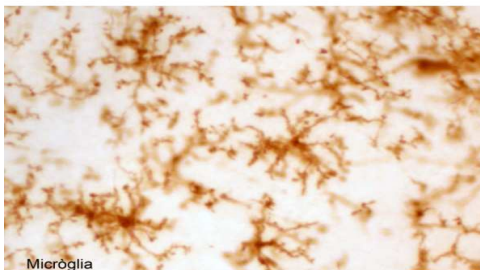
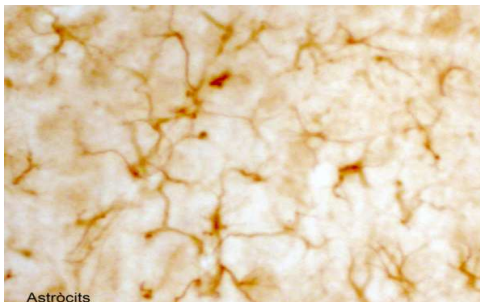


Figura 5. Talls de cervell de ratolí transgènic que expressa l'enzim SOD1 humà.

Com ja s'ha esmentat la micròglia forma part del sistema immunitari del SNC que està separat de la resta de l'organisme per la barrera hematoencefàlica. Per tant, juga un paper de defensa i es beneficia en front d'agents patògens o de lesions ja que en aquest casos fagocita les despulles cel·lulars i mitjançant un procés de gliosi (proliferació) permet fer una cicatriu glial on hi havia la lesió (per exemple un trencament vascular, ictus, etc.). Aquests aspectes són necessaris i positius. No obstant això, com també ja hem citat, una reacció inflamatòria

microglial descontrolada s'ha pogut comprovar que pot ser nociva per la supervivència de les neurones i agreujar diverses malalties neurodegeneratives. En aquest cas diríem que juga un paper negatiu. De fet això també passa a les malalties autoimmunes sistèmiques degut a un mal funcionament del sistema immunitari.

En la figura 5 podem veure l'expressió de l'enzim SOD1 humà en talls de cervell de ratolí transgènic. Aquests ratolins es fan servir com a model de l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA). La fotografia superior correspon als astròcits que es visualitzen perquè s'ha emprat un anticòs contra la seva proteïna específica GFAP. En la fotografia inferior es presenta un altra tall del mateix cervell on es veuen les cèl·lules microglials visualitzades

emprant un anticòs contra una proteïna específica (CD68). Els ratolins "ELA" presenten una activació exacerbada de les cèl·lules gials i això pot contribuir a una major neurodegeneració.

1.2. LA COMUNICACIÓ ENTRE CÈL·LULES I MICRÒGLIA

La comunicació entre neurones i micròglia es produeix de manera ininterrompuda tant en condicions fisiològiques com en la patologia. Per dur a terme aquesta comunicació són molt importants els senyals "on" i els senyals "off".

- Senyals On: són unes molècules que normalment (en condicions fisiològiques) estan en molt baixes concentracions al SNC però en condicions patològiques aquests marcadors augmenten fent que la micròglia s'activi. Aquesta activació podria ser amb fenotip pro inflamatori i antiinflamatori. Exemples d'aquestes molècules serien el glutamat, purines, quimiocines o també cossos estranys com patògens com el LPS (lipopolisacàrid de la paret del bacteri E. coli) que indueix una activació pro inflamatòria.
- Senyals Off: s'expressen constitutivament, mantenint la micròglia en un estat no activat. La seva manca és el que indueix el fenotip pro inflamatori a la micròglia. Aquestes senyals permeten a la micròglia respondre a danys "desconeguts", ja que no cal un receptor que reconegui cada dany concret, només la interrupció de la comunicació ja s'interpreta com a senyal de perill. Dins d'aquesta categoria trobem molècules com les parelles lligand-receptor fractalcina-CX3CR1, CD47-SIRP α i CD200-CD200R.

La comunicació entre neurones i micròglia, tant *on* com *off*, es pot donar mitjançant senyals solubles, com els neurotransmissors, pèptids secretats per neurones que s'uneixen a receptors microgials, o contacte cèl·lula-cèl·lula.

1.2.1. Senyalització mitjançant neurotransmissors

Els neurotransmissors (Glutamat, AMPA, glicina, dopamina, noradrenalina etc.) són senyals amb un gran camp de senyalització ja que són alliberats directament a l'espai presinàptic. Dins els neurotransmissors en podem trobar que es comporten com a

senyals *on*, és a dir activant la micròglia quan augmenten de concentració en el medi, o com a senyals *off*, que inactiven la micròglia quan baixen de concentració.

Molts neurotransmissors actuen inhibint la producció micròglia de citocines pro inflamàtores (Bessis i cols. 2007). Un exemple d'això en són el GABA o la noradrenalina que redueixen la secreció micròglia de diverses citocines i l'NO, el TNF- α , i el IL-6 respectivament, en cèl·lules activades per el LPS.

També podem trobar neurotransmissors implicats en la quimiotaxi, fent que la cèl·lula sàpiga on hi ha un dany i vagi fins al punt de la lesió d'una manera més fàcil.

1.2.2. Senyalització mitjançant pèptids

La comunicació neurona-micròglia mitjançant pèptids es du a terme gràcies a la capacitat de modular l'activació microglial que presenten algunes molècules solubles secretades per les neurones. Una d'aquestes molècules és la fractalcina (CX3CL1). Aquesta pot actuar com a quimiocina en resposta d'algun estímul excitotòxic i reclutar cèl·lules glials fins on s'ha produït el dany neuronal, o pot actuar com a senyal *off* inhibint la resposta de la micròglia.

En la comunicació neurona-micròglia podem trobar també implicats altres proteïnes com el CD-22. Aquesta molècula s'expressa a la membrana neuronal i s'allibera en resposta a un dany (Tan i cols. 2000; Mott i cols. 2004). El seu receptor és el pèptid CD45 que es troba en nivells molt baixos en la micròglia fisiològica però que augmenta quan aquesta està activada.

1.2.3. Senyalització mitjançant contacte

Una altra forma de comunicació són els contactes cèl·lula- cèl·lula, és a dir, a partir de contactes entre lligands i receptors de membrana. Un exemple d'això en són el lligand SIRP α i el receptor CD47 que pot inhibir la funció fagocítica d'aquestes cèl·lules (Okazawa, 2005).

Un altre mecanisme de senyalització és el receptor TREM-2 . Aquest és un senyal *on* que quan és estimulada és produeix resposta microglial en alguns casos augmentant la funció fagocítica de la micròglia. D'altra banda la seva manca faria baixar la capacitat de fagocitar de la cèl·lula. El receptor TREM-2. s'expressa a la micròglia, a les cèl·lules

dendrítiques i als osteoclasts (Colonna, 2003) i no té lligant conegut. El TREM-2, com acabem d'esmentar, i és la seva estimulació la que desencadena una resposta microglial, en aquest cas augmentant la capacitat de fagocitosis de la micròglia (Takahashi i cols. 2005).

1.3. L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL

1.3.1. Rol de l'activació microglial en les malalties neurodegeneratives

Com ja hem comentat, les cèl·lules microgials són les responsables de la defensa i la resposta immune innata al SNC. L'activació microglial és un procés caracteritzat per la seva gran rapidesa en resposta al mínim canvi patològic del SNC, com podrien ser desequilibris en l'homeòstasi, canvis en la integritat estructural del cervell o alteracions en el microambient.

Davant d'aquestes situacions la micròglia té la capacitat de respondre experimentant canvis morfològics i funcionals, secretar citocines i quimiocines, que recluten i activen a altres cèl·lules (macròfags perifèrics, astròcits o cèl·lules de la micròglia d'altres regions), i fagocitar els cossos estranys que poden estar presents al parènquima nerviós dels pacients de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, on es formen les plaques de β amiloide ($A\beta$, de l'anglès *amyloid beta*) o els cossos de Lewy.

Es tracta doncs d'una resposta multifactorial que pot resultar beneficiosa ja que proporciona mecanismes de defensa davant les agressions, amb la funció principal d'eliminar els agents nocius i inhibir els seus efectes perjudicials. La resposta inflamatòria però inclou l'alliberament de substàncies potencialment neurotòxiques que poden acabar agreujant el dany que pretenien eliminar i fins i tot mantenir la glia en un estat d'activació crònica.

Nombroses evidències suggereixen que la neuroinflamació juga un paper molt important en la progressió de nombroses malalties neurodegeneratives com podrien ser el Parkinson, l'Alzheimer, l'esclerosi múltiple i l'esclerosi lateral, i el Huntington. D'altra banda, també la podem trobar relacionada amb isquèmies, traumes i amb l'envelliment cerebral.

Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és la més comú de les malalties neurodegeneratives i el seu principal factor de risc deriva de l'edat, afectant aproximadament el 7% de les persones majors de 65 anys i un 40% de les majors de 80. Aquesta es caracteritza per pèrdues de memòria, empitjorament progressiu de la capacitat cognitiva i motora, presentant falta de coordinació, a més d'estar associada a desordres del comportament.

Es tracta d'una malaltia multifactorial en la gran majoria dels casos és a dir en la que intervenen factors genètics i ambientals. Podem trobar, però també un 5% de casos de la malaltia que es donen únicament degut a mutacions hereditàries, és a dir per factors genètics.

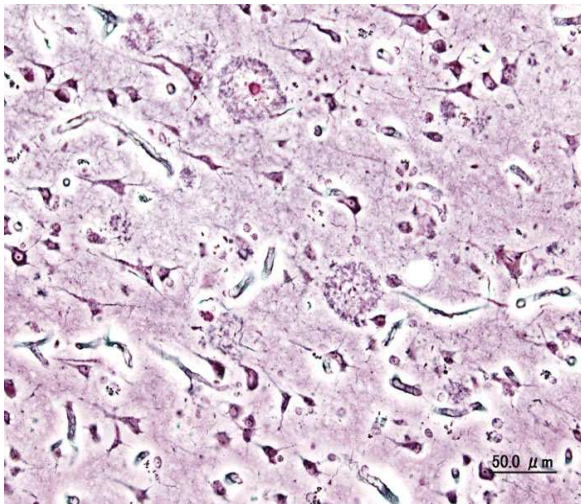


Figura 6. Imatge histopatològica de plaques senils observades en el còrtex cerebral d'una persona amb Alzheimer.

Els estudis apunten que la malaltia d'Alzheimer està clarament relacionada amb els dipòsits extracel·lulars de beta amiloide (Aβ) i els cabdells neurofibrilars (figura 6). En presència d'aquests marcadors s'observa una activació microglial proinflamatoria caracteritzada per un canvi morfològic, que inclou la secreció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), ON⁻, de citocines proinflamatòries (TNF-α, IL-1β i IL-6), quimiocines i prostaglandines.

Pel moment no es coneix la cura de l'Alzheimer però es creu que l'estimulació mental, l'exercici i una dieta equilibrada ajudarien tant a prevenir com a millorar les condicions un cop s'ha expressat la malaltia i una hipòtesi interessant és la que preveu que si és pugués atenuar la neuroinflamació microglial crònica associada a la malaltia, probablement els pacients tindrien un menor grau de neurodegeneració. Aquest tipus d'estudi són els que fan, entre d'altres en el laboratori on s'ha fet aquest treball de recerca i els experiments fets en aquest treball han consistit en caracteritzar un model de inflamació microglial emprant una línia cel·lular transformada (BV2) que en molts aspectes, és comporta com la micròglia.

Malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson representa el segon trastorn neurodegeneratiu més freqüent després de la malaltia d'Alzheimer. Les principals manifestacions d'aquest trastorn crònic són motores dins d'aquest grup trobaríem la bradicinèsia, l'alteració de la motricitat fina, la rigidesa muscular, tremolors en repòs i l'alteració i la inestabilitat postural. També podem trobar altres símptomes com la depressió i l'ansietat, trastorns del son, l'anòsmia i alteracions sensorials i del dolor.

Aquesta malaltia es caracteritza per la presència de dipòsits de la proteïna α -sinucleïna, els anomenats "cossos de Lewy", i per la pèrdua de neurones dopaminèrgiques, sobretot a la substància negra. Podríem trobar també algun cas relacionat amb la mutació de la proteïna α -sinucleïna .

S'ha pogut observar que diversos pacients de la malaltia de Parkinson comptaven amb la presència de micròglia activada. Aquesta activació, com ja hem anat dient, pot tenir un efecte neurotòxic que pot afectar molt negativament les neurones dopaminèrgiques, i d'aquesta manera, agreujar la malaltia.

L'activació glial com a diana terapèutica

Després de comprovar-se l'important paper que té la neuroinflamació i els seus mediadors inflamatoris en les malalties neurodegeneratives s'ha vist la necessitat de buscar nous fàrmacs per tal de tractar-les. Quan parlem del SNC hem de tenir en compte que es tracta d'un ambient immunodeprimit i "aïllat" de la resta del cos per la barrera hematoencefàlica. Això per una part té les seves avantatges ja que podríem dir que no hi ha intercanvi de cossos estranys o altres amenaces amb la resta del cos però en canvi aquesta separació també comporta dificultats a l'hora de buscar principis actius que puguin incidir i tractar els danys que es produeixen al SNC ja que aquest és de difícil accés. D'altra banda, hem de tenir en compte que el fàrmac que utilitzem ha de poder ser administrat durant tot el període que duri la patologia (sovint desenes d'anys) sense produir molts efectes adversos.

Uns dels primers fàrmacs utilitzats per a pacients amb malalties neurodegeneratives van ser els antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) que inhibeixen la COX-2 . Diversos estudis demostraren que prendre AINEs durant llargs períodes de temps disminuïa

considerablement les possibilitats de patir Alzheimer però en canvi, si es donava a pacients ja malalts no es veia una millora clara.

1.3.2. La resposta microglial a la mort neuronal

Quan una cèl·lula mor la micròglia és l'encarregada de fagocitar-la. S'ha comprovat però que la micròglia no es comporta de la mateixa manera quan la mort ha estat deguda a l'apoptosi o a la necrosi.

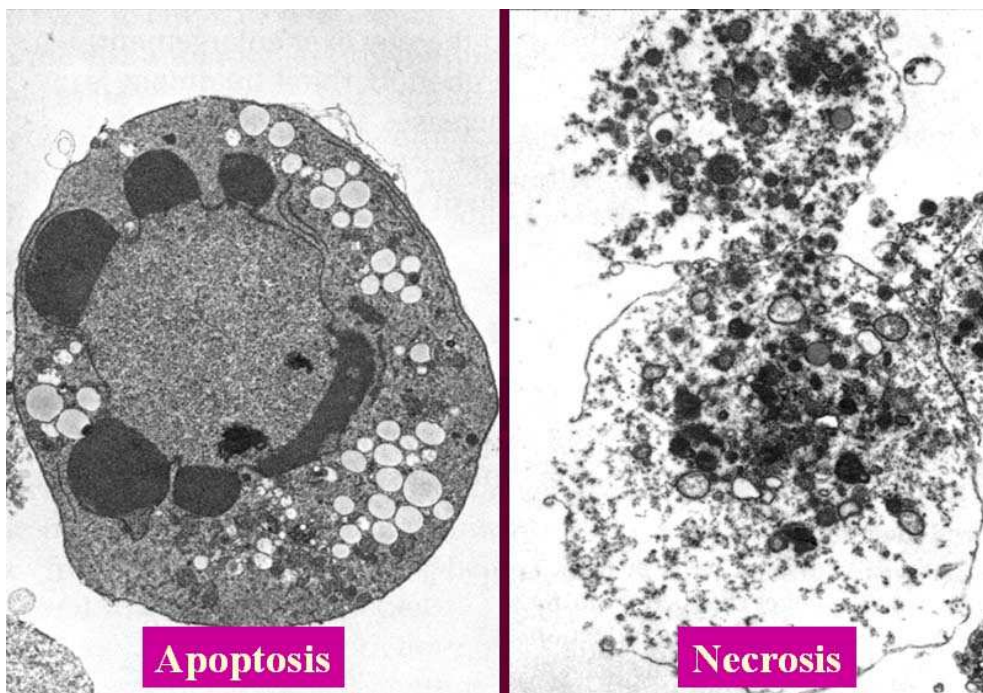


Figura 7. Imatges de microscòpia electrònica d'una cèl·lula apoptòtica i una necròtica. Plana web Cell biology.

Apoptosi

L'apoptosi és una forma de mort cel·lular programada . Aquesta consisteix en una sèrie de canvis en la membrana cel·lular com ara una pèrdua de la simetria i l'ancoratge, un empetitiment de la cèl·lula, la formació de vesícules intracel·lulars d'autofàgia, condensació de la cromatina, i fragmentació del DNA. Aquest procés és molt "net" ja que també inclou la fagocitosi i la expulsió dels vestigis cel·lulars. Aquests canvis estan regulats per les caspases que són enzims de la família de cisteïna proteases que es sintetitzen en forma de proenzim. Les caspases són mediadors essencials dels processos d'apoptosis, amb especial rellevància en els processos morfogènètics del desenvolupament embrionari.

L'apoptosi forma part del desenvolupament de les malalties neurodegeneratives però aquest també es dona en el SNC de forma fisiològica. En aquest últim cas l'apoptosi es produeix en processos com el desenvolupament ja que durant aquest hi ha uns alts nivells de neurones, de les quals només sobreviuen les necessàries en sinapsis funcionals, la resta seran eliminades mitjançant la micròglia. Aquest procés es du a terme gràcies als receptors *scavenger*, que inicien la fagocitosi. En les cèl·lules apoptòtiques trobem marcadors: *eat-me signals* i *don't eat-me signals*, que tal i com el nom indica permeten reconèixer a la micròglia què fagocitar.

Fagocitant les cèl·lules apoptòtiques s'aconsegueix disminuir la resposta inflamatòria, i la secreció de citocines proinflamatòries com la IL-1 β i el TNF- α . D'aquesta manera s'incrementen les citocines antiinflamatòries, com la IL-10 o el TGF β , a més de factors de creixement, fet que contribueix positivament a la reducció de la inflamació.

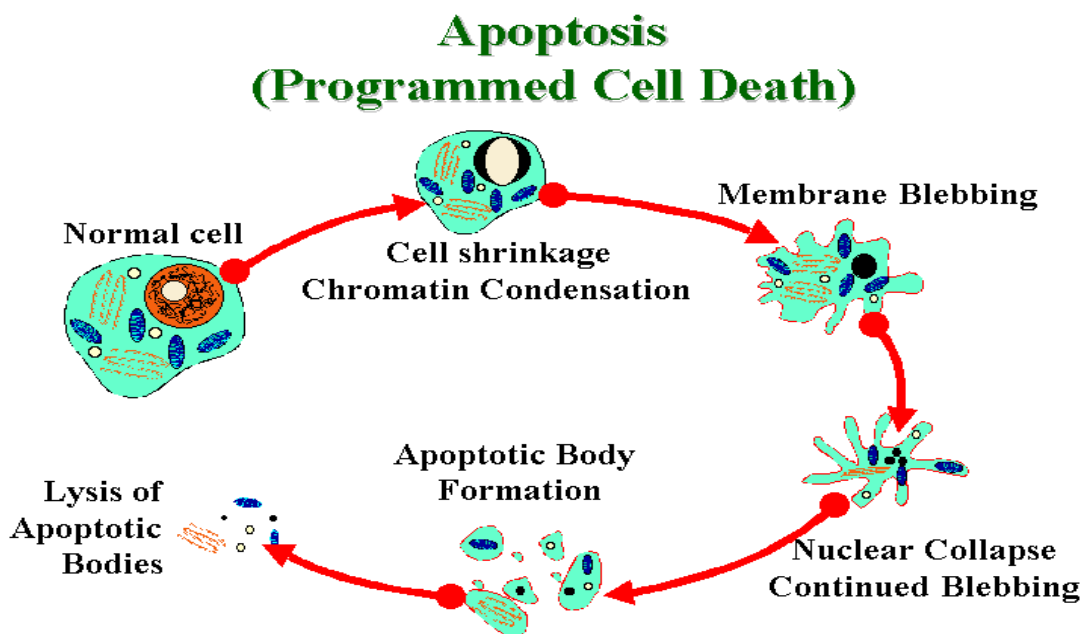


Figura 8 . Procés d'apoptosi.

Necrosi

La necrosi és la mort patològica d'una o més cèl·lules de qualsevol teixit provocada per un agent nociu. Aquest és un estat irreversible per la cèl·lula que comprèn la incapacitat de manteniment de la integritat plasmàtica i el consegüent escapament dels elements citoplasmàtics, desnaturalització de proteïnes per acció dels lisosomes i pèrdua de la seva funció específica per acabar sent fagocitada. Després d'un dany isquèmic, d'un

traumatisme cranial o malalties neurodegeneratives s'ha descrit la presència de neurones necròtiques.

Un dels indicadors d'una cèl·lula necròtica és la secreció de *heat shock proteins* i fibrinogen, que són lligands endògens dels TLRs . L'activació dels TLRs pels factors alliberats per les neurones necròtiques indueix una pujada de NF- κ B i això dóna lloc a la transcripció de gens proinflamatoris. D'aquesta manera la micròglia s'activa incrementant l'expressió de diversos marcadors proinflamatoris com el MHC II, el CD11b, la secreció de IL-6, TNF- α , iNOS i COX-2.

1.4. ESTRATÈGIES PER A INHIBIR L'ACTIVACIÓ GLIAL, UTILITAT TERAPÈUTICA

Tenint en compte l'important paper que juga l'activació glial crònica en el desenvolupament de les malalties neurodegeneratives i la seva neurotoxicitat quan es tracta d'una inflamació sistèmica, s'ha intentat controlar aquesta activació de varies maneres. Una d'elles consisteix en mantenir la micròglia en un estat quiescent de manera que aquesta no passa a altres estadis d'activació com serien la micròglia activada i la ameboide i per tant no varia morfològicament ni desprèn substàncies per atacar la possible amenaça, ja que aquest fet, en una inflamació ja crònica l'únic que comportaria és agreujar el dany neuronal inicial. Això es podria aconseguir reforçant els senyals inhibidors que mantenen la micròglia en estat de "repòs". Una segona estratègia consistiria en inhibir els mecanismes relacionats amb l'activació proinflamatòria ja que sense aquests estímuls la micròglia no es pot activar.

En els dos casos la solució passaria per inhibir l'activació microglial. Aquesta teràpia implica que la micròglia ja no seguirà amb la funció de defensa del SNC i per tant no podrà combatre cossos estranys o lesions, aquest procés en un SNC seria un fet molt negatiu però d'altra banda quan es tracta de patologies amb inflamació crònica, com les malalties neurodegeneratives, aquest fet podria resultar positiu.

1.4.1. Prevenció de l'activació glial

Una de les maneres de prevenir l'activació glial, com ja s'ha explicat és mantenir la micròglia en un estat de vigilància però sense activar . Això es pot dur a terme mitjançant la modulació de senyals inhibidores *off* com el CD200, i *on* com el TREM-2 de manera

que inhibissin la micròglia . La modificació d'aquests senyals ha ajudat a millorar els símptomes i el progrés de les malalties neurodegeneratives.

S'ha pogut comprovar aquest fet per exemple amb l'expressió del TREM-2 que aconsegueix un augment de la fagocitosi i una disminució de l'expressió gènica de IL-1 β , TNF- α i IFN- γ (Takahashi i cols. 2007) induint d'aquesta manera un ambient antiinflamatori molt favorable a millorar el curs de les malalties neurodegeneratives.

D'altra banda, també s'ha descobert que la interacció de les senyals inhibidores off CD200-CD200R es pot modular de manera que es pugui prevenir l'activació microglial.

1.4.2. Inhibició de l'activació glial

Una altra estratègia a seguir és l'inhibir l'activació glial, això es pot aconseguir inhibint els mediadors proinflamatoris, com alguns factors de transcripció com NF- κ B, C/EBPs o STATs, enzims com iNOS, COX-2 o NADPH oxidasa, o citocines com TNF- α , IL-1 β o IL-6.

Per modular la inhibició de l'activació glial comptem amb diversos mecanismes com els inhibidors farmacològics, siRNAs (ARNs silenciadors o d'interferència) o ratolins deficientes per algun o dels factors pro inflamatoris. D'altra banda també es poden utilitzar elements antiinflamatoris més naturals i usats en la medicina tradicional com podrien ser els Flavonoides com per exemple la Crisina.



Figura 9. Oroxyllum indicum.

Els Flavonoides són un grup de compostos polifenòlics que es poden trobar en les plantes. Es creu que incorporats a la dieta humana a través dels cereals, verdures, vi, etc. tenen un efecte antioxidant i antiinflamatori i alguns treballs més recents el relacionen amb la inhibició de la COX-2 i la iNOS (revisat per Yoon i Baek, 2005).

La crisina és un flavonoide del grup de les flavones que s'extreu de la planta *Oroxyllum indicum* (figura 9) . Tradicionalment ha estat conegudes pels seus efectes antioxidants, actualment però es creu que aquesta podria

tenir, a més del seu efecte antioxidant, un paper antitumoral i que també seria un inhibidor de la inflamació.

Un treball afirma que les cèl·lules de micròglia procedent de la línia cel·lular BV2, tractades amb crisina disminuïen els seus nivells de iNOS, el TNF- α , la IL-1 β (Ha i cols. 2010).

1.5. UTILITZACIÓ DE CULTIUS CEL·LULARS PER A L'ESTUDI DE L'ACTIVACIÓ GLIAL:

Entenem per cultiu cel·lular el conjunt de tècniques que permeten mantenir cèl·lules de diferents teixits o línies cel·lulars establertes fora del seu hàbitat, preservant al màxim les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques. Aquest tipus de tècnica és útil no únicament en la investigació bàsica, sinó que també té aplicació dins de l'àmbit del diagnòstic, i en estudis farmacològics i de toxicitat o en teràpia gènica, entre d'altres.

Una de les característiques més importats del treball amb cultius cel·lulars és que s'ha de mantenir en tot moment les màximes condicions higièniques i d'esterilitat ja que s'ha d'intentar imitar el millor possible les condicions en les que es trobaven les cèl·lules dins el seu organisme . Per fer això és necessari garantir un medi nutritiu ric en nutrients, sals i vitamines, i evitar en tot moment la presència d'altres microorganismes o agents contaminants.

La millor manera de complir això és treballar sempre que sigui possible sota una campana d'extracció amb filtres adients per tal de que l'aire no pugui quedar contaminat i que disposi de un sistema de llum ultraviolada per matar els possibles microorganismes que puguin arribar-hi. Naturalment aquest dispositiu és desconnecta mentre s'hi treballa i és torna a connectar per tal de que mentre la campana no estigui en funcionament la llum ultraviolada actuï. També és imprescindible mantenir la zona de treball, la roba i les mans el màxim d'estèrils possibles.

1.5.1. Cultius primaris i línies cel·lulars

Els cultius cel·lulars es poden classificar de diverses maneres: depenent de la seva capacitat d'adherència en una superfície per exemple el plàstic o el vidre. Aquesta

característica sol venir determinada pel tipus de cèl·lula de la qual deriven. La majoria de cèl·lules solen provenir de disgregacions tissulars, de tumors o de cèl·lules sanguínies.

Els cultius procedents de cèl·lules disgregades a partir d'un teixit original reben el nom de **cultiu primari**. Aquest cultius (per exemple cèl·lules glials a partir d'un cervell) tenen la particularitat que les cèl·lules són de l'òrgan de procedència i per tant, la seva fisiologia i comportament són, en principi molt semblants al que tenen *in vivo*. Presenten la dificultat de que no es poden mantenir molts dies en cultiu i que cada vegada que es tornen a necessitar cèl·lules cal sacrificar més animals. D'altra banda, podem trobar les **línies cel·lulars** que són cultius cel·lulars que provenen de sotmetre-les a processos de transformació (normalment provenen de tumors de teixits) i s'intenta que no perdin les seves característiques bàsiques (bioquímiques, fisiològiques i genètiques) i se'ls hi confereix capacitat il·limitada de multiplicació i passen a estar "immortalitzades". Aquest tipus de cultiu es pot guardar congelat i en necessitar-lo, descongelar-lo. És poden tenir nous cultius sense haver de sacrificar animals o necessitar noves mostres de teixit. No obstant això, en ser cèl·lules modificades moltes vegades es comporten de manera molt diferent a com ho fan en el teixit de procedència i per tant, la seva utilització per segons quin tipus d'estudis no és recomanable.

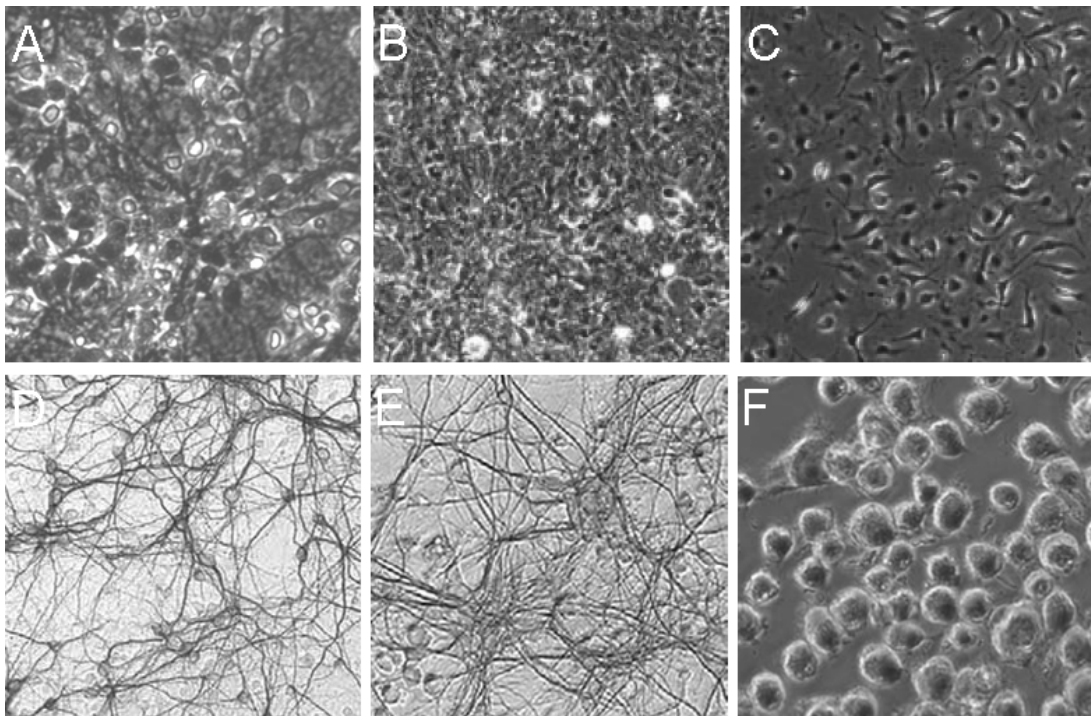


Figura 10. Diferents tipus de cultius cel·lulars: a la imatge A es mostra la fotografia d'un cultiu primari d'escorça de cervell de ratolí. A la B, un cultiu primari mixt d'astròcits i micròglia, també d'escorça de ratolí. La C és la fotografia d'un cultiu primari de micròglia i la D, un cultiu primari mixt (neurona i glia) també d'escorça de cervell de ratolí. En la imatge E es presenta un co-cultiu de neurona primària amb cèl·lules BV2 (línea transformada que serveix com a model de micròglia) i finalment, en la F es mostra un cultiu pur de la línia cel·lular BV2. Fotografies del laboratori de Neurobiologia cel·lular del CSIC.

1.5.2. Línies cel·lulars en l'estudi de l'activació microglial

El paper de la micròglia en a neurodegeneració, la toxicologia i la immunitat cada dia té una major importància en la recerca biomèdica. La recerca bàsica experimental fa servir diferents estratègies per tal de poder aportar coneixements sobre el paper, en aquest cas de la micròglia. Una de les estratègies inevitables és fer servir animals d'experimentació (usualment rates i ratolins). No obstant això, segons el nivell d'estudi que es vulgui fer (per exemple a nivell molecular o fins i tot cel·lular) pot ser molt útil poder treballar amb cultius cel·lulars. Si són primaris malgrat que també s'han de sacrificar animals, un cop s'obté el cultiu cel·lular es poden fer tractaments sobre les cèl·lules i molts més experiments que no els que podríem fer havent de tractar cada un dels animals per separat. Naturalment aquest tipus d'estratègia té les seves limitacions doncs moltes vegades la cèl·lula que es vol estudiar (en el nostre cas la micròglia) pot comportar-se en cultiu de manera diferent a com ho fa en el cervell de l'animal viu ja que hi ha molta interacció amb les altres cèl·lules i em l'entorn circumdant. Malgrat això, com ja em dit, en estudis de recerca bàsica els cultius cel·lulars poden ser molt adients per a l'estudi de les interaccions entre molècules i per a la simulació d'efectes tòxics o per a l'assaig de fàrmacs els estudis amb cultius poden ser i de fet són de gran ajut.

D'altra banda, si es poden emprar línies cel·lulars modificades que s'hagin pogut "immortalitzar" llavors s'obra un ventall de possibilitats d'experimentació molt important doncs permet fer abordatges que en el cas d'haver d'emprar animals crearia problemes ètics tan pel nombre d'animals a emprar com pel patiment a que podrien ser sotmesos en molts casos. A més a més, tampoc cal sacrificar tants animals com en el cas dels cultius primaris. Les línies cel·lulars establertes, però s'han de comportar com la cèl·lula que volem estudiar i això moltes vegades és una limitació ja que en ocasions el seu comportament és tant sols parcial i perden moltes característiques de la cèl·lula original o, fins i tot, en presenten de noves i de molt diferents.

En qualsevol cas, ens permeten realitzar les primeres etapes d'un estudi sense necessitat de sacrificar animals. D'altra banda aquestes presenten moltes altres avantatges com l'acceleració del ritme de treball ja que es reproduïxen de manera contínua i indefinida i ens eviten haver de fer l'extracció de les cèl·lules de l'animal i tota la seva preparació.

Línia cel·lular BV2

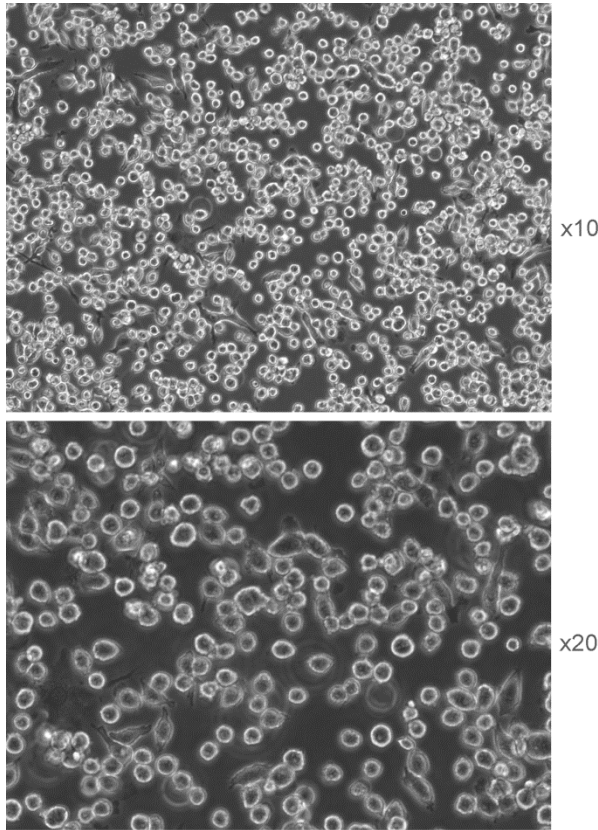


Figura 11. Cèl·lules de la línia cel·lular BV2 vistes a 10 augments i a 20.

Per els nostres experiments hem utilitzat la línia micròglia BV2 que es comporta en molts aspectes com la micròglia de cultius primaris i, el més important, com la micròglia del cervell de l'organisme viu.

La línia cel·lular BV2 és una línia murina (de ratolí) que va ser immortalitzada amb la infecció d'un retrovirus recombinant v-raf/v-myc (un oncogen). La línia comparteix propietats amb els macròfags del cos pel que fa al perfil d'antígens, la seva capacitat fagocítica i l'activitat antimicrobiana però són diferents dels macròfags perifèrics en altres aspectes, com per exemple, el comportament dels canals K^+ .

En un estudi es va demostrar que les cèl·lules de la línia BV2 tenien una regulació normal de la producció de NO i una resposta funcional a IFN-gamma, els paràmetres importants per a la interacció apropiada amb les cèl·lules T i les neurones. A part també tenen la capacitat d'estimular altres cèl·lules glials.

La línia cel·lular BV2 per tant, representa un model alternatiu apropiat per a estudis *in vitro* del comportament que presenta la micròglia davant d'agressions externes i també és un bon model per a l'estudi de la neuroinflamació produïda per la micròglia.

La línia cel·lular BV2 va ser cedida per la Dra. Elisabetta Blasi (Azienda Ospedaliero-Universitaria, Modena, Itàlia) i s'ha anat subcultivant al laboratori de neurobiologia on s'ha realitzat aquest treball de recerca.

2. OBJECTIUS

L'objectiu del nostre treball es caracteritzar alguns aspectes de la línia cel·lular BV2 i veure algunes de les seves semblances amb els cultius primaris de micròglia.

- 1- Veure si les cèl·lules de la línia cel·lular BV2 presenten proteïnes específiques de la micròglia. Estudi sobre la CD68.
- 2- Comprovar la reacció inflamatòria produïda en l'activació microglial de les cèl·lules de la línia BV2 a partir de paràmetres com l'expressió de la iNOS i la COX-2 i la producció i alliberació de nitrits.
- 3- Comparar els resultats de l'activació per LPS en BV2 i en cèl·lules microgials.
- 4- Observar el procés d'inflamació d'unes cèl·lules BV2 davant de l'aplicació de LPS.
- 5- Observar el procés d'inflamació d'una cèl·lules BV2 davant de l'aplicació de LPS+ IFN- γ .

L'objectiu final d'aquest treball és que si aquesta línia cel·lular immortalitzada es comporta, al menys en part, com les cèl·lules de la micròglia llavors es podrà emprar com a model per determinats tipus d'experiments sense haver de sacrificar tants animals com quan es treballa amb cultius primaris.

3. Materials i mètodes

3.1. CULTIU DE LA LÍNIA CEL·LULAR MICROGLIAL

3.1.1. Cultiu línia BV2:

Materials :

- Plaques de cultiu de 48 pous (figura 12) i flascons T75. (figura 13)
- Pipetes serològiques, tubs Falcon.
- Rascadors
- Càmera de Neubauer. (figura 14)
- Dimetilsulfòxid (DMSO)
- Criotubs.

Reactius utilitzats:

- El medi RPMI 1640
- Sèrum fetal boví en una concentració del 10%
- Penicil·lina-estreptomicina en una concentració del 0.1%

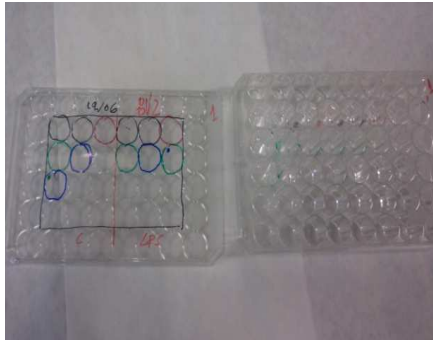


Figura 12. Placa de cultiu de 48 pous oberta.

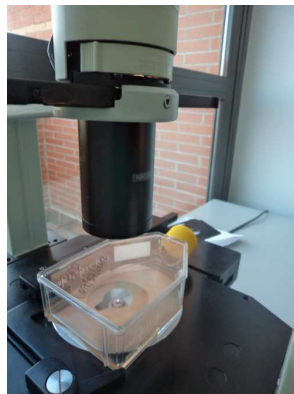


Figura 13 .Observació d'un flascó T-75

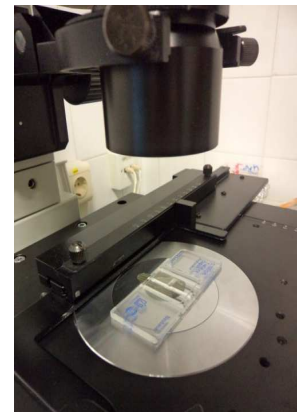


Figura 14 . Observació d'una càmera de Neubauer al microscopi.

Procediment

Manteniment

Les BV2, degut al seu component tumoral, són cèl·lules que es divideixen amb molta freqüència i amb un metabolisme molt actiu. És per aquest motiu que és necessari fer

canvis de medi aproximadament cada 2 dies i un pas de sembrat per manteniment quan tenim un cultiu confluent, és a dir, el flascó ple gairebé al 100% i sense espais entre les cèl·lules. Aquest procediment és necessari com a mínim 2 cops per setmana, sinó les cèl·lules es poden desenganxar de la paret de la placa o el flascó.

Les cèl·lules es mantenen en els incubadors a 37°C i en unes condicions de l'aire semblant al de l'atmosfera. En aquest cas podríem trobar un 5% de CO₂ (figura 15).

Tot i que encara no s'han realitzat estudis que ho demostrin, es creu que les cèl·lules BV2 podrien perdre propietats després d'un cert nombre de passos de sembrat. Això vol dir que de tant en tant hauríem de tornar a recórrer a les cèl·lules inicials.

Per fer el pas del sembrat:

- 1- Es canvia el medi inicial per un de nou.
- 2- Es desenganxen les cèl·lules de la paret amb el rasclat i es pipeteja contra la superfície de sembrat amb una pipeta serològica.
- 3- Es dilueixen 0,5 mL de la suspensió cel·lular que hem extret amb la pipeta amb 4,5 mL de medi fresc i es posa a un flascó T75 nou.

Sembrat les cèl·lules en plaques de cultiu

- 1- Fer saltar les cèl·lules de la paret del flascó de cultiu ajudant-se amb un rasclat (figura 17) i pipetejar contra la superfície del flascó amb una pipeta serològica.
- 2- Es posen les cèl·lules amb el medi en un tub Falcon de 50 ml i es centrifuga a 1000rpm durant 5 minuts.
- 3- S'espira el medi de cultiu i el *pellet* (sediment de cèl·lules) i es resuspenen amb 10 ml de cultiu nou.
- 4- Es posen 10 µL d'aquesta suspensió a la càmera de Neubauer per fer el recompte de cèl·lules.*
- 5- Ajustar la concentració de cèl·lules que volem amb el medi fresc i sembrar cada pou de la placa (figura 20). El volum per pou és de 300 µL .

*El recompte de cèl·lules consisteix comptar els 4 quadrants de 16 quadrícules cadascun i apartir d'aquí calcular el número total de cèl·lules/mL. Això es fa aplicant la fórmula:

$$\text{Núm. de cèl·lules} = (\text{promig de 4 quadrants}) \times 10^4 \times \text{MI de suspensió}$$

Gràcies a això podem ajustar la densitat (en el nostre cas volíem una concentració de 5×10^4 cèl·lules/mL) amb el medi fresc . (figura 19)

Observacions:

- Els cultius cel·lulars són altament contaminables sense les mesures de prevenció necessàries, per això és important que aquest procediment sigui dut a terme amb material estèril i sota una campana d'extracció. D'aquesta manera s'evita l'introducció de qualsevol microorganisme o residus que podem trobar en l'aire o en l'espai de treball. (figura 16)
- Les cèl·lules estan vives i necessiten oxigen en tot moment, per això és molt important que mai mantinguem els flascons amb les cèl·lules tancats totalment. Per facilitar això els flascons tenen un mecanisme de tancament que permet que es pugui obrir totalment, deixar-lo mig obert perquè hi pugui entrar l'aire o tancar-lo.
- És molt important mantenir les cèl·lules sempre a temperatures molt pròximes a 37 C i en unes condicions d'aire adequades.



Figura 15. Incubadors amb flascons T-75.



Figura 16. Campana d'extracció .



Figura 17. Procés de rascat de les cèl·lules.

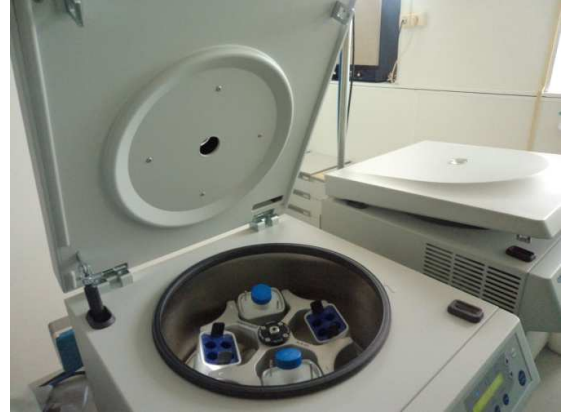


Figura 18 . Centrifugadora amb els tubs Falcon.

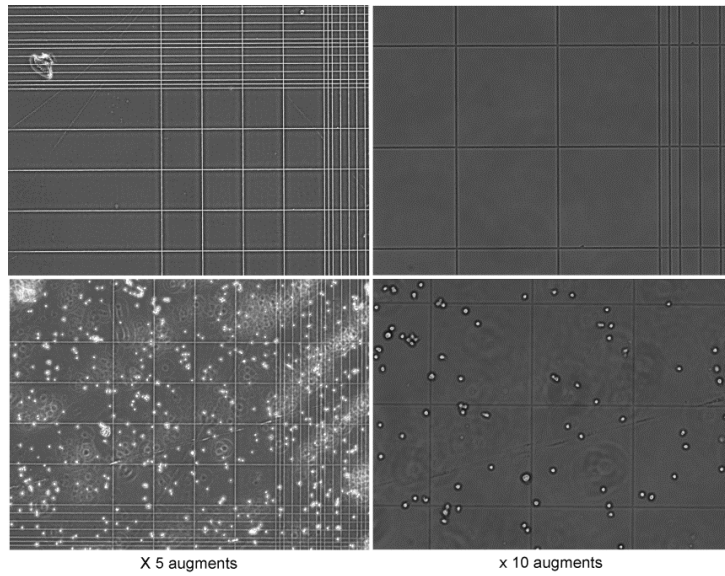


Figura 19. Vista d'una càmera Neubauer en un microspi.



Figura 20. Procés de pipetejat en un tub Falcon.

Congelació

Una vegada tenim suficients cèl·lules podem optar per congelar-les (figura 21) i així poder mantenir-les el temps que necessitem. En aquest cas hem de canviar el medi, preparar una suspensió cel·lular , posar en un criotub 900uL i 100uL de DMSO, posar-ho en gel i després deixar-ho durant 2h a -80 C. Finalment hem de posar els criotubs (figura 23) en un tanc de nitrogen líquid (figura 22).



Figura 21. Congelador .



Figura 22. Tancs de nitrogen líquid.



Figura 23. Criotubs en el tanc de nitrogen líquid a -80 C.

3.2. IMMUNOCITOQUÍMICA

La immunocitoquímica és una tècnica que permet la localització d'antígens en cèl·lules mitjançant anticossos per la posterior observació a través d'un microscopi.

En aquest treball s'han utilitzat diferents protocols d'immunocitoquímica, tant mitjançant l'observació amb llum visible com el marcatge amb fluorescència. Dins d'aquest últim grup podem distingir entre marcatges senzills i dobles.

Marcatge amb fluorescència

Materials:

Anticossos Primaris

- **AntiCD68:** Reconeix la proteïna CD68 a les cèl·lules de ratolí. Per fer aquest experiment s'ha utilitzat un anticòs monoclonal de rata de la casa Serotec, Ref. MCA1957.

- **Anti-iNOS:** reconeix l'enzim d'òxid nítric sintetasa induïble (iNOS). Per fer l'experiment s'ha utilitzat un policlonal de conill de la casa Transduction laboratories (BD).
- **Anti-COX2:** reconeix l'enzim ciclooxigenasa 2. Per fer l'experiment s'ha utilitzat un policlonal de conill de la casa Santa Cruz.

Anticossos Secundaris:

- Alexa 488 donkey anti-rat
- Alexa 488 donkey anti-rabbit
- Alexa 546 donkey anti-rat
- Alexa 546 donkey anti-rabbit

Tots són de la casa Molecular Probes (invitrogen)

Altres reactius:

- Paraformaldehid(PFA).
- Phosphate buffered saline (PBS).
- Tampó fosfat (TP) 0.1M
- BSA (Bovine serum albumine).
- Timerosal .
- Hoescht.

Tots són de la casa Sigma (excepte tampó fosfat).

Procediment

Pas 1: Fixació

a) Material

- Paraformaldehid (PFA) al 4% amb tampó fosfat (TP) 0.1M, pH 7.4.
- PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal. *

b) Procediment

- 1- Aspirar el medi de cultiu.
- 2- Afegir PFA al 4% i deixar-ho a temperatura ambient durant 20 min.
- 3- Aspirar el PFA.
- 4- Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.
- 5- Procedir al pas 2 (permeabilització) o deixar en PBS-timerosal i guardar a 4°C fins al processat de la placa.

* El Timerosal és un compost organomercúrics amb propietats bactericides i fungicides que s'utilitza per evitar possibles contaminacions.

Observacions:

- Per evitar contaminacions és molt important que tot el procés sigui dut a terme dins d'una campana extractora
- Una vegada hem fixat les cèl·lules dels pous evitem que aquestes es puguin contaminar tan fàcilment i d'aquesta manera aconseguim poder conservar-la més temps (unes dues setmanes) a la temperatura adequada. Ja no són necessàries tantes mesures preventives.

Pas 2: Permeabilització

La permeabilització és un procés mitjançant el qual es fa que la membrana cel·lular es faci permeable i permeti l'accés de l'anticòs a l'interior de la cèl·lula.

a) Material

- PBS.
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal.
- Metanol.

b) Procediment

- 1- Si la detecció del marcatge es realitzi utilitzant fluorescència, s'ha d'incubar 8 min a temperatura ambient amb metanol fred (-20°C).

- 2- Es renta 3 vegades amb PBS i es deixa agitant-se durant 5 min cada vegada.

Pas 3: bloqueig

a) Material

-PBS amb BSA al 1%.

-Sèrum (del mateix animal que l'anticòs secundari que volem utilitzar)

b) Procediment

- Incubar durant 20 min a temperatura ambient amb PBS-BSA 1% amb un 10% de sèrum.

Pas 4: incubació amb anticossos i revelat amb un anticòs secundari fluorescent

a) Material

- Anticossos primaris i secundaris.
- PBS.
- PBS +0,4 mg/mL de timerosal.
- PBS-BSA 1%.
- Sèrum.
- Anticossos primaris i secundaris.

b) Procediment

- 1- Es prepara l'anticòs primari i es dilueix en una solució de PBS-BSA 1% + 10% sèrum.
- 2- Es deixa tota la nit a la nevera a 4°C.
- 3- Es renta amb PBS 3 vegades i es deixa en agitació cada vegada durant 5 minuts.
- 4- Es prepara l'anticòs secundari i es dilueix en una solució de PBS-BSA 1% + 10% sèrum.
- 5- Es deixa reposar una 1h a temperatura ambient i en agitació.

- 6- Es renta 3 vegades amb PBS i es deixa 4 min en agitació cada vegada
- 7- Finalment es fa un quart rentat en PBS-timerosal i es deixa guardat a 4C.

Observacions:

- Els anticossos desprenen llum fluorescent. Si deixem les plaques a la llum arriben components de ultraviolats de la llum que fan que la fluorescència s'exciti i es vagi gastant. Per evitar això hem de protegir la placa de la llum per exemple mitjançant el paper d'alumini.
- Els anticossos poden formar cristalls per condensació que es necessari eliminar, per això és important agitar la solució dins d'un eppendorf.(figura 24)



Figura 24. Procés d'agitació d'un eppendorf

Tractament amb LPS

- LPS : 100 ug/ml . Casa SIGMA

Els LPS o lipopolisacàrids són components essencials de la paret cel·lular externa dels bacteris Gram (-), fan d'endotoxina i provoquen una forta resposta dels sistemes immunitaris d'animals normals. És un agent molt utilitzat per a induir l'activació glial in vitro.

Tractament amb LPS i IFN- γ

-LPS + IFN- γ : 100 ug/ml LPS+ 0.3ng/ml IFN- γ



Figura 25 . Funció de la molècula de IFN- γ . Plana web: <http://www.medmol.es/moleculas/18/>

L' interferó gamma és un tipus de citoquina soluble amb la funció principal d'activar els macròfags, en les respostes immunitària innates com les respostes cel·lulars adaptatives. Aquest augmenta l'expressió de gens relacionats amb reconeixement de patògens, processament i presentació d'antígens, resposta antiviral, resposta antiproliferativa amb accions sobre l'apoptosi. activació d'efectors antimicrobians, entre d'altres.

Expressió de la iNOS

L'enzim iNOS (òxid nítric sintetasa induïble) és el responsable de la producció de NO en les cèl·lules gials activades per diversos estímuls.

3.3. TINCIONS

Hoechst 33258

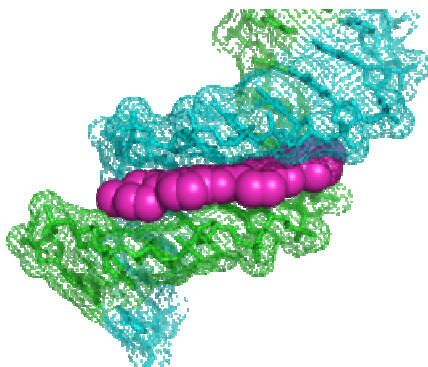


Figura 26. Hoechst (magenta) bound to the minor groove of DNA (green and blue). From [PDB 264D](https://www.rcsb.org/structure/264D). Plana web: http://en.wikipedia.org/wiki/Hoechst_stain

El Hoechst o bisbenzimidaz (figura 26) és un compost que s'uneix als àcids nucleics i emet fluorescència blava. Aquest es pot detectar al microscopi al excitar amb llum ultravioleta.

El Hoechst 33258 no és capaç de travessar les membranes cel·lulars, el que fa necessari permeabilitzar les cèl·lules abans de realitzar la tinció.

En aquest treball aquesta tinció ha estat utilitzada com a marcador del nucli cel·lular ja que aquest conté DNA i per tant surt senyalitzat de color blau en aplicar-hi el Hoescht.

Materials

- PBS.
- Solució de Hoechst 33258 100 µg/mL preparada en H₂O milliQ. És important que aquesta es conservi a -20°C i tapada de manera que no pugui perdre fluorescència en arribar-hi la llum.
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal.

Procediment

Partim de cèl·lules fixades i permeabilitzades:

- 1- Aplicar el Hoechst 33258 1 µg/mL en PBS i deixar-lo reposar durant 5min a temperatura ambient.
- 2- Fer 2 rentats amb PBS, deixant-lo reposar agitant-se durant 4 min cada vegada .
- 3- Fer un tercer rentat amb PBS-timerosal.
- 4- Guardar a 4°C.

Obsevacions

- 1- Una vegada aplicat la solució de Hoechst és important mantenir la placa en la foscor el major temps possible ja que quan li arriba la llum aquesta estimula el component fluorescent de la tinció i aquesta va desapareixent.
- 2- Aquest mètode de tinció es pot utilitzar també amb cèl·lules on ja s'hi ha fet una immunocitoquímica.

3.4. DETERMINACIÓ DE NITRIT

Una de les característiques indicadores de la activació microglial és la producció d'espècies reactives d'oxigen i de NO. A partir del procés de determinació de nitrats hem pogut veure els nivells de producció de NO i així afirmar o no si les cèl·lules estaven activades o com d'activades estaven. Això s'ha aconseguit mitjançant l'observació de l'acumulació de l'ió nitrit (NO_2^-) al medi de cultiu i amb l' utilització de les solucions de Griess.

Material

- NaNO_2
- Medi de cultiu.
- Placa de 96 pous.
- Solucions de Griess A i B.

Estàndards i recta patró

A partir d'una solució 20 mM de NaNO_2 es prepara la recta patró amb les concentracions: 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,13 - 0 μM

Primer es prepara una solució diluint 4 μL de la solució 20 mM de NaNO_2 en 800 μL de medi. Després l'únic que s'ha de fer és anar fent dilucions a cada pou amb la meitat del medi anterior.

Procediment

- 1- Es posen 50 μL de cada una de les mostres en les que volem veure la quantitat de nitrats per duplicat (es posen de costat horitzontalment) en una placa de 96 pous.
- 2- Es posen 50 μL en cada punt de la recta patró per duplicat a la placa de 96pous.
- 3- Es barregen les solució A i solució B en quantitats iguals i s'apliquen (3 mL de cada un per a una placa de 96p).
- 4- S'afegeixen 50 μL de la solució A+B a cada pou i es deixa a temperatura ambient durant 10 min.

- 5- Finalment es porta la placa a un espectrofotòmetre* que ens dóna els nivells de NO segons la intensitat del color rosat de la placa (més rosa= més activat). La lectura resultant s'analitza mitjançant l'interpolació a la recta patró per obtenir el resultat de l'assaig en concentració μM .

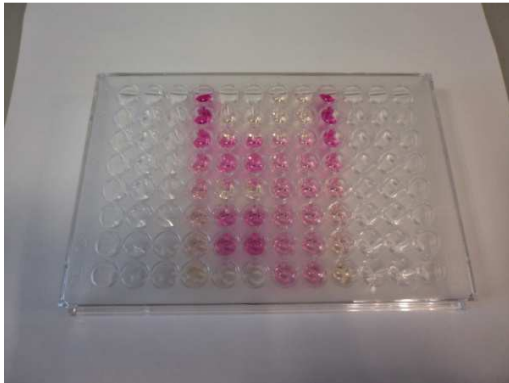


Figura 27. Placa on s'han aplicat les solucions de Griess.



Figura 28. Espectrofotòmetre

*El funcionament de l'espectrofotòmetre es basa en la seva capacitat d'analitzar, en funció de la longitud d'ona, la relació entre els valors d'una mateixa magnitud fotomètrica relativament a les radiacions i la concentració o reaccions químiques de la mostra.

3.5. MICROFOTOGRAFIA

Les observacions s'han fet amb un microscopi invertit Olympus model Ix71 equipat amb contrast de fases i epifluorescència i amb un microscopi de transmissió normal Nikon Eclipse equipat amb contrast de fases i epifluorescència.

Les fotografies s'han obtingut mitjançant càmeres digitals especials per a microscòpia (una CC-12 en el cas del microscopi Olympus i una DX73 en el cas del microscopi Nikon).

Les imatges han estat gestionades amb un software de tractament i anàlisi especial per aquestes càmeres, el Soft Imaging System Cell[^]F.



Figura 30. Microscopi Olympus Ix71 .



Figura 31. Càmera especial CC-12 .



Figura 32. Microscopi Nikon Eclipse i ordinador on es processen les imatges.

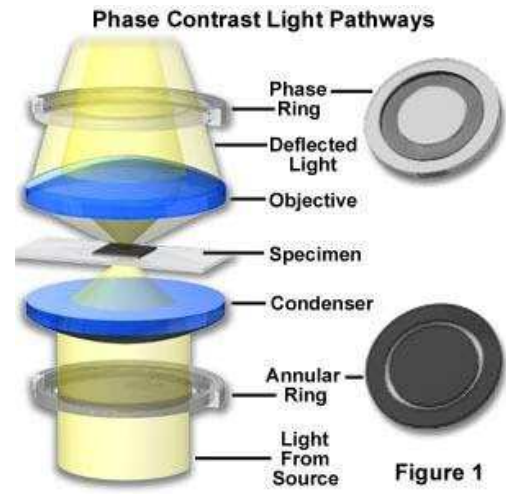


Figura 33. Procés de funcionament d'un microscopi de contrast per fases. Plana web :<http://morfoudec.blogspot.com.es/2008/07/microscopa-de-contraste-de-fase.html>

4. RESULTATS

4.1 CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES DE LA LÍNIA MICROGLIAL BV2

Per tal de caracteritzar millor la línia cel·lular BV2 vam comprovar si aquesta mostrava la proteïna CD68, que sí que es troba en la micròglia . Es va fer una immunocitoquímica amb un anticòs monoclonal de rata que reconeix específicament la proteïna CD68 (pròpia de la micròglia in vivo). Seguint el protocol indicat a la metodologia, després es va incubar amb un segon anticòs conjugat a molècules fluorescents per poder veure on es trobava la proteïna i el resultat va ser afirmatiu (figures 34 i 35). És a dir, les cèl·lules BV2 tenen la proteïna CD68 que està distribuïda all llarg de la seva superfície i que a les figures està marcada amb fluorescència verda. Les imatges de color vermell corresponen als nuclis de les cèl·lules que s'han marcat amb un altre fluorocrom tal com s'indica a la metodologia.

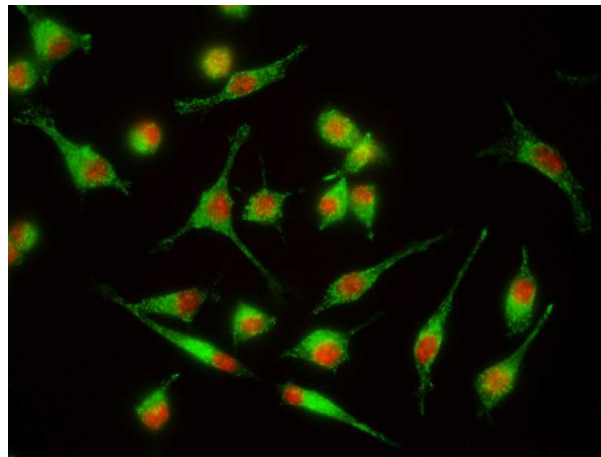


Figura 34. Cèl·lules BV2 marcades amb CD68 en verd. El color taronja correspon als nuclis.

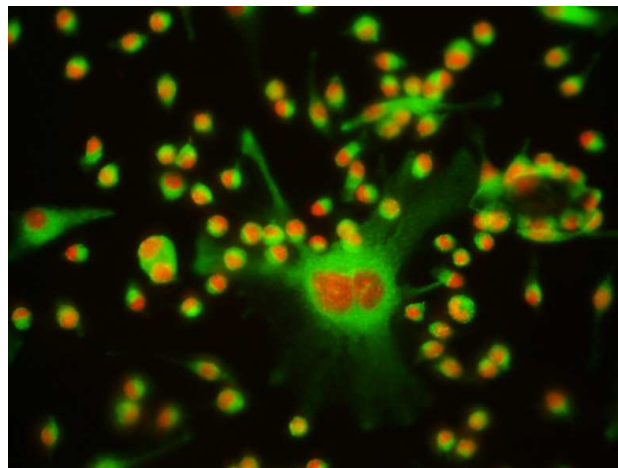


Figura 35. Cèl·lules BV2 marcades amb CD68 en verd.

4.1.1. Contrast de fases

BV2

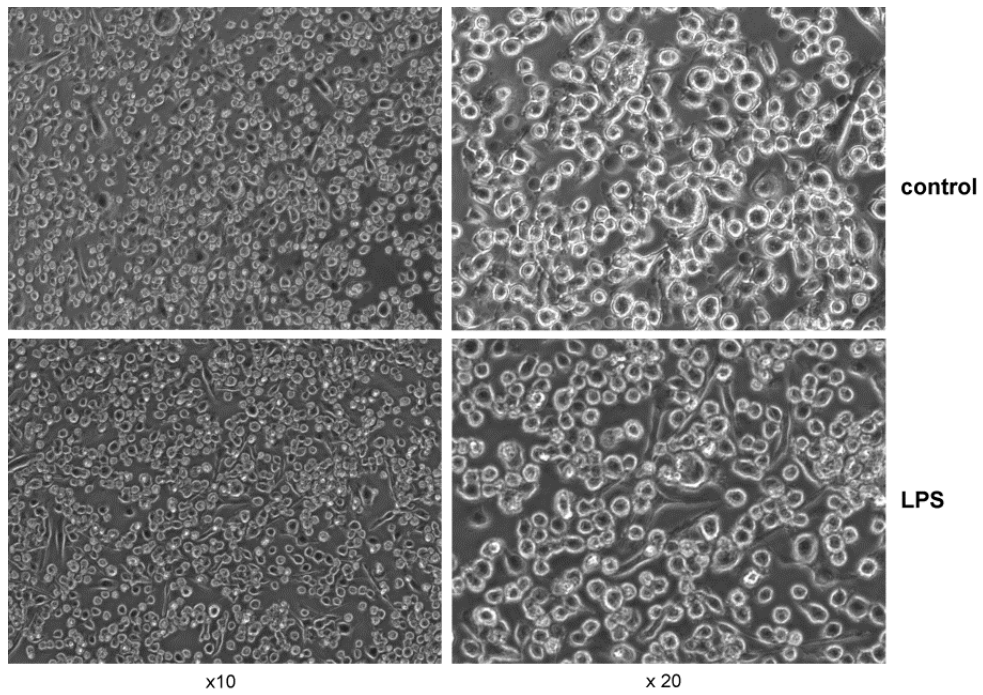


Figura 36. Tractament de les cèl·lules BV2 amb LPS. Comparació del control i LPS. Observades amb contrast de fases.

Micròglia

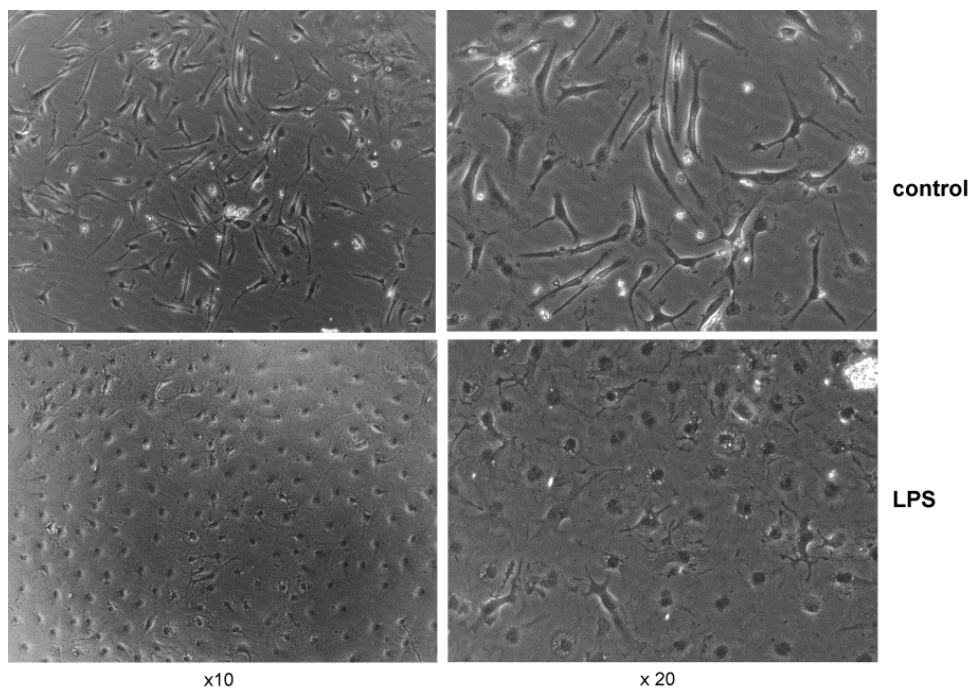


Figura 37. Tractament cèl·lules de micròglia amb LPS. Comparació del control i LPS. Observades amb contrast de fases.

4.1.2. Fotografies en color

BV2

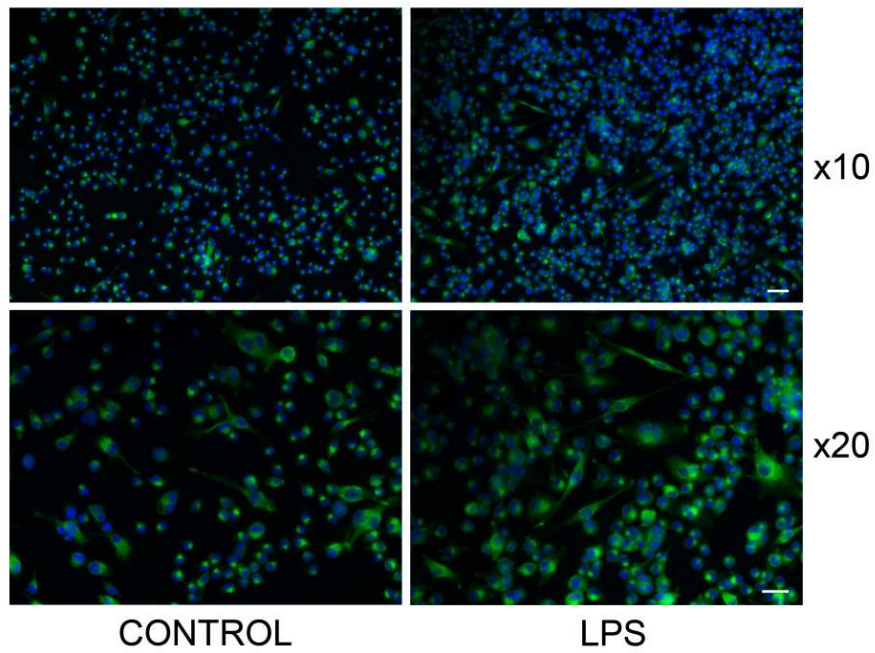


Figura 38. Tractament cèl·lules de micròglia amb LPS. Comparació del control i LPS. En verd el CD68 i en blau el marcador d'àcids ribonucleics Hoescht.

Micròglia

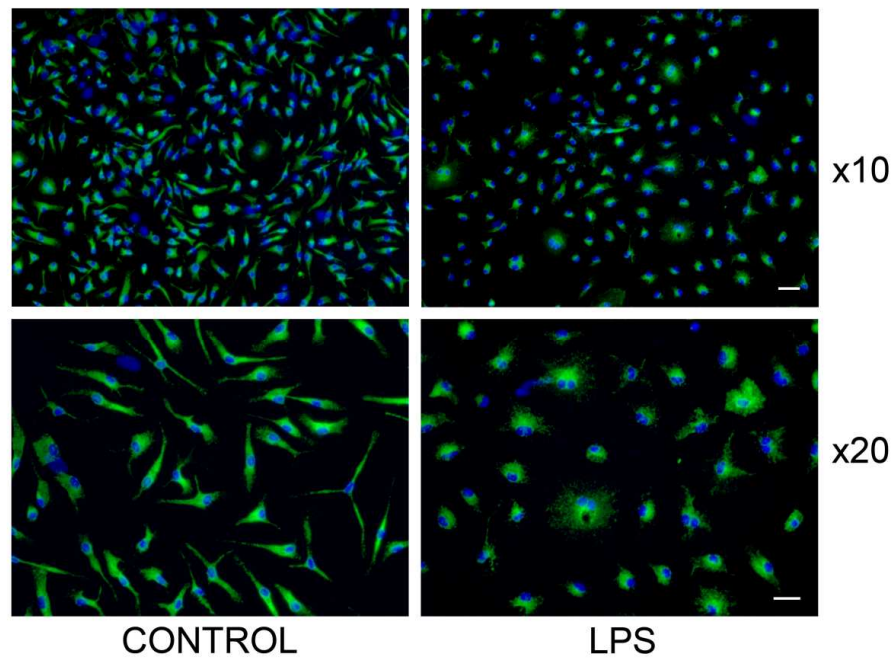


Figura 39. Tractament cèl·lules de micròglia amb LPS. Comparació del control i LPS. En verd el CD68 i en blau el marcador d'àcids ribonucleics Hoescht.

En les figures anteriors podem veure primer mitjançant l'observació per contrast de fases (figures 36 i 37) i després en color (figures 38 i 39), com varien les cèl·lules BV2 i les cèl·lules microgials en tractar-les amb el LPS i observar les diferències entre els dos models.

En els controls de micròglia tant de les figures en color com per contrast de fase podem veure com la majoria de cèl·lules del cultiu es trobarien en un estat quiescent, de "repòs". Aquest estat es caracteritza perquè la cèl·lula presenta una morfologia ramificada. En aquestes condicions, gràcies a l'observació en color també podem veure com les cèl·lules no estan gaire marcada de color verd, fet que ens indica la poca reactivitat de les cèl·lules control. En canvi la micròglia tractada amb LPS produeix uns canvis de forma (es perd l'aspecte allargat per passar a formes més arrodonides. En aquestes condicions es parla de micròglia activada o reactiva. És a dir, la cèl·lula ha reaccionat a l'estímul proinflamatori del LPS i respon mitjançant la inflamació. Aquest estat es caracteritza per un canvi de morfologia: les ramificacions es fan més curtes i gruixudes. En el cas de les cèl·lules ameboides veiem que moltes cèl·lula han adoptat una morfologia encara més arrodonida i ja sense prolongacions. Les cèl·lules ja poden respondre a l'estímul mitjançant la fagocitosi. També podem observar que les cèl·lules tractades amb LPS tenen unes dimensions més grans comparades amb les del control. D'altra banda veiem com les cèl·lules han quedat clarament més marcades de color verd. Fet que també ens indica el seu estat d'activació.

Quan observem la línia cel·lular BV2, en els controls de BV2 tant de les figures en color com per contrast de fase podem veure com la cèl·lula es trobaria en un estat de repòs, sense activació, però que en canvi no acostumen a presentar ramificacions com en el cas de la micròglia sense activar. Les BV2 de control es mostren en general arrodonides. És una forma, per tant, diferent a la de les cèl·lules microgials però que sabem que no han estat activades i que també presenten poc marcatge de CD68 (imatges de fluorescència).

Les cèl·lules BV2 tractades amb LPS tant de les figures en color com per contrast de fase podem veure que també presenten (igual que la micròglia) un estat d'activació. Que, en aquest cas es manifesta amb un increment de la mida i de la superfície cel·lular comparades amb les cèl·lules control (les BV2 no tractades amb LPS). També podem

veure com hi ha un increment de la fluorescència verda lo qual indica que hi ha més expressió de la proteïna CD68 (això com ja hem vist, també passa a la micròglia).

Podem veure doncs com tant els cultius primaris de micròglia com les BV2 han respost a l'estímul, tot i així viem com les diferències morfològiques entre les cèl·lules en control i tractades es fan més evidents en les cèl·lules del cultiu primari microglial.

4.1.3. Expressió de l'iNOS i COX2 en cèl·lules tractades amb LPS i LPS/IFN γ

Un cop caracteritzada la capacitat reactiva de les cèl·lules BV2 passem a estudiar altres proteïnes que la micròglia expressa quan està activada a fi de veure si les BV2 segueixen el recrear un model d'activació microglial proinflamatori. Tractem les cèl·lules BV2 amb l'estímul LPS i també amb LPS/IFN γ (l'interferó gamma incrementa l'estímul produït pel LPS), i s'observen els canvis que la inflamació (activació de les cèl·lules) comporta.

24h

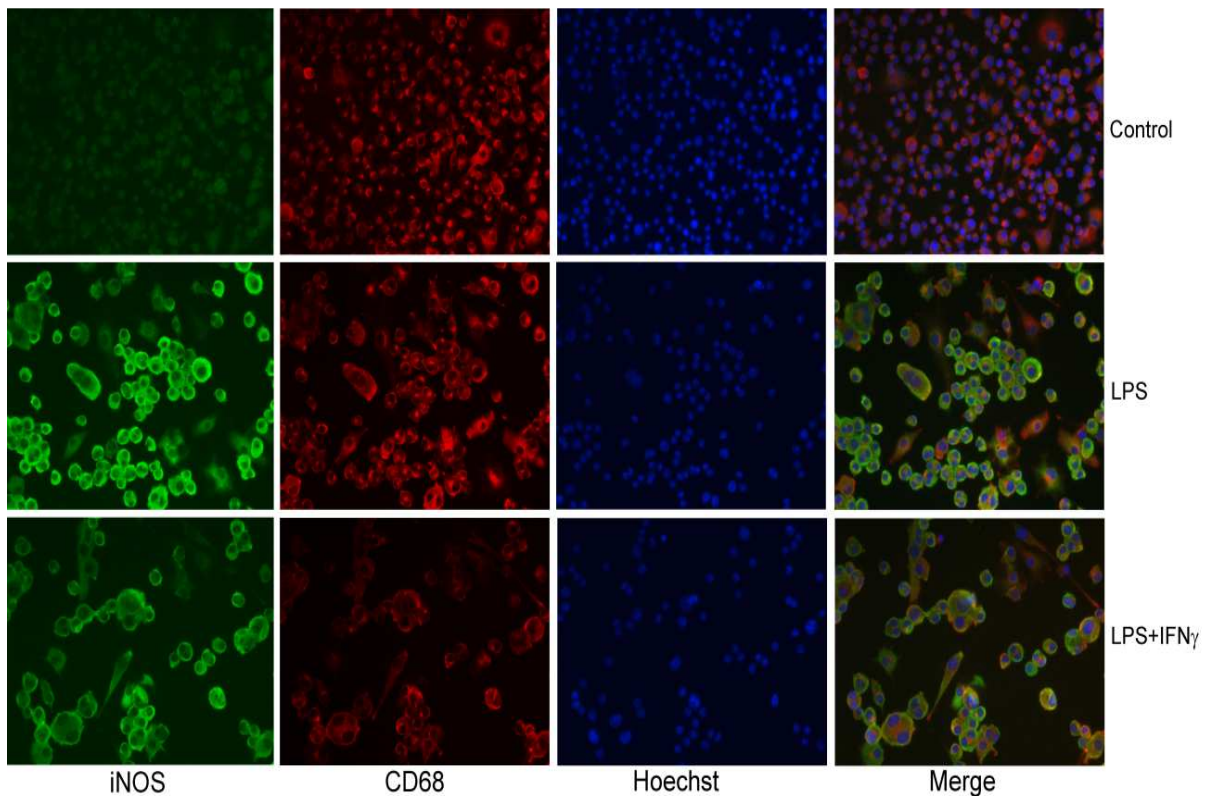


Figura 40. Expressió de iNOS en cultius de BV2 en condició de control, tractat amb LPS i LPS/IFN- γ durant 24h. Podem veure imatges d'una immunocitoquímica de la proteïna CD68 i de tincions Hoechst (que marca els nuclis).

48h

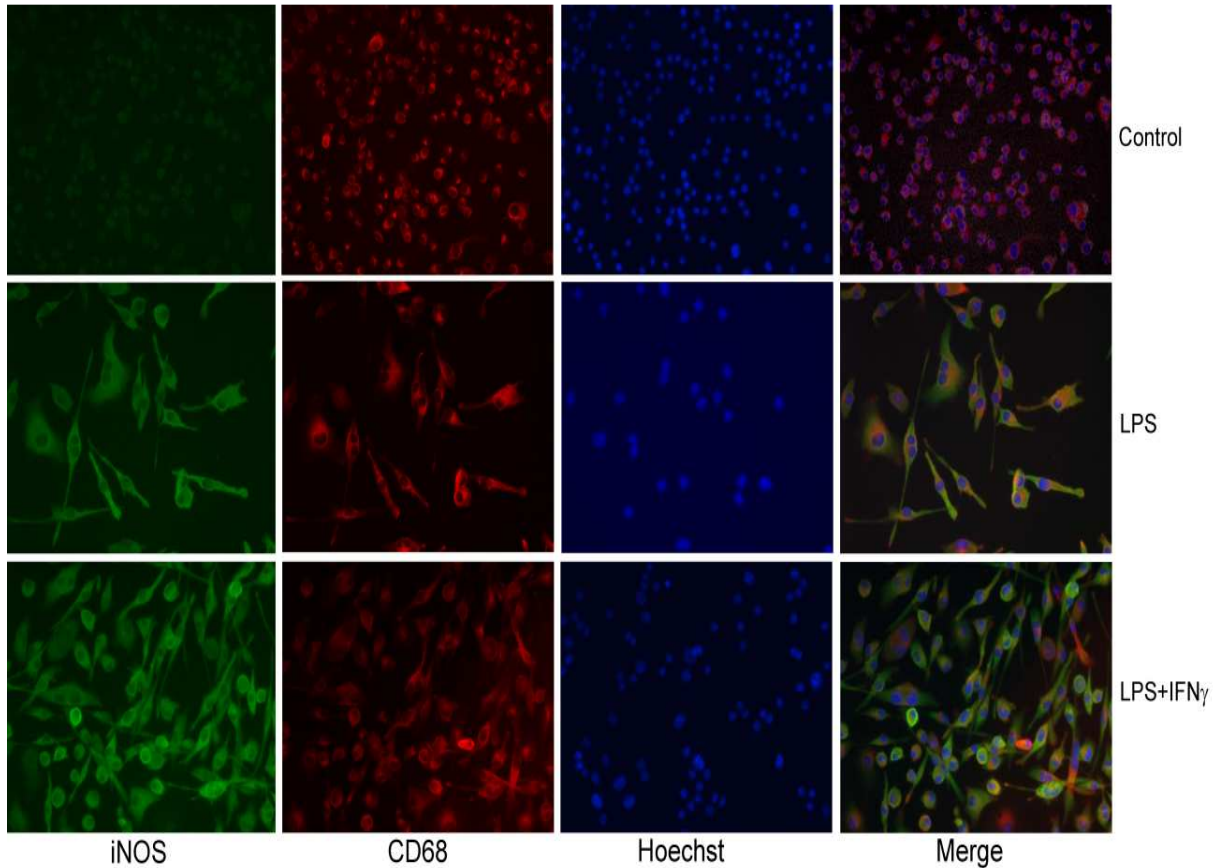


Figura 41. Expressió de iNOS en cultius de BV2 en condició de control, tractat amb LPS i LPS/IFN- γ durant 48h. També podem veure imatges d'una immunocitoquímica de la proteïna CD68 i de tincions Hoechst (que marca els nuclis).

Les cèl·lules BV2 són tractades amb LPS 100 ng/mL i també amb LPS 100 ng/mL + IFN- γ 0,5 ng/mL, durant 24 i 48h en ambdós casos. Aquests tractaments proinflamatoris indueixen un clar augment en l'expressió proteica de iNOS i COX2 tant a les 24 com a les 48h (figures 40 i 41).

Diversos autors descriuen com al afegir IFN- γ en el tractament alguns efectes del LPS es potencien (Schroder i cols. 2006)., per tant la utilització dels dos tractaments a la vegada tindria uns efectes proinflamatoris molt més elevats en el cultiu. Malgrat això, no es pot assegurar clarament una gran diferència d'augment en l'expressió de l'iNOS quan s'utilitza el doble tractament en comptes del simple amb LPS.

iNOS – 24h

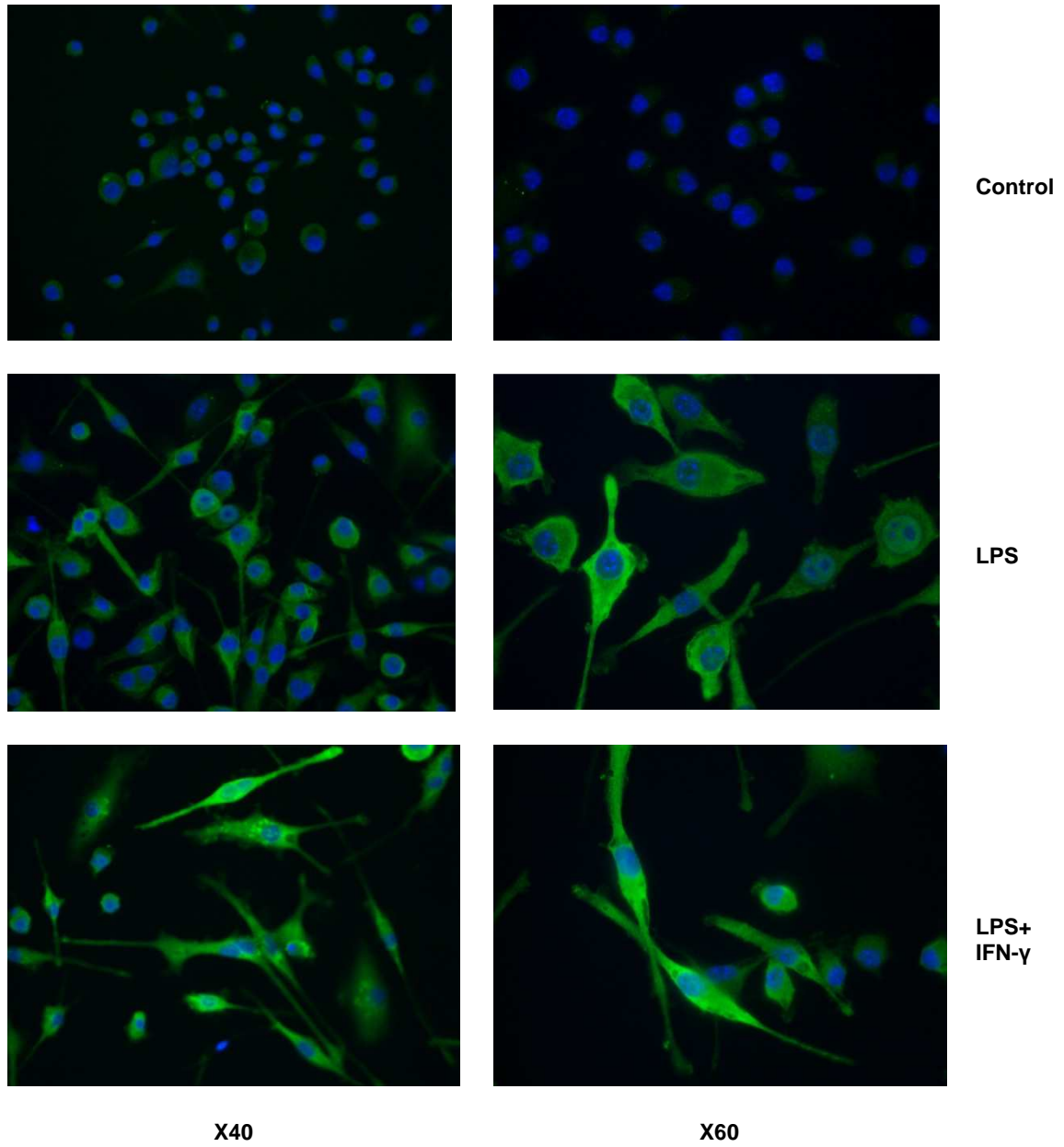


Figura 42. . Expressió de iNOS en cultius de BV2 en condició de control, tractat amb LPS i LPS/IFN- γ durant 24h.

COX2 – 24h

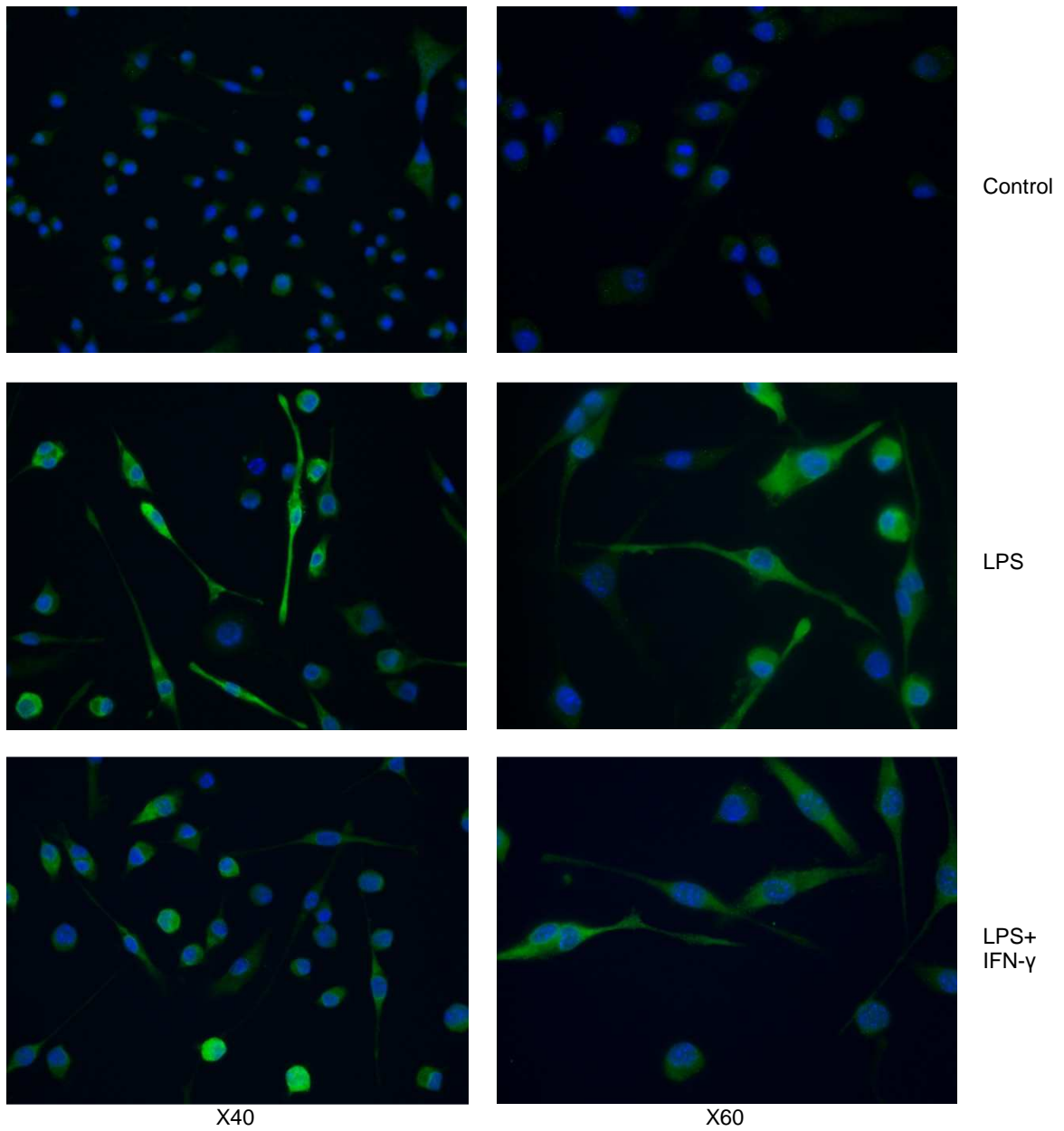


Figura 43. . Expressió de la COX2 en cultius de BV2 en condició de control, tractat amb LPS i LPS/IFN-γ durant 28h.

4.2. PRODUCCIÓ D'ÒXID NÍTRIC (NO) EN LES BV2 ACTIVADES

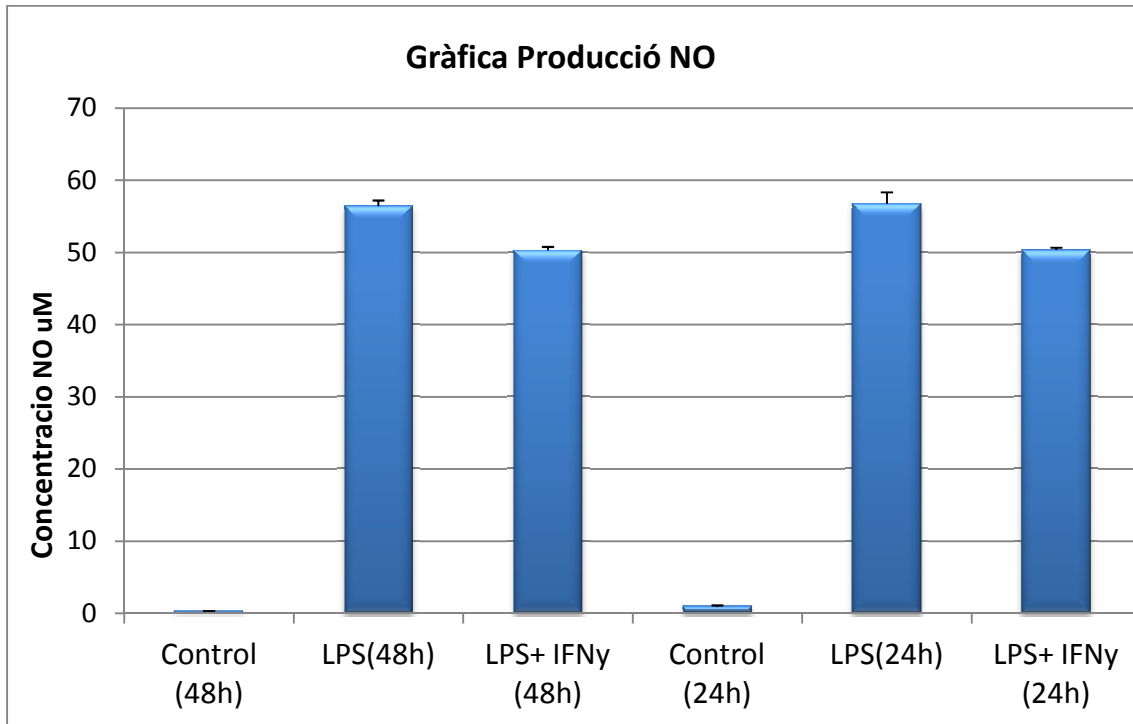


Figura 44 .Produccions de NO en cultius de BV2 en condició control , tractat amb LPS i LPS/IFN- γ durant 24 i 48h . Les barres representen l'error estàndard.

Un molt bon indicador de l'estat d'activació de la micròglia i també de les BV2 és el NO ja que fàcilment es pot mesurar i representar.

En el gràfic (figura 44) podem veure com en els tractaments amb LPS (100 ng/mL) i amb els de LPS (100 ng/mL) + IFN- γ (0,5 ng/mL) les concentracions de NO són molt més elevades que les del control, tant en el cas de les 24 com de les 48h.

5. CONCLUSIONS

- 1- Les cèl·lules de la línia cel·lular BV2 presenten la proteïna CD68, pròpia dels cultius primaris de cèl·lules microglials. Aquest aspecte ens permet considerar-les com, al menys en part, microglials.
- 2- Quan estimulem les cèl·lules d'una línia cel·lular BV2 amb LPS sol o amb LPS més IFN- γ les cèl·lules BV2 s'activen (com les cèl·lules microglials). No obstant això quan tractem les cèl·lules BV2 amb LPS i IFN- γ a la vegada, no obtenim un augment en els nivells d'expressió de la iNOS i el COX-2 més alts que amb LPS sol com podria passar en els cultius primaris de micròglia.
- 3- Amb els tractaments estudiats les cèl·lules BV2 presenten un fort alliberament al medi de cultiu d'òxid nítric (igual que les cèl·lules microglials). Per tant, segueixen un patró d'activació semblant a la micròglia.
- 4- Les cèl·lules de la línia cel·lular BV2 necessiten menors quantitats de LPS i de IFN- γ que les cèl·lules microglials per generar patrons semblants d'activació.
- 5- Les cèl·lules microglials canvien cada vegada de funció i de morfologia en el seu procés d'activació en resposta a un estímul com el LPS. Aquests canvis de morfologia també es presenten a les cèl·lules BV2 (incrementa la seva mida) però no són tant evidents ja que en l'estat de repòs també tenen la forma rodona.
- 6- Si exposem les cèl·lules (tant la micròglia com les BV2) a concentracions molt elevades de tòxics com el LPS o el LPS + IFN- γ aquestes poden acabar morint.

Malgrat els resultats presentats, cal indicar que per assegurar amb més rigor les nostres observacions caldria poder repetir més vegades els nostres experiments. No obstant això els resultats són clarament indicatius de que la línia cel·lular BV2 en els aspectes estudiats, és comporta com la micròglia.

De tot aquest treball i tal com indicàvem en el nostre objectiu general, es pot concloure que la línia cel·lular BV2 es pot emprar, al menys en alguns tipus d'estudis, com a model de les cèl·lules microglials i que això pot contribuir a no haver de fer patir i de sacrificar tants animals d'experimentació.

6. BIBLIOGRAFIA

Tesis doctorals

GRESA ARRIBAS, N. *Modulació de l'activació microglial com a estratègia neuroreparadora*. Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC). Barcelona; Catalunya. 7 d'abril de 2011

STRACCIA, M. *C/EBP β and C/EBP β in neuroinflammation*. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Biologia Cel·lular i de Fisiologia. Barcelona; Catalunya. 5 de febrer de 2012

PEREZ CAPOTE, K. *Respuesta de las células gliales al daño neuronal in vitro*. Universitat de Barcelona. IDIBAPS. CSIC. Barcelona; Catalunya. Febrer 2006.

Documents en línia

ALTEX. *The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation* [En línia]. Pubmed

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565166>> [Consulta 9 Novembre 2012]

Apoptosis [En línia]. About mutation.

<<http://mutation.blogspot.com.es/2011/08/apoptosis.html>> [Consulta 12 Gener 2013]

BV-2 (mouse, C57BL/6, brain, microglial cells). [En línia]. Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro. Itàlia

<<http://bioinformatics.istge.it/cldb/cl7130.html>> [Consulta 8 Octubre 2012]

Complex Neuroglia and informations about the cell it self [En línia]. Cell Diagram

<http://www.celldiagram.net/wordpress/wp-content/uploads/Complex_Neuroglia_Cell_Diagram_And_Information_About_The_Cell_It_self.gif> [Consulta 20 Setembre 2012]

GARCÍA SÁNCHEZ, A. [En línia]. *Efecte de les citocines inflamatòries sobre el sistema òxid nítric/ gmp cíclic de cèl·lules nervioses en relació amb l'esclerosi múltiple i la malaltia d'Alzheimer*. [En línia]. TV3: Fundació La Marató.

<<http://www.tv3.cat/marato/docs/simposiums/marato96/catala/txt10.html>> [Consulta 3 Agost 2012]

Hoescht Stain [En línia]. Wikipèdia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Hoechst_stain> [Consulta 22 Juliol 2012]

Interferon-gamma [En línia]. Wikipèdia.

<<http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon-gamma>>[Consulta 20 Juliol 2012]

Interferón gamma[En línia]. Medicina molecular. 16-10-2007

<<http://www.medmol.es/moleculas/18/>>[Consulta 12 Gener 2012]

Lipopolysaccharide [En línia]. Wikipèdia.

<<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide>>[Consulta 23 Juliol 2012]

Microscopio de contraste de fase [En línia]. Portal del estudiant, tecnologia mèdica
mención morfofisiopatología y citodiagnóstico.

<<http://morfoudec.blogspot.com.es/2008/07/microscopa-de-contraste-de-fase.html>>[Consulta 3 Octubre 2012]

Microscopio de contraste de fase [En línia]. Revista Digital Universitaria. Ciudad
Universitaria, México D.F. : revista Unam.

<<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num7/art70/art70-2.htm>>[Consulta 3 Octubre
2012]

Nitric oxide synthase [En línia]. Wikipèdia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide_synthase>[Consulta 24 Setembre 2012]

Oligodendrocyte [En línia]. Wikipèdia.

<<http://en.wikipedia.org/wiki/Oligodendrocyte>>[Consulta 12 Juliol 2012]

RES NEUROSÍ, J. *An immortalized cell line expresses properties of activated microglial
cells* [En línia]. Pubmed

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1578513>>[Consulta 9 Novembre 2012]

RESINO GARCÍA, S. *Citocinas* [En línia]. Epidemiología Molecular de Enfermedades
Infecciosas (EMEI).

<<http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>>[Consulta 18 Novembre 2012]

Sistema nervioso, Neuroglía [En línia]. Universidad Nacional de Tucumán

<http://www.herrera.unt.edu.ar/bioingenieria/temas_inves/sist_nervioso/pagina2.htm>
[Consulta 10 Juliol 2012]

Fonts orals:

SERRATOSA SERDÀ, J. Investigador al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC).

La part pràctica d'aquest treball ha estat realitzada al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC).