



À 681511CS-1101-00191
MASTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID 11/12

ACTIVACIÓN DE LA GLÍA EN PROCESOS INFLAMATORIOS

TUTOR; MARIA LUISA NIETO CALLEJA
CO-TUTOR: Dr. RUBEN MARTIN

ADRIÁN GONZÁLEZ MARTÍN
VALLADOLID

2012

1. LA GLÍA: MICROGLÍA Y ASTROCITOS

Hay cuatro tipos especiales de células gliales en el cerebro humano; astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimales. Aunque las células gliales componen más del 50% del total de la población en el cerebro, históricamente se ha pensado que únicamente servían como células de soporte para las neuronas.

Sin embargo, ahora sabemos que varias células gliales tienen funciones críticas durante el desarrollo y el correcto funcionamiento del cerebro.

Además, las células gliales son las participantes centrales de la mayoría de los desordenes del Sistema Nervioso Central (SNC), participando tanto en la protección como en el daño del tejido cerebral.

El concepto de que las células gliales producen el aislamiento de las fibras nerviosas para aumentar la transmisión del impulso fue propuesto por Ramón y Cajal en 1909 y además postulo que las células gliales llenaban el espacio creado por la muerte neuronal patológica.

En 1932, Río Hortega (1), utilizando una innovadora técnica de impregnación de plata fue el primero en dar una descripción morfológica de la microglía. Aunque aun no se entiende claramente el origen, linaje y el modo de diferenciación de la microglía (2).

La microglía

Es considerada como las células inmunes residentes del SNC. Desde la descripción inicial de Río Hortega, el origen exacto de ésta sigue siendo objeto de debate, aunque esta generalmente aceptado que deriva de células precursoras del mesodermo de posible linaje hematopoyético que entran en el cerebro durante las fases de desarrollo embrionario y la postnatal temprana (3) (4).

Se pueden encontrar dos tipos de microglía; en el cerebro maduro y bajo condiciones fisiológicas la microglía adopta una morfología ramificada característica llamada microglía en reposo. Sin embargo, es especialmente sensible a cambios en su microambiente y rápidamente se vuelve activa en respuesta a infecciones o daños, sufriendo un cambio dramático desde células ramificadas en reposo a la forma ameboide de la microglía activada. La microglía activada juega un papel esencial en la defensa del parénquima neural contra enfermedades infecciosas, inflamación, traumas, isquemias, tumores y neurodegeneración. Por tanto, forma un sistema de macrófagos residentes de alerta inmune con capacidad para la vigilancia y control inmune.

La microglía activada puede destruir los microorganismos invasores, eliminar desechos, promover la reparación del tejido mediante secreción de factores de crecimiento y así facilitar el retorno a la homeostasis del tejido (5).

Además, los cambios morfológicos y los cambios en la regulación de las moléculas de su superficie, activan la secreción de factores solubles por la microglía. Muchos de estos factores son beneficiosos para la supervivencia neuronal potenciando el papel neuroprotector desempeñado por los astrocitos, el otro tipo de células gliales del cerebro (6).

Uno de los agentes mejor estudiados que pueden activar la microglía es la endotoxina de la pared bacteriana LPS. El LPS es ampliamente usado, siendo una fuerte herramienta para activar la microglía y las células del sistema inmune periférico. Aunque no se conoce un efecto tóxico directo sobre las neuronas, el LPS activa la liberación de factores neurotóxicos por la microglía que produce la muerte neuronal (7)(8).

2. LAS FOSFOLIPASAS A₂

Son enzimas del tipo de las hidrolasas que catalizan el proceso de hidrólisis del enlace ester en la posición 2 de los fosfolípidos dando lugar como productos a un ácido graso insaturado y una molécula de lisofosfolípido.

Tienen importancia en fenómenos biológicos como la inflamación la producción de lípidos bioactivos como los eicosanoides cuando el ácido graso liberado es el ácido araquidónico y la remodelación de los fosfolípidos de las membranas celulares para el mantenimiento de su fluidez.

Estas fosfolipasas forman una gran familia que ha ido creciendo a medida que se han descrito, habiendo unos quince tipos diferentes hasta el momento.

Se pueden clasificar en tres grandes grupos;

- Fosfolipasas A₂ citosólica - cPLA₂
- Fosfolipasas A₂ independientes de Ca²⁺ - iPLA₂
- Fosfolipasas A₂ secretadas - sPLA₂

LA FOSFOLIPASA CITOSÓLICA cPLA₂

Se encuentra en el citosol celular, tiene un peso molecular de 85KDa y es expresada en una amplia variedad de tejidos excepto en linfocitos T. Presenta especificidad de sustrato liberando preferentemente ácido araquidónico de los fosfolípidos y por tanto, va a estar muy implicada en la regulación de la liberación de eicosanoides.

Otro rasgo importante es que esta regulada post-transcripcionalmente por estímulos extracelulares. Su activación es dependiente de fosforilación en residuos de serina por miembros de la familia de las MAPK y su translocación del citosol a las membranas nucleares donde va a ejercer su acción es dependiente de calcio(9).

LA FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE DE Ca^{2+} iPLA₂

También es citosólica y con el mismo peso que la anterior pero no es específica de sustrato ni regulable, y se encarga de remodelar las membranas por procesos de acilación y deacilación de fosfolípidos(10-).

LA FOSFOLIPASA SECRETADA PLA₂

Forman una amplia familia y se caracterizan por su pequeño tamaño entre 13 y 18 KDa y por su estructura terciaria mantenida por un número variable de puentes disulfuro (entre 5 y 8) lo que les confiere una gran estabilidad frente a la proteólisis y desnaturalización en el ambiente extracelular.

No presentan especificidad de sustrato y requieren cantidades minimolares de calcio para la catálisis. El sitio catalítico esta muy conservado entre los miembros de esta familia, siendo un grupo His y otro Asp esenciales para la catálisis (11)

Un rasgo muy importante es que se han descrito receptores específicos en la superficie celular muy similares en su estructura al receptor de manosa. Esto sugiere que además de ejercer su acción mediante su actividad enzimática, la sPLA₂ podría jugar un papel en señalización intracelular interaccionando con estructuras de membrana.

Las sPLA₂ se distinguen entre ellas por ciertos aspectos de su estructura y su distribución en tejidos y su numeración se debe al orden temporal en que se han ido describiendo. Entre ellas la sPLA₂ secretada pancreática IB que es secretada por el páncreas exocrino junto con lipasas y otras enzimas digestivas y actúa en el intestino metabolizando los fosfolípidos de la dieta.

De entre las diferentes sPLA₂ nos vamos a centrar en la sPLA₂-IIA que como ya se describió en células astrogliales (12) induce la proliferación y es una molécula relevante en los procesos inflamatorios.

Se la conoce como sPLA₂ inflamatoria y tiene un peso molecular de 14KDa y siete puentes disulfuro y se la considera uno de los principales miembros de la familia de las sPLA₂ por varias razones;

- Su caracterización temprana como una enzima secretada del fluido sinovial (13)(14)
- Su amplio patrón de expresión en tejidos humanos comparado con otros elementos del grupo II (15).
- La inducción de su síntesis por endotoxinas bacterianas y citoquinas vía procesos autocrinos y paracrinos durante los procesos inflamatorios de relevancia clínica, lo cual ha permitido la caracterización de estas enzimas como una proteína de fase aguda (16).

- Sus potentes efectos bactericidas (17).

Hay varios campos donde la relevancia funcional de la sPLA₂ puede ser objeto de estudio. Entre ellos están los eventos patofisiológicos del sistema neural y condiciones inflamatorias.

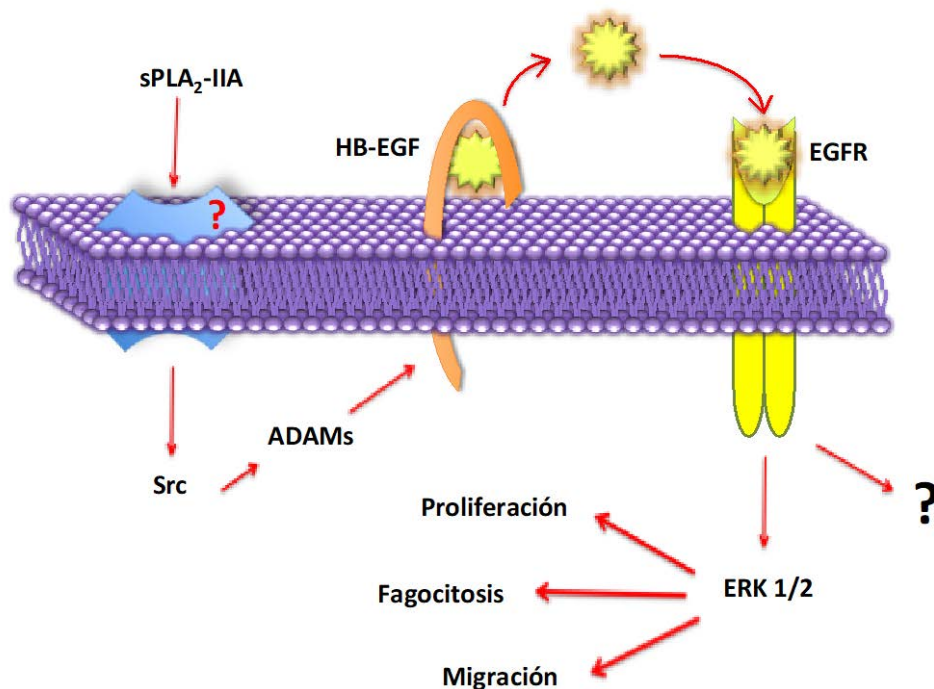
Las funciones fisiológicas y señalizadoras de la sPLA₂ pueden ser explicadas por varios mecanismos de acción:

- Generación como resultado de su actividad catalítica de ácidos grasos no esterificados y lisofosfolípidos (18).
- Perturbación de la membrana celular por su interacción interfacial con fosfolípidos (19).
- Interacción con receptores de membrana análogos a los que se unen otras sPLA₂ (20)
- Interacción con estructuras de la membrana celular como los proteoglicanos ricos en heparán-sulfato (21).

Estos mecanismos de acción pueden ser específicos del tipo celular conduciendo a diversos efectos biológicos en los diferentes tejidos.

Mediante análisis de inmunoprecipitación vieron que sPLA₂-IIA inducía la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que la fosforilación de éste contribuía a la activación de la proteína quinasa ERK.

Esta vía de señalización es la que nos interesa y en la que vamos a basar los estudios de la presente memoria.



3. OBJETIVOS

3.1. Caracterización del cultivo primario de microglía

El principal objetivo de éste trabajo se basa en caracterizar este tipo de cultivo ya que es donde se llevarán a cabo los estudios para intentar clarificar la vía de señalización anteriormente mencionada en este tipo celular.

3.2. Identificación de moléculas señalizadoras activadas por la fosfolipasa C

Aunque ya se han descrito algunas de las moléculas que activa sPLA₂-IIA en otros tipo celulares como los astrocitos (22) en este trabajo queremos ver si ocurre lo mismo en las células microgliales utilizando diferentes técnicas de nos permitan identificar éstas moléculas que van a ser activadas por sPLA₂-IIA.

3.3. Caracterización de actividades biológicas moduladas por la sPLA₂-IIA.

Al igual que se ha descrito con diferentes citocinas y con el LPS, cuando provocan la activación de la microglía, ésta va a responder produciendo una serie de respuestas biológicas como son:

- Fagocitosis
- Proliferación
- Migración

Nosotros hemos querido estudiar este tipo de actividades en las células microgliales que han sido aisladas de los cultivos primarios, lo que nos a permito comprobar al mismo tiempo la funcionalidad de éste tipo de cultivo.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización del presente trabajo se han utilizado dos cepas diferentes de ratones de laboratorio, como son las líneas consanguíneas C57BL/6 y la Swiss, lo que nos ha permitido realizar los experimentos eliminando la variabilidad de origen genético.

El número de ratones necesarios para la realización de cada experimento fue de entre 7-8 ratones, número que se encuentra dentro del rango de ratones obtenidos en cada una de las camadas, que varía normalmente entre 6-10 ratones.

Dichos ratones se han utilizado entre los días 1-3 post-nacimiento, siendo mejor cuanto más se aproxime a la fecha de nacimiento.

2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GLIALES

Se ha realizado bajo campana con estrictas medidas de esterilidad. Ésta se dejó 20 minutos antes con rayos UV y todo el material necesario para el cultivo.

Como material esencial necesario para la operación de extracción de los hemisferios cerebrales, se han utilizado: PBS (autoclavado), papel Watman absorbente (autoclavado), placa de Petri de 60mm (estéril), falcon 50ml (estéril), pipetas de diferentes volúmenes (estéril), tres agujas tipo insulina (estéril), dos vasos con etanol 70% para enjuagar el material de cirugía, corcho donde fijar al animal y el material de cirugía (autoclavado) formado por dos pinzas de relojero, unas microtijeras, unas tijeras grandes, una microespátula y una cuchilla de bisturí (figura 1a).

Partiendo de los neonatos vivos, el primer paso fue rociarles la cabeza con etanol 70% antes de ser decapitados mediante un corte limpio con las tijeras grandes; dicho proceso se realizó de manera individual a medida que se fue operando a cada animal.

La cabeza se fijó al corcho mediante una aguja atravesando la parte más anterior de la cabeza, sin afectar a la zona craneal (figura 1b).

Con ayuda de una de las pinzas de relojero y las microtijeras se elevó la piel craneal y se realizó un corte desde la parte posterior hasta aproximadamente la altura de los ojos, y a continuación se separaron del cráneo cada una de las dos zonas de piel resultante para dejar al descubierto éste. Para que esta piel no nos interfiera y a su vez nos estabilice la cabeza sobre el corcho, se fijó a este último a través de agujas (figura 1c).

Una vez descubierto el cráneo se pudieron observar sus suturas (figura d), y el siguiente paso fue dar un corte horizontal que vaya aproximadamente de ojo a ojo, a

continuación se realizó otro corte vertical desde la parte más posterior por la línea media craneal hasta el corte que se había dado anteriormente.

Ahora, con ayuda de las dos pinzas de relojero, se separó el cráneo del cerebro para dejar al descubierto éste último.

Cuando estén descubiertos el cerebro y cerebelo, se tomó con ayuda de la cucharilla cada uno de los dos hemisferios cerebrales (figura 1e), los cuales fueron pasados a través del papel absorbente mediante movimientos rotatorios para eliminar los restos de sangre y meninges que quedarán en su superficie, y a continuación fueron depositados en el interior de la placa de Petri (en hielo) en la cual se había puesto una cantidad de entre 5-10ml de PBS 1x, dependiendo del número de animales disponibles.

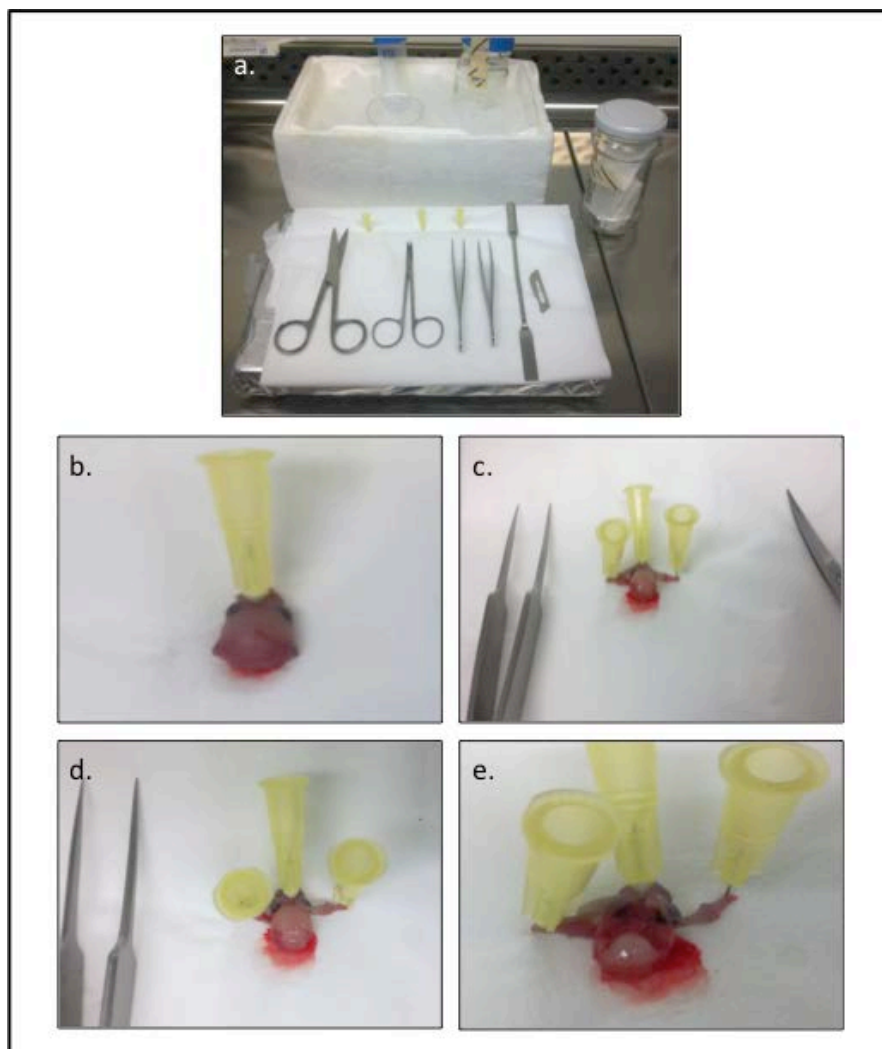


Figura 1. Realización de cultivo primario de células gliales a) Material necesario para realizar la cirugía. b) Fijación de la cabeza por su parte más anterior. c) Apertura y sujeción de la piel craneal a ambos lados del cráneo. d) Visualización de las suturas craneales. e) Extracción de los hemisferios cerebrales quedando únicamente el cerebelo en la cavidad craneal.

Una vez aislados todos los cerebros, éstos fueron triturados en el interior de la placa de Petri con ayuda de la cuchilla de bisturí hasta conseguir un disgregado óptimo. A continuación, se pasaron a un falcon de 50ml con ayuda de una pipeta de 10ml y se enjuagó la placa de Petri con otros 5-10ml de PBS 1X. La suspensión de cerebro se disgregó aun más mediante repipeteo con una pipeta de 5ml. Tras disgregar lo máximo posible el tejido, éste se centrifugó a 1100 rpm durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 12ml de Tripsina-EDTA (GIBCO#25200-072) a 37°C mediante inversión. Después, se incubó durante 15-20 minutos en un baño de agua caliente a 37°C con agitación 60 U/min.

Realizada la tripsinización, ésta se detuvo añadiendo 12ml de medio DFF10, que es DMEM:F12 1:1 (GIBCO#31330-038, con Gln y HEPES) suplementado con antibióticos streptomicina y penicilina y suero fetal bovino al 10%, + 0,5ml de DNasa I (Sigma D-5025). Para hacer desaparecer el moco formado por el DNA se realizó una mezcla mediante 10-12 inversiones del falcon y a continuación, se hicieron entre 40-60 repipeteos hasta que no sea visible ningún trozo de tejido (éste paso es muy importante para conseguir una suspensión de células únicas).

La suspensión celular se centrifugó a 1300 rpm durante 7 minutos, se retiró el sobrenadante cuidadosamente, y el pellet obtenido se resuspendió en 25-30ml de medio DFF10 (1).

Las células se sembraron en placas de 60mm o bien en frascos T-25 a una densidad aproximada de 800.000 células/ml.

3. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS GLIALES

Las células se cultivaron en medio DFF10, en un incubador a 37°C y una saturación de CO₂ del 5%.

Una vez obtenidas las células gliales, se les cambió el medio a las 24 horas, ya que es cuando poseen mayor cantidad de desechos correspondientes a células muertas, ya sean de la glía u otro tipo celular.

Si transcurridas 48 horas volvieran a generar gran cantidad de residuos, se les cambió de nuevo el medio; si no, se mantuvieron en ese mismo medio durante 5 días, cambiándose después semanalmente si fuese necesario. Una vez alcanzada la confluencia, se les cambió el medio por última vez y se las dejó crecer en éste medio condicionante durante 8-10 días antes de ser tripsinizadas para separar los dos tipos celulares de las que consta el cultivo glial, microglía y astroglía (1).

4. SEPARACIÓN DE LAS ESTIRPES CELULARES DE LA GLÍA EN CULTIVO

Una vez transcurridos entre 5-10 días desde el establecimiento de la confluencia celular (mejor cuantos más días) se procedió a la separación de las dos estirpes celulares presentes en el cultivo (figura 2).

El primer paso fue retirar el medio en el que se encuentran las células, teniendo especial cuidado de no descartarlo, ya que es necesario para ser utilizado posteriormente.

Después, se realizó un lavado con DFF10 sin suero, antes de poner el medio de tripsinización, el cuál es una mezcla en proporción 1:3 de Tripsina-EDTA y DFF10 sin suero, respectivamente.

El cultivo fue incubado con el medio de tripsinización entre 20-30 minutos a 37°C hasta que se observó como una capa/telena de astrocitos se desprendió (figura 2) del cultivo, quedando únicamente adheridas las células de microglía (figura 2).

La tripsinización se detuvo al añadir medio DFF10+10% SFB. La suspensión del medio fué aspirada y recogida, ya que es donde se encuentran las células de la astrogía, y a las células de la microglía que han quedado adheridas se les añadió el medio que tenían inicialmente y había sido guardado a 37°C.

Es recomendable usar las células de la microglía para la experimentación 24 horas después de haber sido separadas de los astrocitos. Las de microglía solo pueden usarse en pase 1.

Por otra parte, la suspensión de astrocitos fue centrifugada a 1500rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en medio DMEM bajo en glucosa para dejar a los astrocitos a una densidad final de 300.000 células/ml.

Los cultivos de astrocitos podrán ser mantenidos durante más pases que la microglía permitiendo que se produzca su división *in vitro*, cambiándoles el medio siempre que sea oportuno.

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA

5.1. MICROGLÍA

Transcurridas 24h. desde su aislamiento, las células de microglía se sembraron en cristales de 12 mm depositados en cajas de 4 pocillos.

Para ello, se descartó el medio de las placas de 60mm, se hizo un lavado con 2ml Tripsina-EDTA (Lonza CC-5012), y se dejaron con otros 2ml de Trispina-EDTA durante 4 minutos a temperatura ambiente para posteriormente proceder a su raspado y recogida en un tubo falcon donde se centrifugaron a 1300rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en medio DFF10 calculando 100 μ l por cada cristal que vaya a ser necesitado.

Después de depositar en su superficie 100 μ l de la suspensión de células, se dejaron incubar durante 4 horas a 37°C para que las células se pegaran. Después de este tiempo, se añadieron 400 μ l más de medio DFF10 para alcanzar un volumen final de 500 μ l/pocillo. Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con 500 μ l/pocillo de PBS-0,1% BSA, dejando durante 10 minutos a temperatura ambiente el segundo lavado bloqueando.

A continuación, las células se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando 200 μ l/pocillo de PFA 4% en PBS 1X (Fluka#76240). Después se realizaron dos lavados de 500 μ l/pocillo con PBS 1X y se estabilizaron las células con 500 μ l/pocillo de H₂O milliQ durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Por último, las células se marcaron con Isolectina β_4 , marcador específico de células de microglía. Para ello se pusieron 200 μ l/pocillo de una solución de PBS-0,1% BSA conteniendo Isolectina β_4 -FITC a una dilución de 1:50. El marcaje se dejó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y luego se hizo un último lavado con 500 μ l/pocillo de PBS-0,1% BSA antes de ser montado sobre los portas con 2 μ l/cristal del medio de montaje Gelvatol.

Las muestras ya estaban listas para poder ser observadas en el microscopio de fluorescencia.

5.2. ASTROCITOS

Los pasos fueron idénticos al caso anterior hasta el momento de identificar las células, a partir de ese punto, éste tipo celular necesita ser permeabilizado con 200 µl/pocillo de Tritón X-100 0,3% en PBS 1x (Calbiochem#648466) durante 10 minutos a temperatura ambiente, ya que en éste caso se utilizó el anticuerpo primario creado en conejo anti-GFAP que reconoce una proteína del citoesqueleto de astrocitos (proteína glial fibrilar ácida). Este anticuerpo se utilizó a una dilucción de 1:50.

Después se realizó un lavado con 500 µl/pocillo de PBS-BSA, y se incubo con un anticuerpo contra la inmunoglobulina G de conejo conjugado con fluoresceína isocianato (FITC). Se utilizarón 200 µl/pocillo de la dilución 1:160 del anticuerpo en PBS-0,1% BSA. Se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos y tras su posterior lavado por dos veces con 500 µl/pocillo de PBS-0,1% BSA se montó sobre los portas con 2 µl/cristal del medio de montaje Gelvatol.

Las muestras estaban entonces listas para ser observadas al microscopio de fluorescencia.

6. CUANTIFICACIÓN DE LA FAGOCITOSIS EN MICROGLÍA MEDIANTE BOLAS DE DEXTRANO MARCADAS CON FITC (FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE)

Las células de microglia se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron 24h en medio DFF10 sin suero. A continuación, se estimularon 18 h con distintos agonistas en presencia o ausencia de inhibidores específicos. Tras la incubación, se añadió al medio Dextrano-FITC y se incubó durante 2-3 horas a 37°C. Pasado este tiempo se hicieron un par de lavados con PBS 1X frio antes de leer la fluorescencia de la placa utilizando el lector GENios Pro (TECAN) a través de su software XFluor4. Excitación a 485nm y la captación de la emisión a 535nm. Cada condición se realizo en triplicado.

6.1. INHIBIDORES

INHIBIDOR	STOCK	DOSIS	µl/ml
AG1478 (TOCRIS#)	2,5 mM	2,5 µM	1
		5 µM	2
PD98059 (TOCRIS#1213)	25 mM	10 µM	0,4
		25 µM	1

Anticuerpo policlonal neutralizante anti-HB-EGF (Calbiochem#)	0,25 mg/ml	2,5 µg/ml	10
		10 µg/ml	40
Anticuerpo policlonal neutralizante anti-TLR4 (Calbiochem#)	2 mg/ml	2,5 µg/ml	1,25
		10 µg/ml	5

6.2. ACTIVADORES

ACTIVADOR	STOCK	DOSIS	µl/ml
sPLA ₂ - IIA	20 µl/ml	1µg/ml	20
LPS (Sigma)	5 mg/ml	0,1µg/ml	0,2
IFN γ	10 ⁶ U/ml	100 UI/ml	2

6.3.DEXTRANO-FITC

MOLÉCULA FAGOCITADA	STOCK	DOSIS	µl/ml
DEXTRANO	10 mg/ml	0,1mg/ml	10

Las bolas se diluyeron en medio DFF 10 sin suero

Los estímulos se realizaron con diferentes mezclas de activadores e inhibidores dependiendo del experimento (gráfica 4)

7. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL KIT DE PROLIFERACIÓN “MTS”

La prueba del MTS es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad.

El MTS es bio-reducido en el interior celular a Formazan, un producto coloreado que es soluble en tejidos que se encuentran en medio de cultivo. Esta conversión es llevada a cabo por NADPH o NADH producidos por la enzima deshidrogenasa de las células metabólicamente activas.

La cuantificación del Formazan es realizada por la medida de absorbancia a 490nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Se realizaron los mismos pasos que en el método anterior de fagocitosis a excepción de que tras el estímulo se cambió el medio por 100µl de DFF10 sin suero y sobre este se pusieron 10µl/pocillo de MTS (PROMEGA).

Se incubó durante 1-4horas a 37°C hasta que se observó un cambio de color anaranjado y posteriormente se leyó la absorbancia a 490nm en el lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices), utilizando el software SOFTmax Pro para la adquisición de los datos. Cada condición se realizó en triplicado.

7.1. INHIBIDORES

INHIBIDOR	STOCK	DOSIS	µl/ml
AG1478 (TOCRIS#)	2,5 mM	2,5 µM	1
		5 µM	2
PD98059 (TOCRIS#1213)	25 mM	10 µM	0,4
		25 µM	1

7.2. ACTIVADORES

ACTIVADOR	STOCK	DOSIS	µl/ml
STF (LONZA)	100%	10%	100
sPLA2 - IIA	PURIFICADA	100%	20
		1/2	10
		1/4	5

Al igual que en el caso de la fagocitosis, los estímulos se realizaron con mezclas de activadores e inhibidores y a diferentes dosis como se muestra en los resultados (gráfica 2)

8. IMNUNOMARCAJE DE RECEPTORES MICROGLIALES PARA SU DETECCIÓN A TRAVÉS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

8.1. DETERMINACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE EGF EN SU RESIDUO INTRACELULAR DE TYR 1173 EN CÉLULAS DE MICROGLÍA.

Las células de microglía se sembraron en frascos T₂₅, y se incubaron con medio DFF10 sin suero durante toda la noche previa al día del experimento.

La estimulación se realizó durante 15 minutos con 1 µg/ml de sPLA₂. Posteriormente, se hizo un lavado con PBS 1X y se despegaron con 4ml de EDTA 5mM a 4°C. Después, se recogieron en un tubo de 15ml y se centrifugaron durante 7 minutos a 1300rpm. Para la fijación y permeabilización de las células, se utilizó PFA 4% (Fluka#76240) y Tritón X-100 0,3% (Calbiochem#648466) respectivamente, los cuales estaban disueltos en PBS 1X. Así, se resuspendió el pellet con un volumen de 100 µl y se pasó a un eppendorf, el cual se dejó balanceándose a temperatura ambiente durante 15 minutos. Antes de poner el anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100µl de PBS-0,1% BSA donde se pusieron 3µg del anticuerpo anti-P-EGFR Tyr1173 (Santa Cruz) dejándose durante 45 minutos en un balancín a 4°C. Una de las muestras de células no estimuladas, fue incubada con 100 µl de PBS-0,1% BSA sin anticuerpo primario (control inespecífico). A continuación, se lavó el exceso de anticuerpo primario centrifugando y eliminando el sobrenadante, y entonces se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC producido en cabra (SIGMA) a una concentración 1:160 en 100µl de PBS-0,1% BSA. Todo ello se incubó en un balancín a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos. Tras un lavado de las muestras, el pellet se resuspendió en 500 µl de PBS-0,1% BSA y las muestras se analizaron por citometría de flujo (GalliosTM; Beckman Coulter, USA). Los datos fueron analizados usando el software WinMDI 2.8.

8.2. IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR HB-EGF Y DEL RECEPTOR EGFR EN CÉLULAS DE MICROGLÍA.

Las células de microglía se sembraron en frascos T₂₅, y se incubaron con medio DFF10 sin suero durante toda la noche previa al día del experimento. A continuación se estimularon durante 20 minutos con 1 µg/ml de sPLA₂.

El procedimiento fue el mismo al realizado en el caso anterior, pero en ésta ocasión solo se fijaron las células y no se permeabilizaron, ya que los anticuerpos que se utilizaron se unen a la parte extracelular de las proteínas de membrana.

Los anticuerpos primarios que se usaron en estos experimentos fueron anti-HB-EGF (R&D Systems) y anti-EGFR (Santa Cruz) ambos a una concentración de 1 µg/ 100 µl de PBS-0,1% BSA.

Como anticuerpos secundarios para reconocer el HB-EGF y el EGFR, se utilizaron el Anti-Cabra IgG-FITC (SIGMA) producido en conejo a una dilución 1:128 y el Anti-Conejo IgG-FITC (SIGMA) producido en cabra a una dilución de 1:160, respectivamente.

9. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS PARA SU ANALISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT

Las células primarias de microglía se sembraron en placas de 60mm y se las mantuvo con medio DFF10 sin suero durante toda la noche previa al día del experimento.

Las células se estimularon con diferentes dosis del agonista sPLA₂-IIA durante 15 minutos y con los inhibidores; anticuerpo anti-HB-EGF a 10 µg/ml y AG1478 a 5µM que inhibe a EGFR. Tras la estimulación, se hicieron dos lavados con PBS y las células se rasparon con buffer de Laemmli 1,5X. El extracto celular total obtenido se hirvió durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar el DNA y posteriormente se las pasó por una jeringa para romper aun más las estructuras lipídicas y nucleares. La muestra de lisado total de proteínas ya estaba lista para ser usada, guardándose mientras a -20°C.

Las proteínas se separaron mediante geles de Acrilamida/Bisacrilamida al 10% y posteriormente fueron transferidas a membranas de PVDF. Después de un bloqueo de las membranas durante un mínimo de 2h, éstas fueron incubadas durante 18 horas a 4°C con los anticuerpos primarios:

Conejo anti-P-ERK 1+2 (cell Signalling#9101)

Conejo anti-ERK 1+2 (Cell Signalling#)

Conejo anti-HB-EGF (.....)

Como anticuerpos secundarios se usaron:

Anti conejo-HRP

Anti ratón-HRP

Las proteínas se detectaron usando la técnica de quimioluminiscencia, ECL, y su posterior revelado en la maquina de revelado Curix 60 (AGFA).

10. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

La evaluación de la migración se llevó a cabo gracias a la utilización de unos insertos de policarbonato (Corning#3422) los cuales poseen una membrana de 6,5 mm de diámetro y cuyos poros de 8 μm permiten el paso de las células. Un día antes al depósito de las células sobre la membrana de los insertos fue necesario su hidratación. Para ello se añadieron 600 μl de medio DFF 10 sin suero en cada uno de los pocillos de una placa de 24 pocillos, y a continuación se colocaron los insertos en su interior (figura 3a). Se dejó incubar a 37°C durante toda la noche.

Las células de la microglía, a una concentración de 200.000 células/100 μl en medio DFF10 sin suero, se depositaron en la parte superior de cada inserto (figura 3b). El pocillo inferior se relleno con medio DFF10 sin suero mas los estímulos correspondientes, LPS o sPLA₂. Ambos estímulos se utilizaron a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Se dejó incubar a 37°C durante 4 horas. Cada condición se realizo en triplicado

Tras la incubación, se descartó el sobrenadante de la parte superior del inserto y se hizo un lavado de esta parte con PBS 1X. Después, se raspó suavemente la parte superior de la membrana del inserto con un bastoncillo de algodón, para retirar las células que no han migrado a través de la membrana.

Las células que habían migrado se fijaron colocando los insertos en otros pocillos que contenían 600 μl /pocillo de PFA 4% (Fluka#76240) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se tiñeron con Cristal Violeta 0,1% en Metanol-PBS (600 μl /pocillo), 3 minutos a temperatura ambiente. Tras esta última incubación, los insertos se lavaron con 1ml de PBS y se dejaron secar para poder ser observados en una lupa Leica (figura 3c).

A continuación, se procedió a extraer las células adheridas a la membrana, para ello, se puso 1ml de Trispina-EDTA (Lonza CC-5012) por cada pocillo donde se colocaron de nuevo los insertos. Los insertos se incubaron en este medio a 37°C durante un periodo de tiempo que permita el desprendimiento del mayor porcentaje de células posible.

Cuando se apreció microscópicamente que se habían desprendido la mayoría de las células, se recogió el medio en un tubo tipo eppendorf y se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos para posteriormente resuspender el pellet en 100 μl de PBS y pasarlo a una placa de 96 pocillos para medir su absorbancia a 590/592nm mediante la utilización del lector VERSAmax (Molecular Devices), utilizando el software SOFTmax Pro para la adquisición de los datos. Como paso opcional y extra en la extracción de las células de la membrana de los insertos, una vez recogido el medio,

se observó de nuevo el inserto en el microscopio, y si aun quedan células se hizo un nuevo lavado con PBS o una nueva tripsinización, dependiendo de la cantidad de células que aun queden en él.

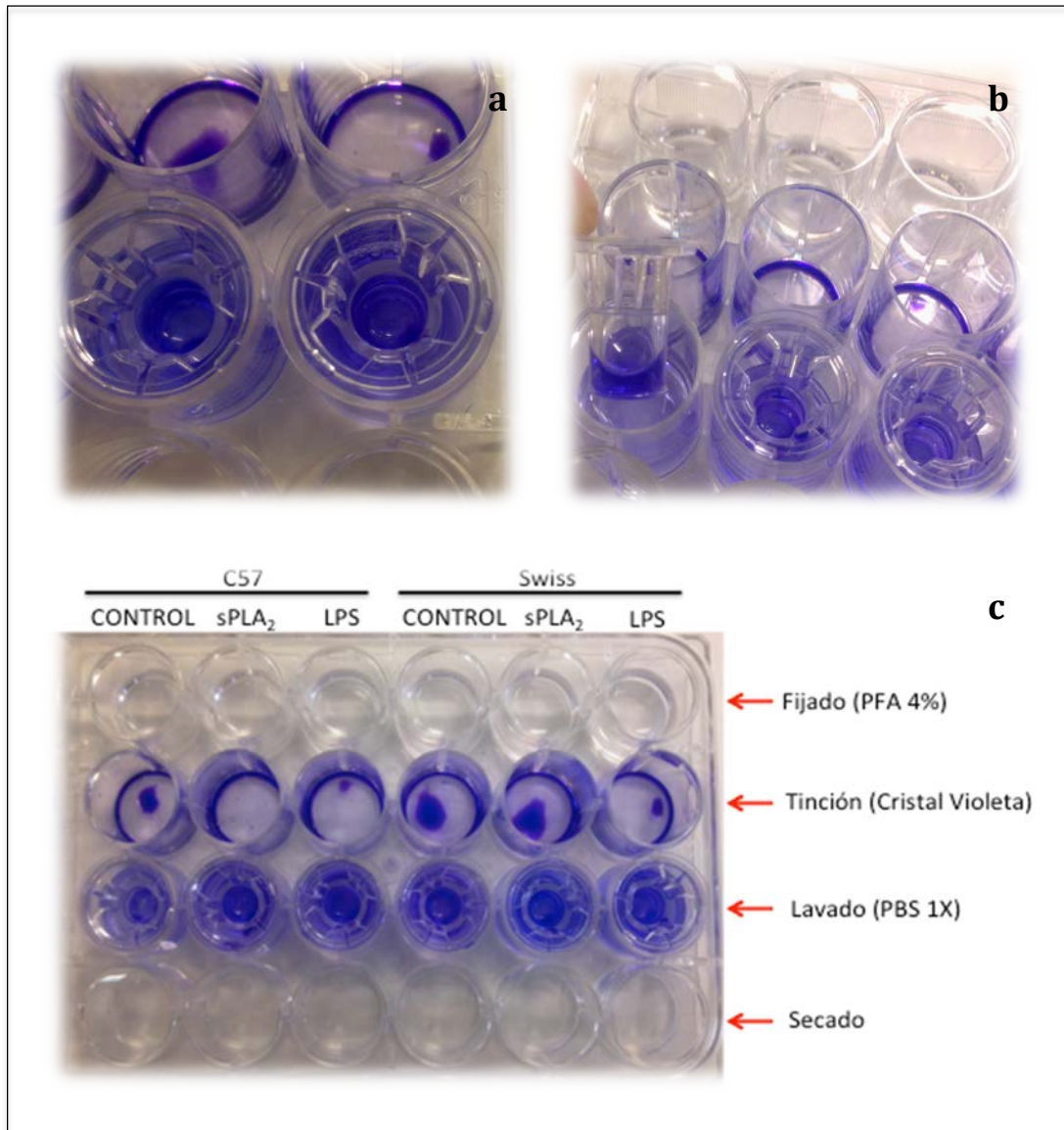


Figura 3. Insertos en placas de 24 pocillos usados en migración. a Colocación del inserto en el interior del pocillo de la placa. b. Sobrenadante en la parte superior de la membrana o interior del inserto. c Disposición de los estímulos utilizados, control, sPLA₂ y LPS, y la cepa a la que corresponden, C57 y Swiss (parte superior), así como la secuencia de pocillos utilizados para cada una de las fases del proceso; fijado, tinción, lavado y secado (derecha).

1. OBTENCIÓN DE MICROGLÍA PRIMARIA A PARTIR DE NEONATOS DE RATÓN

Mediante la técnica utilizada hemos conseguido aislar células de microglía a partir de un cultivo mixto de glía, el cual fue mantenido durante 20 DIV para alcanzar su confluencia óptima. Fue importante un seguimiento temporal del proceso de crecimiento del cultivo, ya que era necesario establecer el día de máxima confluencia (figura 1e,f), momento en el que prácticamente toda la placa de cultivo esta ocupada por las células, para poder calcular cuando el cultivo se encontraba en su momento adecuado para ser tripsinizado (figura 1g,h).

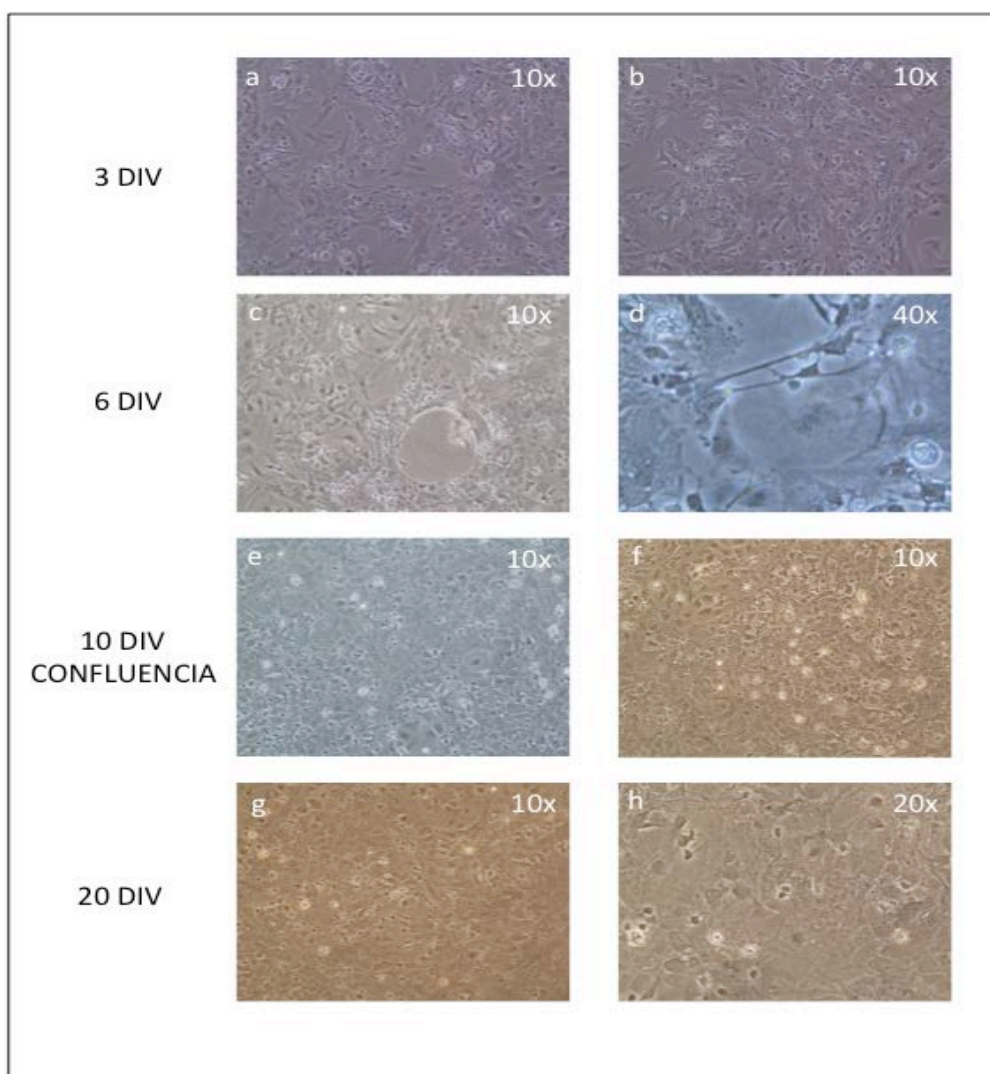


Figura 1. Estadios en el crecimiento de las células gliales. a) y b) las células ya se encuentran pegadas y han comenzado a crecer. c) y d) todavía existen espacios entre las células aunque por ellos ya hay prolongaciones de células que comienzan a contactar. e) y f) en este momento no existen espacios físicos aparentemente libres entre las células y es el momento en el que se establece la "confluencia". g) y h) las células siguen creciendo y formando contactos entre ellas, lo que permitirá separar posteriormente a los astrocitos (capa tripsinizada) de la microglía.

Resultados

A medida que pasaban los días, las células iban creciendo y ocupando los espacios libres de la placa, pudiéndose observar como ciertas células iban creando conexiones con las células vecinas (figura 1d) hasta que finalmente toda la placa estaba ocupada por células, momento indicado para establecer la confluencia; así, a partir del día de confluencia se dejaron entre 8-10 días más, en los cuales no se apreciaba un cambio en el tamaño poblacional pero a la postre es un requisito indiscutible para obtener un cultivo óptimo de microglía.

La tripsinización del cultivo confluyente de las células adheridas nos a permitido despegar una capa intacta de astrocitos (figura 2 izquierda y derecha superior) mientras que las células microgliales se han mantenido adheridas al soporte (figura 2 derecha abajo y figura 3 derecha arriba), consiguiendo una alta purificación aunque con cantidades celulares no muy altas.

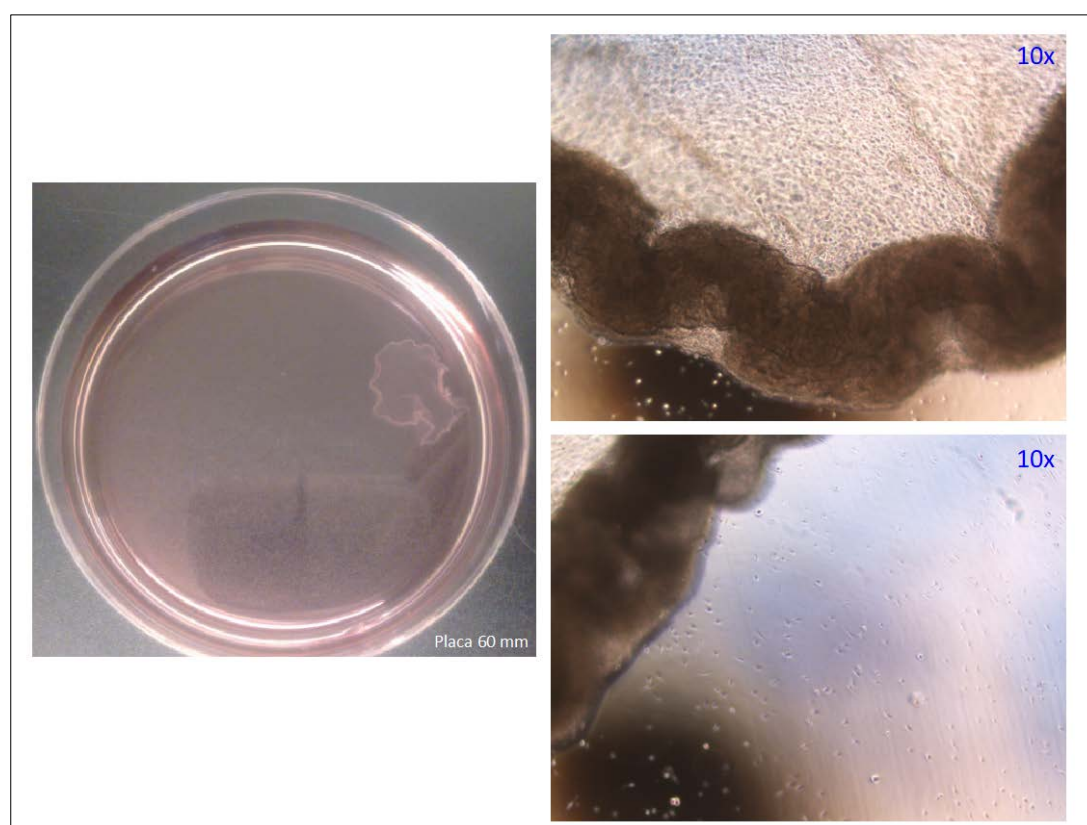


Figura 2. Separación de astrocitos y microglía del cultivo mixto glial. Al tratar la placa con Tripsina-EDTA e incubarla a 37°C, los dos tipos celulares presentes en el cultivo se van a separar, quedando la microglía adherida a la placa y los astrocitos se levantaran, esto ocurrirá a los 25-30 minutos. En la parte izquierda se puede ver el ovillo formado por la capa de astrocitos cuando se han despegado totalmente de la placa quedando flotando en el medio. En la esquina derecha superior tenemos una ampliación del borde del ovillo y la capa formada por los astrocitos. En la esquina derecha inferior se aprecia como las células microgliales quedan adheridas al soporte.

Se ha visto que los astrocitos que se separan es mejor utilizarlos en su primer pase, ya que en pases sucesivos se diferencian demasiado. Sin embargo, aun es demasiado pronto para hablar de este tipo celular ya que nos encontramos en los

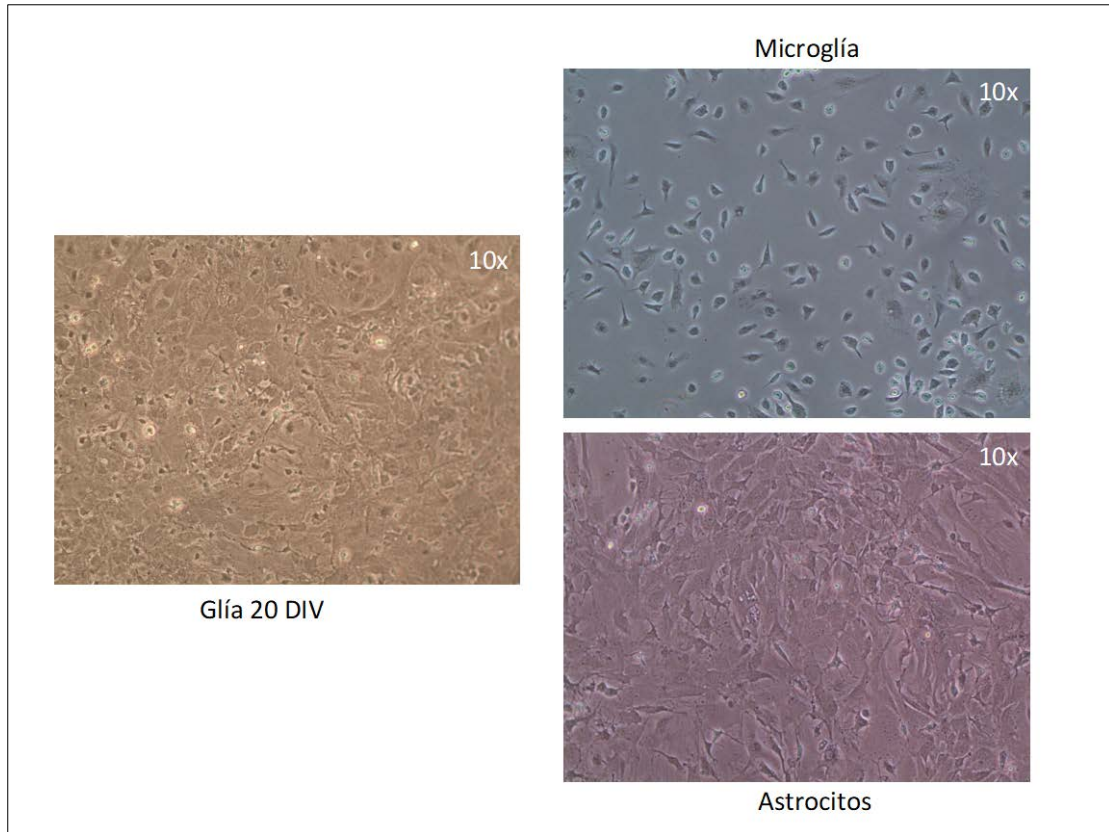


Figura 3. Obtención de cultivos aislados de microglía y astrocitos a partir del cultivo mixto glial. Mediante tripsinización del cultivo de 20 DIV de glía, fotografía de la izquierda, se obtendrán dos cultivos de una elevada pureza de microglía, fotografía superior derecha, y de astrocitos, fotografía inferior derecha. Se puede observar como la morfología y tamaño de ambos tipos celulares es bastante diferente y distinguible.

comienzos de su utilización y, por tanto, aun no esta puesto totalmente a punto su mantenimiento y cultivo, aunque hemos observado que su crecimiento y viabilidad tras su tripsinización y posterior cultivo son muy buenas, obteniéndose células funcionales que responderán a los estímulos expuestos y sin una diferenciación morfológica (figura 3 parte inferior derecha) marcada.

Por el contrario, las células de microglía una vez aisladas (figura 3 parte superior derecha) necesitan ser utilizadas para la experimentación en las 24 horas posteriores, ya que al separarlas de los astrocitos se quedan muy aisladas y no poseen ya capacidad para un gran crecimiento, por lo que acabaran diferenciándose. Su aislamiento es muy alto, en torno al 98% según estudios previos ([josep](#)) pero el número de células no es muy alto, alrededor de 20.000cel/cm² aun así superior al número obtenido mediante otras técnicas

como pueden ser la del gradiente de Percoll (Ford) o el método de agitación (Giulian), por lo que esto a supuesto ser un factor limitante a la hora de la realización de ciertos experimentos como realizar estudios de citometría.

Aunque ya existían estudios previos sobre la caracterización de este tipo de cultivo (1), se realizó en nuestros cultivos utilizando marcadores específicos de cada tipo celular; así, se realizó una inmunocitoquímica para las células de microglía usando la isolectina β_4 la cual es una glicoproteína que se une específicamente a un residuo de α -D-galactosa presente en la membrana de la microglía. Se vio que las células marcadas (fig. 4 izq. arriba) eran todas las que estaban presentes en el campo estudiado, como se pudo observar en su misma imagen en campo claro (fig. 4 dch. arriba).

Estos mismos resultados se obtuvieron al realizar la inmunocitoquímica en astrocitos, utilizando el anticuerpo anti-GFAP que es la proteína gliar fibrilar acídica. Dicha proteína forma los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, viéndose que en los cultivos de astrocitos primarios casi la totalidad de las células fueron marcadas (figura 4 izquierda abajo) con respecto a las observadas en la imagen de campo claro (figura 4 derecha arriba).

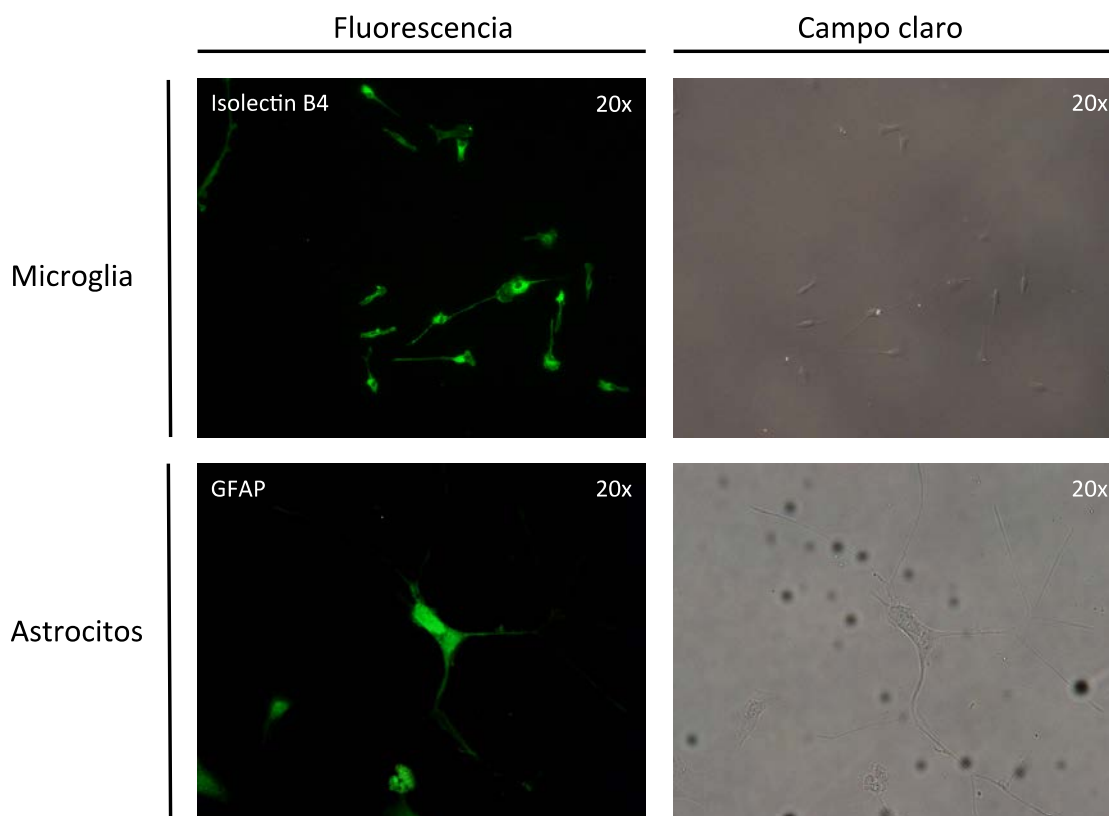


Figura 4. Inmunocitoquímica de células gliales. En la parte superior izquierda se observan células de microglía marcadas con Isolectina β_4 y a su derecha el mismo campo de la fotografía de fluorescencia, pero con luz clara. En la parte inferior izquierda se encuentran los astrocitos marcados con anti-GFAP, viéndose en la fotografía de su derecha esa misma área pero en campo claro.

2. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS AISLADAS Y DEL EFECTO ACTIVADOR DE PROCESOS INFLAMATORIOS PRODUCIDO POR LA FOSFOLIPASA SECRETADA A₂ DEL GRUPO IIA (sPLA₂-IIA)

2.1. Estudio de la proliferación celular

Quisimos comprobar si la sPLA₂-IIA generaba señales de proliferación celular. Así, realizamos un estudio en el que comparamos cuales eran los efectos de nuestra fosfolipasa en comparación con dos agonistas que están totalmente caracterizados como activadores de esta proliferación: el LPS y el INF γ .

Para ello, las células de microglía primaria fueron tratadas con las dosis ya establecidas en estudios previos del laboratorio con la línea celular de microglía de ratón BV-2, de los diferentes estímulos (STF-suero de ternera fetal 10%, sPLA₂-IIA 1 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml, INF γ 100 UI/ml) y sus efectos fueron comparados con los niveles de proliferación que teníamos en las células control sin tratamiento.

Los resultados nos muestran que nuestra fosfolipasa genera unos efectos sobre la proliferación que son muy parecidos a los que se consiguen con los agonistas clásicos. Como podemos observar en la grafica 1, los niveles de proliferación de las células estimuladas tenían valores de más del doble de la proliferación control, por lo que la sPLA₂-IIA si que va a generar señales que induzcan a la célula a proliferar.

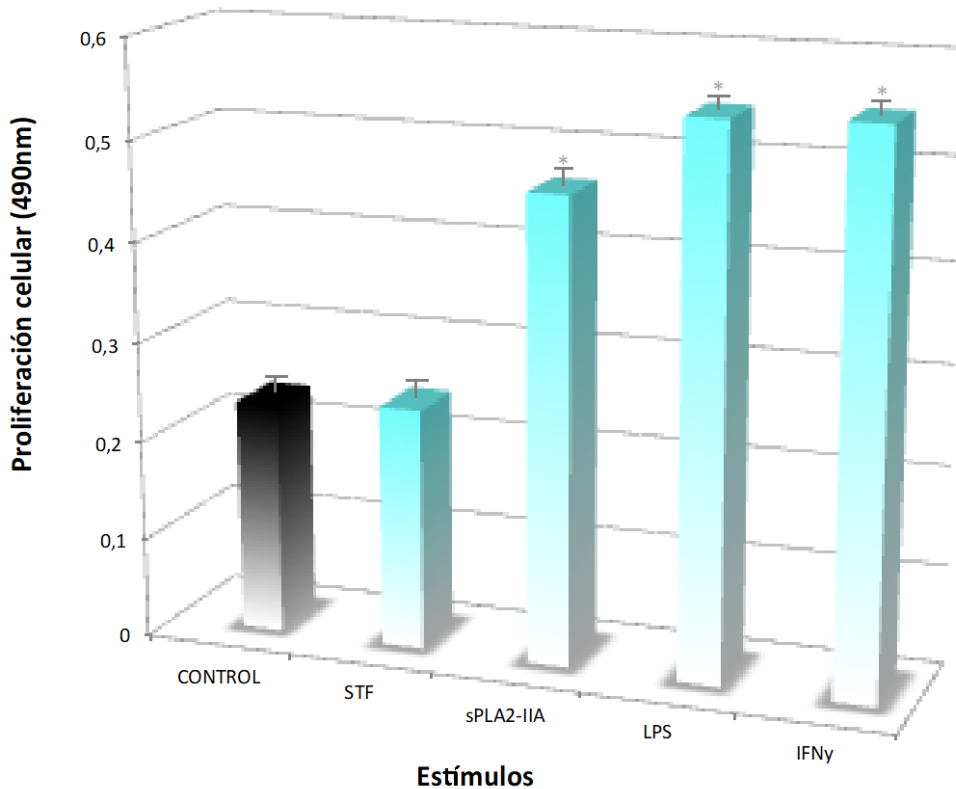
Por el contrario, los resultados que se obtuvieron para la proliferación producida por el STF no fueron claramente significativos para la activación de ésta, por lo que podría ser debido a que en células primarias se necesite mayor dosis de este estimulante u otras causas que desconocemos por el momento.

La proliferación celular obtenida con dos de los agonistas que ya se conocen que actúan sobre la activación de ésta, fueron claramente significativos obteniéndose unos niveles que prácticamente triplican los valores controles de proliferación de una célula de este tipo.

Por tanto, esto nos lleva a pensar que la fosfolipasa sPLA₂-IIA puede ser utilizada y comparada con los agonistas clásicos para producir efectos de proliferación sobre las células microgliales que hemos obtenido de cultivos primarios.

Además, para saber si la proliferación causada por la fosfolipasa sPLA₂-IIA era realmente producida por la vía de señalización propuesta por la que actúa y que no era producida por el estímulo de manera inespecífica, se realizó un estudio en el que se utilizaron los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal growth factor) que es un receptor por el que esta fosfolipasa inicia la cascada de señalización en diferentes tipos celulares como las BV-2 y el anticuerpo

bloqueante del Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) que es la proteína de membrana que una vez soltada de ésta, va a actuar activando al EGFR al unirse a él. Los inhibidores utilizados son del receptor EGFR, AG1478 y el anticuerpo bloqueante anti – HB-EGF.



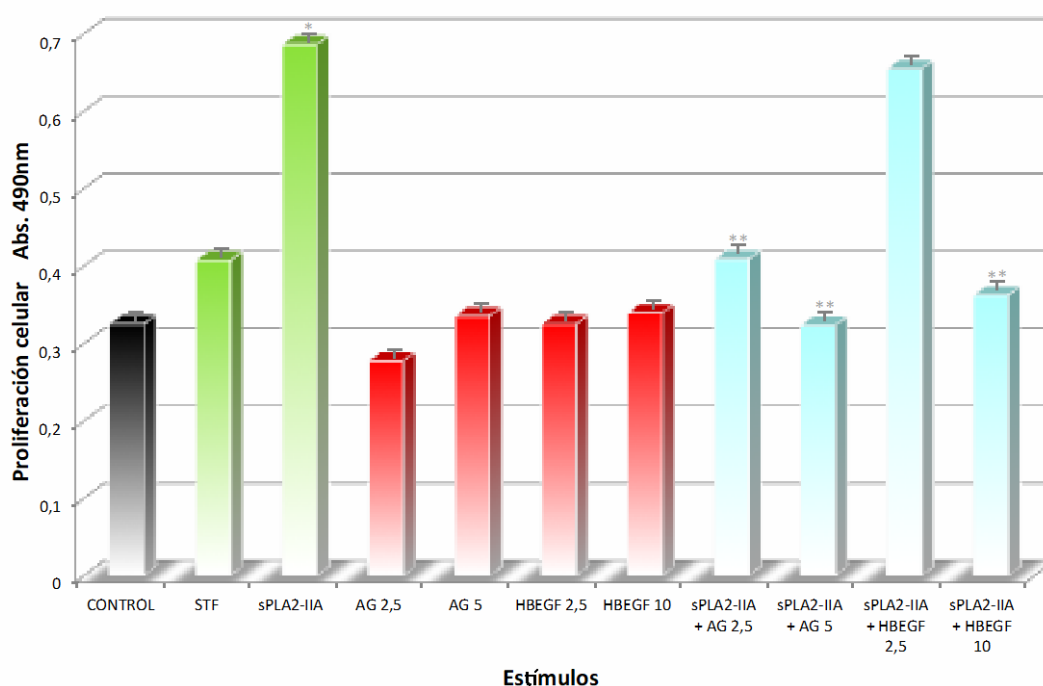
Gráfica 1. Efectos en la proliferación celular causada por diversos agonistas. A excepción del STF, que no provoca unos efectos significativos sobre la proliferación, la fosfolipasa sPLA₂-IIA sí que lo consigue teniendo unos niveles muy próximos a los observados para el lipopolisacárido y el interferón γ , agonistas ya demostrados que producen este efecto, con un aumento de más del doble a los valores control. * Cambios significativos con respecto al control.

Así, las células se trataron con la fosfolipasa sPLA₂-IIA en presencia o ausencia de diferentes dosis de los inhibidores, para ver si el bloqueo también era dosis-dependiente. Las dosis utilizadas fueron: AG 2,5 μ M, AG 5 μ M, anti-HBEGF 2,5 μ g/ml, anti-HBEGF 10 μ g/ml. Además, para ver que el efecto de la utilización de estos inhibidores no tenía una alteración sobre los niveles basales de la proliferación celular, se estimularon células controles únicamente con éstos. Como puede observarse en la gráfica 2, los niveles de proliferación obtenidos con los controles de los inhibidores no variaban significativamente con respecto al control.

Resultados

De nuevo, se observó que con el STF no se alcanzaban valores de proliferación significativos con respecto al control, pero que la activación que provoca la sPLA₂-IIA esta por encima del doble de los niveles control.

Los resultados con los inhibidores sugieren que los efectos de éstos sobre la proliferación inducida por la fosfolipasa son dosis-dependiente, ya que a mayor dosis, mayor inhibición de la proliferación. Así, con las dosis más altas se obtienen valores semejantes a los del control.

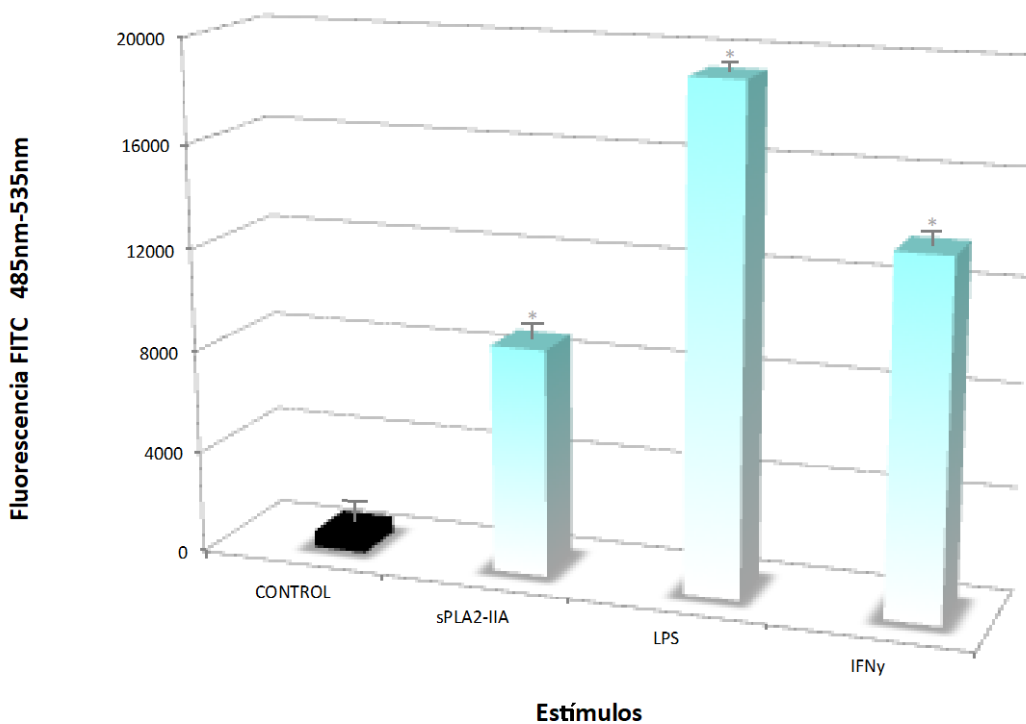


Gráfica 2. Proliferación celular obtenida de la co-estimulación con agonistas e inhibidores. En verde se pueden ver los niveles alcanzados al estimular las células con agonistas de la proliferación y en rojo los que se obtienen al ser tratadas únicamente con los inhibidores. La combinación de sPLA₂-IIA e inhibidores puede observarse en azul y se aprecia como las dosis altas de éstos consiguen devolver los niveles de proliferación hasta el nivel de los controles. * Aumento significativo de la proliferación inducida por sPLA₂-IIA con respecto al control. **Devolución hasta niveles de fagocitosis control al estimular con sPLA₂-IIA y tratar con dosis adecuadas de los inhibidores.

2.2. Detección de fagocitosis mediante Dextrano-FITC

Otro de los efectos característicos propios de los procesos inflamatorios es la observación de fagocitosis, por ello, se quiso comprobar si las células microgliales bajo el estímulo de la fosfolipasa sPLA₂-IIA generaban dicho proceso.

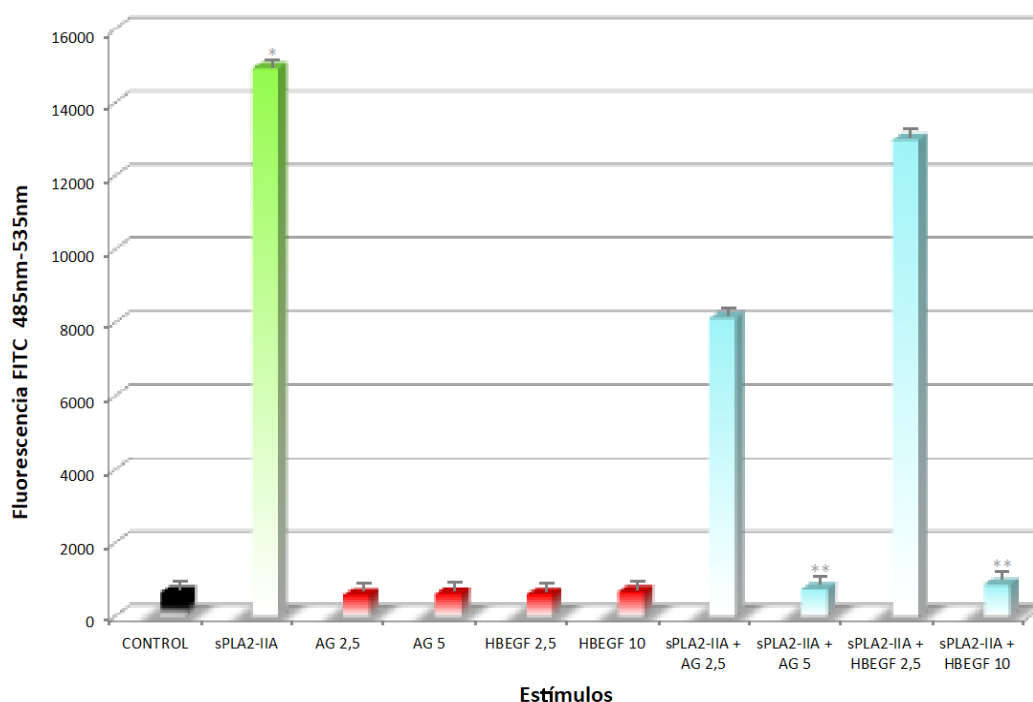
Para la realización de este experimento se utilizaron bolas de Dextrano marcadas con fluorescein isothiocyanate (FITC) las cuales una vez fagocitadas por las células pueden ser localizadas gracias al fluoróforo FITC que cuando es estimulado a una longitud de onda de 485nm éste va a emitir a 535nm, pudiendo ser registrada esta emisión.



Gráfica 3. Estimulación de la fagocitosis por moléculas proinflamatorias. Los resultados han sido obtenidos al utilizar la fosfolipasa (sPLA₂-IIA) a una concentración de 1µg/ml, el lipopolisacarido (LPS) a 0,1µg/ml y el interferón gamma (INF_γ) a 100 UI/ml.
* Aumento significativo de la fagocitosis con respecto al control.

Como ya se conoce que los estímulos con LPS y con el INF_γ provocan que las células realicen fagocitosis, se compararon los niveles de fagocitosis inducidos por estas dos moléculas y la fagocitosis que puede inducir la fosfolipasa sPLA₂-IIA. Los resultados obtenidos muestran que la sPLA₂-IIA aumenta significativamente los niveles de fagocitosis (gráfica 4) en este tipo de células pero estos niveles siguen siendo claramente inferiores a los que se obtienen al estimular a las células con el LPS, el cual provoca los mayores niveles de fagocitosis, o con el INF_γ.

Una vez que se supo que la fagocitosis era activada por sPLA₂-IIA se quiso comprobar si el bloqueo de alguno de los elementos de su ruta de señalización podría inhibir dicha señal y que las células no realizaran la fagocitosis en presencia de éste estímulo. Para ello, se utilizaron los mismos inhibidores que en experimento anterior de proliferación y en las mismas dosis, como se muestra en la grafica 5, observándose que por si solo no causan efectos en la fagocitosis y que cuando son utilizados junto con la fosfolipasa sPLA₂-IIA los niveles de fagocitosis únicamente disminuirán hasta los que se tenían en las células control cuando la dosis del inhibidor sea alta, ya que con las dosis bajas los niveles no disminuyen significativamente, observándose que la fagocitosis en esas células aun sigue siendo elevada y más próxima a los valores que se tenían cuando las células eran estimuladas únicamente con la fosfatasa.



Gráfica 4. Niveles de fagocitosis observados mediante la combinación de diferentes inhibidores y la sPLA₂-IIA. En verde se observa como el sPLA₂-IIA provoca un aumento muy significativo de los valores de fagocitosis en la célula. Por el contrario, en rojo, los inhibidores no aumentan la fagocitosis ni alteran la viabilidad celular, pero cuando se combinan con la sPLA₂-IIA, en azul, se puede comprobar como a concentraciones altas consiguen devolver a la célula a valores normales de fagocitosis. * Aumento significativo de la proliferación inducida por sPLA₂-IIA con respecto al control. **Devolución hasta niveles de fagocitosis control al estimular con sPLA₂-IIA y tratar con dosis adecuadas de los inhibidores.

2. IDENTIFICACIÓN DEL ESTADO Y LOCALIZACIÓN DEL FACTOR DE LIGAMIENTO HB-EGF Y DEL RECEPTOR EGF

Como ya se ha descrito en la línea celular inmortalizada de glía de ratón BV-2 la fosfolipasa sPLA₂-IIA va a ejercer su actividad a través de la señalización por medio del receptor de EGF, consigue ésta activación gracias a una transactivación producida por el factor de ligamiento HB-EGF el cual cuando es activado por la cascada iniciada por la sPLA₂-IIA va a desprender una porción extracelular que será la que se una al receptor EGF y provoque su activación.

Cuando se une el ligando a el receptor de EGF éste se va a fosforilar en residuos de Tirosina como el 1173 y al cabo de un tiempo el receptor será internalizado.

A través de anticuerpos específicos de residuos situados en las diferentes regiones del receptor o del factor de ligamiento podemos saber en que estado se encuentran estas dos moléculas cuando son estimuladas.

Aquí se utilizó la citometría de flujo para detectar la fluorescencia emitida por la fluoresceína isotiocinato FITC que esta conjugado a los anticuerpos secundarios utilizados.

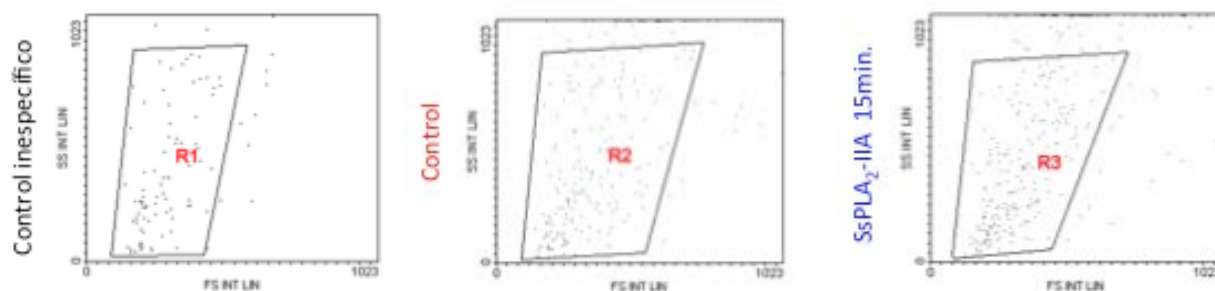
Detectando la presencia o no de los anticuerpos hemos podido saber donde se encontraban estas moléculas en ausencia y en presencia de estimulación.

En el caso del factor de ligamiento HB-EGF cuando no existía estímulo lo podíamos detectar al estar unido a la membrana (gráfica 5, control) obteniendo así la fluorescencia basal de éstas moléculas cuando poseen su porción extracelular unida.

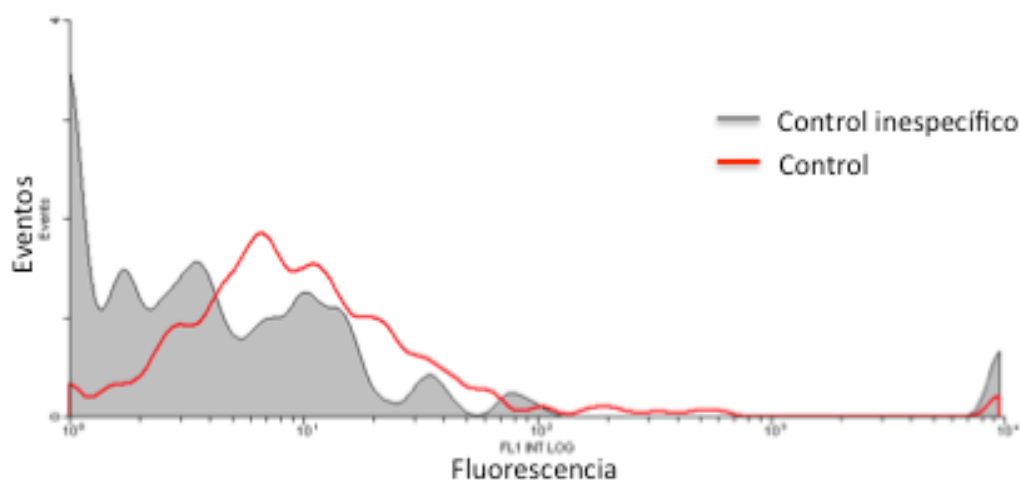
Pero cuando se realizó un estímulo durante 15 minutos con sPLA₂-IIA, pudimos ver que esta fluorescencia disminuyó (gráfica 6, sPLA₂-IIA), lo que nos confirmaba que al realizar dicha estimulación la parte de la molécula que actúa como ligando y la cuál es reconocida por el anticuerpo, se desprende de la membrana y deja de ser detectada, por lo que conseguimos ver como nuestro agonista sPLA₂-IIA provoca la liberación del ligando HB-EGF.

En la gráfica 5 podemos ver que la fluorescencia control es mayor a la del control inespecífico, lo que nos indica que el anticuerpo utilizado no se une de manera inespecífica a el resto de moléculas y por lo tanto, no nos genera un gran fondo.

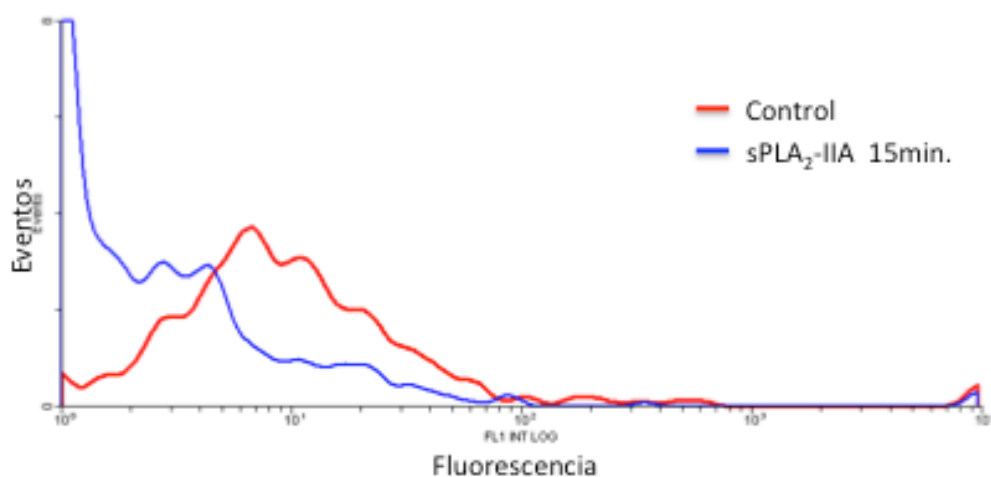
Estos resultados nos permiten confirmar que con un tiempo de estímulo con la sPLA₂-IIA de 15 minutos se consigue que el factor de ligación HB-EGF libere su parte extracelular que actúa como ligando para la activación de otras moléculas como puede ser el receptor de EGF que se estudió a continuación.



Región de la población seleccionada para el estudio



Gráfica 5. Comparación de la fluorescencia inespecífica y de la del control del factor de ligación HB-EGF. En rojo se puede ver las moléculas de factor de ligación y en gris las que se ha unido de forma inespecífica el anticuerpo secundario.



Gráfica 6. Comparación de los niveles del ligando HB-EGF unido a la membrana sin estímulo de sPLA₂-IIA y con el. Cuando no existe estímulo es mayor el número de moléculas presentes en la membrana (control), observándose una disminución de éstas cuando se realizan 15 minutos de estimulación con sPLA₂-II a una concentración de 1µg/ml.

Estaba descrito en la línea celular BV-2 (3) que el receptor EGFR se fosforilaba en su residuo de Tirosina 1173 al ser activado, por lo que quisimos comprobar si la estimulación con sPLA₂-IIA producía la fosforilación-activación del receptor.

Para este estudio usamos un anticuerpo que reconocía a dicho residuo fosforilado, por lo que la presencia del anticuerpo nos confirmaría la activación de éste o por el contrario su ausencia nos indicaría que el receptor no había sido activado.

Para intentar observar esta fosforilación del receptor EGFR se realizó un estímulo de 15 minutos con 1µg/ml de la fosfolipasa sPLA₂-IIA.

Los resultados nos sugieren que con 15 minutos de estimulación son suficientes para generar una marcada respuesta en la activación del EGFR como se puede observar en la gráfica 8, ya que el número de residuos Tirosina 1173 fosforilados es bastante mayor en las células estimuladas con respecto a las control.

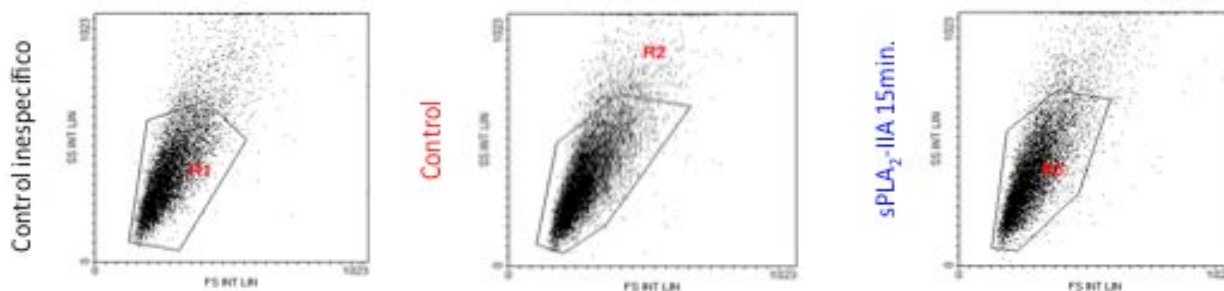
También se vio comparando las células control con un control inespecífico (gráfica 7) que el anticuerpo no se unía de manera inespecífica a otros residuos puesto que daba los mismos niveles de fluorescencia que las muestras que no habían sido tratadas con el anticuerpo primario. Este nos confirma que la fluorescencia obtenida ha sido producida por la fosforilación de EGFR, y por tanto, que se ha producido su activación.

Por último, se estudió la internalización del receptor EGFR ya que el receptor una vez que se activa va a poder ser internalizado por la célula, por lo que desaparece de la membrana.

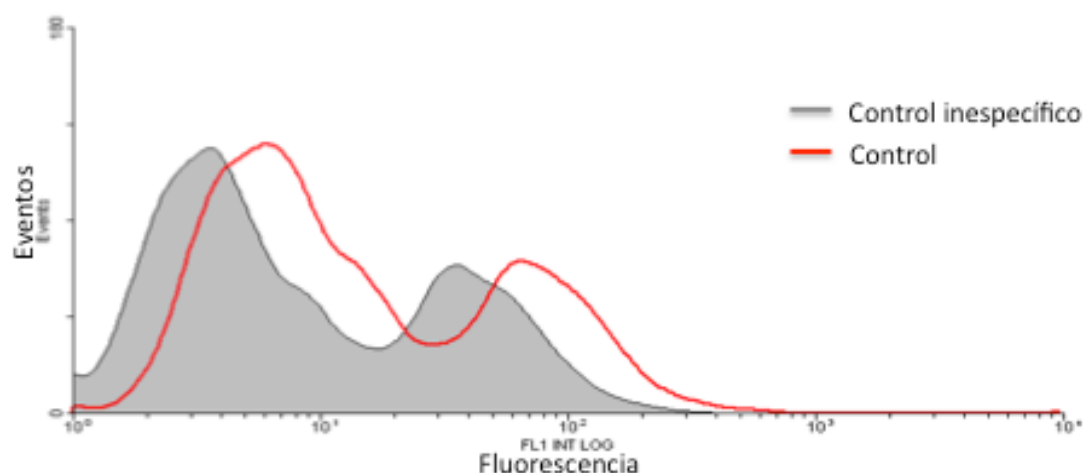
Este hecho nos permite estudiarle a través de un anticuerpo que se une a su región extracelular y gracias a esto hemos podido ver que cuando se detecta el anticuerpo es por la situación en la membrana del receptor ya que cuando se internaliza el anticuerpo deja de ser detectado.

Como en los casos anteriores, se realizó una estimulación de 15 minutos con la sPLA₂-IIA para ver si el receptor se internalizaba en este tiempo cuando se le activaba. Los resultados obtenidos, como se puede apreciar en la gráfica 10, nos muestran que en este tiempo de estímulo el receptor no ha sufrido una internalización significativa ya que como se aprecia, los niveles son prácticamente iguales a los de la muestra control.

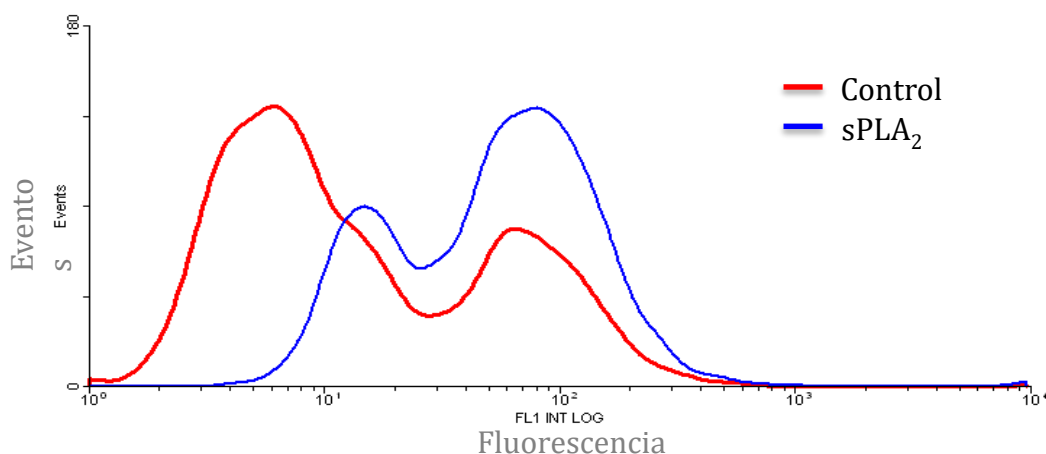
Para ver que el control nos marcaba realmente a EGFR y no era porque el anticuerpo se había unido a otras moléculas de manera inespecífica se comparo con un control inespecífico (gráfica 9), viéndose que la fluorescencia pertenecía efectivamente al receptor EGFR.



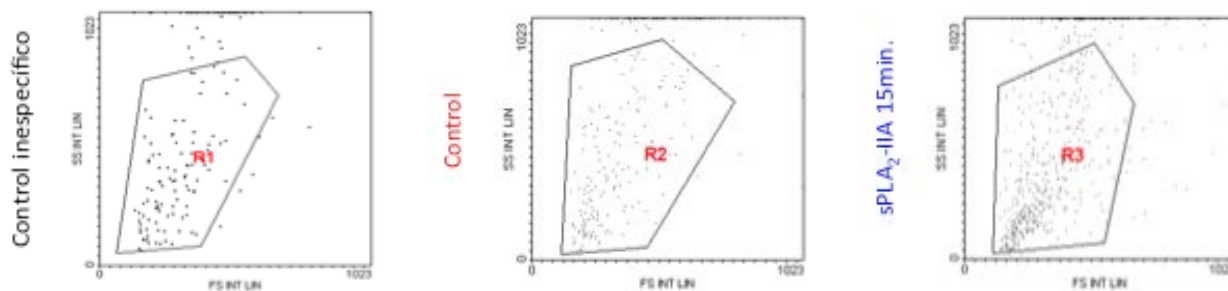
Región de la población seleccionada para el estudio



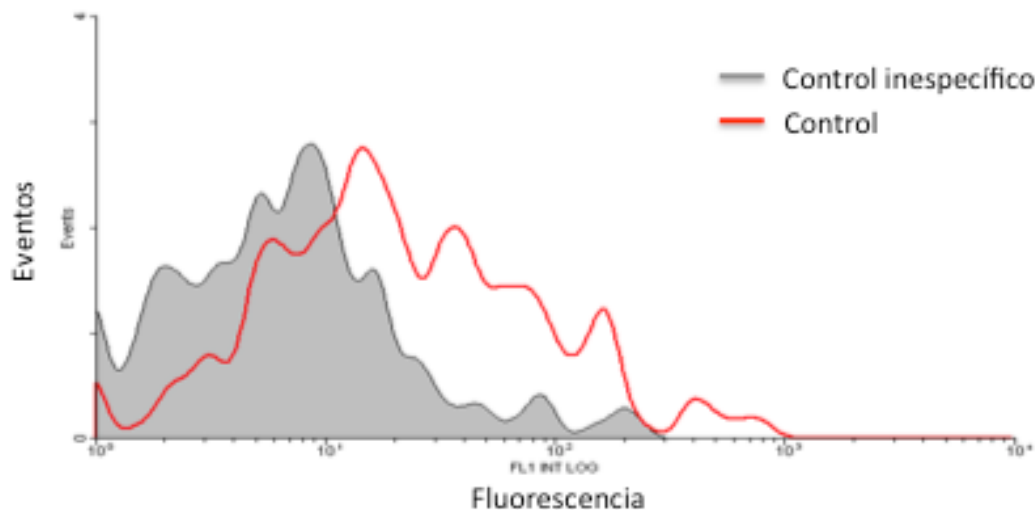
Gráfica 7. Comparación de la fluorescencia inespecífica y el control de la fosforilación del residuo de Tirosina 1173. Se aprecian los mismos niveles en ambas muestras, por lo que el anticuerpo no se une de manera inespecífica a residuos fosforilados. Se observan dos picos de fluorescencia que son característicos de las líneas primarias.



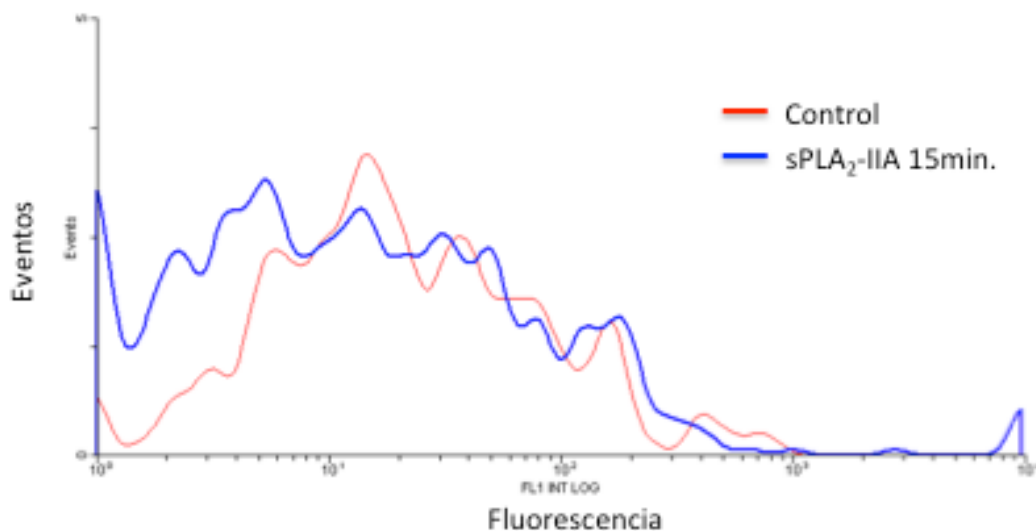
Gráfica 8. Fosforilación del residuo Tirosina 1173 del receptor EGFR mediante estimulación con sPLA₂-IIA. Cuando se realizan 15 minutos de estimulación con sPLA₂-II a una concentración de 1µg/ml se observa un aumento de la fosforilación de éste residuo propia de la activación del receptor EGFR (azul). Sin estimulación no se produce fosforilación del residuo de tirosina.



Región de la población seleccionada para el estudio



Gráfica 9. Comparación de la fluorescencia inespecífica y la del control del EGFR. Se puede observar en rojo los receptores EGFR que se encuentran marcados en la membrana y en gris el bajo nivel de uniones inespecíficas.



Gráfica 10. Comparación de los niveles de receptor EGFR internalizado y en membrana. La superposición de ambas líneas nos indica que no se está produciendo internalización del receptor, hallándose en su mayoría en la membrana. La estimulación se realizó con una concentración de 1µg/ml de sPLA₂-IIA durante 15 minutos.

3. LA ACTIVACIÓN DE EGFR A TRAVÉS DE sPLA₂-IIA ENVUELVE LA SEÑALIZACIÓN MEDIANTE ERK 1/2

Una vez comprobado que la estimulación con sPLA₂-IIA provocaba la activación de EGFR, se quiso comprobar si la vía de señalización utilizada por dicho receptor para generar la respuesta de activación celular era a través de la MAPK/Erk 1/2.

Para ello, se realizó un Western Blot observando que la estimulación con 1 µg/ml de sPLA₂-IIA durante 15 minutos provocaba la fosforilación de la ERK 1/2, la cual en estado control se encontraba levemente fosforilada (figura 5^a). Esta fosforilación se detectó utilizando un anticuerpo policlonal de ratón que reconocía la fosforilación de los residuos Thr202 y Tyr204 de la ERK 1/2.

Como control de carga se utilizó la misma ERK 1/2 en su estado sin fosforilar mediante un anticuerpo policlonal de ratón que reconocía los niveles totales de p44/42 (ERK 1/2).

Después de ver que sPLA₂-IIA provocaba la activación de ERK 1/2 se utilizaron dos inhibidores como son el anticuerpo bloqueante anti-HB-EGF a 10 µg/ml, que inhibe dicho factor de ligamiento (figura 5b), y el AG1478 a 5 µM, inhibidor del EGFR (figura 5c),

Ambos inhibidores conseguían disminuir la fosforilación producida sobre ERK 1/2 a través de sPLA₂-IIA, por tanto, inhiben la vía por la cual el sPLA₂-IIA pone en marcha la señalización de las MAPK/ERK 1/2.

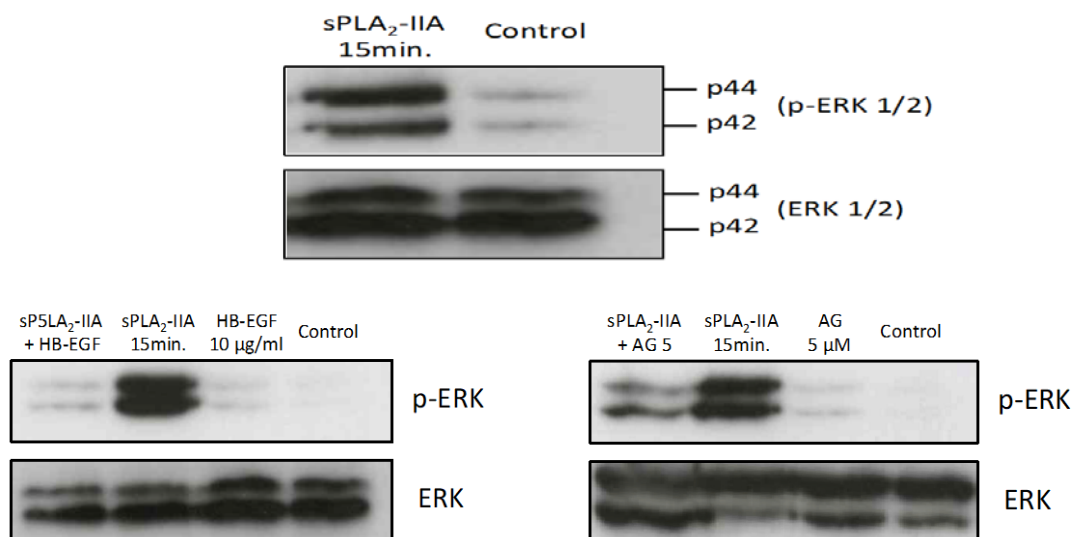


Figura 5. Detección de fosfo-ERK 1/2 mediante Western Blot. a) Niveles de fosfo- y ERK total al estimular durante 15 minutos con 1 µg/ml de la fosfolipasa sPLA₂-IIA. b) Análisis de la inhibición de la fosforilación con la adición de 10 µg/ml del anticuerpo inhibidor anti-HB-EGF. . b) Inhibición de p-ERK tras su activación con sPLA₂-IIA al aplicar 5 µM de AG1478 inhibidor del EGFR.

4. LAS CÉLULAS ACTIVADAS INICIAN UN PROCESO DE MIGRACIÓN

La utilización de los insertos para poder ver si las células microgliales al ser activadas ponían en marcha un proceso de migración dio unos resultados significativos para dicho proceso, ya que esto indica que este tipo celular va a poder desplazarse para poder hacer frente y poder ejercer su papel de defensa inmune contra los estímulos de patógenos.

Las células que respondieron a los estímulos efectuados mediante sPLA₂-IIA y LPS cruzaron al otro lado de la membrana donde se las situó, a través de sus poros, lo que nos permitió hacer una visualización de estas al situar los insertos bajo lupa, dándonos una primera idea del nivel de migración obtenido para cada estímulo (figura 6) viéndose que este fenómeno se producía bajo estimulación pero no en situación de reposo (control).

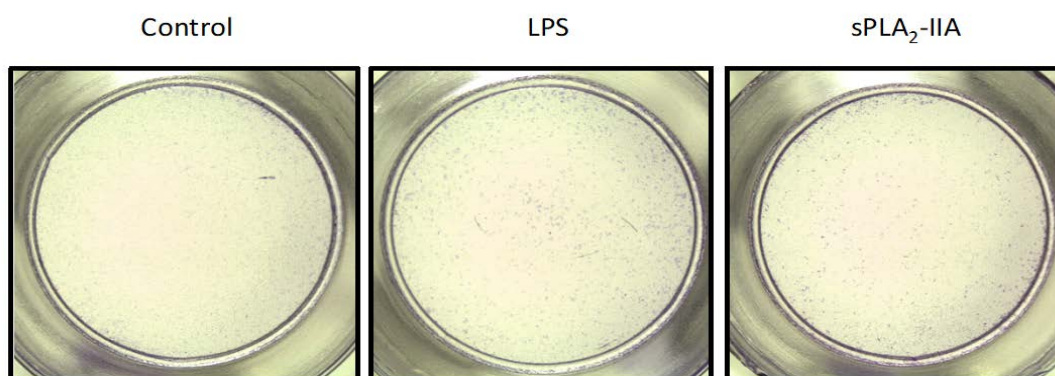
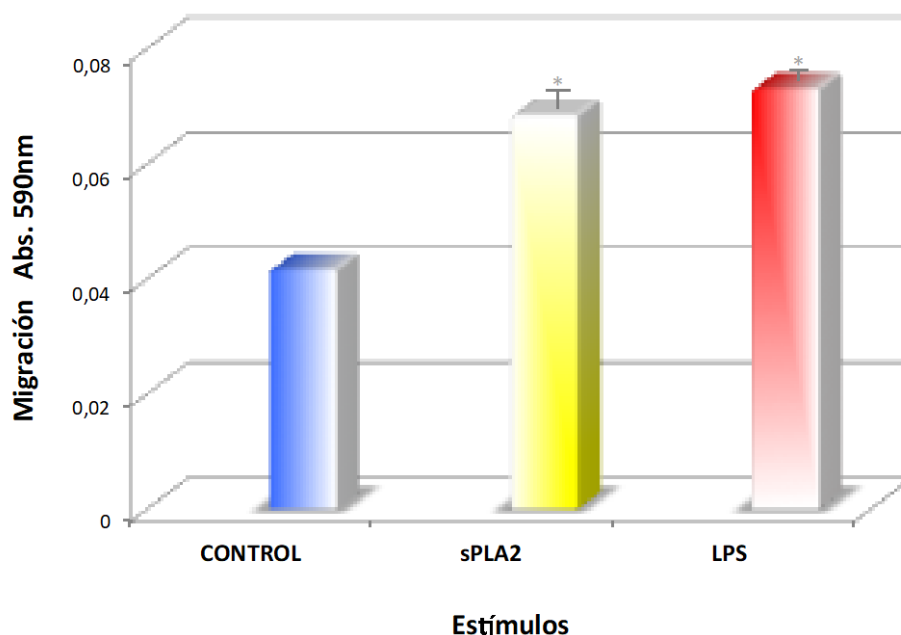


Figura 6. Células que han migrado a través de los poros de la membrana de los insertos.

Se observa como bajo estimulación el número de células que atraviesa la membrana es sustancialmente mayor que con respecto al control.

La realización de la tinción con Cristal Violeta nos permitió llevar a cabo la cuantificación colorimétrica de las células que habían conseguido atravesar la membrana, viéndose gráficamente que la estimulación con agonistas proinflamatorios genera este tipo de respuesta de migración (gráfica 11).



Gráfica 11. Cuantificación de la migración celular mediante Cristal Violeta. Medida de la absorbancia a 590nm de las muestras que poseen los estímulos con los agonistas de la activación celular, LPS y sPLA₂-IIA, las cuales han sido extraídas de las membranas de los insertos.

5. COMPROBACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL AISLADO DE ASTROGLIA PRIMARIA MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE SU PODER DE PROLIFERACIÓN.

Los astrocitos son el otro grupo de células importantes para generar una respuesta inmune y una respuesta inflamatoria en el cerebro.

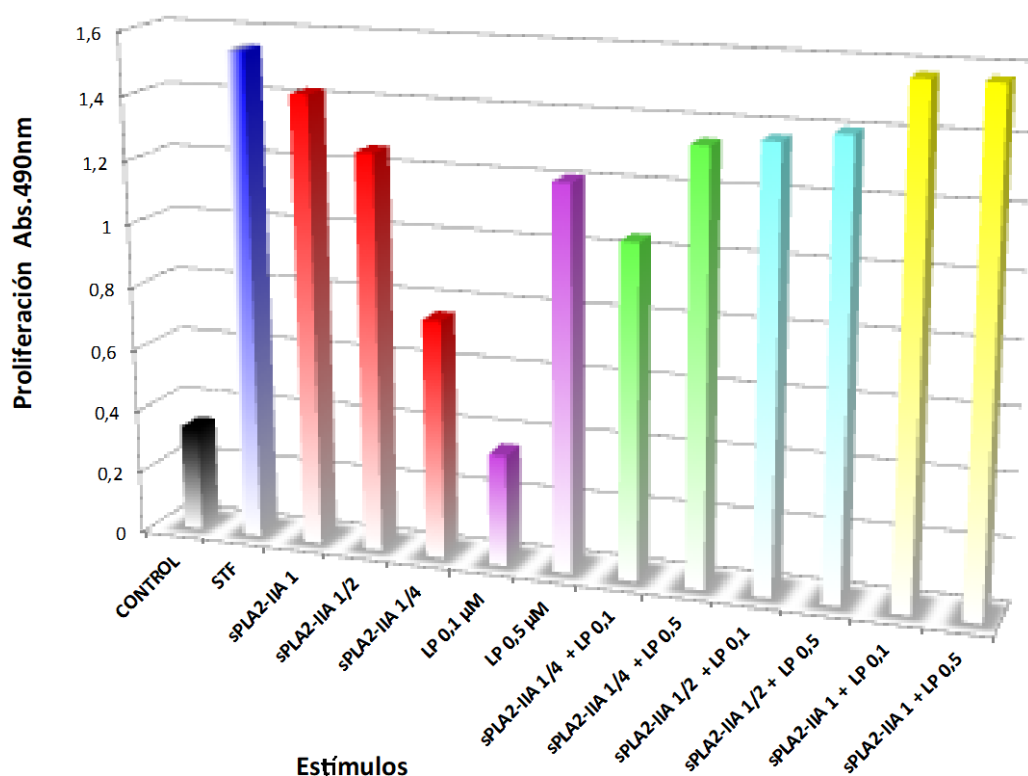
Como se consiguió aislarlos al realizar el cultivo primario de microglía, se quiso ver si estos eran funcionales frente a estímulos y para ello se realizó el mismo experimento de proliferación que en el caso de microglía.

En este caso se utilizaron como agonistas la sPLA₂-IIA en diferentes concentraciones 100%, ½, ¼, el Suero Fetal Bovino (STF) y la citoquina Leptina también en dos concentraciones diferentes 0,1 y 0,5 µM.

A parte de ver que los astrocitos eran completamente funcionales, se pudo comprobar que la respuesta al STF era la que realmente se esperaba y la que generaba una mayor respuesta proliferativa.

Como se puede observar en la gráfica 12, la respuesta proliferativa al usar las diferentes concentraciones de cada agonista son dependientes de la dosis, a mayor concentración del agonista mayor tasa proliferativa se observa, y esto mismo ocurre cuando ambos agonistas se usan conjuntamente, viéndose también que la máxima respuesta al usar las concentraciones altas de ambos es similar a la que se obtenía con el STF.

Aunque los estudios con los astrocitos se están comenzando a realizar y aun no se disponen de datos realmente significativos, estos primeros experimentos generan grandes esperanzas para los futuros estudios.



Gráfica 12. Proliferación de los astrocitos bajo diferentes estímulos. La respuesta proliferativa es dependiente de la dosis usada de cada estímulo (azul, rojo y violeta). Esto mismo se observa cuando se usan de forma conjunta (verde, azul y amarillo). Los mayores niveles de proliferación son los conseguidos con el uso conjunto de las dosis altas de cada agonista los cuales son semejantes a los conseguidos con el STF.

JOSEP SAURA, JOSEP MARIA TUSELL, AND JOAN SERRATOSA. 2003. High-Yield Isolation of Murine Microglia by Mild Trypsinization. *GLIA* 44:183–189

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *J Immunol* 154:4309–4321.

Giulian D, Baker TJ. 1986. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163–2178.

A pesar de ser una técnica no realizada antes en el laboratorio, el aislamiento y cultivo de células microgliales dio resultados que fueron muy satisfactorios en un corto periodo de tiempo, no solo por los niveles de aislamiento celular obtenidos sino por la metodología y reproducibilidad exitosa que se ha conseguido. Aunque se realizaron ligeras variaciones respecto al protocolo original seguido (1), éstas no influyeron sustancialmente en la calidad del cultivo obtenido, aun sin conseguir una pureza de células microgliales del 100%.

Aunque la técnica utilizada era para el aislamiento exclusivo de células microgliales conseguimos aislar y mantener células astrogiales perfectamente funcionales como hemos podido observar en los resultados de proliferación y que nos permitirá realizar futuros estudios. Por tanto, la técnica permite aislar más de un tipo celular sin suponer un riesgo en la viabilidad de las células que se pretendía aislar inicialmente.

Tras diversos contajes de las células obtenidas el número medio obtenido por cada hemisferio aislado era en torno a 1 millón de células, aunque parezca ser un alto número comprobamos que este disminuía considerablemente cuando aislábamos la microglía exclusivamente, lo que resultaba ser un claro inconveniente para la realización de ciertas técnicas y experimentos como la citometría de flujo que necesita un alto número de células para dar resultados más significativos.

Otro inconveniente de usar las células microgliales primarias es que tienen que ser usadas a las 24 horas posteriores de ser aisladas, ya que sino se diferenciarían demasiado, mientras que se ha visto que los astrocitos que se separan se pueden mantener durante más tiempo, pero es mejor utilizarlos en su primer pase, ya que en pases sucesivos se diferencian demasiado.

Con respecto a las inmunocitoquímicas para caracterizar los cultivos, solamente se comparó el marcaje específico de cada tipo celular con su campo claro porque en los pasos anteriores del cultivo salieron los resultados que se indicaban en el protocolo seguido (1) mediante el cual se consigue una pureza mayor al 95%, esto junto a que la observación fenotípica también nos daba una gran idea de la pureza, nos fue suficiente para determinar la pureza de nuestro cultivo.

Los estudios de proliferación mostraron que la sPLA₂-IIA la activaba a niveles comparables a los de otros agonistas clásicos como el LPS y el INF γ , pero en contra de lo esperado, con el STF no se apreciaba una activación la cual si que se esperaba para este agonista clásico.

También es importante remarcar que a concentraciones bajas de los inhibidores que se usaron en alguno de los casos no se lograba inhibir la activación por sPLA₂-IIA, lo que nos puede indicar que su señalización es bastante fuerte y las moléculas que participan en ella serán sensibles y con gran afinidad por su ligando.

Nuevamente en los estudios de fagocitosis se pudo comprobar que la sPLA₂-IIA es un gran activador de la microglía puesto que los niveles alcanzados de ésta eran muy elevados con respecto al control. Al igual que se observó que utilizando los inhibidores a una concentración adecuada es posible bloquear totalmente la señalización iniciada por sPLA₂-IIA, lo que nos da la seguridad de estar usando unos inhibidores que actúan sobre las moléculas que forman parte de nuestra ruta de señalización.

Los estudios de citometría nos ayudaron a comprobar la sensibilidad y especificidad del EGFR y de la HB-EGF hacia la sPLA₂-IIA, pero como se indicaba anteriormente estos estudios fueron complicados de realizar ya que al iniciarlos con una cantidad de células algo bajas y ser un protocolo que favorece la pérdida celular, era difícil obtener unos resultados concluyentes.

Pudo observarse que el receptor EGFR no se internalizaba de manera significativa al ser activado por la sPLA₂-IIA durante los 15 minutos de estimulación, lo que indica que necesita más tiempo para producirse su internalización.

Con respecto a la vía de señalización a través de las MAPK/ERK 1/2 se pudo comprobar que efectivamente la sPLA₂-IIA provoca su fosforilación y que la utilización de los inhibidores del HB-EGF y del EGFR, anti-HB-EGF y AG1478 respectivamente, consiguen disminuir esta fosforilación, pero en las concentraciones utilizadas no consiguen anularla completamente.

El uso de los insertos en los estudios de migración, ha permitido no solo visualizar como se han desplazado físicamente las células, sino también poder cuantificarlo gracias al fácil tratamiento de las células en este soporte. Los resultados muestran que la utilización de agonistas aumenta esta migración, por tanto, la microglía podría ocupar los espacios generados por la muerte de otras células en el SNC.

Con los astrocitos aislados se han comenzado a hacer estudios como el de la proliferación obteniéndose unos resultados muy prometedores y que nos indican que son células completamente funcionales y que responden adecuadamente a los estímulos teniendo un comportamiento comparable al que ya se observó en la línea celular BV-2, por lo que serán un buen modelo para futuros estudios.

- El cultivo de microglía aislada a resultado ser de gran pureza consiguiendo una población de células completamente funcionales que responden a los estímulos aplicados.
Como subpoblación del cultivo se consiguieron crecer los astrocitos que en los estudios previos parecen estar respondiendo de manera adecuada a los su estimulación.
Por tanto, se a conseguido realizar y reproducir la técnica de cultivo primario de microglía a partir de ratones neonatos con una gran efectividad y pureza, así como obtener a partir de la misma las células de astroglía en buenas condiciones fisiológicas.
- La estimulación de la microglía con la fosfolipasa sPLA₂ a producido su activación a través de más moléculas de la vía que se propuso al comienzo de este trabajo, como son el factor de ligamiento HB-EGF y el EGFR.
- La activación del EGFR va a generar la activación de la vía de las MAPK como es ERK1/2 y esta activación va a ser la responsable de generar las respuestas de:
 - Fagocitosis
 - Proliferación
 - Migración
- Las células microgliales van a responder a estímulos de infección o daño en el SNC a través de alguno de los procesos anteriores, teniendo, por tanto, una gran implicación en los procesos inflamatorios que se dan en éste.

- (1) Del Rio Hortega, P. (1932). Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (W. Penfield, Ed.), Vol. 2, pp.481–534. Hoeber, New York.
- (2) Adelman, G., and Smith, B. H. (Eds.) (1996). *Encyclopedia of Neuroscience*, Vols. 1 and 2. Elsevier, Amsterdam.
- (3) Barron KD (1995) *The microglial cell. A historical review. J Neurol Sci 134:57–68.*
- (4) Cuadros MA, y Navascues J (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol 56:173–189*
- (5) Kreutzberg GW (1996) *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312–318.*
- (6) Aloisi F (1999) *The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. Adv Exp Med Biol 468:123–133.*
- (7) Araki E, Forster C, Dubinsky JM, Ross ME, Iadecola C (2001) *Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 protects neuronal cultures from lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. Stroke 32:2370–2375.*
- (8) Liu B, Gao HM, Wang J-Y, Jeohn G-H, Cooper CL, Hong JS (2002) *Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. Ann NY Acad Sci 962:256–263.*
- (9) *da Fosfolipase a2 eicosanoid generation.am J.respir crit Care y med. 2000;161:F32-S35*
- (11) *bl, arn JT fosfolipase A2 prostaglandins leukopt essent fatty acids. 2003;69:87-97*
- (12) *Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phosfolipase A2 enzymes:Clasidication and caracterización. 2000 14;88-19*
- (13) *Seil Hamer JJ truzansky W Vavas T et al. Cloning and recombinant*
- (14)
- (15)
- (16)
- (17)
- (18)

(19)

(21)

(22)

(23)

(24)

(25)

(26)

(27)

(28)

(29)

(30)

(31)