



SEÑALIZACIÓN EN MICROGLÍA ACTIVADA

Autor: Alberto Valenzuela Palomo

Director: Dr Maria Luisa Nieto Callejo

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Respuesta general de la microglía al daño	2
1.2 Fosfolipasas A2.....	4
1.2.3 sPLA ₂ -IIA.....	4
1.3 LPS	5
1.4 Inflamasoma	6
2. Antecedentes.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Material y metodos.....	10
4.1 Materiales.....	10
4.2 Métodos.....	11
4.2.1 Cultivos celulares.....	11
4.2.2 Obtención de lisados de proteínas celulares y análisis mediante western blot.....	11
4.2.3 Análisis mediante Citometría de flujo.....	13
4.2.4 Inmunocitoquímica	14
5. Resultados.....	17
6. Discusión.....	23
7. Conclusiones.....	24
7. Bibliografía.....	25

Introducción

En 1932, Pio del Rio Hortega describió la microglía, siendo esta la tercera población de células gliales, junto a oligodendrocitos y astrocitos del sistema nervioso central, representando el 10-15% de la población total de células dentro del parénquima cerebral (3).

Las células microgliales son las células inmunes residentes en el SNC, dentro del parénquima detrás de la barrera hematoencefálica. Se originan a partir de precursores hematopoyéticos mesodérmicos (4). Tienen la capacidad de modificar su comportamiento en respuesta a diversas señales de otras células en infinidad de condiciones experimentales y enfermedades humanas, tanto agudas como crónicas.

Su transformación desde el estado de reposo hacia células activadas está regulada por varios mecanismos de control y es acompañada por la secreción de citoquinas, aminoácidos y especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante las cuales la microglía se relaciona con otras células del cerebro y del sistema inmunológico.

Por lo tanto, representan un sistema de defensa y reparación en el huésped, pudiendo ser responsables además de la destrucción del tejido y de la muerte neuronal, en función del equilibrio del “sistema” de activación y las señales inhibitoras (5).

La microglía puede ser diferenciada morfológicamente en dos estados:

Microglía “en reposo”: Posee una morfología ramificada, un soma estático, procesos con alta motilidad y se encuentra en el cerebro adulto en condiciones normales. Esta motilidad es necesaria en su búsqueda constante de cambios patológicos o procesos inflamatorios.

Se pensaba anteriormente que las células microgliales eran inactivas e inmóviles en un estado de reposo. Sin embargo, utilizando microscopía de dos fotones se demostró que estas células estaban lejos de serlo (6,7).

Microglía activada: Se encuentra tanto durante el desarrollo embrionario temprano como en estados de activación donde adquiere una morfología “ameboide” pudiendo migrar hacia el lugar de la lesión liberando diversos compuestos neuroactivos induciendo neuroprotección o en última instancia neurotoxicidad (4,8).

El grado de activación de la microglía dependerá de la intensidad del estímulo, pudiéndose observar un gradiente de activación microglial desde el epicentro de una lesión hasta la periferia, siendo este estado reversible una vez el estímulo haya terminado.(9)

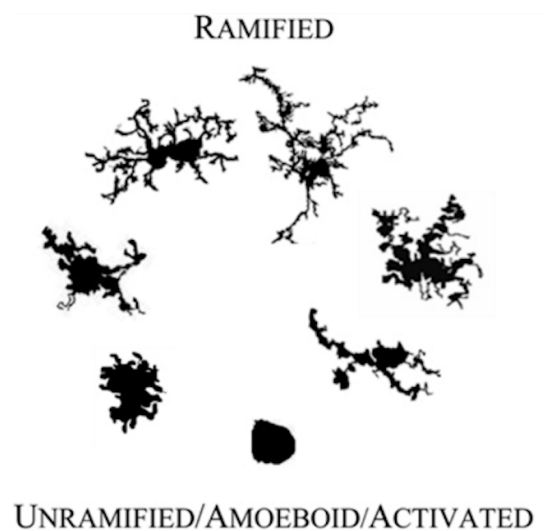


Imagen1: Morfología microglial del SNC de un humano adulto(27).

Respuesta general de la microglía al daño

La microglia, en el sistema nervioso central lesionado (SNC) puede contribuir en el proceso inflamatorio a inducir una lesión secundaria y a la recuperación de esta después del trauma. Si la respuesta de la microglía a la lesión es beneficiosa o perjudicial es objeto de debate, con un fuerte apoyo para una doble función(5).

Las células microgliales son células que se encuentran en continuo movimiento, respondiendo a señales extracelulares y son responsables de la limpieza de los desechos celulares y de sustancias tóxicas por fagocitosis, manteniendo así la homeostasis celular del sistema nervioso central.

Para poder detectar los posibles estímulos nocivos, estas células expresan una gran variedad de receptores entre los que se encuentran un conjunto de receptores denominados “receptores de reconocimiento de patrón” (PRRs), a través de los cuales reconocen pequeños motivos moleculares situados en la superficie de ciertos patógenos o factores asociados con el daño tisular.

Estos PRRs son capaces de reconocer:

PAMPs: Patrones moleculares exógenos asociados a patógenos.

DAMPs: Patrones moleculares asociados a peligros endógenos.

Además de los PRRs la células microgliales expresan receptores para ATP, glutamato, factores de crecimiento y citoquinas, que son liberadas por las neuronas lesionadas.

Aunque se han hecho avances significativos para identificar la contribución de los agentes citotóxicos liberados de la microglía al proceso neurodegenerativo, es poco clara y queda por determinar qué factores desencadenan la activación microglial en estos diversos trastornos.

En las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, los mediadores que participan en el proceso inflamatorio incluyen S100A9, los péptidos beta-amiloide ($A\beta$), el factor estimulante de colonias y de fase aguda, proteínas de macrófagos tales como la proteína C-reactiva, amiloide P y fosfolipasa secretada A2 - IIA (sPLA2-IIA), entre otros(10).

Fosfolipasas A₂

Las fosfolipasas A₂ son una familia de enzimas que hidrolizan los enlaces éster sn-2 de los glicerofosfolípidos, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos.

Los estudios recientes en el SNC se han centrado en:

La fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio (cPLA₂ del grupo IV).

La fosfolipasa A₂ independiente de calcio (iPLA₂ del grupo VI).

La fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂ del grupo IIA) (11).

sPLA₂-IIA

La sPLA₂ representa una familia de 11 proteínas lipolíticas de bajo peso molecular (14-19 kDa) con una estructura terciaria rígida, que tiene de cinco a ocho enlaces disulfuro, que probablemente le confieren resistencia a la proteólisis y a la desnaturalización térmica, poseyendo además una zona de unión a calcio (12).

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster sn-2 de los glicerofosfolípidos presentes en las membranas celulares, que son esenciales para formar las estructuras señalizadoras de la célula, dando como resultado un ácido graso y un lisofosfolípido (12).

Las PLA₂ secretadas se descubrieron por primera vez en el veneno de serpiente, jugos pancreáticos y en tejidos, y se encuentra distribuidas ampliamente por los diferentes tejidos humanos, incluyendo el cerebro.

La sPLA₂-IIA es segregada por el tejido sinovial o inflamatorio y además de su reconocida función enzimática, se sabe que las sPLA₂-IIA interaccionan con receptores específicos de membrana, que participan en sus actividades biológicas. El receptor M es la diana fisiológica de las sPLA₂-IIA, se encuentra en la membrana celular y está implicado en gran parte de los efectos biológicos de esta molécula, incluidas, la migración celular, la liberación de eicosanoides y el shock séptico(13,14).

LPS

El lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas siendo el antígeno superficial más importante de estos microorganismos. El LPS está compuesto por una región lipídica y una glicosídica con funciones separadas y/o sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de comprende(3). El LPS es ampliamente usado como una herramienta para activar la microglía y las células del sistema inmune periférico. El LPS activa la liberación de factores neurotróficos por la microglía, que producen la muerte neuronal.

El LPS es un ligando específico del receptor TLR4 y se ha convertido en un método muy popular para investigar las respuestas de las células gliales a estímulos neuroinflamatorios, simulando el entorno neuronal en diferentes trastornos el sistema nervioso central. (15)

Los receptores (**TLR4**) son receptores de reconocimiento de patrones que se unen a patrones moleculares asociados a patógenos en LPS e inician una cascada de señalización a través del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (16).

Los receptores (**TLR4**) después de interactuar con su ligando, dimerizan y sufren un cambio conformacional, requerido para el reclutamiento moléculas de señalización, como las moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM, kinasas asociadas con el receptor de IL-1 (IRAK), kinasas activadas por el factor transformante de crecimiento beta/ TGF- β (TAK1), proteínas de unión a TAK1 (TAB1), TAB 2 y el factor 6 asociado con el receptor de TNF (TRAF6).

Cada molécula adaptadora induce vías de señalización intracelular distintas que promueven la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas coestimuladoras(28).

Inflamasoma

Los inflamosomas son plataformas de señalización que detectan los microorganismos patógenos y factores de estrés, activando las citoquinas pro-inflamatorias, interleucina - 1 β (IL- 1 β) y IL- 18.

La activación del inflamasoma es esencial para defender al organismo frente a patógenos, pero participa además de forma muy activa en la fisiopatología de muchas enfermedades, especialmente aquellas con componente inflamatorio, como arteriosclerosis o diabetes tipo 2 (17,18).

Además, se han descrito muchos síndromes autoinflamatorios, también conocidos como síndromes asociados a NLPR3, en los que la alteración en los mecanismos de regulación promueve una respuesta inflamatoria crónica y descontrolada (39,40). También se ha descrito que el inflamasoma NLRP3 puede ser activado directamente por virus o por sus productos(21).

Los inflamasomas se organizan de forma sencilla. Las moléculas sensoras del inflamasoma(NLR) se conectan a la caspasa1 a través de ASC; que actúa como adaptador de proteínas. ASC se compone de dos dominios death-fold e interactúan con las moléculas sensoras del inflamasoma a través de su dominio pirina 5. Esta interacción desencadena el ensamblaje de ASC en una proteína constituida principalmente por múltiples dímeros de ASC.

ASC se ancla a los monómeros de pro-caspasa 1 a través de CARD, iniciando la autoescisión de la caspasa y convirtiéndose en caspasa 1 heterotrimérica (22).

Esta es ya proteolíticamente activa para inducir la activación de numerosas proteínas como la IL 1 β -pro y IL 18 y favorecer su secreción a través de la vía de señalización no clásica.

La transcripción de pro-IL-1 β es inducida por la activación del factor de transcripción nuclear-kB (NF-kB), mientras que pro-IL-18 se expresa constitutivamente y su expresión se incrementa después de la activación celular.

La caspasa 1 mediada por la activación de los miembros de la familia de las citoquinas IL-1 β conduce al reclutamiento y la activación de otras células inmunes, tales como los neutrófilos, en el sitio de la infección y / o daños en los tejidos(2).

Muchas moléculas sensoras del inflamasoma pueden desencadenar su formación y sabemos que la mayoría de los inflamasomas que han sido descritos hasta ahora, contienen unas moléculas receptoras NOD-Like (NLR) denominadas NLRP1 (contiene el dominio 1), NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 o NLRC4.

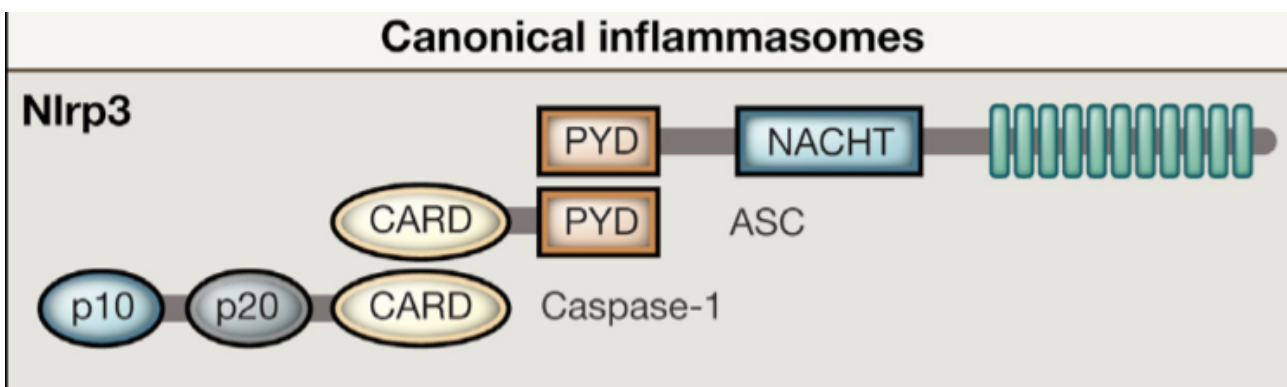


Imagen 2: Composición canónica del inflamasoma NLRP3 (2).

La activación del inflamasoma tiene como resultado final la liberación de las interleuquinas IL-1 β e IL-18 y se produce en dos fases. La primera señal es mediada por la estimulación de los PRRs a través de los PAMPs o los DAMPs (inductores de la PKC y de la señalización dependiente de MAPK, tales como acetato de forbol miristato (PMA) se han utilizado como primeras señales para la activación in vitro del inflamasoma (23,24); la inducción de los PRRs finaliza en la activación de la vía NF- κ B para la expresión de la pro-IL-1b y de los genes asociados a las proteínas del inflamasoma. La segunda señal puede ser producida por:

- Flujo de potasio**, debido a la estimulación del canal P2X7 sensible a ATP, o por la formación de poros por toxinas bacterianas
- desintegración lisosomal**, que conduce a la salida de catepsina B en el citosol
- la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)**: Esta señal además es requerida para el ensamblaje del inflamasoma, que da como resultado la maduración de las interleuquinas IL-1 β e IL-18 por la enzima caspasa-1, mediante el procesamiento proteolítico, induciendo muerte celular inflamatoria (piroptosis).

La mitocondria de la célula cumple una función muy importante en la activación del inflammasoma NLRP3, y se organiza en dos categorías. La primera es que la mitocondria es el andamiaje sobre el cual se ensambla el complejo molecular denominado inflammasoma NLRP3. La segunda es que la proteína NLRP3 se activa por distintas moléculas efectoras producidas o liberadas por la mitocondria tales como: las especies reactivas de oxígeno mitocondrial, el ADN mitocondrial y el fosfolípido cardiolipina (2).

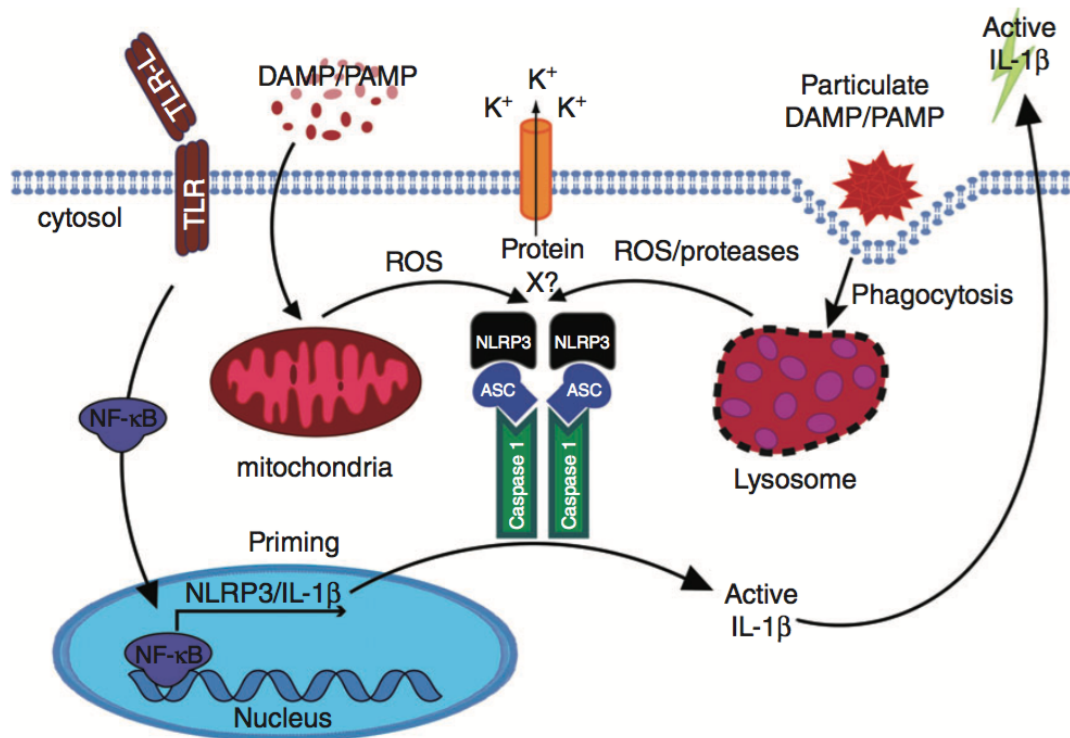


imagen 3: modelo de activación del inflammasoma por la formación de NLRP3(1).

Sabemos que las especies reactivas de oxígeno (ROS) sirven como señales de activación del inflammasoma. ROS activa inflammasoma a través de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y por proteínas quinasas 1 y 2, reguladas por señales extracelulares (ERK1 / 2). En la diabetes, la inhibición de la autofagia con la acumulación resultante de las mitocondrias disfuncionales conduce a la activación del inflammasomas y a la producción de ROS (25)

Además, está descrito que PKC gamma puede fosforilar directamente la serina 533 que controla la activación de NLRP4 y que utilizando el inhibido DPP-4 se suprime la activación del inflammasoma inhibiendo la activación de la PKC (1).

En resumen , las moléculas sensoras del inflamasoma pueden detectar una amplia gama de señales moleculares para responder a diferentes microorganismos o al estrés del tejido, desencadenando una respuesta inflamatoria a través de la activación de las caspasas inflamatorias. (22)

Antecedentes

Estudios previos del laboratorio han demostrado que la sPLA₂- IIA aumenta la proliferación y la capacidad fagocítica de la microglía (ref de nuestro paper). En estos estudios se observó que las acciones de la sPLA₂-IIA se producen a través de la transactivación del EGFR que da lugar a la fosforilación de proteínas como ER, p70S6K y rS6 (Imagen 4)

Asimismo, en células de microglía, el LPS también es capaz de inducir la transactivación del EGFR (resultados sometidos a publicación) y este mecanismo está implicado en la modulación de la fagocitosis inducida por el LPS.

En base a estos estudios, en esta memoria se ha continuado con la caracterización de la señalización inducida por estos estímulos proinflamatorios en las células de microglía BV-2

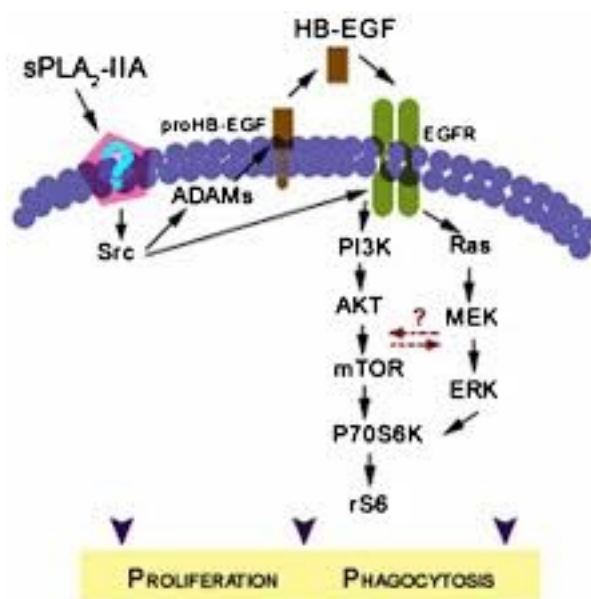


Imagen4: Representación esquemática de los mecanismos de señalización en la activación inducida en células BV-2 inducidas por sPLA₂ (10).

Objetivos

1. Efecto de agonistas inflamatorios en la expresión del inflamasoma NLRP3 en células de microglía BV-2.
2. Caracterización de las vías de señalización implicadas en la regulación del inflamasoma en células de microglía activada.

Materiales.

1. Tubos tipo eppendorf
2. Tubos falcon de 25 ml
3. Tubos falcon de 50 ml
4. Tubos de citómetro
5. Tubos de criocongelación
6. Raspadores de placas de cultivo
7. Puntas de pipetas para cargar geles “ flat tips”
8. Puntas de pipeta
9. Portaobjetos
10. Placas de cultivo de 4 pocillos.
11. Placas de cultivo de 30 y 60cm de diametro
12. Pipetas esteriles de 5, 10 y 25 ml
13. Pinzas
14. Películas de autorradiografía Hyperfilm ECL
15. Papel de filtro Watman P81
16. Membranas de nitrocelulosa 0,45um
17. Membranas Inmobilon de polivinilfluoruro (PVDF), 45 um
18. Frascos para cultivos de células adherentes
19. Cubreobjetos de 12mm de diametro.
20. jeringa de plastico 1 ml
21. Flask T25 y T75
22. Vasos de precipitados.
23. Probetas de 100ml, 200 ml y 1000

METODOS

Cultivos Celulares

Las células BV-2 de microglía, fue un regalo del Dr. JR Bethea (Universidad de Miami, Escuela de Medicina, Miami, Florida, EEUU.), se cultivaron a 37° C en DMEM de alta glucosa, complementado con 100 U de penicilina/ ml, estreptomicina 100mg/ml, glutamina 2mM, y 10% de suero de ternera fetal inactivado con calor (FCS) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%

Las células de la microglía immortalizadas fueron privadas de suero 24 h antes de los experimentos, siendo estimuladas a diferentes tiempos, por los distintos agonistas, en ausencia o presencia de inhibidos indicados

OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES Y ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Las células BV2 se cultivaron en en placas p60 hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Tras ser estimuladas a 37°C durante diferentes tiempos y con los tratamientos indicados, las células se lavaron dos veces con tampón PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄) a 4°C y se recogieron en 150µl de buffer de Laemly 3X(0.5M Tris PH 6.8, 35% glicerol, SDS 65 mg/L, azul de bromofenol, 6% DTT). Las muestras se hirvieron a 100°C durante 5-10 minutos, para asegurar que la desnaturalización/reducción es total, y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Las proteínas de los lisados celulares (~ 50 µg) se separaron por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida con SDS al 10%.

Para determinar la evolución de la electroforesis así como para estimar el peso molecular de las bandas de proteínas se emplearon marcadores de peso molecular preteridos con colorantes específicos.

La electroforesis se llevo a cabo en tampón de electroforesis hasta que el frente o el marcador de peso molecular mas proximo a la proteina de interés alcanzó el final del gel.

A continuación, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF, en una cubeta de electroforesis BioRad (1 hora, 100V). El tampón de transferencia fue 25mM Tris, 0.2M Glicina y 20% (v/v) de metanol.

La membrana se tiñó con ponceau S para visualizar la eficacia en la transferencia de la proteínas. Después, para bloquear las uniones inespecíficas, la membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en TTBS (20mM Tris, pH 7.6, 135mM NaCl y 0,1% (v/v) Tween20) con 5% (p/v) de leche desnatada o BSA. La membrana se incubo con los anticuerpos primarios de interés diluidos apropiadamente en TTBS toda la noche a 4°C. Tras 3 lavados de 10min. con TTBS y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) y diluidos en TTBS. durante 45 minutos a temperatura ambiente. Por ultimo las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TTBS y la detección se realizó mediante el sistema de aumento de quimioluminiscencia ECL.

Anticuerpos utilizados:

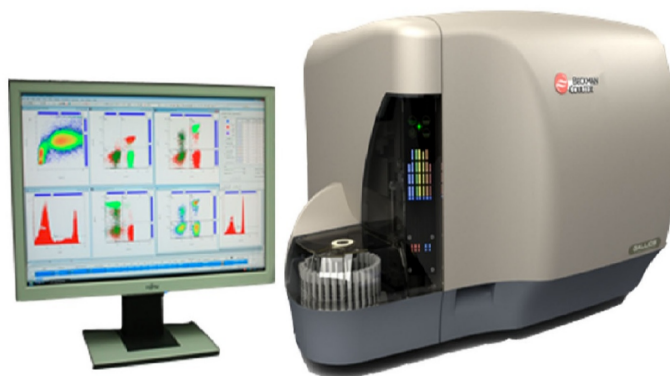
- **anti- β - Actina** Sigma (A5441) 1:3000
- **anti- p65 nFKB** Cell signaling (#3031) 1:100
- **anti- NLRP3** R&D Systems MAB7578) 1:500



Análisis mediante Citometría de flujo

Las células de microglía BV-2 se cultivaron en frascos T25 hasta que alcanzaron una confluencia del 80%, y se trataron con 0.1 μ g/ml de LPS o 1 μ g/ml de sPLA2-IIA durante 4 horas. Una vez pasado el tiempo de estimulación, las células se lavaron dos veces con PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄) a 4°C. A continuación las células se recogieron y se fijaron/permeabilizaron con 100 μ l de PFA 4% + TRITON-X100 0.2% durante 10 min. Tras un lavado con 600 μ l de PBS, se centrifugaron a 4°C durante 7 minutos a 1200 rpm y se resuspendieron en 100 μ l de PBS-0,1% BSA donde se pusieron 5 μ l del anticuerpo anti-NLRP3/NALP3 (7683199); dejándose incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos en balancín a temperatura ambiente.

Cuando se completó el periodo de incubación, las células se lavaron con 600 μ l de PBS-0.1% BSA, se centrifugaron durante 7 minutos a 4°C y 1200 rpm, se resuspendieron en 100 μ l de un anticuerpo secundario Anti-IgG-FITC producido en la rata a una concentración de 1:320 y se incubaron en un balancín durante 30 minutos en la oscuridad. Por último las células se lavaron nuevamente con 600 μ l de PBS- 0.1% BSA, se centrifugaron 7 minutos a 1200 rpm a 4°C, se resuspendieron en 500 μ l de PBS-0.1% BSA y se analizaron por citometría de flujo (Gallios™; Beckman Coulter, USA). Los datos se analizaron usando el software KALUZA.



Inmunocitoquímica

Las células BV2 (75000 células) se resuspendieron en 100 µl de medio DMEM completo y se sembraron en placas de 4 pocillos con cubres de 12mm de diámetro. Después de dejarlas pegarse al cristal durante 4 horas en el incubador a 37°C, se añadieron otros 400µl de medio/pocillo para dejarlas en un volumen final de 500µl/pocillo. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia se cambio el medio completo por medio sin suero y se dejaron toda la noche en estas condiciones. A continuación, se estimularon con 0.1 µg/ml de LPS ó 1 µg/ml de sPLA2-IIA y se incubaron a 37°C durante 4 horas.

Cuando finalizó el periodo de incubación, se retiro el medio y se realizaron 2 lavados con 500µl/pocillo de PBS-0.1% BSA , dejando durante 10 minutos a temperatura ambiente el segundo lavado bloqueando. A continuación las células se fijaron con paraformaldehido al 4% durante 15 minutos y tras un lavadero anti o con PBS, se permeabilizaron con TRITON X-100 al 0.3% durante 5 minutos. Después se lavaron con PBS y se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo anti-NLRP3/NALP3 antibody (7683199) 0.5 mg/ml diluidos en PBS- 0.1% BSA . Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con 500 µl de PBS-0.1% BSA y se incubaron 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Anti Rat FITC 1:320).

Cuando se recogieron las muestras después de los 30 minutos hicimos 2 lavados con 500 µl de PBS-0,1% BSA y marcamos con DAPI; dejándolo incubar durante 10 minutos.

Por ultimo, se lavaron las muestras 3 veces con 500 µl de PBS-BSA DURANTE 5 minutos y una con 500 µl de agua M.Q. y se procedió al montaje de las muestras mediante GELVATOL para su futura observación en el Microscopio Confocal.

RESULTADOS

sPLA2-IIA y LPS INDUCEN LA EXPRESION DE NLRP3 EN CELULAS BV-2

La línea celular inmortalizada de microglía murina BV - 2 se utilizó como un modelo in vitro para estudiar la activación microglial observada en los trastornos neurodegenerativos. Se ha demostrado que estas células pueden reproducir perfectamente el comportamiento de la microglía primaria y no expresan la proteína endógena sPLA2 - IIA. Las células BV -2 privadas de suero se estimularon durante 4 h con las concentraciones indicadas de sPLA2 -IIA y LPS y a continuación se trataron 30 minutos con ATP, y su efecto sobre la expresión de la proteína NLRP3 se evaluó mediante la técnica de western blot.

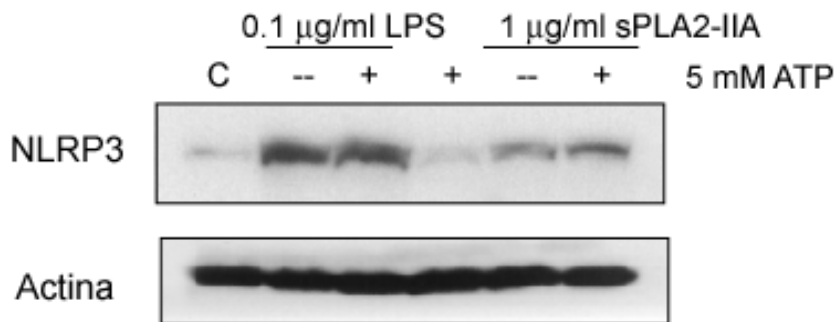


Figura1: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) o sPLA2-IIA (1ug/ul) en presencia y ausencia d ATP(5mM).n=3.

Como podemos ver en la figura 1A, la estimulación de las células con sPLA2-IIA y LPS, en presencia o ausencia de ATP, produce un incremento en la expresión de la proteína NLRP3.

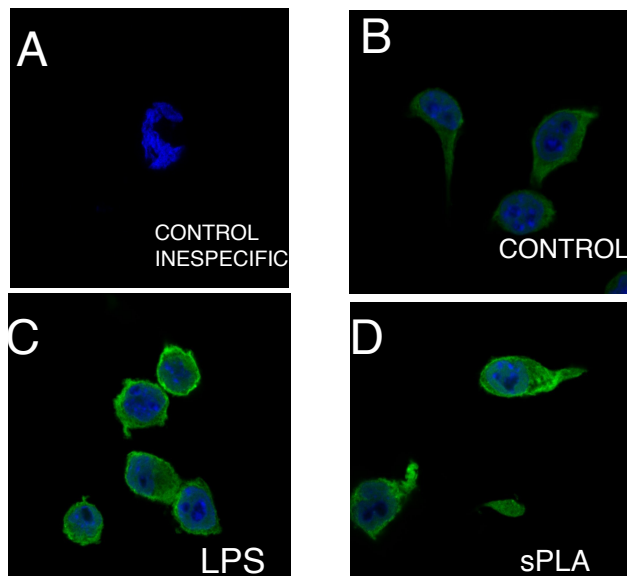


Figura2: Inmunocitoquímica de células BV2 sin estímulo y estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul)(C) (o sPLA2-IIA (1ug/ul) (D) se marcaron con o el anticuerpo anti-NLRP3/NALP3 Y Anti-igG-FITC. A) El control inespecifico fue marcado únicamente con el Ab. secundario.n=1.

La figura 2 demuestra que las células estimuladas con con LPS(0,1ug/ul) o sPLA2-IIA (1ug/ul) aumentan considerablemente la expresión de la proteína NLRP3, corroborado los datos obtenidos mediante la técnica de western blot.

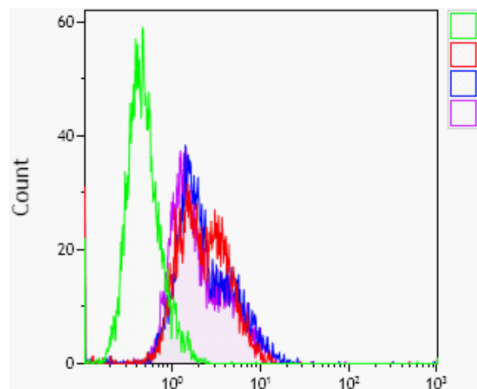


Figura3: Analisis de citometría de flujo de células BV-2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) o sPLA2-IIA (1ug/ul) teñidas con el anticuerpo anti-NLRP3/NALP3 Anti-igG-FITC.n=1.

El análisis de citometría de flujo no nos dio los resultados esperados (Figura3), Este experimento solo ha sido reproducido una vez por problemas de contaminación del cultivo celular, por lo tanto los resultados no son concluyentes. El experimento requiere una puesta a punto desde el punto

de vista metodológico: por ejemplo dosis del anticuerpo, condiciones de fijación/ permeabilización celular o bloqueo de uniones inespecíficas.

Efecto de la inhibición de metaloproteasas en la expresión de proteínas señalizadas del inflamasoma inducidas por sPLA2-IIA y LPS en células BV-2

Estudios preliminares del laboratorio demostraron la implicación de la transactivación del receptor del EGF (EGFR) en la señalización inducida por la sPLA2-IIA y el LPS en las células de microglía BV2. Con el fin de evaluar si esta ruta de señalización está implicada en la sobreexpresión de la proteína NLRP3, las células se estimularon con los agonistas LPS o sPLA2-IIA en presencia, o ausencia, del inhibidor de gamma secretasas y ADAMs TAPI-1 y del inhibidor general de metaloproteasas GM 6001. Se emplearon diferentes dosis de inhibidores que previamente habían demostrado bloquear la activación del EGFR (6).

Las células BV-2 se pretrataron con diferentes dosis del inhibidor de metaloproteasas GM6001 durante 30 minutos. A continuación las células se estimularon con LPS durante 4 horas y la expresión de la proteína NLRP3 se evaluó western blot.

En la figura 4, se muestra como la presencia del inhibidor GM6001 no afecta al incremento de la expresión de NLRP3 inducida por LPS.

LPS y GM6001

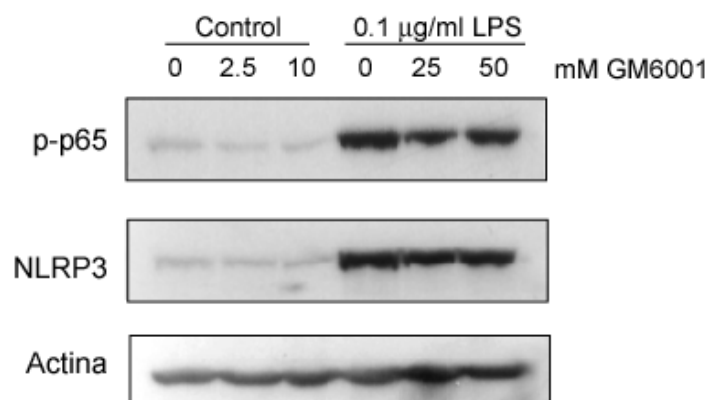


FIGURA 4: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1 µg/ul) en presencia y ausencia del inhibidor GM6001. n=3

También estudiamos la modulación de la activación de NFκB, mediante la valoración de la presencia de la subunidad p65 fosforilada (p-p65). En la figura 4, se muestra como la presencia del inhibidor GM6001 no afecta la fosforilación de p65 inducida por LPS.

En la figura 5 y 6, se muestra como la presencia del inhibidos TAPI no afecta al incremento de la expresión de NLRP3 inducido por los estímulos LPS y sPLA₂-IIA.

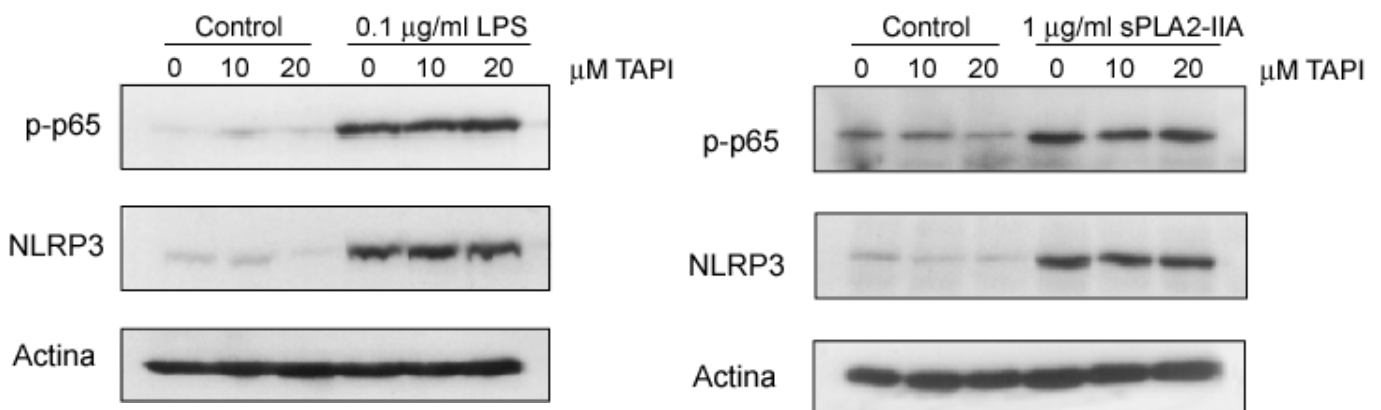


FIGURA 5: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor TAPI. n=3

FIGURA 6: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con sPLA₂-IIA (1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor TAPI. n=2

También estudiamos la modulación de la activación de NFκB, mediante la valoración de la presencia de la subunidad p65 fosforilada (p-p65).

Efecto de la Inhibición de proteínas PKC en la expresión de proteínas señalizadoras del inflammasoma inducidas por sPLA₂-IIA y LPS en células BV-2

Con el fin de valorar el papel de las proteínas quinasas C (PKC) en la modulación de la expresión del inflammasoma se emplearon los inhibidores GF109203X (inhibidor de PKC clásicas) y Rottlerin (inhibidor de PKCδ)

a) Las células BV2 fueron pretratadas durante 30 minutos con las concentraciones indicadas de Rottlerin y a continuación estimuladas con LPS o sPLA₂-IIA durante 4 horas. Los resultados del experimento se evaluaron mediante la técnica de western blot.

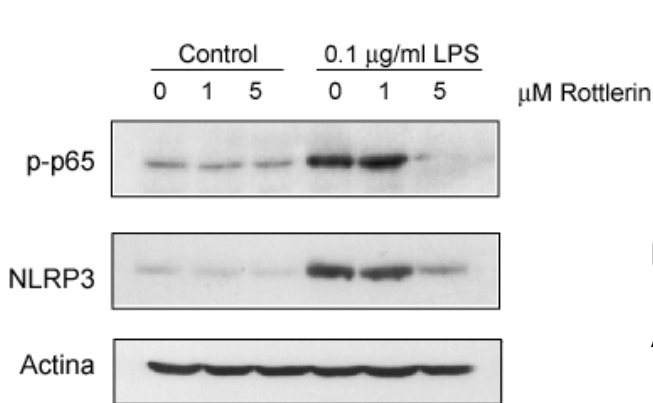


FIGURA 6: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor Rottlerin. n=3

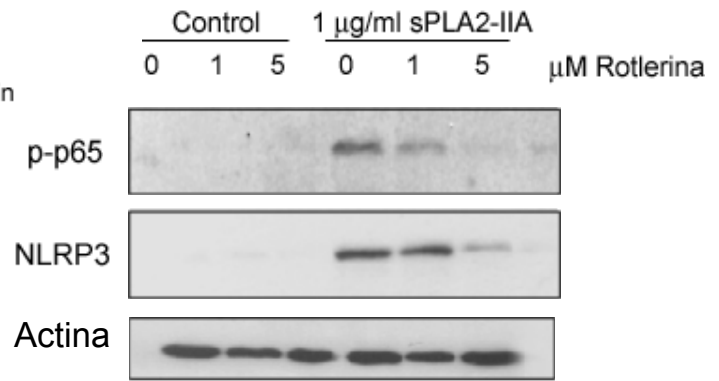


FIGURA 7: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con sPLA₂-IIA (1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor Rottlerin. n=3

Como se muestra en la figura 6 y 7 el inhibidor de PKC delta, Rottlerin, disminuye la expresión de NLRP3, en las células BV-2 de una forma dependiente de la dosis tanto en las células estimuladas con LPS, como en las estimuladas con sPLA₂-IIA.

También estudiamos la modulación de la activación de NFκB, mediante la valoración de la presencia de la subunidad p65 fosforilada (p-p65).

b) Las células BV2 fueron pretratadas durante 30 minutos con las concentraciones indicadas del inhibidor GF109203X y a continuación se estimularon con LPS o sPLA₂-IIA durante 4 horas. Los resultados del experimento se evaluaron mediante la técnica de western blot.

La figura 8 nos muestra como el GF109203X inhibe a concentraciones altas (10uM) la expresión de NLRP3 cuando las células han sido estimuladas con LPS. Los estudios con la sPLA2-IIA están en curso

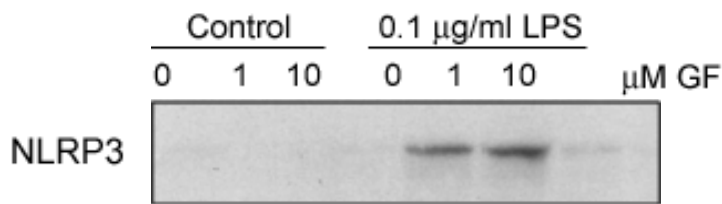


FIGURA 8: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor GF109203X n=3.

Efecto de la Inhibición de ROS por NAC en la expresión de proteínas señalizadoras del inflammasoma inducidas por sPLA2-IIA y LPS en células BV-2

Para evaluar el efecto la producción de ROS en la sobreexpresión del inflammasoma NLRP3, las células BV-2 se trataron con las dosis indicadas del inhibidor NAC, durante 30 minutos y a continuación se estimularon con LPS Y sPLA₂-IIA durante 4 horas.

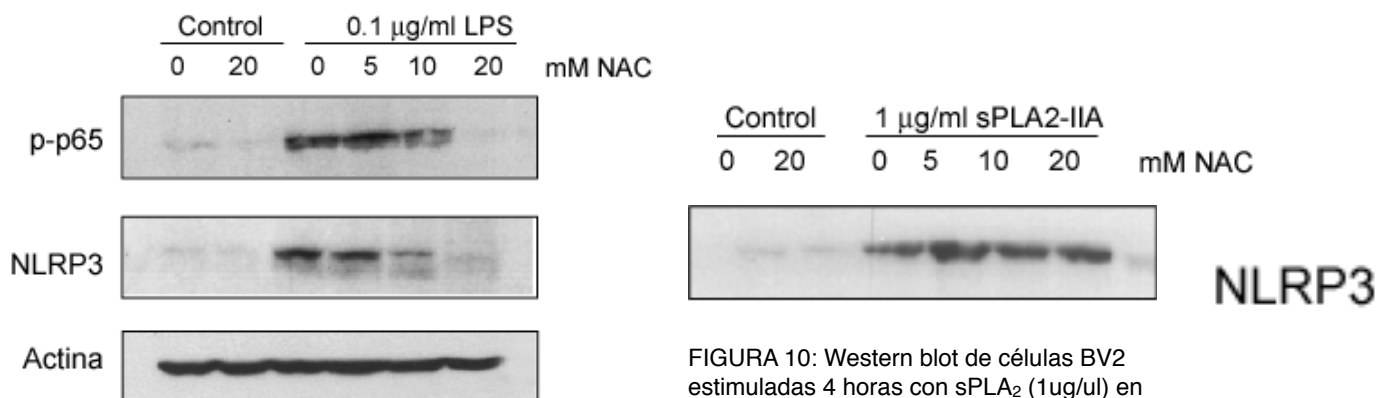


FIGURA 9: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor NAC.n=3.

FIGURA 10: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con sPLA₂ (1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidor NAC. n=1.

En la figura 9 se muestra como la expresión de NLRP3 inducida por LPS disminuye a medida que aumentamos la concentración de NAC. Un efecto similar fue observado en la presencia de p-p65. Sin embargo, como se muestra en la figura 10, la presencia de NAC, no afecto la respuesta inducida por la sPLA2-IIA

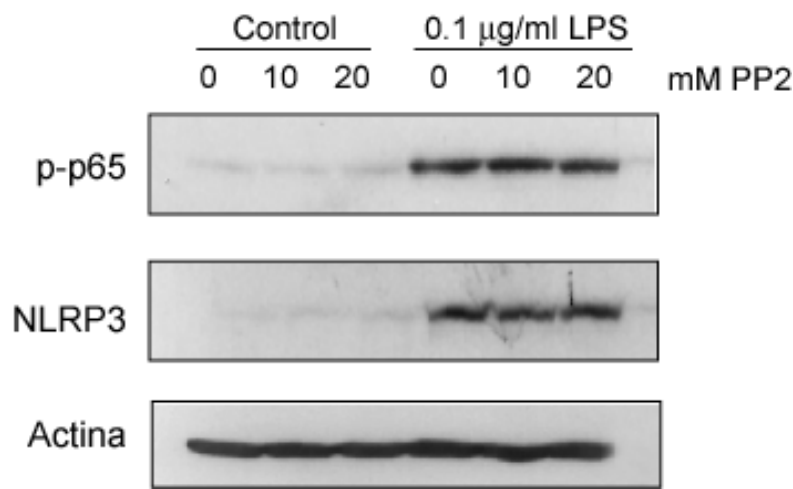


FIGURA11: Western blot de células BV2 estimuladas 4 horas con LPS(0,1ug/ul) en presencia y ausencia del inhibidos PP₂.n=3.

Efecto de la inhibición de SRC kinasa en la expresión de proteínas señalizadoras del inflammasoma inducidas por sPLA2-IIA y LPS en células BV-2

Para poder estudiar este efecto las células BV-2 se pretrataron con diferentes dosis del inhibidor selectivo de kinasas de la familia Src PP2, durante 30 minutos. A continuación, se estimularon con LPS durante 4 horas. La expresión de la proteína NLRP3 y p-p65 se evaluó mediante western blot.

La figura 11 nos muestra como el inhibidor de proteínas kinasas específico de la familia Src; PP2 no afecta a la expresión de las proteínas NLRP3 ni a la expresión de p-p65 (NF-κB), cuando son las células son estimuladas con LPS. Los estudios con la sPLA₂-IIA están en curso.

Discusión

La microglía constituye la principal fuente de mediadores inflamatorios en el sistema nervioso central, actuando además como diana de alguno de ellos.

Estas células contribuyen tanto a la neurodegeneración como a la neuroprotección, por lo tanto es fundamental identificar los mecanismos de activación del inflamasoma NLRP3 y caracterizar las vías de señalización implicadas en la regulación de este.

La expresión del inflamasoma NLRP3 y del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) inducida por sPLA2-IIA es independiente de la transactivación del EGFR (figura 4).

Sin embargo sPLA2-IIA utiliza la vía de señalización de la PKc para inducir la producción de NLRP3 y del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) (figura 6).

Por otro lado, el LPS favorece la expresión de NLRP3, y del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) independientemente de la transactivación del EGFR (figuras 2 y 3), siendo sensible a inhibidores de la ruta de la PKc (figura 5 y 7).

Además, hemos comprobado que es indispensable la producción de ROS para inducir la expresión de NLRP3 y del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) a través del estímulo LPS (Figura 8), y sin embargo sPLA2 no requiere de ROS para inducir la generación del inflamasoma NLRP3 (9).

Por último podemos afirmar que LPS no induce la expresión del inflamasoma, ni del factor de transcripción nuclear a través de la acción de proteínas kinasas de la familia Src (Figura 10).

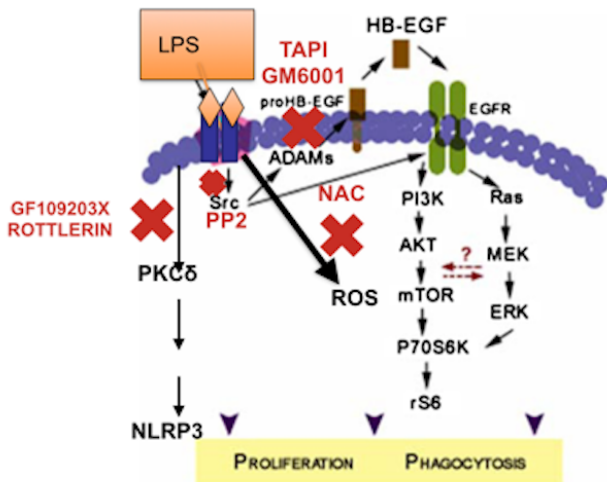


Imagen5. Representación esquemática de los mecanismos de señalización inducidos por LPS en BV-2.

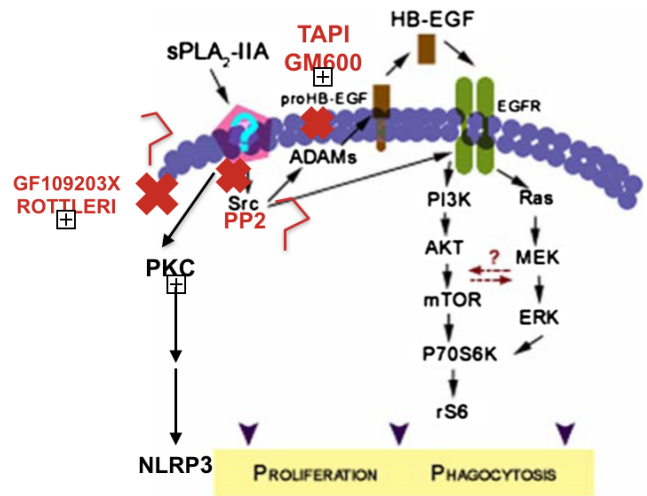


Imagen6. Representación esquemática de los mecanismos de señalización inducidos por sPLA₂ en BV-2.

Conclusiones

- 1.La estimulación de células de microglía por la fosfolipasa A₂ –IIA y LPS induce la sobreexpresión de NLRP3
- 2.La estimulación de células de microglía por la fosfolipasa A₂ –IIA y LPS induce la activación del factor NFκB
- 3.La sobre-expresión de NLRP3 es independiente de la ruta de señalización que promueve la transactivación del EGFR
- 4.La sobre-expresión de NLRP3 inducida por la fosfolipasa A₂ –IIA y LPS es dependiente de la activación de PKC
- 5.La sobre-expresión de NLRP3 inducida LPS es dependiente de la producción de ROS. Imagen5: Representación esquematitica del mecanismo de señalización inducido por LPS en BV-2

Bibliografía

1. Menu, P., and J. E. Vince. 2011. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* **166**: 1-15.
2. Lamkanfi, M., and V. M. Dixit. 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**: 1013-1022.
3. Carson, C. F., K. A. Hammer, and T. V. Riley. 2006. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* **19**: 50-62.
4. Vilhardt, F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 17-21.
5. Loane, D. J., and K. R. Byrnes. 2010. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* **7**: 366-377.
6. Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin, and W. B. Gan. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**: 752-758.
7. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**: 1314-1318.
8. Biber, K., H. Neumann, K. Inoue, and H. W. Boddeke. 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* **30**: 596-602.
9. Streit, A., A. J. Berliner, C. Papanayotou, A. Sirulnik, and C. D. Stern. 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**: 74-78.
10. Martin, R., C. Cordova, and M. L. Nieto. 2012. Secreted phospholipase A2-IIA-induced a phenotype of activated microglia in BV-2 cells requires epidermal growth factor receptor transactivation and proHB-EGF shedding. *J Neuroinflammation* **9**: 154.
11. Sun, G. Y., P. B. Shelat, M. B. Jensen, Y. He, A. Y. Sun, and A. Simonyi. 2010. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med* **12**: 133-148.
12. Karray, A., F. Frikha, Y. Ben Ali, Y. Gargouri, and S. Bezzine. 2011. Purification and biochemical characterization of a secreted group IIA chicken intestinal phospholipase A(2). *Lipids Health Dis* **10**: 10-27.

13. Ohara, O., J. Ishizaki, and H. Arita. 1995. Structure and function of phospholipase A2 receptor. *Prog Lipid Res* **34**: 117-138.
14. Hanasaki, K., Y. Yokota, J. Ishizaki, T. Itoh, and H. Arita. 1997. Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem* **272**: 32792-32797.
15. Tarassishin, L., H. S. Suh, and S. C. Lee. 2014. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia* **62**: 999-1013.
16. Palsson-McDermott, E. M., and L. A. O'Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**: 153-162.
17. Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* **11**: 136-140.
18. Xu, X. H., P. K. Shah, E. Faure, O. Equils, L. Thomas, M. C. Fishbein, D. Luthringer, X. P. Xu, T. B. Rajavashisth, J. Yano, S. Kaul, and M. Arditi. 2001. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**: 3103-3108.
19. Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins, and J. Tschopp. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**: 319-325.
20. Masters, S. L., A. Simon, I. Aksentijevich, and D. L. Kastner. 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol* **27**: 621-668.
21. Rajan, J. V., D. Rodriguez, E. A. Miao, and A. Aderem. 2011. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. *J Virol* **85**: 4167-4172.
22. Latz, E., T. S. Xiao, and A. Stutz. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* **13**: 397-411.
23. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**: 237-241.
24. Hu, X., L. C. Moscinski, N. I. Valkov, A. B. Fisher, B. J. Hill, and K. S. Zuckerman. 2000. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. *Cell Growth Differ* **11**: 191-200.
25. Hottz, E. D., A. P. Monteiro, F. A. Bozza, and P. T. Bozza. 2015. Inflammasome in platelets: allying coagulation and inflammation in infectious and sterile diseases? *Mediators Inflamm* **2015**: 435783.

- 26 Hurtado,R. El Lipopolisacárido. Rev. Med. Vet. [online]. 2010, n.19 [cited 2016-06-27], pp.37-45. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0122-9354.
- 27.Colton, C. A., Chernyshev, O. N., Gilbert, D. L., and Vitek, M. P. 2000. Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 899, 292–307.
28. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine.;42:145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.