



Modulació de l'activació microglial com a estratègia neuroreparadora

Núria Gresa Arribas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



MODULACIÓ DE L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL COM A ESTRATÈGIA NEUROREPARADORA

Tesi doctoral presentada per

Núria Gresa Arribas

Programa de Doctorat en Biomedicina

**Tesi realitzada al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de
l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC)**

Barcelona, 7 d'abril de 2011

La doctorant, Núria Gresa Arribas

La directora, Dra. Carme Solà Subirana

Científic titular del CSIC. Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC).

El codirector, Dr. Josep Saura Martí

Professor agregat de la Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona.

**“Si el cervell humà fos tan simple que el poguéssim entendre,
nosaltres seríem tan simples que no el podríem entendre”**

Jostein Gaarder, El Món de Sofia

A mi madre

AGRAÏMENTS

Arriba el moment de pensar en tots aquells que m'han ajudat durant aquests 4 anys i donar-los les gràcies. Com tots m'havien avisat, escriure els agraïments no és fàcil. No perquè no sàpiga què dir, sinó per la por de no dir suficient. Si em deixo algú que em perdoni, es vingui a queixar i així li agrairé en persona.

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors de tesi. A la Carme per ser el contrapunt que necessita el meu caràcter impulsiu i inquiet. Per ensenyar-me a treballar, a planificar, per entendre que els errors passen i no fer-me mai retrets. Per les converses mentre dissecionàvem i per fer-me sentir que sempre podia acudir a tu fos per feina o no. Al Jou per creure tant en mi i fer-me sentir millor científica del que sóc, per interessar-te per tot allò que em passa, siguin resultats o anècdotes de les classes de conduir. De tots dos admiro la vostra vocació, curiositat i intel·ligència, i espero que se m'hagi enganxat una mica de cada després d'aquests 4 anys junts. Als meus altres jefes, en Joan i en Pep. Al Joan perquè ets un tros de pa, sempre pendent de que tots estiguem bé, per resoldre'm tots els dubtes, sempre tan didàctic, sempre tan amable, i per ser la resistència culé al perico més pesat que he conegut mai! Al Pep, perquè m'ho he passat de conya amb tu, discutint, cotillejant, descongelant el -20°C... per ser tan corcò, i conèixer-me tan bé. Als meus companys de grup, presents i passats. Arolica!, gracias porque me acogiste con los brazos abiertos, me enseñaste como funciona un laboratorio, y porque yo aún digo "si Aroa lo hacía así es que así está bien hecho", te perdí como compañera pero por suerte te conservo como amiga. A la Pili, no he conegut a ningú amb qui sigui tan fàcil treballar, no saps com trobo a faltar el "Pili's corner"! Tot i que no ens veiem tant com m'agradaria, sempre ens queda el Facebook. T'espero de visita a Berlin! A Cris, fue genial tenerte en el lab, siempre alegre y tranquila, mucha suerte con tu tesis! A Marco, mi amigo además de compi de grupo, por tus consejos laborales y los otros (no pierdas la fe en mi, los alemanes me esperan!) porque me encanta contarte todo lo que me pasa, por ser taaaan italiano, porque contigo da gusto estrenar ropa! Al Guido, per ser tan desastre i tan encantador, cuida el laboratori (i puja coses a l'armari de cultius de tant en tant). A l'Eva, perquè ets un Sol, sempre ben disposada a treballar, a cotillejar o a riure, et felicito fill! Al nostre doctor Valente, metòdic i rigorós com a científic, encantador com a persona. A les noves incorporacions, la M^aJosé i la Marta, ànims, els inicis sempre són durs però val molt la pena!

Als altres grups de departament, on sempre es pot acudir ja sigui per demanar un anticòs o anar a fer un cafè. Als "Planas", sou tants que segur em deixo algú! Als meus companys de lab, Cedric, porque me haces reír mucho, gracias a que no me dejaras levantar del ordenador ahora esta tesis está acabada! Espero que te guste el pica-

pica! A l'Ester, per ser tan sincera, i per fer-me companyia al lab els caps de setmana. A mi vecino Unai por ser tan divertido bajo esa apariencia tímida, y por animarme siempre cuando te cuento mis penas. A Paqui, por estar tan loca y mimarme tanto. A Leo, mi confidente y consejero, porqué siempre me haces reír, lo único que no echaré de menos de ti es tu extraño gusto musical. A la Miriam, la dolçor personificada, ànims que et falta poc! Al Xevi, que quan no està de vacances em fa sentir com una damisela. A l'Anna Serra, com trobo a faltar la teva alegria! A la "nova" Ester, hola carinyo! gràcies pel teu somriure. Gràcies a l'Anna Planas, sempre tan amable disposada ajudar en tot el que he necessitat.

Als "Pablos" presents i passats. A Laura, por tu risa y tu entusiasmo que hace que todo lo que me pasa parezca mejor cuando te lo cuento. A Jari, currante, eficiente, divertida, que se apunta a un bombardeo, siento no haber podido convencerte de que no soy tan chungu! A Pedro, siempre dispuesto a charlar conmigo mientras meriendo, mucha suerte con las becas! A Bego, gracias por todas las conversaciones, los consejos y los ánimos. A les meves nenes de la 7a planta, amb les qui dóna gust xerrar. Sabrina, gràcies per descobrir-me les falles, sort a la recta final! Natalia, un torbellino de energía, metida en mil historias, siempre divertidísimas de escuchar, Joana, eres tan mona! te voy a echar de menos. Ánimo con todo, te mereces lo mejor!! A mis compis "no pipeteadores" del IIBB, que ayudan a desconectar de la ciencia cuando hace falta. Al señor gerente, porqué me encanta entrar a molestarte al despacho para hablar de fútbol o contarte cualquier chorrada. A Isaac, porque eres un solete! Por tu sinceridad, por preocuparte por mi, por las excursiones a Roda, a Bellpuig, a Segovia... la gira sigue en Berlín!

La tesi és més fàcil de portar quan tens el suport dels amics de sempre, que et coneixen des de fa anys, que saben com animar-te quan les coses no van bé, i t'escolten sempre, fins i tot quan els parles de ciència. Al Joan, tot i que ara no ens veiem gaire sempre hi ets quan et necessito, els teus mails m'han animat molts dies de feina, ja saps que sempre em faran gràcia les teves bromes dolentes! A l'Ana, enèrgica, motivada, i una mica flipada. Hem compartit moments difícils per les dues, però també altres fantàstics (mai oblidaré aquell cap de setmana a Bonastre... ni el teu cotxe tampoc!). Als meus amics de l'institut, que van viure els meus primers passos en la ciència, ai pobres mosques! L'Ori, per ser el meu conseller literari, perquè és molt fàcil parlar amb tu de qualsevol cosa, marxaré a Berlin sense veure el teu pis! A la Miriam, perquè podem passar mesos sense veure'ns però al retrobar-nos em sento com si t'hagués vist ahir. A l'Albert, gràcies per deixar que m'autoconvidi a sopar, pel Sumial, per fer-me sentir que puc comptar sempre amb tu, perquè ets un dels amics més importants per mi. A les meves "pompis", a la Marta, per compartir les nostres

penes i també les alegries, sort amb el futur que triïs. A la Laura, el caos més divertit que he conegut, a la Mireia sempre tan dolça i amb un punt boig que em fa riure molt. Hi ha amics amb qui has compartit tant, que et coneixen tan bé, que més que amics són família. Laia i Mar, us estimo tant i sou tant importants per a mi que tot el que pugui dir aquí es quedarà curt. Laia, hem estat juntes a l'institut, a la carrera i al clínic, que faré sense tu? Gràcies per tots els moments viscuts, les excursions a Altafulla i Sant Pol, les nits de marujeo menjant festucs, els sopars amb la teva família (i de vegades sense tu!), i per tots els bons moments que encara ens queden per viure. Gràcies Mar, per ser una amiga amb majúscules, perquè quan em passa alguna cosa ets la primera persona a qui se la vull explicar, per entendre'm tan bé, per ser tan divertida, pel suport incondicional, i perquè sé que farem l'impossible per a què no es notin els kilòmetres de distància. Jero! Veus com sí que surts als agraïments? Ets el millor company de pis amb el que podia somniar, gràcies per els 4 anys més divertits de la meva vida. Gràcies pels viatges, les discussions, les incomptables tradicions freakis del pis, per no deixar de sorprendre'm, per fer-me veure que es pot viure més relaxadament, per dir-me sempre el que penses amb sinceritat. Crec que encara no sóc conscient de quant et trobaré a faltar.

La tesi no hagués estat el mateix sense el suport incondicional de la família. Perquè no tenen ni idea de en què treballes, però igualment n'estan molt orgullosos, i perquè sempre que surt l'Hospital Clínic a les notícies es pensen que allò ho has descobert tu. A la meva família, gràcies per ser-hi sempre que us he necessitat, i deixar-me espai per ser independent. Gràcies Julio per estimar-me tant i per la voluntat i valentia que has demostrat. Gràcies Ramon pel teu esperit crític, per ensenyar-me a qüestionar-me les coses, per fer de germà gran... i per ser l'únic a casa amb qui es pot mirar un partit de futbol! Gràcies Cris, ets la que més lluny està i amb la qui més propera em sento, gràcies per mimar-me tant, per mostrar-te tan orgullosa de mi, per ser tan dolça, per ser una segona mare quan ha calgut. Gràcies per donar-nos a l'Oriana, la nena més maca i divertida del món, a la que estimo amb bogeria des del primer segon que la vaig veure. Gràcies Papa per ser un tros de pa, per tenir tanta paciència, per ser tan alegre i tan desastre, i sobretot per estimar-nos de manera incondicional. Em tranquil·litza molt saber que sempre que et necessiti et tindrè, i sempre que tu em necessitis m'ho diràs. Mama, por fin dejo de ser becaria! Una de las cosas más tristes de acabar esta tesis es que tu no estés para verlo, tú que estabas tan orgullosa de mi carrera, de mi trabajo, y lo que más importa, de mi forma de ser. No me voy a quejar de lo que echo de menos, sino a darte las gracias por el tiempo que me lo pudiste dar. Muchas veces me elogian mi vitalidad, mi determinación, mi tesón, y sé que todo eso lo heredé de ti. Esta tesis te la dedico a ti.

LLISTAT D'ABREVIATURES

A β , pèptid β amiloide, de l'anglès *Amyloid β*

AINE, Antiinflamatori no esteroïdal

AP-1, proteïna activadora 1, de l'anglès *Activator Protein-1*

APP, proteïna precursora del pèptid β amiloide, de l'anglès *Amyloid Precursor Protein*

BSA, albúmina sèrica bovina, de l'anglès *Bovine Serum Albumin*

C/EBP, de l'anglès *CCAAT/Enhancer Binding Protein*

Ch, crisina, de l'anglès *Chrysin*

CSF, factor estimulador de colònies, de l'anglès *Colony Stimulating Factor*

COX-2, Ciclooxygenasa 2

CREB, de l'anglès *cAMP Response Element Binding protein*

DAB, Diaminobenzidina

DIV, Dies *in vitro*

DMEM, de l'anglès *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO, Dimetilsulfòxid

EAE, Encefalitis Autoimmune Experimental

EDTA, àcid etilendiaminotetraacètic

ELA, Esclerosi Lateral Amiotròfica

ELISA, assaig immunològic lligat a enzim, de l'anglès *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK, de l'anglès *Extracellular signal-Regulated Kinase*

FBS, sèrum fetal boví, de l'anglès *Foetal Bovine Serum*

GABA, àcid gamma amino butíric, de l'anglès *Gamma Amino Butiric Acid*

GFAP, proteïna àcida fibril·lar glial, de l'anglès *Glial Fibrillary Acidic Protein*

HEPES, àcid 4-(2-hidroxietil)-1piperacinaetàsulfònic

IFN- γ , Interferó gamma

Ig, Immunoglobulina

IL, Interleucina

iNOS, sintasa induïble d'òxid nítric, de l'angles *inducible Nitric Oxide Synthase*

IRAK, de l'anglès *IL-1R Associated Kinase*

JAK, de l'anglès Janus Kinase

JNK, de l'anglès *c-Jun N-terminal Kinase*

LAP, de l'anglès *Liver-enriched Activating Protein*

LIP de l'anglès *Liver-enriched Inhibitory Protein*

LPS Lipopolisacàrid

MAP2 proteïna associada a microtúbuls, de l'anglès *Microtubule-Associated Protein 2*

MAPK, de l'anglès *Mitogen Activated Protein Kinase*

MEK, cinasa de la ERK cinasa

MHC, complex major d'histocompatibilitat, de l'anglès *Major Histocompatibility Complex*

NADPH oxidasa, enzim donador d'electrons del dinucleòtid de nicotinamida i d'adenina

NF-κB, de l'anglès *Nuclear Factor-κ B*

NO, òxid nítric, de l'anglès *Nitric Oxide*

OPC, cèl·lula precursora d'oligodendròcits, de l'anglès *Oligodendrocyte Precursor Cell*

PBS, tampó fosfat salí, de l'anglès *Phosphate Buffered Saline*

PFA, Paraformaldehid

PG, Prostaglandina

PPAR, de l'anglès *Peroxisome Proliferator Agonist Receptors*

PRR, receptors de reconeixement de patró, de l'anglès *Pattern Recognition Receptors*

PS, Presenilina

ROS, espècies reactives d'oxigen, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*

SNC, Sistema Nerviós Central

SOD-1, Superòxid Dismutasa 1

STAT, de l'anglès *Signal Transducers and Activators of Transcription*

TBS, tampó Tris Salí, de l'anglès *Tris Buffered Saline*

TGF- β , factor de creixement transformador β , de l'anglès *Transforming Growth Factor- β*

TLR, de l'anglès *Toll-Like Receptors*

TNF- α , factor de necrosi tumoral α , de l'anglès *Tumor Necrosis Factor- α*

TNFR, receptor del factor de necrosi tumoral, de l'anglès *Tumor Necrosis Factor Receptor*

TREM-2, de l'anglès *Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells*

TRAF, de l'anglès *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor*

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Les cèl·lules glials al sistema nerviós central	3
1.1.1 Oligodendròcits	3
1.1.2 Astròcits	5
1.1.3 Micròglia	9
1.2 La comunicació entre neurones i micròglia	16
1.2.1 Senyalització mitjançant neurotransmissors	17
1.2.2 Senyalització mitjançant pèptids	20
1.2.3 Senyalització mitjançant contacte	20
1.3 L'activació microglial	22
1.3.1 Rol de l'activació microglial en les malalties neurodegeneratives	22
1.3.2 L'activació microglial: característiques i molècules implicades	28
1.3.3 Mediadors implicats en la neurotoxicitat	35
1.3.4 Factors de transcripció que regulen l'activació microglial	37
1.3.5 La resposta microglial a la mort neuronal	43
1.4 Estratègies per inhibir l'activació glial, utilitat terapèutica	47
1.4.1 Prevenició de l'activació glial	47
1.4.2 Inhibició de l'activació glial	49
2. OBJECTIUS	53
3. MATERIALS I MÈTODES	57
3.1 Cultius	59
3.1.1 Plaques i flascons de cultius	59
3.1.2 Cultiu de la línia cel·lular de micròglia murina BV2	59
3.1.3 Cultius cel·lulars primaris de glia	62
3.1.4 Cultiu de neurones corticals de ratolí	65
3.1.5 Cocultius	69
3.1.6 Tractaments	71
3.2 Immunocitoquímica	75
3.2.1 Anticossos i altres reactius	75
3.2.2 Procediment	76

3.3 Tincions	79
3.3.1 Hoechst 33258 (bisbenzimidida)	79
3.3.2 Hematoxilina	79
3.4 PCR en temps real	81
3.5 Western blot	85
3.5.1 Anticossos i altres reactius	85
3.5.2 Procediment	86
3.6 Assaig d'unió de factors de transcripció al DNA	95
3.7 Assaig d'ELISA de TNF- α i IL-6	101
3.7.1 Assaig d'ELISA de TNF- α	101
3.7.2 Assaig d'ELISA de IL-6	102
3.8 Determinació de nitrit	105
3.9 Tècniques d'avaluació de mort cel·lular	106
3.9.1 Tinció amb iodur de propidi	106
3.9.2 ELISA MAP2-ABTS	106
3.10 Tractament estadístic de les dades	108
4. RESULTATS	109
4.1 Posta a punt i caracterització del model de neurotoxicitat mediada per activació glial	111
4.2 Inhibició de C/EBPs: efectes antiinflamatoris i neuroprotectors	133
4.3 Regulació de CD200 i modulació de la senyalització CD200-CD200R	153
5. DISCUSSIÓ GENERAL	167
6. CONCLUSIONS	177
7. BIBLIOGRAFIA	181

1. INTRODUCCIÓ

1.1 LES CÈL·LULES GLIALS AL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Les cèl·lules glials constitueixen el 90% de les cèl·lules del sistema nerviós central (SNC). El terme glia engloba principalment a 3 tipus cel·lulars: els astròcits i oligodendròcits (també anomenats macròglia), d'origen neuroectodèrmic, i la micròglia, d'origen mesodèrmic. Virchow va descriure per primera vegada l'any 1856 la presència al SNC d'un teixit conjuntiu que embolcallava als components nerviosos al que va anomenar neuròglia, terme que deriva de la paraula grec "gliok" i que vol dir ciment o cola d'enganxar. A principis del segle XX, gràcies a la tinció de plata desenvolupada per Golgi i als treballs de Ramón y Cajal i Del Rio Hortega es van descriure tres dels elements cel·lulars que componen la glia: els astròcits, els oligodendròcits i la micròglia. L'estudi del SNC s'ha centrat durant molts anys en les neurones, donada la seva excitabilitat i el seu paper en la transmissió nerviosa, mentre que a les cèl·lules de la glia se'ls va atribuir un paper secundari de suport a la funció neuronal. En els últims anys però s'han realitzat diversos descobriments que han donat una major rellevància al paper d'aquestes cèl·lules. Tot seguit es descriuran les característiques dels principals tipus de cèl·lules glials, centrant-me sobretot en la micròglia, donat que l'objectiu d'aquesta tesi és estudiar l'activació microglial i com modular-la.

1.1.1 OLIGODENDRÒCITS

Característiques i classificació

Els oligodendròcits són les cèl·lules encarregades de constituir les beïnes de mielina que envolten axons al SNC (Butt, 2005). Van ser descrites per primera vegada per Del Rio-Hortega al 1928, qui els va classificar en 4 grups (I-IV) segons el número de processos, la mida de les fibres que mielinitzen i la seva distribució al SNC (Del Rio-Hortega, 1928) com s'indica a la taula 1. Aquests grups presenten diferències entre si tant a nivell funcional com morfològic (volum i composició de la mielina que sintetitzen o número d'axons que envolten).

Característica	Tipus I	Tipus II	Tipus III	Tipus IV
Número de processos	4 o +	4 o +	1 o +	cap
Localització al SNC	Prosencèfal, cerebel i medul·la espinal	Substància blanca	Peduncles, medul·la oblongata i medul·la espinal	Sortida de les fibres nervioses del SNC
Morfologia	----	----	Cos cel·lular allargat	Cos cel·lular allargat
Axons que envolten	10-30 axons <2 µm	10-30 axons <2 µm	<5 axons 4-15 µm	1 axó amb molt gruix

Taula 1. Classificació dels oligodendròcits (adaptat de Butt, 2005)

Origen

Els oligodendròcits s'originen a partir de poblacions de cèl·lules precursors provinents de diverses regions del neuroectoderm, però a nivell cel·lular podem parlar d'un únic patró de desenvolupament, tal com il·lustra la figura 1. Els progenitors perinatals són cèl·lules precursors d'oligodendròcits (OPCs, de l'anglès *oligodendrocyte precursor cells*); aquestes cèl·lules es caracteritzen per l'expressió del proteoglicà de membrana NG2. Alguns OPCs resten indiferenciats en el cervell adult, per produir nous oligodendròcits quan sigui necessari, la resta migren a

les regions que esdevindran substància blanca i es diferencien a oligodendròcits immadurs, que encara no tenen la capacitat de formar mielina. Aquests finalment esdevindran oligodendròcits madurs, capaços de produir mielina i que expressen marcadors com MBP (de l'anglès *myelin basic protein*), PLP (de l'anglès *proteolipid protein*) i MOG (de l'anglès *myelin oligodendrocyte glycoprotein*). En el procés de

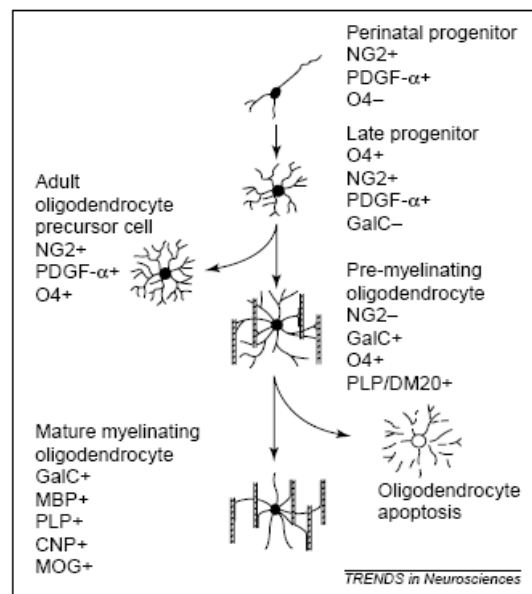


Figura 1. Procés de diferenciació dels oligodendròcits. Levin i cols. 2001

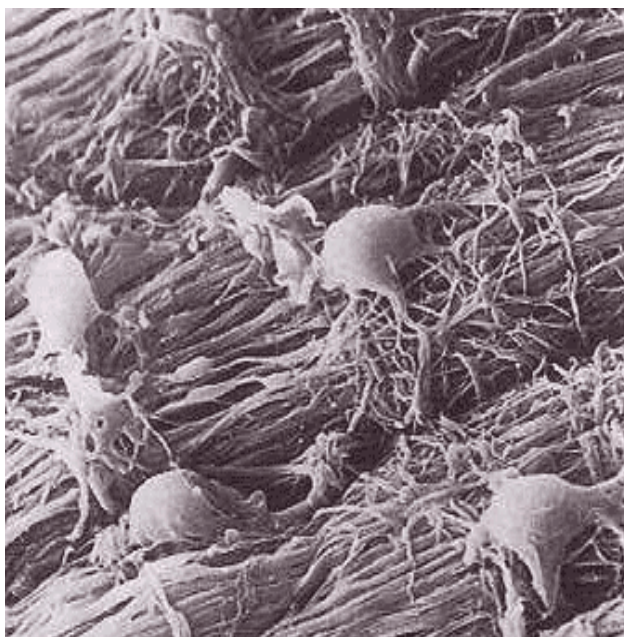


Figura 2. Oligodendròcits mielinitzant els axons. Plana web Neurophilosophy

diferenciació d'OPCs a oligodendròcits madurs hi juga un paper molt important la comunicació entre l'oligodendròcit i l'axó que acabarà mielinitzant (Bradl i Lassmann, 2010).

Funcions

La principal funció dels oligodendròcits és la formació de la coberta de mielina (veure figura 2). Aquesta és de gran importància, ja que permet la transmissió eficient de l'impuls nerviós al llarg de l'axó, i n'incrementa la velocitat de

transmissió. La manca d'una correcta mielinització comporta l'aparició de diverses malalties al SNC, com es descriurà més endavant en aquest apartat. La mielinització és un procés altament regulat, que necessita una comunicació entre axons i oligodendròcits. Se sap que el polimorfisme dels oligodendròcits (tipus I-IV) determina les funcions dels axons que mielinitza; d'altra banda, una alta activitat elèctrica de l'axó indueix una major mielinització (Bradl i Lassmann, 2010). Un sol oligodendròcit pot mielinitzar diversos axons, però la mielinització de tots ells no té perquè iniciar-se al mateix moment. Hi ha diverses proteïnes implicades en aquest procés, que generalment són proteïnes de superfície que regulen el contacte entre axons i oligodendròcits (Miller i Mi, 2007).

Els oligodendròcits en la patologia del SNC

Els oligodendròcits són unes de les cèl·lules del SNC més sensibles al dany mediat per estrès oxidatiu (Ness i cols. 2005), donat que tenen una taxa metabòlica molt alta, i per tant generen molts radicals lliures que han de ser metabolitzats. També contenen grans quantitats de ferro, que pot reaccionar amb el peròxid d'hidrogen, alliberant radicals lliures d'oxigen que indueixen la peroxidació dels lípids. A més, tenen una baixa concentració de glutatió, un pèptid amb propietats antioxidants (Bradl i Lassmann, 2010). És per això que la pèrdua d'oligodendròcits i mielina és un factor comú a diverses patologies del SNC que cursen amb neuroinflamació. Una de les patologies on els oligodendròcits i la manca de mielina juguen un paper més important és l'esclerosi múltiple. Es postula que aquesta és una patologia autoimmunitària, ja que els pacients tenen cèl·lules T CD4+ circulants reactives a la mielina. Aquestes cèl·lules medien una reacció inflamatòria, que cursa amb infiltració de macròfags al SNC i alliberament de citocines, que acaben degradant la mielina (Korn, 2008).

1.1.2 ASTRÒCITS

Característiques i classificació

El terme astròcit va ser encunyat per Lenhossek al 1895, i fa referència a la morfologia estrellada que presenten aquestes cèl·lules (Matyash i Kettenmann, 2010). Els astròcits són una població molt heterogènia de cèl·lules, amb diferents característiques i propietats. Tot i això els astròcits *in vivo* es poden classificar en dos grans grups segons la seva morfologia i localització: els *astròcits protoplàsmics*, que es troben a la substància blanca i presenten una morfologia globosa, amb diversos processos primers, i els *astròcits fibrosos*, presents a la substància grisa i de morfologia més allargada, amb processos més llargs i robustos. Aquesta classificació va ser establerta per Ramón y Cajal (1911), i segueix usant-se avui en dia, tot i que s'han descrit altres tipus

d'astròcits com la glia radial, present només al SNC en desenvolupament, les cèl·lules de Müller, que es troben a la retina, la glia de Bergmann, present només al cerebel, i els tanicits, que es troben als ventricles i presenten característiques típiques d'astròcits i de glia radial. Els astròcits de les diferents subpoblacions poden diferir en el potencial de membrana, l'expressió de receptors per a neurotransmissors, l'acoblament per *gap junctions* o la senyalització per calci (Matyash i Kettenmann, 2010).

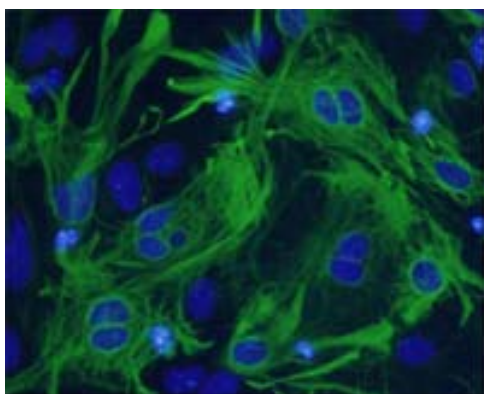


Figura 3. Astròcits en cultiu, marcats amb GFAP en verd. Plana web de Cosmo Bio Co Ltd.

Una conseqüència d'aquesta heterogeneïtat és la varietat de marcadors que expressen les diferents subpoblacions i la dificultat per trobar-ne un que sigui comú a totes les poblacions i marqui únicament l'astroglia. Clàssicament s'ha utilitzat com a marcador d'astròcits la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP, de l'anglès *glial fibrillary acidic protein*), una proteïna de filaments intermedis. Aquest marcador però no és present a tots els astròcits; a més, hi ha cèl·lules no astroglials

que sí l'expressen (Sofroniew i Vinters, 2010). Tot i això, la GFAP és avui en dia el que més s'aproxima a un marcador universal d'astròcits (per a imatge, veure figura 3).

Origen

Els astròcits tenen un origen neuroectodèrmic. El procés de formació d'astròcits madurs és complex, i pot variar molt en funció de l'àrea del SNC i de la subpoblació d'astròcits. Un dels mecanismes més ben estudiats és el de la maduració d'astròcits a partir de la glia radial. De fet, aquestes són les primeres cèl·lules del llinatge astroglial en formar-se; durant el desenvolupament del SNC les seves prolongacions ajuden als neuroblastes a migrar; després retreen les seves prolongacions i es diferencien en astròcits madurs.

Funcions

Els astròcits s'han considerat clàssicament com les cèl·lules encarregades de mantenir l'homeòstasi del SNC per tal de facilitar la funció neuronal, realitzant funcions com per exemple tamponar l'excés de potassi i neurotransmissors, proveir nutrients i suport estructural a les sinapsis i contribuir a la integritat de la barrera hematoencefàlica (Wang i Bordey, 2008). En els últims anys però, se'ls ha atribuït un paper en el control de la sinapsi neuronal, participant en el que es coneix com sinapsi tripartida (Parpura i cols. 1994; Araque i cols. 1999); quina és la importància real dels astròcits en aquest

procés és encara motiu de controvèrsia. Per últim també cal destacar la importància de l'activació dels astròcits en processos inflamatoris, on la comunicació astròcit-micròglia participa en el procés neuroinflamatori. Vegem amb més detall algunes de les principals funcions dels astròcits en condicions no patològiques.

Manteniment de la homeòstasi

Els astròcits expressen transportadors de glutamat, àcid γ amino butíric, (GABA, de l'anglès *Gamma Amino Butiric Acid*) o glicina, recaptant-ne els excessos en la sinapsi neuronal. A més, recapten el potassi del medi extracel·lular per evitar canvis bruscos en la concentració d'aquest ió, que podrien afectar la transmissió sinàptica. També participen en el manteniment del pH mitjançant els transportadors de bicarbonat, bombes sodi/potassi o la bomba de protons/ATP (Sofroniew i Vinters, 2010).

Metabolisme energètic

A les neurones, degut a la seva especialització per a la transmissió nerviosa, els manquen moltes de les vies metabòliques necessàries pel manteniment del seu elevat consum energètic. Els astròcits supleixen aquestes mancances proveint a les neurones de nutrients i precursors energètics. Per exemple, la glucosa provinent dels vasos sanguínies pot passar directament a les neurones, emmagatzemar-se als astròcits com a glicogen o ser metabolitzada pels astròcits fins formar lactat que s'allibera al medi per a que el captin les neurones (Wang i Bordey, 2008).

Manteniment de la barrera hematoencefàlica

La barrera hematoencefàlica és una estructura selectiva que impedeix el pas de diverses molècules al SNC. Està formada per les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, els perícits i els astròcits (Zlokovic, 2008). Es creu que els astròcits estan implicats en la formació i especialització de la barrera, i regulen la seva permeabilitat (Haseloff i cols. 2005; Abbott i cols. 2006).

Regulació del flux sanguini

Els astròcits emeten prolongacions cap als vasos sanguinis, i secreten molècules com prostaglandines, òxid nítric (NO, de l'anglès *nitric oxide*) o àcid araquidònic que regulen el flux sanguini i el diàmetre dels vasos. Donat que els astròcits també estan en estret contacte amb les sinapsis neuronals, poden regular el flux sanguini en funció de l'activitat sinàptica (Wolf i Kirchhoff, 2008).

Regulació de l'activitat sinàptica

L'activitat sinàptica pot induir una excitabilitat en els astròcits. Com il·lustra la figura 4, l'alliberació de neurotransmissors a l'espai sinàptic indueix una pujada del calci intracel·lular als astròcits; aquest increment dels nivells intracel·lulars de calci indueix la secreció per part de l'astròcit de transmissors com el GABA, l'adenosina i el glutamat a l'espai sinàptic, que poden regular la comunicació entre les neurones pre i postsinàptica (Cornell-Bell i cols. 1990; Nedergaad,1994; Parpura i cols. 1994). Aquesta afirmació, basada en descobriments duts a terme a principis dels anys 90, ha portat a parlar del concepte de sinapsi tripartida (Araque i cols. 1999), una teoria que

postula una participació activa de l'astròcit en la sinapsi neuronal, i una comunicació entre astròcits i neurones que es produiria mitjançant neurotransmissors i gliotransmissors.

Segons aquesta teoria, no només les neurones poden modular l'activitat dels astròcits, sinó que l'activació dels astròcits pot influir en la comunicació entre neurones. Aquest nou concepte trenca amb la visió "neurocèntrica" del SNC i ha despertat una gran controvèrsia que està encara lluny de ser resolta (Hamilton i Attwell, 2010).

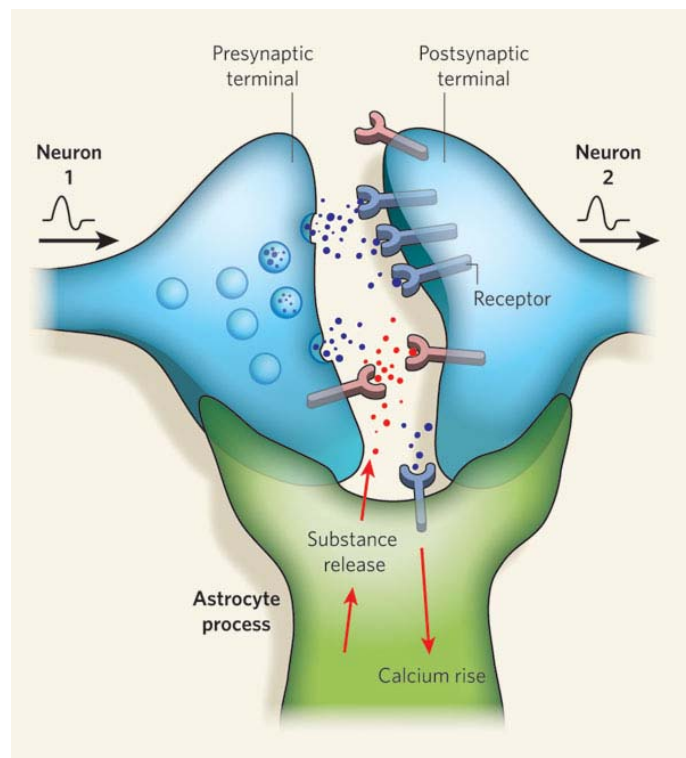


Figura 4. Esquema de la sinapsi tripartida. Allen i Barres, 2009

L'activació astroglià

Es coneix com a astrogliosi reactiva el conjunt de canvis en la morfologia cel·lular i l'expressió molecular que pateixen els astròcits en resposta a alteracions o danys al SNC. D'una banda poden produir i alliberar mediadors inflamatoris com el NO, el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α , de l'anglès *tumor necrosis factor- α*), o les interleucines (ILs) entre d'altres, que poden ajudar a la micròglia activada a eliminar el dany desencadenant de la resposta. D'altra banda, alliberen factors tròfics i neuroprotectors per tal d'ajudar les neurones a recuperar-se del dany produït, evitant que la mort

neuronal sigui major. En alguns casos també es produeixen canvis en la proliferació cel·lular, per omplir l'espai deixat per les neurones mortes, el que dona lloc a la formació de la cicatriu glial. Aquesta cicatriu té un efecte beneficiós ja que conté la inflamació al lloc on s'ha produït el dany, evitant la propagació del dany (Sofroniew, 2009). En l'astrogliosi és molt important la comunicació entre els astròcits i la resta de cèl·lules del SNC, en especial la micròglia.

Els astròcits en la patologia del SNC

Com ja s'ha descrit en aquest apartat els astròcits estan implicats en una àmplia varietat de processos al SNC i, per tant, juguen un paper en la majoria de patologies del SNC. S'ha descrit una implicació dels astròcits en la malaltia d'Alzheimer, havent-se descrit la presència d'astròcits reactius al voltant dels agregats de pèptid β amiloide ($A\beta$) a les plaques senils (Thal i cols. 2000). A l'esclerosi múltiple hi ha autors que postulen que la presència d'astròcits és perniciosa, ja que secreten factors proinflamatoris tòxics per a oligodendròcits i neurones, i formen la cicatriu glial que impedeix la regeneració axonal. Altres autors en canvi defensen que els astròcits creen un microambient favorable per a la remielinització (revisat a Williams i cols. 2007). Una de les patologies on es coneix més el paper dels astròcits és en el traumatisme de la medul·la espinal, on els astròcits formen una cicatriu glial. Aquesta té un efecte beneficiós al impedir que la inflamació i els factors alliberats (potencialment neurotòxics) difonguin més enllà del lloc on s'ha produït el dany neuronal, però té com a conseqüència la inhibició del creixement axonal i la seva regeneració (Silver i Miller, 2004). Els astròcits també estan implicats en la isquèmia cerebral, ja que regulen el flux sanguini, poden suplir la manca de glucosa sintetitzant-ne a partir dels dipòsits de glicogen i són capaços de metabolitzar les espècies reactives d'oxigen, el glutamat i altres metabòlits que s'alliberen com a conseqüència de la deprivació d'oxigen. Els astròcits també poden constituir tumors; els astrogliomes són els tumors intracranials més comuns i uns dels més letals (Furnari i cols. 2007)

1.1.3 MICRÒGLIA

Característiques i classificació

La micròglia va ser descrita per primera vegada per Pio del Rio Hortega (del Rio Hortega, 1919), qui la va anomenar "el tercer element" (per distingir-la de les neurones i els astròcits) i va estudiar-ne per primera vegada la morfologia i el procés d'activació. Les cèl·lules de la micròglia constitueixen el sistema immunitari resident del SNC, sent la seva funció principal rastrejar el medi i respondre davant de patògens o alteracions

al parènquima nerviós. Degut a la seva funció, són cèl·lules amb una alta capacitat de migrar, proliferar i fagocitar; a més, poden presentar antígens i produir mediadors pro o antiinflamatoris (Hanisch, 2002; Haas i cols. 2008) tal com s'il·lustra la figura 5.

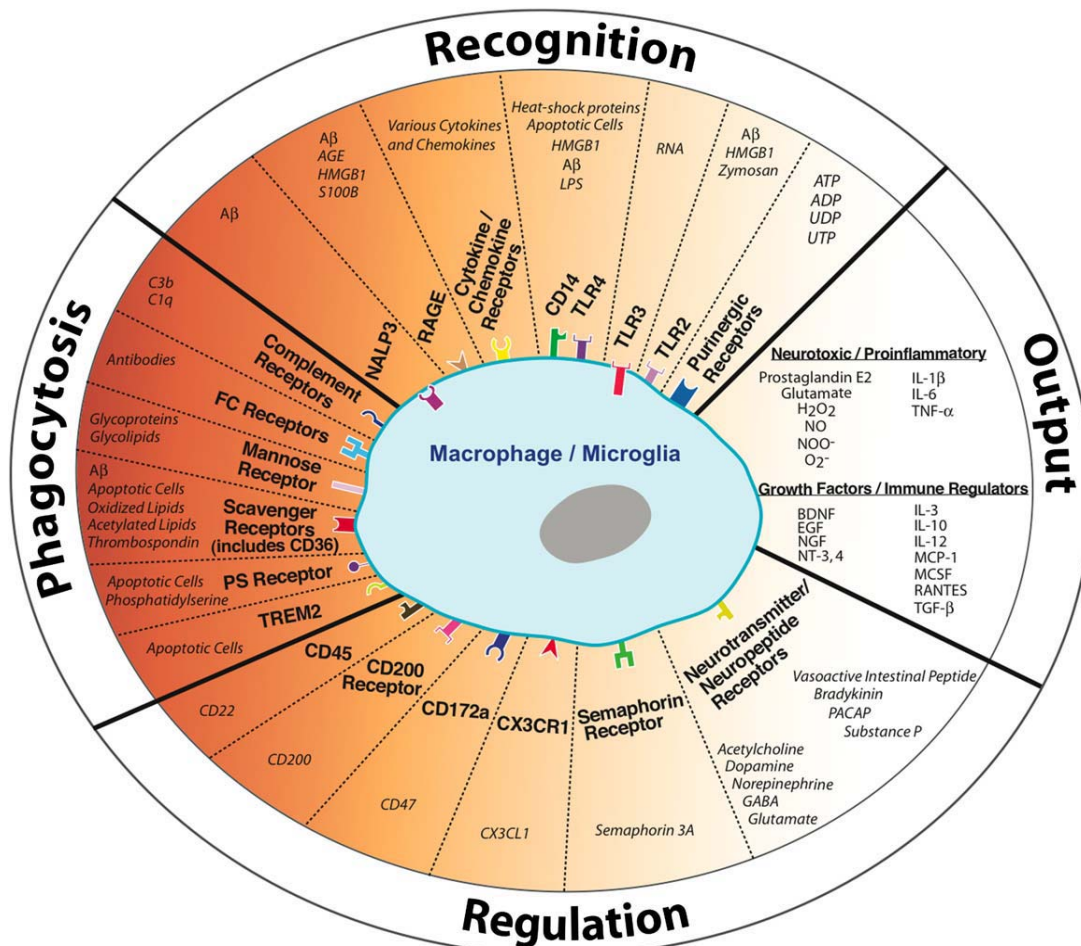





Figura 5. Funcions de la micròglia i proteïnes implicades en elles.
Lucin i Wyss-Coray, 2009

L'activació de la micròglia és un procés que implica un canvi fenotípic, tant a nivell de morfologia com de síntesi de molècules. Clàssicament es parla de 3 estats d'activació: la micròglia quiescent, la micròglia activada i la micròglia ameboide. La *micròglia quiescent* correspon a l'estat basal de la micròglia i presenta una morfologia ramificada, emetent prolongacions per rastrejar el parènquima. Per això se l'ha rebatejat com micròglia rastrejadora (Hanish i Kettenmann, 2007). La *micròglia activada* és el fenotip de resposta a un estímul, ja sigui pro o antiinflamatori, que es caracteritza per la presència de ramificacions més engruixides i curtes, i la secreció de factors com quimiocines i citocines. La *micròglia ameboide* té una morfologia arrodonida, sense prolongacions, i s'encarrega de fagocitar (Streit, 2002; Kim i de Vellis, 2005). La taula 2 indica l'expressió diferencial de diversos marcadors en

aquests tres fenotips. Cal tenir clar però que aquesta classificació no és estanca, i que, per exemple, la micròglia activada també pot fagocitar. A més, una cèl·lula pot passar d'un estadi d'activació a l'altre (Schwartz i cols. 2006; Hanish i Kettenmann, 2007).

			
	Quiescent	Activada	Fagocítica
Proliferació	-/+	+	+
Marcadors de macròfags (CD68)	-	-/+	-/+
CD11b (CR3 del complement) +		+	+
MHC classe II	-/+	+	+
CD4	-/+	+	+
CD8	-	-/+	+

Taula 2. Característiques fenotípiques dels diferents estadis de la micròglia. Adaptat de Streit, 2005.

Com a cèl·lula immunitària, la micròglia expressa marcadors com proteïnes del complex major d'histocompatibilitat II (MHC, de l'anglès *major histocompatibility complex* II) i receptors del complement, que permeten marcar-les de forma específica per diferenciar-les de la resta de cèl·lules gials i neuronals. Alguns dels marcadors més utilitzats són el CD11b, component del receptor del complement CR3, l'Iba-1, una proteïna de senyalització de membrana (figura 6), o determinades lectines, que marquen les glicoproteïnes de membrana, tot i que aquestes últimes són menys

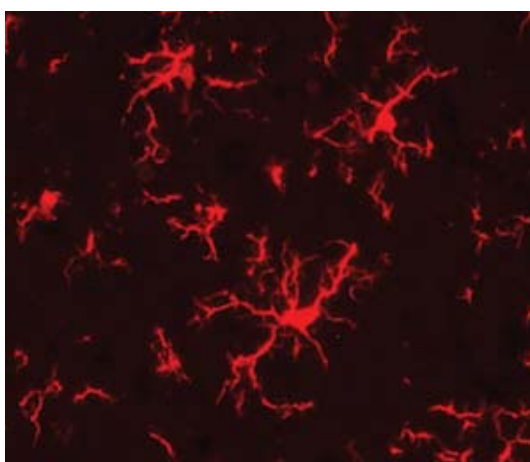


Figura 6. Morfologia de la micròglia in vivo marcada amb anticòs anti-Iba-1. Plana web de Biocare medical.

específiques (Streit, 2005). La micròglia però, no és una població homogènia de cèl·lules, el seu fenotip depèn molt del microambient on es trobi, com demostra el fet que micròglia de diferents àrees cerebrals expressa diferents nivells de determinats marcadors de superfície; és el cas del CD11b, la fractalcina (CXCR3) o la molècula de senyalització neurona-micròglia TREM-2 (de l'anglès *triggering receptor expressed in myeloid cells*) (Schmid i cols.

2002; Haas i cols. 2008). A més, hi ha diferències a nivell de morfologia cel·lular i densitat (Lawson i cols. 1990).

Un inconvenient a l'hora de caracteritzar la micròglia és la manca d'un marcador específic que permeti diferenciar-la dels macròfags infiltrants (Carson i cols. 2007). Una estratègia que es pot utilitzar és la relació CD11b/CD45, ja que estudis realitzats amb citometria de flux demostren que els macròfags expressen majors nivells de CD45. Es poden així diferenciar dues poblacions: CD11b+/CD45 baix, corresponent a la micròglia resident, i CD11b+/CD45 alt, corresponent als macròfags infiltrants (Ford et al. 1995).

Origen

La micròglia és l'única cèl·lula glial que no deriva del neuroectoderm sinó del mesoderm, ja que pertany al llinatge mielomonocític. El seu origen ha aixecat força controvèrsia, i encara avui no està clar quin és la provinença exacta de les cèl·lules microglijals. Durant els primers estadis del desenvolupament embrionari es produeix una entrada al sistema nerviós de precursors d'origen mesodèrmic. Aquestes cèl·lules arriben al sistema nerviós per vies extravasculares, i s'acumulen en llocs concrets del SNC formant les anomenades fonts de micròglia, des d'on migren a la resta del parènquima nerviós, diferenciant-se progressivament de precursors a cèl·lules microglijals madures (Streit, 2005). Un estudi recent postula que els precursors mesodèrmics que colonitzen el SNC són precursors de macròfags que provenen del sac vitel·lí (Ginhoux i cols. 2010). En estadis perinatals es produeix un increment considerable en la població de cèl·lules microglijals. Clàssicament s'ha considerat que aquest increment és degut a l'entrada de precursors microglijals a través dels vasos sanguinis (Ling i Wong, 1993), però recentment hi ha autors que postulen que és degut a la proliferació de la micròglia ja existent al SNC (Ransohoff i Cardona, 2010). A l'adult, en condicions basals la micròglia té capacitat per autorenovar-se. En situacions patològiques, la població de la micròglia augmenta, en part degut a la proliferació de la micròglia resident, en part per l'entrada de cèl·lules mieloides perivasculares. Cal tenir en compte que en condicions no patològiques la contribució de les cèl·lules sanguínies a la població microglijal és insignificant (Ajami i cols. 2007).

Funcions

Les cèl·lules de la micròglia són el sistema immunitari resident del SNC, la seva principal funció per tant és rastrejar el medi i activar-se en presència de patògens per tal d'eliminar-los (veure figura 5). Una reacció inflamatòria de la magnitud de la que es dona a nivell sistèmic podria causar danys irreparables al parènquima nerviós per diverses raons (Lucas i cols.2006; Lehnardt, 2010). D'una banda, la inflamació sistèmica comporta l'acumulació de líquid i l'increment de volum de la zona danyada, el SNC però es troba en un compartiment estanc i un petit increment de mida podria resultar fatal. A més, els factors proinflamatoris alliberats en aquesta resposta poden tenir efecte tòxic sobre les neurones, un dany irreparable donat que pràcticament no existeix neurogènesi a l'adult. Per això l'entrada de monòcits i leucòcits circulants està altament regulada mitjançant la barrera hematoencefàlica, i és la micròglia qui

Abbreviation	Full name
GRO α	growth regulated oncogene α
IL-1 α /IL-1 β	interleukin-1 α /1 β
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-3	interleukin-3
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
IL-12	interleukin-12
IL-15	interleukin-15
IL-18	interleukin-18, also interferon- γ inducing factor (IGIF)
IP-10	gamma interferon inducible protein-10
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MDC	macrophage derived chemokine
MIP-1 α /MIP-1 β	macrophage inflammatory protein-1 α /1 β
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
MIP-3 β	macrophage inflammatory protein-3 β
TGF β	transforming growth factor
TNF α	tumor necrosis factor α
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

Taula 3 Citocines i quimiocines secretades per la micròglia. Hanisch, 2002.

s'encarrega principalment del control immunitari del SNC. Hi ha autors que defensen que la magnitud de la resposta inflamatòria que pot induir la micròglia (com la síntesi de citocines i quimiocines o la presentació d'antígens) és molt inferior a la de les cèl·lules immunitàries circulants (Streit, 2002). Altres autors en canvi postulen el contrari, ja que les concentracions d'alguns marcadors proinflamatoris són majors a processos inflamatoris que es donen al SNC que a processos inflamatoris sistèmics (McGeer i McGeer, 2003). En qualsevol cas, sigui quin sigui el "potencial inflamatori" de la micròglia, cal tenir en compte que l'activació microglial està sota la regulació de factors inhibidors propis del SNC (Neumann, 2001). Tot i això, la micròglia al activar-se pot secretar una gran varietat de citocines, tant proinflamatòries com antiinflamatòries, i quimiocines, que poden atraure cèl·lules perivasculars a envair el parènquima, tal com s'indica a la taula 3.

Degut a què el rol de la micròglia s'ha estudiat més àmpliament en la patologia, clàssicament es té la idea que la micròglia està quiescent en el SNC sa, i és en resposta a un dany quan s'activa i comença a desenvolupar la seva funció immunitària. Treballs recents realitzats *in vivo* mitjançant microscòpia de dos fotons (Davalos i cols. 2005; Nimmerjahn i cols. 2005) han demostrat que la micròglia actua com a sensor en tot moment i no només quan rep una senyal d'alerta, estenent processos cap al parènquima de forma molt dinàmica; per això ara es tendeix a parlar de la micròglia no activada com a "rastrejadora" en comptes de quiescent (Hanisch i Kettenmann, 2007).

La micròglia no només rastreja el parènquima buscant cossos estranys, també controla l'activitat de les altres cèl·lules del SNC; està àmpliament demostrat que senyals emeses per astròcits o neurones poden activar la micròglia tant en un fenotip proinflamatori com antiinflamatori (Neumann, 2001; Ovanesov i cols. 2008; Graeber i Streit, 2010). Els astròcits poden modular la magnitud de l'activació microglial regulant

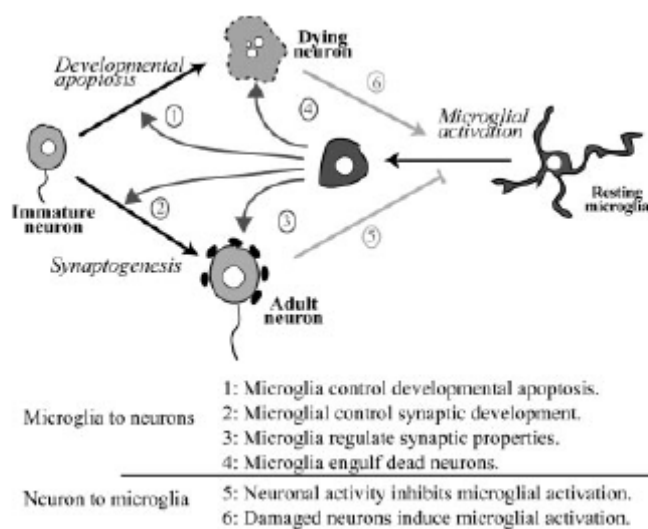


Figura 7. Comunicació neurona-micròglia. Regulació de l'activitat neuronal per la micròglia i viceversa. Bessis i cols. 2007

l'activació de vies de senyalització implicades en la resposta inflamatòria, regulant així la producció de mediadors proinflamatoris com el NO (Solà i cols. 2002; Tichauer i cols. 2007). Pel que fa a la regulació de l'activació microglial per part de les neurones (veure figura 7), cal tenir en compte que la micròglia expressa una gran varietat de receptors per a neurotransmissors, l'activació dels quals modula la seva activació (Pocock i Kettenmann, 2007). Així per exemple l'activació dels receptors ionotròpics de glutamat modula l'alliberament microglial de TNF- α (Hagino i cols. 2004), els receptors metabotròpics de glutamat poden decantar l'activació microglial cap a neurotoxicitat o neuroprotecció (Taylor i cols. 2003; Taylor i cols. 2005) i els receptors purinèrgics regulen la seva migració (Ohsawa i cols. 2007).

Les cèl·lules microglijals també juguen un paper en la transmissió nerviosa regulant les sinapsis, ja sigui en el SNC en desenvolupament, expressant molècules extracel·lulars que ajuden a la formació de sinapsis (Christopherson i cols. 2005) o en el cervell adult,

emeten processos cap a les sinapsis, regulant la freqüència d'aquests contactes en funció de l'activitat sinàptica (Wake i cols. 2009). La micròglia també juga un paper en la regulació de l'homeòstasi del glutamat, recaptant-lo del medi extracel·lular amb el transportador sodi dependent GLT-1. Tot i que aquest transportador es troba principalment en astròcits, la micròglia activada en models d'axotomia o d'estimulació amb lipopolisacàrid (LPS) també n'expressa (López-Redondo i cols. 2000; Persson i cols. 2005). Cal tenir en compte però, que el glutamat recaptat per la micròglia és al voltant d'un 10% del recaptat pels astròcits (Persson i cols. 2005).

En situacions de patologia com la isquèmia cerebral el contacte entre els processos microglials i les sinapsis es prolonguen més i acostumen a anar seguits per una desaparició de la sinapsis (Wake i cols. 2009). Això ha portat a proposar que la micròglia monitoritza el circuit nerviós del SNC, modulant la desaparició de sinapsis quan aquestes no s'han format correctament (Bessis i cols. 2007; Trapp i cols. 2007).

La micròglia en la patologia del SNC

La presència de micròglia reactiva s'ha descrit en pràcticament totes les malalties neurodegeneratives, com per exemple la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, la malaltia de Huntington, o l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Lobsiger i Cleveland, 2007; Farfara i cols. 2008). Hi ha una certa controvèrsia sobre si la presència de micròglia activada en aquestes patologies és beneficiosa o perjudicial ja que, si bé un procés inflamatori activat de forma controlada per un període curt de temps té un efecte positiu, en una inflamació exacerbada i cronificada els efectes nocius poden acabar sent més importants que els beneficiosos (Lucas i cols. 2006; Lehnardt, 2010).

1.2 LA COMUNICACIÓ ENTRE NEURONES I MICRÒGLIA

La micròglia i les neurones es comuniquen de forma constant tant en condicions fisiològiques com en la patologia. Les senyals implicades en aquesta comunicació es poden classificar en dos tipus: les senyals *on* i les senyals *off* (Biber i cols. 2007), com indica la figura 8. Les senyals *on* són molècules la presència de les quals activa la micròglia. En condicions fisiològiques no es troben al parènquima, o ho fan en baixes concentracions; exemples d'aquestes molècules serien el glutamat, purines, quimiocines o també cossos estranys com patògens o acumulacions de proteïnes intracel·lulars.

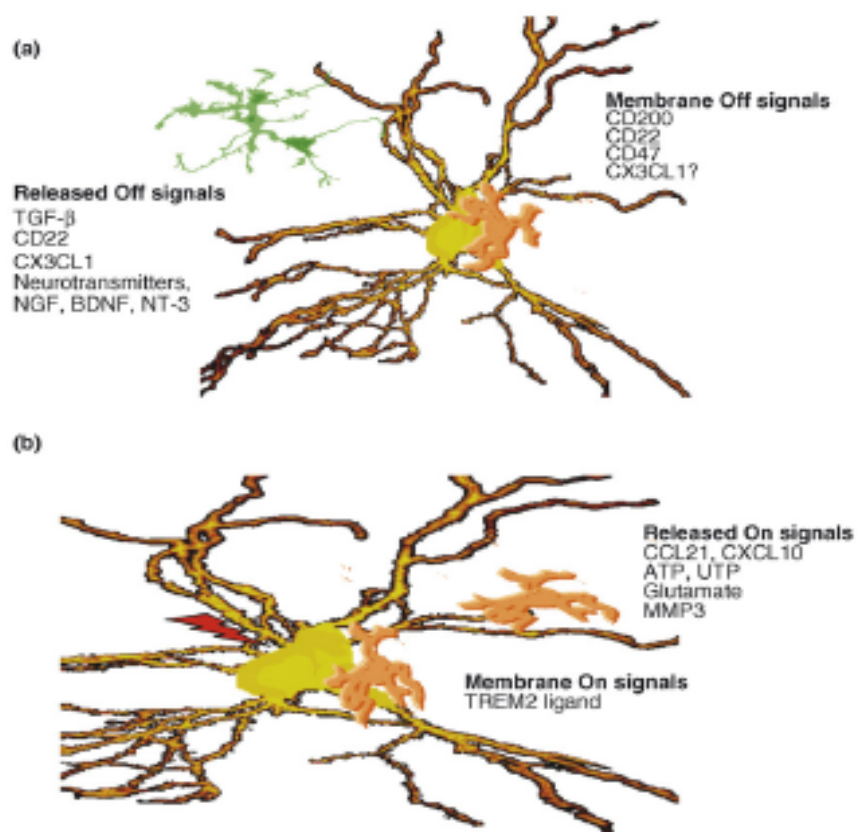


Figura 8. Senyals "Off" (a) i "On" expressades per les neurones. Biber i cols. 2007

Cal destacar que hi ha senyals *on*, com el LPS, que indueixen una activació amb fenotip proinflamatori mentre que d'altres, com la IL-4, indueixen una activació amb fenotip antiinflamatori (Butovsky i cols. 2005). Les senyals *off* s'expressen constitutivament, mantenint la micròglia en un estat no activat, creant un ambient immunodeprimit, que es coneix com a "immunoprivilegiat". La seva manca és el que indueix el fenotip proinflamatori a la micròglia. Aquestes senyals permeten a la micròglia respondre a danys "desconeguts", ja que no cal un receptor que reconegui cada dany concret, només la interrupció de la comunicació ja s'interpreta com a senyal de perill (Hanisch i Kettenmann, 2007). Dins d'aquesta categoria trobem molècules com les parelles lligand-receptor fractalcina-CX3CR1, CD47-SIRP α i CD200-CD200R. La comunicació entre neurones i micròglia, tant *on* com *off*, es pot donar mitjançant senyals solubles, com neurotransmissors o pèptids secretats per neurones que s'uneixen a receptors microglials, o contacte cèl·lula-cèl·lula (veure figura 9).

1.2.1 COMUNICACIÓ MITJANÇANT NEUROTRANSMISSORS

Els neurotransmissors, en ser alliberats a l'espai presinàptic poden difondre pel medi extracel·lular, estenent així la senyalització més enllà de la neurona postsinàptica. Les cèl·lules microglials presenten receptors per a pràcticament tots els neurotransmissors, el que els permet detectar els canvis en la concentració dels neurotransmissors que es donen a causa d'alteracions en l'activitat neuronal i respondre en conseqüència (Pocock i Kettenmann, 2007). Alguns neurotransmissors actuen com a senyals *off*, ja que es troben presents al medi en condicions basals i tenen un efecte inhibitor sobre la micròglia, i baixades en la seva concentració activen a la micròglia; altres neurotransmissors es comporten com a senyals *on*, activant la micròglia al augmentar la seva concentració al medi (Biber i cols. 2007).

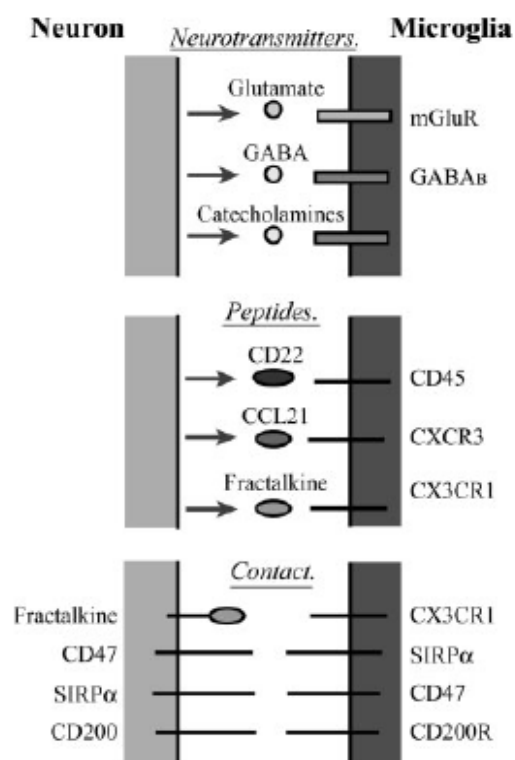


Figura 9. Vies de comunicació neurona-micròglia. Bessis i cols.2007

La majoria de neurotransmissors inhibeixen la producció microglial de citocines proinflamatòries (Bessis i cols. 2007). Alguns exemples d'aquest efecte són el GABA, que redueix la secreció microglial de diverses citocines en resposta al LPS (Kuhn i cols. 2004), la glicina, que inhibeix la secreció de citocines proinflamatòries i la capacitat fagocítica dels macròfags perivasculars (Schilling i Eder, 2004) i la noradrenalina, que en cèl·lules microgials estimulades amb LPS redueix l'alliberament de NO (Chang i Liu, 2000), TNF- α i IL-6 (Farber i cols. 2005).

Altres neuromoduladors s'alliberen en resposta al dany i estan implicats en la quimiotaxi de la micròglia cap al lloc de la lesió. Dos dels més importants són l'ATP i els endocannabinoides. Els agonistes dels receptors cannabinoides CB₂ estimulen la proliferació i migració de la micròglia (Franklin i Stella, 2003). L'estimulació dels receptors purinèrgics incrementa la capacitat fagocítica (Davalos i cols. 2005; Koizumi i cols. 2007) i la manca del receptor purinèrgic P2Y₁₂ resulta en una capacitat menor de la micròglia per migrar i estendre processos (Haynes i cols. 2006). Aquestes molècules doncs, actuen com un senyal per a la micròglia, indicant on hi ha un dany i facilitant-ne la migració.

La regulació de l'activació microglial per part del glutamat és força més complexa. El glutamat és un neurotransmissor excitador, que pot induir neurotoxicitat quan es troba present a concentracions elevades; de fet s'han descrit alteracions en l'homeòstasi del glutamat en moltes malalties neurodegeneratives (Pocock i Ketenmann, 2007). Hi ha dos tipus de receptors glutamatèrgics: els ionotròpics i els metabotròpics. La micròglia expressa receptors ionotròpics, sobretot del tipus AMPA (àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic), i receptors metabotròpics dels grups I, II i III. L'activació dels receptors AMPA en micròglia inhibeix la secreció de TNF- α (Trika i Koistinaho, 2001). L'estimulació dels receptors metabotròpics tipus II indueix l'activació de la micròglia resultant en un efecte tòxic tant per les neurones com per a les pròpies cèl·lules microgials (Taylor i cols. 2005). L'estimulació dels receptors metabotròpics tipus III per contra disminueix la toxicitat de la micròglia. (Taylor i cols. 2003). Aquesta regulació diferencial del glutamat doncs podria actuar com un mecanisme de retroalimentació negativa.

L'efecte de cada neurotransmissor sobre l'activació glial s'explica més detalladament a la taula 4.

Receptor	Subtypes	Functional activity
Glutamate, ionotropic		
AMPA	mRNA flip variants of GluRs 1-4	GluR1 and GluR3 in flip form.
	mRNA flop variants of GluR2 and GluR4	Modulate TNF α release.
NMDA	NR1 subunit expressed after transient forebrain ischaemia	No functional activity shown so far.
Glutamate, metabotropic		
Group I	mGluR1 and mGluR5a mRNA	Agonist 1S,3R-ACPD induces increased Ca ²⁺ .
Group II	mGluR2 and mGluR3 mRNA and protein	Activation of mGluR2 induces neurotoxic microglial phenotype and TNF α release.
Group III	mGluR4, -6 and -8 (but not -7) mRNA and protein	Activation is protective of microglia and neurones when microglia are exposed to activating stimuli. Group II and III negatively coupled to adenylate cyclase.
GABA		
	GABA _(B) , GABA _(B1a) , GABA _(B1b) and GABA _(B2) proteins	Stimulation of GABA _B leads to activation of a K ⁺ conductance; attenuates LPS-induced interleukin release.
Purinerergic		
ATP	Gi/G α -coupled P2Y (Y ₁ , Y ₂ , Y ₄ and Y ₁₂), P2X (X ₁ , X ₄ and X ₇), P2Y ₆ and P2X ₆ mRNA and protein	Agonists cause a cationic conductance, increased K ⁺ conductance and increased intracellular Ca ²⁺ ; membrane ruffling and chemotaxis.
	P2Y ₁₂	Modulate movement of microglial fine processes. Activation induces chemotaxis.
	P2Y ₆	mRNA and receptor protein is upregulated on microglia after neuronal injury; functions as a mediator of microglial phagocytosis; responds to UDP.
	P2X ₇	Triggers TNF α release. Controls endocannabinoid-2-arachidonylglycerol production; requires high ATP concentration. Modulates superoxide production.
	P2X ₄	Activation implicated in neuropathic pain pathways. Activation induces chemotaxis.
Adenosine		
	A2a	Induces expression of NGF, COX-2 mRNA and synthesis of PGE ₂ .
	A3	Suppresses LPS-induced TNF α release.
Cholinergic		
	α 7 nAChR subunit	ACh or nicotine inhibits LPS-induced TNF α release. Nicotine attenuates gp120 or IFN γ -induced microglia activation.
Cannabinoid		
	CB ₂ receptor expressed in perivascular microglia	Activation reduces microglial toxicity and cytokine secretion. Present on cultured microglia.
	CB ₁ , CB ₂ and abn-CBD	Non-specific activation of cannabinoid receptors suppresses microglial activation and neurotoxicity. Stimulation of CB ₂ and abn-CBD increases cell migration. Stimulation of CB ₂ induces proliferation and blocks microglial activation induced by A β ₁₋₄₀ .
Adrenergic		
	mRNA for α 1, α 2, β 1 and β 2 (but not β 3)	Agonists decrease mRNA for IL-6 and TNF α . Functional noradrenergic receptors identified on cultured microglia and in acutely isolated brain slices; modulates membrane currents; suppresses cytokine and NO release. β -adrenergic agonist; isoproterenol; inhibits PMA-induced superoxide production. β 2 agonists inhibit LPS-induced IL-12p40 release and suppress proliferation.
Dopamine		
	D ₁ - and D ₂ -like receptors, expression inferred from function	Functional dopamine receptors identified on cultured microglia and in acutely isolated brain slices; modulates membrane currents; suppresses NO release; promotes migration.
Opioid		
	MOR and KOR mRNA	Evidence of MOR and KOR function and an opioid-receptor-independent pathway.
MOR	MOR3 in cat and rat microglia	Agonists induce amoeboid phenotype in microglia, chemotaxis and BDNF-gene expression.
	MOR mRNA constitutively expressed in cultured human foetal microglia	Morphine inhibits C5a and RANTES chemotaxis and LPS- or IL1 β -induced production of RANTES.
KOR		KOR agonists prevent cytokine- or PMA-induced superoxide production, HIV-related toxicity and quinolinate release from human foetal microglia.
Neuropeptide		
Substance P	neurokinin-1 (NK-1)	Modulates chemotaxis; activates of NADPH oxidase.
Bradykinin	B ₁ and B ₂	Increases microglial motility; releases NO and PGE ₂ .
PACAP or VIP	VPAC1	Inhibits production of inflammatory chemokines and cytokines.

Taula 4. Expressió i funció dels receptors de neurotransmissors a la micròglia. Pocock i Ketenmann 2007.

1.2.2 COMUNICACIÓ MITJANÇANT PÈPTIDS

Hi ha diverses molècules solubles secretades per les neurones que poden modular l'activació microglial. Una de les més estudiades és la fractalcina, també coneguda com a CX3CL1, una quimiocina constitutivament expressada a neurones (Bazan i cols. 1997), mentre que el receptor (CX3CR1) s'expressa a la micròglia. La fractalcina es troba en dues formes: ancorada a la membrana o soluble. Chapman i cols. (2000) van descriure que la forma de membrana pot ser secretada per les neurones en resposta a estímuls excitotòxics, actuant com a quimiocina per reclutar cèl·lules microglijals al lloc on s'ha produït el dany neuronal. Quan es troba ancorada a la membrana actua com a senyal *off*, inhibint la resposta de la micròglia. Estudis realitzats amb ratolins deficientes per a la fractalcina han demostrat que aquesta proteïna inhibeix l'activació microglial i la secreció microglial de TNF- α tant *in vitro* (Zujovic i cols. 2000) com *in vivo* (Zujovic i cols. 2001). Pel que fa al receptor, la seva manca augmenta la neurotoxicitat de la micròglia en resposta a un dany (Cardona i cols. 2006) i inhibeix l'apoptosi microglial (Bohem i cols. 2000). Els resultats obtinguts *in vivo* usant models animals de malalties neurodegeneratives als que s'ha delectonat CX3CR1 són més controvertits. Alguns autors defensen que la manca del receptor empitjora la simptomatologia de patologies com la ELA (Cardona i cols. 2006) o l'Alzheimer (Bhaskar i cols. 2010). Altres autors en canvi, han demostrat que l'absència de CX3CR1 atenua els signes de l'Alzheimer, (Lee i cols. 2010; Liu i cols. 2010; Fuhrmann i cols. 2010).

Un altre pèptid neuronal implicat en la comunicació neurona-micròglia és el CD22. Aquesta molècula s'expressa a la membrana neuronal i s'allibera en resposta a un dany (Tan i cols. 2000; Mott i cols. 2004). El seu receptor és el CD45, una proteïna de membrana amb activitat tirosina-fosfatasa que s'expressa a nivells elevats a macròfags i a nivells més baixos a la micròglia (Ford et al.1995; Tan i cols. 2000), tot i que l'expressió a aquestes cèl·lules augmenta quan s'activen (Carson i cols. 1998). L'activació del CD45 inhibeix la secreció de TNF- α (Tan i cols. 2000). Estudis realitzats en cocultius neurona-micròglia demostren que les neurones secreten CD22, que s'uneix al receptor microglial CD45 induint una inhibició de la secreció de TNF- α (Mott i cols. 2004).

1.2.3 COMUNICACIÓ MITJANÇANT CONTACTE

La micròglia i les neurones es poden comunicar mitjançant contactes cèl·lula-cèl·lula (veure figura 10), que es donen a partir de contactes entre lligands i receptors de membrana. Aquest és un camp d'estudi relativament nou i encara es coneixen poc tant les molècules implicades com les seves funcions al SNC. Un exemple d'aquesta senyalització és la que es dona entre el lligand SIRP α i el receptor CD47. Estudis

realitzats en macròfags perifèrics demostren que aquesta senyalització té un efecte inhibitor en la funció fagocítica d'aquestes cèl·lules (Okazawa i cols. 2005). Es coneix molt poc sobre el paper de CD47-SIRP α en la comunicació entre micròglia i neurones. Se sap que CD47, el receptor, s'expressa a neurones i SIRP α , el lligand, a la micròglia (Bessis i cols. 2007). També es coneix que el SIRP α està implicat en el paper neuroprotector del BDNF (Ohnishi i cols. 1999), però són necessaris més estudis per conèixer el paper en la modulació de l'activació microglial.

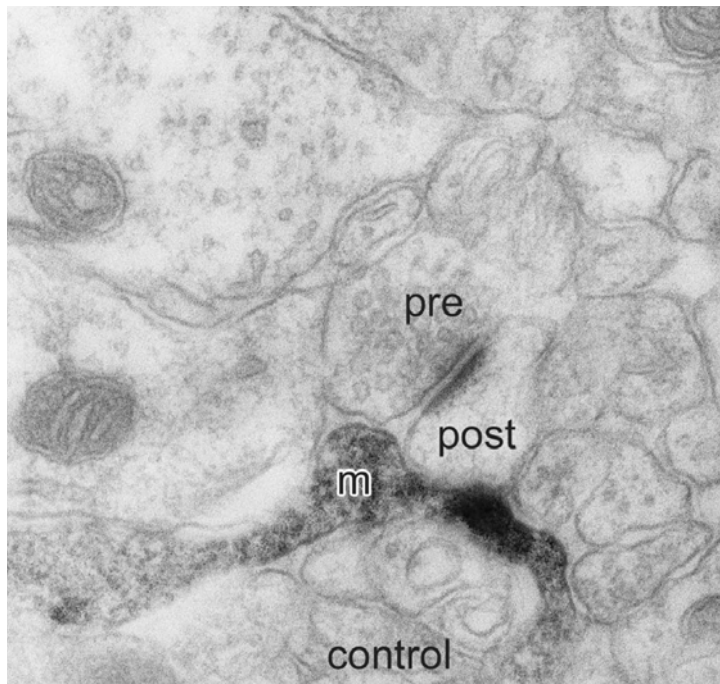


Figura 10. Micròglia (m) envoltant una sinapsi (pre i post). Wake i cols. 2009.

Un altre mecanisme de senyalització es dona mitjançant el receptor TREM-2. Aquesta molècula s'expressa a la micròglia, a les cèl·lules dendrítiques i als osteoclasts (Colonna, 2003) i no té lligand conegut, tot i que se n'han postulat alguns, com components de la paret bacteriana (Daws i cols. 2003), la *heat shock protein-60* (Stefano i cols. 2009) o factors presents a les neurones apoptòtiques (Biber i cols. 2007). El TREM-2 és

una senyal *on*, ja que no es troba activat normalment i és la seva estimulació la que desencadena una resposta microglial, en aquest cas augmentant la capacitat fagocítica de la micròglia (Takahashi i cols. 2005). Estudis realitzats amb micròglia en la que el TREM-2 va ser silenciada van demostrar que la seva manca induïx una baixada en la capacitat de fagocitar les neurones apoptòtiques. A més, la micròglia presentava un major estat d'activació, amb un augment de la transcripció dels gens de IL-1 β , TNF- α i sintasa induïble d'òxid nítric (iNOS, de l'anglès *inducible nitric oxide synthase*) (Takahashi i cols. 2005). Aquests resultats es van confirmar estimulant macròfags del ratolí deficient per a TREM-2 amb agonistes dels TLRs (de l'anglès *toll-like receptors*); els macròfags TREM-2^{-/-} secretaven més IL-6 i més TNF- α (Turnbull i cols. 2006).

Un tercer mecanisme de senyalització mitjançant contacte neurona-micròglia és el sistema de lligand-receptor CD200-CD200R. El CD200 (anteriorment anomenat OX-2) és una glicoproteïna de membrana que pertany a la família de les immunoglobulines i al SNC s'expressa de forma constitutiva a neurones (Hoek i cols. 2000; Wright i cols. 2001). El receptor, CD200R, s'expressa a les cèl·lules de la línia mieloide (Wright i cols. 2000), per tant a micròglia al SNC. Aquest receptor té només una isoforma a humans, però 4 en ratolins (Wright i cols. 2003), sent CD200R1 la única isoforma inhibidora i la única capaç d'unir-se a CD200 (Minas i Liversidge, 2006). La funció del CD200 és inhibir l'activació de monòcits, cèl·lules dendrítiques i macròfags, unint-se al receptor CD200R1 que expressen aquestes cèl·lules. Al SNC, el CD200 contribueix a establir l'estímul inhibitor sobre la micròglia, fent que aquesta es mantingui en un estat quiescent en condicions basals (Barclay i cols. 2002), actuant doncs com un senyal *off*. Estudis realitzats en ratolins deficients per a CD200 mostren un augment de l'activació de la micròglia, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (Hoek i cols. 2000). Pel que fa a estudis realitzats amb ratolins deficients per al receptor, aquests mostren un augment en la producció de TNF- α , tant a nivell basal com després de l'estimulació amb LPS (Boudakov i cols. 2007). S'ha descrit però una forma truncada de CD200 (CD200_{tr}), que és soluble i té efectes antagònics al CD200 de membrana, i reverteix l'efecte inhibitori de la senyalització CD200-CD200R sobre la producció de citocines proinflamatòries a cultius de limfòcits (Chen i cols. 2008).

1.3 L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL

1.3.1 ROL DE L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL EN LES MALALTIES NEURODEGENERATIVES

La micròglia és la primera línia de defensa de la resposta immune innata al SNC. L'activació microglial és un procés altament regulat que permet una resposta ràpida al dany. La seva funció en aquestes situacions és, d'una banda, secretar citocines i quimiocines, que recluten i activen a altres cèl·lules (macròfags perifèrics, astròcits o cèl·lules de la micròglia d'altres regions) i de l'altra fagocitar restes cel·lulars i els cossos estranys que poden estar presents al parènquima nerviós, com per exemple els dipòsits d'A β als malalts amb Alzheimer o els cossos de Lewy als malalts de Parkinson. Hi ha autors que postulen que aquesta funció fagocítica no la realitza només la micròglia resident del SNC, sinó que també és necessària la infiltració de micròglia derivada de la medul·la òssia (Kang i Rivest, 2007; Boissonneault i cols. 2009). L'activació microglial però, inclou l'alliberament de substàncies potencialment neurotòxiques que poden acabar agreujant el dany que pretenien eliminar,

desencadenant una retroalimentació positiva que acaba mantenint la glia en un estat d'activació constant i independent de la molècula o senyal neuronal que ha iniciat el procés inflamatori (Lucas i cols. 2006; Glass i cols. 2010). Es creu que la neuroinflamació té una gran importància en la progressió de les malalties neurodegeneratives, ja que s'ha descrit la presència de micròglia activada en les malalties neurodegeneratives més prevalents, com la malaltia d'Alzheimer o la malaltia de Parkinson.

Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una de les malalties neurodegeneratives més prevalents, i es caracteritza per pèrdues de memòria i empitjorament cognitiu progressiu, a més d'estar associada a desordres del comportament. Es tracta d'una malaltia multifactorial, en la que intervenen factors genètics i ambientals. Pel que fa als factors genètics, s'han descrit mutacions hereditàries que causen el 5% dels casos de la malaltia. Aquestes mutacions es troben als gens de la presenilina (PS), que participa en el processat de la proteïna precursora d'A β (APP, de l'anglès *Amyloid Precursor Protein*) per donar lloc a l'A β . El gen de l'ApoE també s'ha relacionat amb la malaltia, ja que diversos estudis d'associació mostren que els portadors de determinats al·lels d'aquest gen tenen un risc de patir la malaltia fins a 4 vegades superior que els no portadors (revisat a Bertram i cols. 2010). També s'ha descrit la rellevància que tenen a la malaltia factors ambientals com les infeccions sistèmiques, els traumatismes i la dieta (Perry, 2004; Migliore i Coppede, 2009). Els marcadors histològics clàssics per a la malaltia d'Alzheimer són els dipòsits extracel·lulars d'A β i els entramats neurofibril·lars, constituïts per acumulacions intracel·lulars de fibril·les riques en proteïna tau hiperfosforilada. En presència d'aquests marcadors s'observa una activació microglial caracteritzada per un canvi morfològic, un increment en l'expressió del MHCII, ciclooxygenasa-2 (COX-2), i la secreció de TNF- α , IL-1 β i IL-6 (Akiyama i cols. 2000).

Tal com s'indica a la figura 11, els agregats d'A β indueixen una activació proinflamatòria en la micròglia, que inclou la secreció d'òxid nítric, d'espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*), de citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-1 β i IL-6), quimiocines i prostaglandines (Akiyama i cols. 2000; Kitazawa i cols. 2004). Aquestes molècules poden augmentar la secreció d'A β per part de les neurones, ja que el promotor del gen que codifica per a l'APP té llocs d'unió pel factor nuclear kappa B (NF- κ B, de l'anglès *nuclear factor kappa B*), i se sap que les citocines proinflamatòries secretades per la micròglia augmenten l'expressió de NF- κ B a les

neurones (Sastre i cols. 2008). Aquest augment d'A β incrementa encara més l'activació microglial, establint-se així un reforç positiu que pot empitjorar cada vegada més el curs de la malaltia.

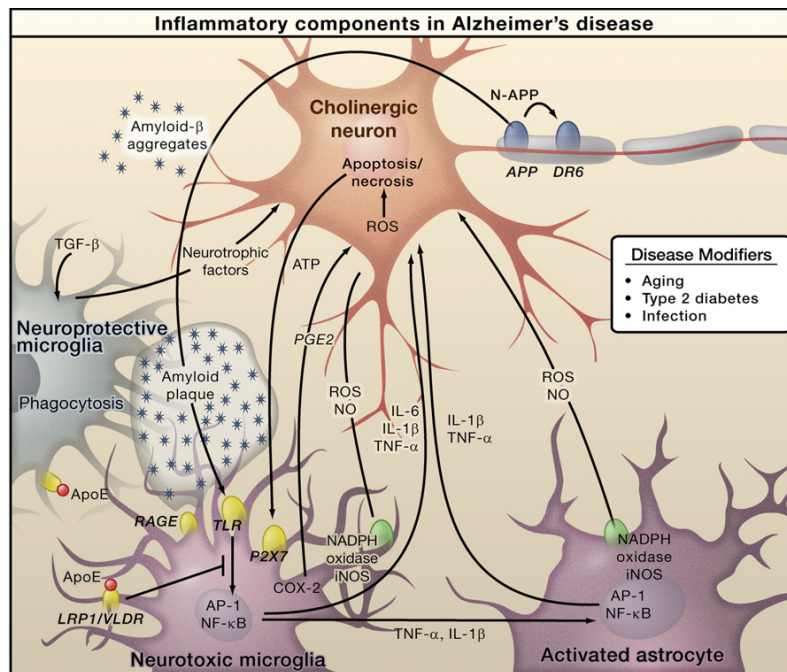


Figura 11. Inflamació a la malaltia d'Alzheimer. Glass i cols. 2010

Tot i que la presència d'inflamació a la malaltia d'Alzheimer està establerta, no és fàcil demostrar directament el paper nociu de la microglia en el curs de la malaltia. Estudis realitzats creuant ratolins model de malaltia d'Alzheimer (doble transgènic APP/PS-1) amb ratolins als que es pot fer una depleció condicional de microglia van mostrar que, 3 setmanes després d'eliminar la microglia, la formació de plaques i el dany neuronal no havien canviat respecte als ratolins APP/PS1 que sí tenien microglia (Grathwohl i cols. 2009). Per contra, un estudi realitzat per Boissonneault i cols. (2009) va mostrar que l'augment de cèl·lules microglials atenuava la patologia. Aquests autors van administrar durant 4 mesos M-CSF, un factor de creixement que indueix proliferació microglial, a ratolins doble transgènics APP/PS1 i van observar que disminuïa el nombre de dipòsits d'A β i la pèrdua cognitiva. Les diferències entre aquests dos treballs es podrien explicar pel fet que en el primer treball es depleciona la microglia resident al SNC, mentre que en el segon treball la microglia que incrementa en nombre i fagocita les plaques no és la resident al SNC sinó que s'ha originat *de novo* a la medul·la òssia. De fet, hi ha autors que postulen que la microglia resident esdevé senescent amb l'edat, perden la capacitat d'activar-se per fagocitar les plaques

d'amiloide (Streit, 2006; Lucin i Wyss-Coray, 2009; Streit i cols. 2009), i que per això cal que arribi nova micròglia que conservi les capacitats fagocítiques per tal d'eliminar els dipòsits d' A β .

Malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson és la segona malaltia neurodegenerativa més prevalent després de la malaltia d'Alzheimer. Els símptomes d'aquesta malaltia són sobretot motors (bradicinèsia, rigidesa, inestabilitat postural o rigidesa) però també s'associa a disfuncions del sistema nerviós autònom, depressió, dèficits cognitius o problemes de la son (Glass i cols. 2010). Histopatològicament es caracteritza per la presència de dipòsits intranuclears de la proteïna α -sinucleïna, els anomenats "cossos de Lewy", i per la pèrdua de neurones dopaminèrgiques, sobretot a la substància negra (Braak i cols. 2003). Tot i que la majoria de casos són esporàdics (Tansey i cols. 2007) també hi ha formes familiars, que es relacionen majoritàriament amb mutacions a la α -sinucleïna (Glass i cols. 2010).

Està establert que la malaltia de Parkinson cursa amb neuroinflamació, ja que s'ha descrit la presència de micròglia activada en pacients de malaltia de Parkinson (Whitton, 2007) i un increment de citocines proinflamatòries al líquid cefaloraquídi (Nagatsu i Sawada, 2005). Hi ha autors que postulen que la mort de neurones dopaminèrgiques és suficient per activar la micròglia (Roodveldt i cols. 2008). Els agregats proteics de α -sinucleïna s'acumulen al medi extracel·lular, on són fagocitats per la micròglia. La fagocitosi dels agregats pot induir l'activació microglial, incrementar l'expressió de la NADPH oxidasa i la producció de ROS (Zhang i cols. 2005), NO, TNF- α i IL-1 β , contribuint a la progressió de la mort neuronal (Hirsch i Hunot, 2009), donada la sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques al dany per estrès oxidatiu (Gao i cols. 2003).

Esclerosi lateral amiotròfica

L'ELA és una malaltia neurodegenerativa fatal que afecta a les neurones motores. Aquesta malaltia cursa amb feblesa muscular, espasmes, hiperreflèxia i acaba causant la mort per fallida dels músculs respiratoris (Glass i cols. 2010). Com la majoria de malalties neurodegeneratives, la major part dels casos són esporàdics. Un 10% són formes familiars, que presenten mutacions en gens com el TARDBP (*transactive response DNA-binding protein*), també anomenat TDP43, o el FUS/TLS (*fused in sarcoma or translocation in sarcoma*), ambdós implicats en la regulació transcripcional. La mutació més ben caracteritzada però, és la del gen que codifica per a la SOD1, un

dels enzims encarregats de l'eliminació de les ROS, més concretament de transformar l'ió superòxid en H_2O_2 (Rosen i cols. 1993).

Tant els models animals com les mostres de pacients han demostrat que l'ELA presenta un elevat component inflamatori, que es caracteritza per gliosi reactiva (acumulació de microglia i astròcits a la lesió) i producció per part d'aquestes cèl·lules de ROS, COX-2, IL-6, TNF- α i IL-1 β (McGeer and McGeer, 2002). L'ELA és una malaltia multifactorial, però la majoria d'estudis i models animals s'han centrat en el paper de la SOD1 (veure figura 12).

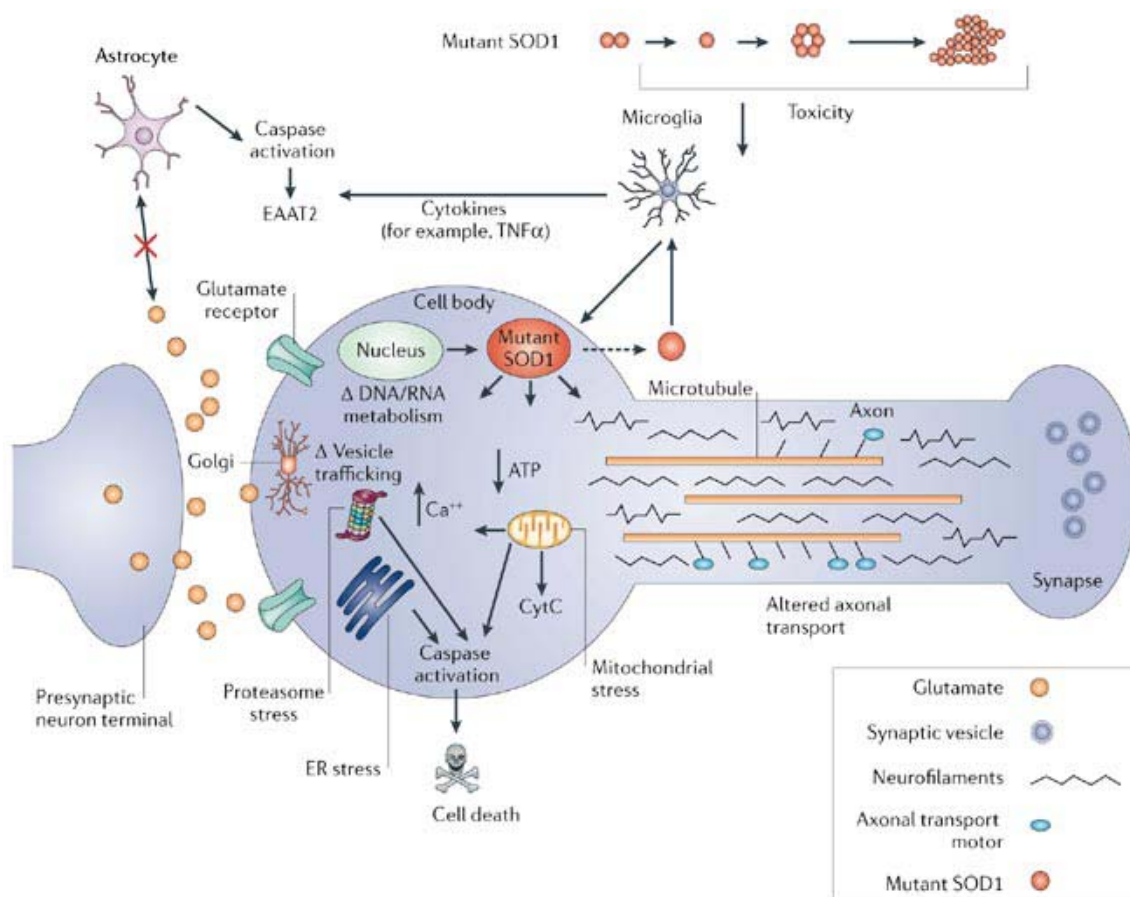


Figura 12. Efecte de la SOD1 sobre les funcions cel·lulars. Pasinelli i Brown. 2006.

El model animal més utilitzat és el de ratolins transgènics que expressen la forma humana de la SOD1 mutada. Estudis realitzats amb aquest model mostren que la micròglia que expressa aquesta forma mutant de la SOD1 sobreexpressa TNF- α i NADPH oxidasa (Liu i cols. 2009). D'altra banda, les neurones aïllades dels ratolins transgènics són més sensibles a la toxicitat induïda per NO (Raoul i cols. 2002). Tot i aquesta major susceptibilitat al dany neurotòxic, no sembla haver-hi un factor que sigui per sí sol responsable de la mort neuronal. Dos de les molècules amb un efecte neurotòxic més establert són la IL- β i el TNF- α ; estudis realitzats creuant ratolins transgènics SOD1 amb ratolins deficientes per a IL- β o TNF- α demostren que la manca d'una d'aquestes molècules no altera la progressió de la malaltia (Nguyen i cols. 2001; Gowing i cols. 2006). Aquest fet es podria explicar per la implicació de la SOD1 en la patologia, que apunta un paper important de la mort per estrès oxidatiu, i no només per la via clàssica TNF- α - Fas-apoptosi. A més, s'ha detectat la presència de SOD1 extracel·lular al líquid cefaloraquidi de pacients (Urushitani i cols. 2006), i se sap que aquesta proteïna activa la micròglia amb un fenotip proinflamatori (Kang i Rivest, 2007). Així doncs, la mort neuronal a l'ELA resulta de la combinació de molts factors i la manca d'un d'ells no és suficient per aturar la malaltia.

Per determinar quin paper juguen les cèl·lules glials en aquest procés s'han realitzat estudis amb ratolins transgènics que expressen SOD1 mutada a totes les cèl·lules excepte a motoneurones, micròglia/macròfags o astròcits (Boillée i cols. 2006; Yamanaka i cols. 2008). Aquests estudis mostren que tots els tipus cel·lulars tenen un paper en la progressió de la malaltia, i que l'absència de la mutació a un sol tipus cel·lular pot alentir la progressió, però no curar la malaltia.

L'activació glial com a diana terapèutica

La implicació de la neuroinflamació en els processos neurodegeneratius ha situat els mediadors inflamatoris en el punt de mira de la teràpia i el desenvolupament de fàrmacs per a tractar les malalties neurodegeneratives. La modulació de la resposta immune pot ser una diana per a trobar un fàrmac que atenuï la progressió d'aquestes patologies. Cal tenir en compte que les malalties neurodegeneratives tenen dues característiques importants a l'hora de buscar principis actius per tractar-les. D'una banda, el dany es produeix al SNC, un ambient immunoprotegit i de difícil accés, cal per tant buscar molècules capaces de travessar la barrera hematoencefàlica. D'altra banda, són patologies la simptomatologia de les quals dura desenes d'anys, de manera que ha de ser un fàrmac prou segur per ser administrat durant tots els anys que duri la malaltia (Glass i cols. 2010).

Una de les primeres estratègies terapèutiques assajades va ser administrar fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), que inhibeixen la COX-2, a pacients de malalties neurodegeneratives. Al 2001 es va publicar un estudi retrospectiu realitzat amb gairebé 7000 individus on es demostrava que les persones que havien pres AINEs durant un període llarg de temps (per al tractament de malalties inflamatòries cròniques) tenien un risc menor de patir Alzheimer (in 'T Veld i cols, 2001). Aquest treball va encoratjar a què es realitzessin estudis prospectius administrant aquests fàrmacs a pacients de malalties neurodegeneratives esperant observar una millora en la simptomatologia; els resultats observats però, han estat força decebedors, ja que no han produït una millora clara als pacients de malaltia d'Alzheimer (Aisen i cols. 2003) i ELA (Cudkowicz i cols. 2006). Una possible explicació d'aquests resultats és que quan apareixen els símptomes de la malaltia la neurodegeneració fa anys que progressa, per això el tractament preventiu sí que produiria una millora (observada als estudis retrospectius) però tractar quan ja s'ha desenvolupat la simptomatologia no seria eficaç (com s'ha observat als estudis prospectius). A més cal tenir en compte que els AINEs són inhibidors de la COX, però no tenen efectes sobre altres marcadors inflamatoris altament neurotòxics com IL-1 β , TNF- α o NO. Cal seguir investigant per a trobar noves dianes, més específiques i eficaces en el tractament d'aquestes malalties.

1.3.2 L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL: CARACTERÍSTIQUES I MOLÈCULES IMPLICADES

L'activació microglial és el conjunt de canvis que experimenta la micròglia en resposta a un canvi en l'homeòstasi del SNC. Els estímuls capaços d'activar la micròglia són molts i molt variats, poden ser patògens, acumulacions proteiques, restes cel·lulars, molècules intracel·lulars alliberades a l'espai extracel·lular, molècules secretades per altres cèl·lules, o fins i tot l'absència de determinats estímuls (veure taula 5). L'activació microglial segueix un patró altament regulat, que inclou canvis tant a nivell morfològic com funcional. La micròglia prolifera i migra al lloc de la lesió, retreu les prolongacions adquirint una morfologia ameboide. També s'indueix l'expressió i reorganització de diverses molècules de superfície, involucrades en els contactes amb altres cèl·lules o amb la matriu extracel·lular, s'alliberen factors immunoreguladors, augmenta l'expressió de MHC II (i per tant, la capacitat de presentar antígens) i s'incrementa l'activitat fagocítica.

Class of compound	Examples
Surface structures and DNA/RNA of viral, bacterial or fungal origin	Agonists of members of the pattern recognition receptor families, notably TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 and TLR9, such as bacterial LPS or cell wall proteoglycans and lipoteichoic acid (LTA), gp41, gp120 (the TLR4-agonistic LPS serving as a common model agent)
Abnormal endogenous proteins	β -amyloid (aggregates), A β 25–35, A β 40, A β 42, prion protein (PrP)
Complement	Complement factors C1q, C5a
Antibodies	Immunoglobulin of various classes and isotypes (IgA, IgG, IgM), presented in immune complexes
Cytokines	Colony stimulating factors (M-CSF, GM-CSF), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TGF- β , TNF- α
Chemokines	Ligands for chemokine receptors: CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R
Neurotrophic factors	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin 3 (NT-3), NT-4
Plasma components	Albumin, fibronectin, fibrinogen, thrombin
Other proteins and peptides	Apolipoprotein E (ApoE), heat shock proteins hsp60 and hsp70, CD40L, melanocyte-stimulating hormone (MSH), endothelin, S100 proteins, vasoactive intestinal peptide (VIP)
Neurotransmission-related compounds	ATP (and related purines), β -adrenergic agonists, glutamate, kainate, NMDA
Ions	K ⁺ , Mn ²⁺
Other compounds	Cannabinoids, ceramide, gangliosides, lysophosphatidic acid (LPA), melatonin, opioids (endomorphines), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E ₂ (PGE ₂), steroid hormones, vitamin D ₃

Taula 5. Estímuls modularadors de l'activació microglial. Hanisch i Kettenmann, 2007

La micròglia passa per diferents estats d'activació (veure figura 13). Clàssicament es parla de micròglia quiescent, micròglia activada i micròglia ameboide. La **micròglia quiescent** es la que trobem en el SNC sa. El terme quiescent s'usa per diferenciar-la de la micròglia activada o reactiva, però no vol dir que es trobi en un estat de repòs. La micròglia quiescent rastreja el medi de forma constant, emetent prolongacions per verificar l'estat de les cèl·lules que l'envolten i rastrejant la possible presència de cossos estranys (Davalos i cols. 2005; Nimmerjahn i cols. 2005). Es coneix poc sobre la micròglia en aquest estadi, sobretot *in vivo*. Se sap que no expressa nivells elevats de marcadors pro o antiinflamatoris ni de MHCII, ja que aquests apareixen en la **micròglia activada** com a resposta a un estímul. El que anomenem activació és més aviat un canvi de funcions, la micròglia passa de rastrejar el medi a secretar factors proinflamatoris i quimiocines, augmenta l'expressió del MHCII per tal de presentar antigens i també augmenta la capacitat fagocítica. L'activació no és un procés de tot o res, pot adquirir diversos estadis entremitjos.

Hi ha un tercer estadi, que es coneix com a **micròglia ameboide**, en el qual la micròglia presenta una morfologia arrodonida, secreta factors immunomoduladors i té una elevada capacitat fagocítica. Aquest estadi d'activació clàssicament s'ha entès com una activació "neta", en la que es fagocita el cos estrany sense inflamació ni

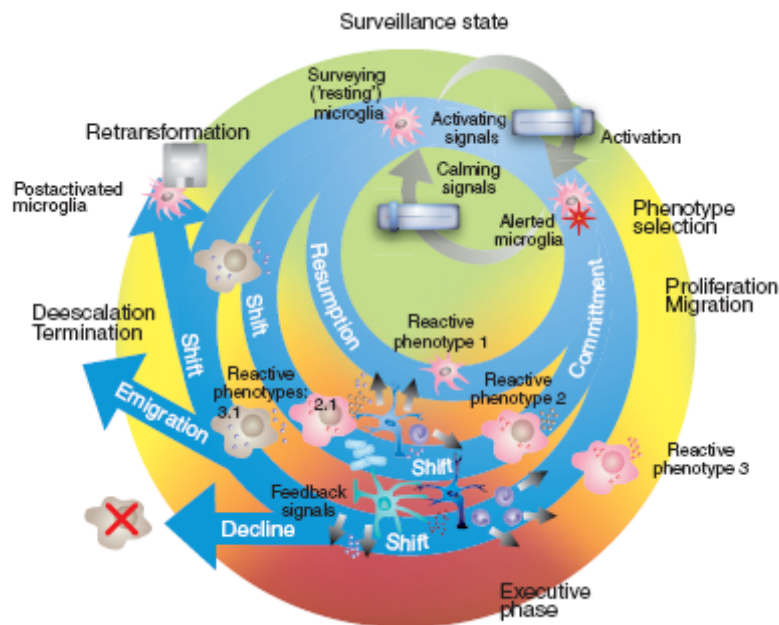


Figura 13. Estats d'activació de la micròglia. Hanisch i Kettenmann, 2007

infiltració d'altres cèl·lules, i allibera factors com la IL-10, el factor transformador de creixement β (TGF β , de l'anglès *transforming growth factor β*) o neurotrofines. Alguns autors defensen l'existència d'un quart estat d'activació, l'anomenada **micròglia hiperramificada**, que representaria un estadi entremig entre la micròglia quiescent i l'activada i que seria més nombrosa amb l'edat (Streit i cols. 1999). Tot i aquesta classificació, es tendeix cada vegada més a considerar l'activació microglial com un procés flexible, en el que les cèl·lules poden passar de l'activació a la quiescència, o mantenir-se activades o fins i tot morir després de l'activació (Schwartz i cols. 2006; Hanisch i Kettenmann, 2007). La desaparició de l'estímul activador o la presència de citocines i quimiocines antiinflamatòries fa que la micròglia torni a passar d'un estat activat a un de vigilància. No se sap gaire sobre el que passa a la micròglia després de l'activació; estudis en macròfags demostren que queda una "memòria genètica" que fa que la segona vegada que es troba amb un estímul l'activació sigui diferent que si es tractés d'una cèl·lula que mai ha estat activada (De Santa i cols. 2007; Foster i cols. 2007; Villagra i cols. 2009). Per últim, cal tenir en compte que l'activació en diferents regions del SNC pot ser diferent, ja que la micròglia presenta molta heterogeneïtat regional (Carson i cols. 2007), i que el tipus de resposta microglial pot variar molt en funció dels factors que es produeixin, com mostra la figura 14.

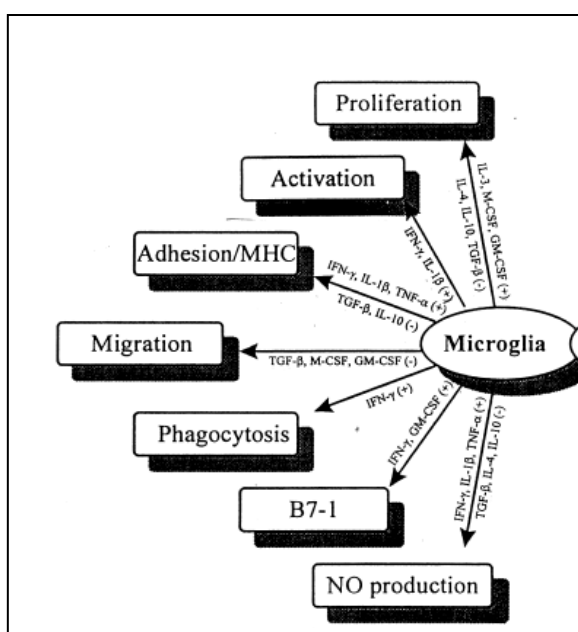


Figura 14. Efecte de les citocines a les cèl·lules microglials. Xiao i Link, 1998

A l'activació microglial també hi pot haver un augment en la proliferació de la microglia. Els mediadors d'aquest efecte són les citocines M-CSF, GM-CSF, produïdes pels astròcits, i IL-6 i IL-1 β , produïdes tant pels astròcits com per la pròpia microglia (Hanisch, 2002). No tots els estímuls que produeixen activació microglial indueixen la proliferació microglial. El LPS inhibeix la proliferació en alguns models experimentals (Ganter i cols. 1992; Bianco i cols. 2006), tot i que en altres models promou la proliferació (Lee i cols. 1994).

Una altra funció que pot desenvolupar la microglia activada és la de fagocitar patògens, acumulacions proteiques extracel·lulars, restes cel·lulars i cèl·lules apoptòtiques. Mentre que la fagocitosi d'un patògen o un component intracel·lular desencadena una resposta proinflamatòria, la fagocitosi d'una cèl·lula apoptòtica no indueix aquesta resposta (Hanisch i Kettenmann, 2007). La fagocitosi de patògens es dona majoritàriament a través de receptors de reconeixement de patró (PRRs, de l'anglès *pattern recognition receptors*), que reconeixen patògens, tot i que també poden reconèixer algunes molècules endògenes (Underhill i Ozinsky, 2002; Aderem, 2003). Entre els PRRs trobem els receptors *scavenger*, les lectines, els receptors del complement i els receptors Fc γ . Mitjançant aquests últims es dona la fagocitosi mediada per anticossos, per a la qual és necessària la presentació d'antígens mitjançant les proteïnes del MHCII, que només s'expressen a la microglia quan està activada, com succeeix en patologies del SNC com malaltia d'Alzheimer, l'isquèmia o l'ELA (revisat a Neumann, 2001).

Mediadors inflamatoris

L'activació microglial implica la producció i secreció de molts mediadors, tant proinflamatoris com antiinflamatoris, que tenen efecte sobre les pròpies cèl·lules microglials i també sobre la resta de cèl·lules del SNC. En aquest apartat descriurem breument les característiques de les citocines, quimiocines i enzims que juguen un paper més rellevant en l'activació microglial.

CITOCINES

Les citocines són un grup heterogeni de proteïnes que actuen de forma autocrina, paracrina i endocrina. Mitjançant la unió a receptors de membrana regulen processos com el creixement, la supervivència cel·lular o la diferenciació, entre d'altres. Dins de les citocines trobem molècules com les interleucines, els interferons, els factors de necrosi tumoral, els factors estimuladors de colònies i les quimiocines.

Les citocines s'acostumen a classificar en antiinflamatòries i proinflamatòries, segons l'efecte primari que produeixen. Cal tenir en compte però, que una mateixa citocina pot tenir diferents efectes, segons el receptor al que s'uneixi o la resta de senyals que estigui rebent la cèl·lula.

Citocines proinflamatòries

- TNF- α

El TNF- α és una proteïna que es sintetitza en forma de procitocina ancorada a la membrana, sent necessària una proteòlisi per a què s'alliberi al medi extracel·lular com a citocina activa (Kriegler i cols. 1988). Al SNC aquesta citocina la produeix principalment la micròglia, en resposta a estímuls exògens, com bacteris o virus, o estímuls endògens, com una concentració anormalment elevada de glutamat, o el dany per isquèmia entre d'altres (Park i Bowers, 2010). El TNF- α té dos receptors, el p55 (TNF-RI) i el p75 (TNF-RII), que al SNC s'expressen a neurones, astròcits i micròglia. La unió a aquests receptors pot donar a efectes molt diferents (Chen i cols. 2002). D'una banda, es pot activar el factor de transcripció NF- κ B, donant lloc a la transcripció de gens proinflamatoris i activant el programa de supervivència cel·lular. D'altra banda a través el receptor de TNF *death domain* (TRDD) s'activa el programa d'apoptosi a través la caspasa 8. Val a dir que per a què el TNF- α indueixi apoptosi cal una senyal secundària (Chao i cols. 1995).

- IL-6

Aquesta citocina és secretada principalment per la micròglia i actua mitjançant la unió al seu receptor (IL-6R), expressat a micròglia i també a astròcits. La IL-6 participa en la iniciació de la resposta immunitària, desencadenant la secreció d'altres factors proinflamatoris. El seu efecte en astròcits per contra, és l'activació de la reparació tissular (Hanish, 2002).

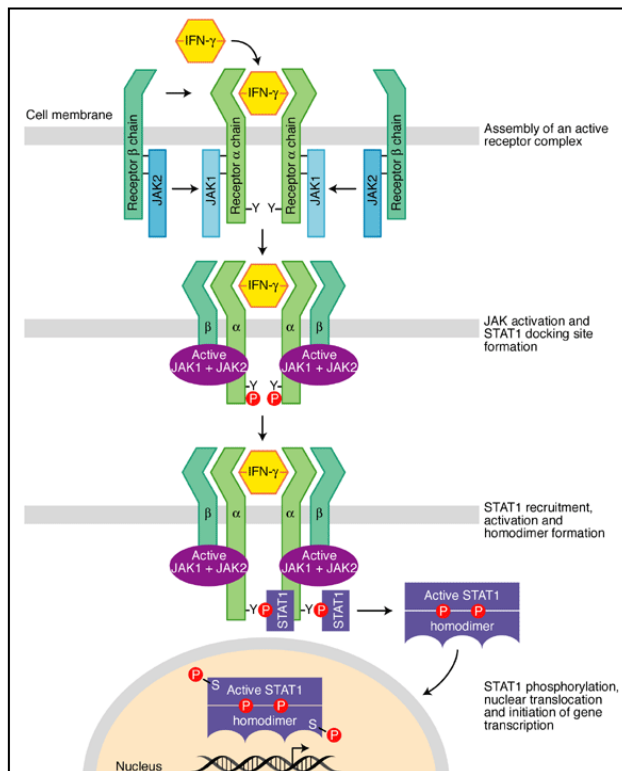


Figura 15. Transducció de senyal de l'IFN- γ . *Exp Rev Mol Med*, 2003

- IFN- γ

L'IFN- γ és una proteïna produïda majoritàriament a nivell sistèmic (pels limfòcits T i les cèl·lules *Natural Killer*) però també hi ha una expressió endògena al SNC. Al unir-se al seu receptor (veure figura 15) regula un gran nombre de funcions de les cèl·lules microgials, induint l'expressió de receptors del complement i de Fc, molècules d'adhesió i molècules de superfície, com el MHCII. A més, augmenta la síntesi de citocines (TNF- α , IL-1 β i IL-6) i de NO (Hanisch, 2001).

- IL-1 β

La IL-1 β és una citocina sintetitzada i secretada majoritàriament per la micròglia. A l'igual que el TNF- α , es sintetitza com a procitocina i la forma proteolitzada i secretada és la biològicament activa. La seva expressió augmenta en resposta al dany de forma molt ràpida i en unir-se al seu receptor, el IL-1R, activa la cascada intracel·lular de MAPK i NF- κ B, induint l'activació de gens que codifiquen per factors proinflamatoris com el TNF- α , la IL-6 o diverses metaloproteïnases. També se li atribueix un paper en l'efecte neurotòxic de la micròglia activada (Rothwell i Luheshi, 2000; Hanisch, 2002). La IL-1 β també té efecte sobre els astròcits, estimulant-ne la proliferació (John i cols. 2005).

Citocines antiinflamatòries

- IL-10

La IL-10 és secretada per les cèl·lules gials i té un paper inhibitor molt potent sobre la resposta proinflamatòria, inhibint la producció de TNF- α , IL-6 i NO entre d'altres. La seva secreció per part de la micròglia es dona majoritàriament com a mecanisme de

retroalimentació negativa, per a retornar a l'homeostasi després d'un procés d'activació proinflamatori (Mosser i Zhang, 2008).

- TGF- β

El TGF β és una citocina antiinflamatòria. Al SNC és secretada per les cèl·lules glials. El seu paper en la micròglia és el d'inhibir la resposta proinflamatòria, disminuint la secreció de IFN- γ i de TNF- α així com la producció de ROS. A més, pot induir apoptosi microglial mitjançant la proteïna intracel·lular Bcl-2 (Böttner i cols. 2000).

QUIMIOCINES

Les quimiocines són citocines amb efecte quimiotàctic que actuen mitjançant receptors acoblats a proteïnes G. La seva funció és atraure a la micròglia cap al lloc de la lesió, i també induir l'extravasació i infiltració de leucòcits al SNC. Les quimiocines són secretades per micròglia, astròcits i cèl·lules extravasades. Els receptors per a quimiocines, els CXCR, s'expressen tant a les neurones com a la glia. Existeixen diverses famílies de quimiocines i de receptors, classificats segons la seva estructura i seqüència aminoacídica. A més, una quimiocina pot unir-se a diversos receptors. Es tracta doncs d'un sistema altament complex i flexible, però a la vegada molt regulat. Una de les quimiocines més estudiades és la fractalcina, o CXCL1, ja descrita en apartats anteriors pel seu paper immunosupressor de l'activació glial (Hanisch, 2002).

ALTRES

- iNOS

La iNOS, també coneguda com NOS-II, és l'enzim encarregat de sintetitzar NO en resposta a un estímul proinflamatori. S'expressa a les cèl·lules glials, sobretot a la micròglia. La seva presència en condicions basals és gairebé nul·la, activant-se en resposta a la presència sobretot de patògens. El NO a baixes concentracions regula la vasodilatació mentre que a concentracions més altes té un efecte neurotòxic, ja sigui per sí sol o al combinar-se amb els ROS per formar peroxinitrit (Saha i Pahan, 2006).

- COX-2

La COX-2 és un dels enzims encarregats de transformar l'àcid araquidònic en prostaglandines que s'expressa tant a neurones com a cèl·lules glials. La seva expressió a micròglia és induïble, i s'activa en resposta a diversos estímuls proinflammatoris. Els productes de la reacció catalitzada per aquest enzim poden ser prostaglandines (PG) antiinflamatòries o proinflammatòries, pel que hi ha certa

controvèrsia sobre quin és el l'efecte de l'activació de la COX-2 a la neuroinflamació. Les prostaglandines proinflamàtores sintetitzades per la COX-2 juguen un paper en la regulació de les citocines i el manteniment de la resposta inflamatòria (Farooqui, 2007). Donada la rellevància de la COX-2 en la neuroinflamació, s'estan realitzant diversos estudis per tractar pacients de malalties neurodegeneratives, sobretot d'Alzheimer, amb fàrmacs antiinflamatoris no esteroidals, que inhibeixen l'expressió de les ciclooxigenases, sense haver obtingut resultats clars fins al moment (Choi i cols. 2009).

- NADPH

La NADPH oxidasa és l'enzim que catalitza la formació de ió superòxid. És un enzim amb diverses subunitats, algunes citosòliques i altres de membrana citoplasmàtica. La seva activació es produeix amb l'assemblatge de totes les subunitats en resposta a un estímul proinflamatori. La producció de superòxid és altament citotòxica, sobretot per a les neurones. A més, aquest ió es pot associar al NO formant una espècie reactiva d'oxigen encara més tòxica, el peroxinitrit (Babior, 2004).

1.3.3 MEDIADORS IMPLICATS EN LA NEUROTOXICITAT

Com s'ha comentat prèviament, l'activació glial és un procés beneficiós i necessari, però una sobreactivació crònica pot tenir conseqüències neurotòxiques (Polazzi i Contestabile, 2002; Allan i Rothwell, 2003). Per la seva banda, sota certes circumstàncies, el dany neuronal pot comportar l'alliberació de factors que activen la microglia, desencadenant-se així una retroalimentació positiva que amplifiqui el dany neuronal inicial (Block i cols. 2007).

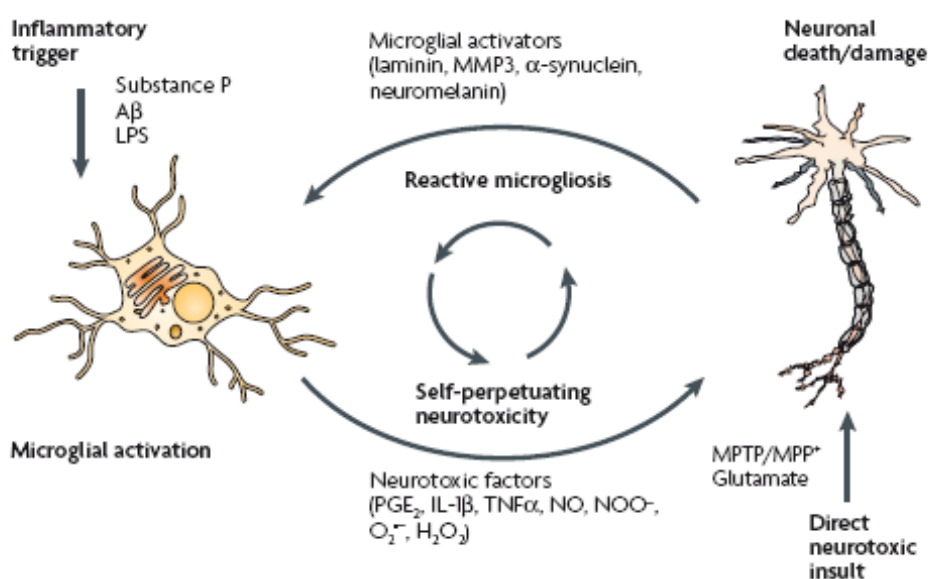


Figura 16. Mecanismes pels quals l'activació microglial induïx neurotoxicitat. Block i cols. 2007

Hi ha diversos factors secretats per la micròglia que tenen potencial neurotòxic (veure figura 16). Un dels més estudiats és el NO, que pot causar mort neuronal per diversos mecanismes. D'una banda difon pel medi extracel·lular fins les neurones dels voltants, inhibint la cadena respiratòria mitocondrial, ja que inhibeix el citocrom C. Això comporta una disrupció en la síntesi d'ATP i un augment de la síntesi de ROS (Vafeiadou i cols. 2007), a més de fer les neurones més sensibles a la neurotoxicitat induïda per glutamat (Brown i Neher, 2010). D'altra banda, reacciona amb l'ió superòxid per produir peroxinitrit, altament neurotòxic, ja que inhibeix la cadena de respiració mitocondrial, indueix apoptosi i promou l'alliberament de glutamat (Bal-Price i cols. 2002; Brown i Bal-Price, 2003). A més, el NO també indueix modificacions a les proteïnes, com la nitrilació i la S-nitrosilació, que provoquen una pèrdua de funció de les proteïnes, produint neurotoxicitat (Zhang i cols. 2006; Vafeiadou i cols. 2007).

Un altre mediador microglial de la neurotoxicitat és l'enzim NADPH oxidasa, encarregat de sintetitzar una de les formes de ROS, l'ió superòxid, un dels ions més tòxics, que causa mort neuronal per estrès oxidatiu. A més regula l'activitat fagocítica i la proliferació microglial i a concentracions molt altes pot fins i tot causar mort de la pròpia micròglia. Les ROS es secreten en resposta a un gran ventall d'estímuls, com patògens, proteïnes endògenes o dany neuronal. La presència de ROS indueix l'expressió de iNOS. De fet, l'alliberament de ROS va seguit de la secreció de factors com NO i PGE₂ i de citocines proinflamatòries, com TNF- α i IL-1 β . La secreció de la citocina IL-1 β no té efecte només sobre micròglia i neurones, sinó que també afecta la integritat de la barrera hematoencefàlica, incrementant-ne la permeabilitat. Com a conseqüència augmenta la infiltració de leucòcits i macròfags (Blamire i cols. 2000). Aquest fenomen pot augmentar la neurotoxicitat, ja que desencadena un procés inflamatori exacerbat i menys regulat. L'efecte de les citocines pot variar en funció de les cèl·lules que les secreten, i de si l'efecte és directe sobre les neurones o està mediat per la glia (Allan i Rothwell, 2001).

Experiments realitzats usant ratolins deficientes per a iNOS, COX-2 o TNF- α han demostrat que la manca d'un sol d'aquests factors és suficient per reduir la neurotoxicitat induïda per l'activació microglial, però que l'efecte és sinèrgic i la secreció d'uns factors potencia l'efecte dels altres (Block i Hong, 2005).

Tot i la importància dels factors secretats, diversos estudis demostren la importància del contacte cèl·lula a cèl·lula per a la neurotoxicitat induïda per activació glial (Gibbons i Dragunow, 2006). Els paradigmes experimentals utilitzats per caracteritzar els factors microglials implicats en la neurotoxicitat acostumen a ser cocultius de neurones i glia, ja que els medis condicionats de micròglia activada no solen ser suficients per a induir mort neuronal.

1.3.4 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ QUE REGULEN L'ACTIVACIÓ MICROGLIAL

La micròglia en activar-se pateix un gran nombre de canvis, i per tal que aquests es puguin produir és necessària l'activació d'un gran nombre de gens. La regulació de l'activació glial es porta a terme per un nombre relativament petit de famílies de factors de transcripció. Les més conegudes són les STATs (de l'anglès *Signal Transducers and Activators of Transcription*), AP-1 (de l'anglès *Activator Protein-1*), CREB (de l'anglès *cAMP Response Element Binding protein*), NF- κ B i C/EBPs (de l'anglès *CCAAT/Enhancer Binding Proteins*). Donada la rellevància que tenen pels estudis plantejats en aquesta tesi, en aquest apartat aprofundiré especialment en les famílies NF- κ B i sobretot, C/EBPs.

STATs

Els STATs són una família de factors de transcripció implicats sobretot en la senyalització intracel·lular dels IFNs. Quan l'interferó s'uneix al seu receptor, aquest recluta les cinases JAKs (de l'anglès *Janus Kinases*), que fosforilen STAT, permetent així la dimerització i activació dels STATs (veure figura 15). Existeixen diverses isoformes, que poden ser fosforilats per més d'una JAK, conferint al sistema una gran complexitat, i fent que un mateix STAT pugui tenir diferents funcions. Els STATs un cop activats entren al nucli per iniciar la transcripció dels seus gens diana, entre els que es troben diversos gens proinflamatoris, així com gens que codifiquen per a altres factors de transcripció, com el C/EBP δ (Bromberg i Darnell, 2000)

AP-1

L'AP-1 és una família de factors de transcripció en la que s'inclouen c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1 i Fra2. Són factors de transcripció de resposta ràpida (menys de 30 min) que s'activen per fosforilació i formen dímers per unir-se al DNA. El seu paper en micròglia no està gaire estudiat, tot i que es coneix que la seva expressió augmenta en resposta a LPS o IFN- γ , i que es poden unir al promotor de COX-2, IL-6 i TNF- α entre d'altres (Herdegen i Waetzig, 2001; Waetzig i Herdegen, 2004).

CREB

El CREB és un factor de transcripció que s'activa en resposta a senyals proinflamatoris i té llocs d'unió als promotors dels gens de la COX-2 i la iNOS entre d'altres, però pot actuar com a repressor o activador de la transcripció (Levi i cols. 1998; Mayr i Montmini, 2001).

NF-κB

Estructura

La família de factors de transcripció NF-κB és una de les més importants i més ben estudiades en l'activació microglial. Està implicada en la regulació d'una gran quantitat de gens, i la majoria de mediadors inflamatoris tenen un lloc d'unió per a NF-κB als promotors dels seus gens. Aquesta família de factors de transcripció té diversos membres, entre els que s'inclouen p65 (també anomenat RelA), p50, p105, p52, p100, RelB i c-Rel, i per unir-se al DNA interaccionen entre ells, amb altres membres de la família o amb membres d'altres famílies de factors de transcripció (Verma i cols. 1995).

La seva estructura es compon d'un domini aminoterminal, que conté les regions de dimerització, la de localització nuclear i la d'unió al DNA, i un domini carboxiterminal, anomenat domini de transactivació, que permet el reclutament de la maquinària transcripcional i per tant activa la transcripció gènica. Aquest darrer domini però, només el tenen alguns membres de la família, com p65, c-Rel i RelB. La resta de membres es poden unir al DNA però no activen la transcripció; d'aquesta manera actuen com a repressors transcripcionals, ja que tapen el lloc d'unió al promotor i no permeten la transcripció del gen (May i Ghosh, 1997).

Regulació

En condicions basals els factors de transcripció NF-κB es troben al citoplasma formant dímers, sent p65/p50 el dímer més comú i estudiat. Aquests dímers es troben units a una proteïna inhibidora que impedeix l'entrada del dímer al nucli. Hi ha diverses proteïnes inhibidores, que formen part de la família de proteïnes IκB. Quan hi ha un estímul activador, IκB és fosforilada i degradada pel proteosoma, alliberant el dímer, que pot entrar al nucli activant la transcripció. Aquest mecanisme de regulació permet que la resposta de NF-κB pugui ser molt ràpida, ja que no cal una síntesi *de novo* del factor de transcripció, sinó que només ha de translocar al nucli (Li i Verma, 2002).

Mecanisme d'activació

El NF-κB s'activa en resposta a diversos estímuls, però hi ha 3 mecanismes majoritaris de receptor-transducció de senyal per activar-lo (veure figura 17): els TLR (de l'anglès *Toll-Like Receptors*), el TNFR1 i l'estimulació per cèl·lules T, tot i que aquest últim és molt poc rellevant a la micròglia. El mecanisme més ben caracteritzat és el de TLRs; els TLRs formen part dels receptors de reconeixement de patró (PPRs), encarregats de reconèixer i respondre a estímuls concrets com components bacterians o virals, tot

i que també poden reconèixer elements endògens del SNC. Un dels models més utilitzats per estudiar l'activació microglial *in vitro* és l'administració de LPS, un component de la paret dels bacteris Gram negatius. El LPS s'uneix al receptor TLR4, que recluta la molècula adaptadora MyD88, iniciant una senyalització intracel·lular que portarà a la fosforilació de I κ B i l'entrada dels dímers NF- κ B al nucli. Les citocines també poden activar NF- κ B. Quan TNF- α o IL-1 s'uneixen als seus receptors s'activa una via de transducció en la que hi ha implicades proteïnes de la família AP-1, que acaba induint la fosforilació de I κ B, permetent així la translocació de NF- κ B al nucli (Li i Verma, 2002).

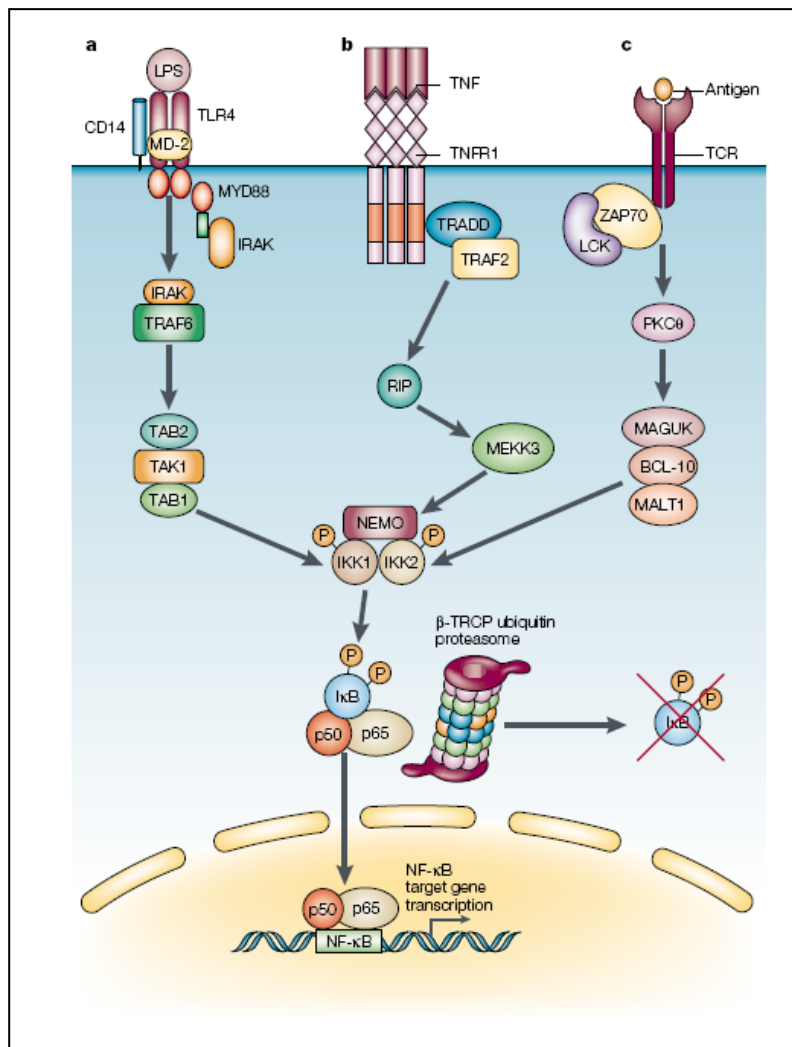


Figura 17. Mecanismes d'activació de NF κ B i la seva transducció de senyal. Li i Verma, 2002

Gens diana

Entre els gens diana de NF- κ B trobem citocines inflamatòries com IL-6 i TNF- α , quimiocines, molècules d'adhesió i enzims proinflamatoris com la COX-2 i la iNOS (O'Neill i Kaltschmidt, 1997).

C/EBPs

La família de factors de transcripció C/EBPs està implicada en la regulació de l'activació microglial, ja que, al igual que NF- κ B, té llocs d'unió als promotors de la majoria de gens proinflamatoris. Tot i això, aquests factors de transcripció han estat menys estudiats en inflamació i es coneix poc sobre el seu paper al SNC.

Estructura

Els C/EBPs pertanyen a la família de les proteïnes *b-zip*, a la que també pertanyen AP-1 i CREB. S'han descrit 6 membres de la família: C/EBP α , β , δ , γ , ϵ i ζ . Tots els membres presenten una estructura conservada, formada per dos dominis, el *b-zip* i el de transactivació. El domini *b-zip* està format per les regions d'unió al DNA i una regió de dimerització (la cremallera de leucines) formada per repeticions de 4 o 5 leucines, i que permet als C/EBPs formar dímers, ja siguin homodímers o heterodímers amb altres membres de la família, com C/EBP β/δ (Ejarque-Ortiz et al. 2010) o amb membres d'altres famílies de factors de transcripció com AP-1 (Hsu i cols. 1994). El domini de transactivació és present a tots els membres excepte a C/EBP γ , considerat per tant un repressor transcripcional, ja que s'uneix al DNA però no pot activar la transcripció. La seqüència aminoacídica d'aquest domini és més variable i poc conservada entre els diferents C/EBPs (Ramji i Foka, 2002).

Funcions fora del SNC

Els C/EBPs participen en diferents funcions fora del SNC. Una de les més estudiades és el paper en la diferenciació cel·lular: s'ha descrit un paper de diversos membres de la família en la diferenciació i maduració de macròfags, adipòcits i hepatòcits entre d'altres (Ramji i Foka, 2002). També estan implicats en la proliferació cel·lular, sent-ne C/EBP α un inhibidor i C/EBP β un activador. Donada la seva importància en la regulació de la proliferació, mutacions en els seus gens estan associades a l'aparició de tumors (Pabst i cols. 2001; Zhou i cols. 2001). Una altra funció destacada dels C/EBPs és la regulació del metabolisme. Els ratolins deficientes per a C/EBP β perden la capacitat de mobilitzar i metabolitzar el glicogen del fetge, i molts moren en fases embrionàries per aquesta causa (Liu i cols. 1999). Per últim, els C/EBPs estan implicats en la resposta inflamatòria, sent molt importants en la resposta immunitària

desencadenada pels macròfags i també als hepatòcits, regulant la resposta de la fase aguda hepàtica (Akira, 1997; Schrem i cols. 2004).

Funcions al SNC

La presència dels C/EBPs s'ha descrit a neurones, on s'ha relacionat amb processos com la neurogènesi (Paquin i cols. 2005), la memòria (Taubenfeld i cols. 2001) i la regulació dels cicles circadians (Zak i cols. 2006), i a les cèl·lules gials, on s'ha relacionat amb la resposta inflammatòria, ja que responen a l'activació per citocines proinflamatòries (Cardinaux i cols. 2000). A més, hi ha seqüències d'unió per a C/EBPs als gens que codifiquen per a IL-1 β , TNF- α , iNOS i COX-2 entre d'altres (Ramji i Foka, 2002). El nostre grup ha demostrat la implicació de C/EBP α , C/EBP β i C/EBP δ en l'activació glial, mostrant que estímuls com el LPS o la mort neuronal induïda per excitotoxicitat modulen l'expressió dels C/EBPs a astròcits i micròglia (Pérez-Capote i cols. 2006; Ejarque-Ortiz i cols 2007a, 2007b, 2010). Donada la seva rellevància en els estudis realitzats a aquesta tesi, descriuré amb més profunditat el paper de C/EBP β i δ a la micròglia (per a esquema, veure figura 18).

- C/EBP β

El C/EBP β presenta tres isoformes, una de 38 KDa anomenada Full, una de 35 KDa anomenada LAP (de l'anglès *Liver-enriched Activating Protein*) i una de 20 KDa anomenada LIP (de l'anglès *Liver-enriched Inhibitory Protein*). Full i LAP presenten l'estructura complerta dels C/EBPs, mentre que a LIP li falta el domini d'activació; es tracta doncs d'un repressor transcripcional, ja que es pot unir al DNA però no activa la transcripció. En resposta a un estímul proinflamatori s'activa la transcripció de Full i LAP, i quan la resposta inflammatòria ha de finalitzar, i per evitar una sobreactivació, es sintetitza LIP, que s'uneix a Full i LAP impedit que segueixin transcrivint gens proinflamatoris.

La regulació de C/EBP β és molt complexa, d'una banda es pot regular a nivell transcripcional, sintetitzant proteïna *de novo* mitjançant la unió de diferents factors de transcripció al seu promotor. S'han descrit seqüències d'unió al promotor de C/EBP β per a CREB i també de C/EBPs, el que permet una autoregulació de la transcripció. D'altra banda, també es regula a nivell posttranscripcional, mitjançant fosforilació, acetilació o sumoilació, però no està clara la importància que tenen aquestes modificacions posttraduccionals en l'activació de C/EBP. Així per exemple, la fosforilació de determinats residus disminueix la unió de C/EBP β , mentre que és necessari que residus concrets estiguin fosforilats per a què C/EBP β es pugui unir als promotors d'alguns gens (revisat a Ramji i Foka, 2002). El mateix es pot dir de la

regulació mitjançant acetilació (Nerlov, 2008). La sumoilació sembla actuar com a mecanisme repressor de l'activitat de C/EBP β , a més de disminuir la interacció de C/EBP β amb altres proteïnes.

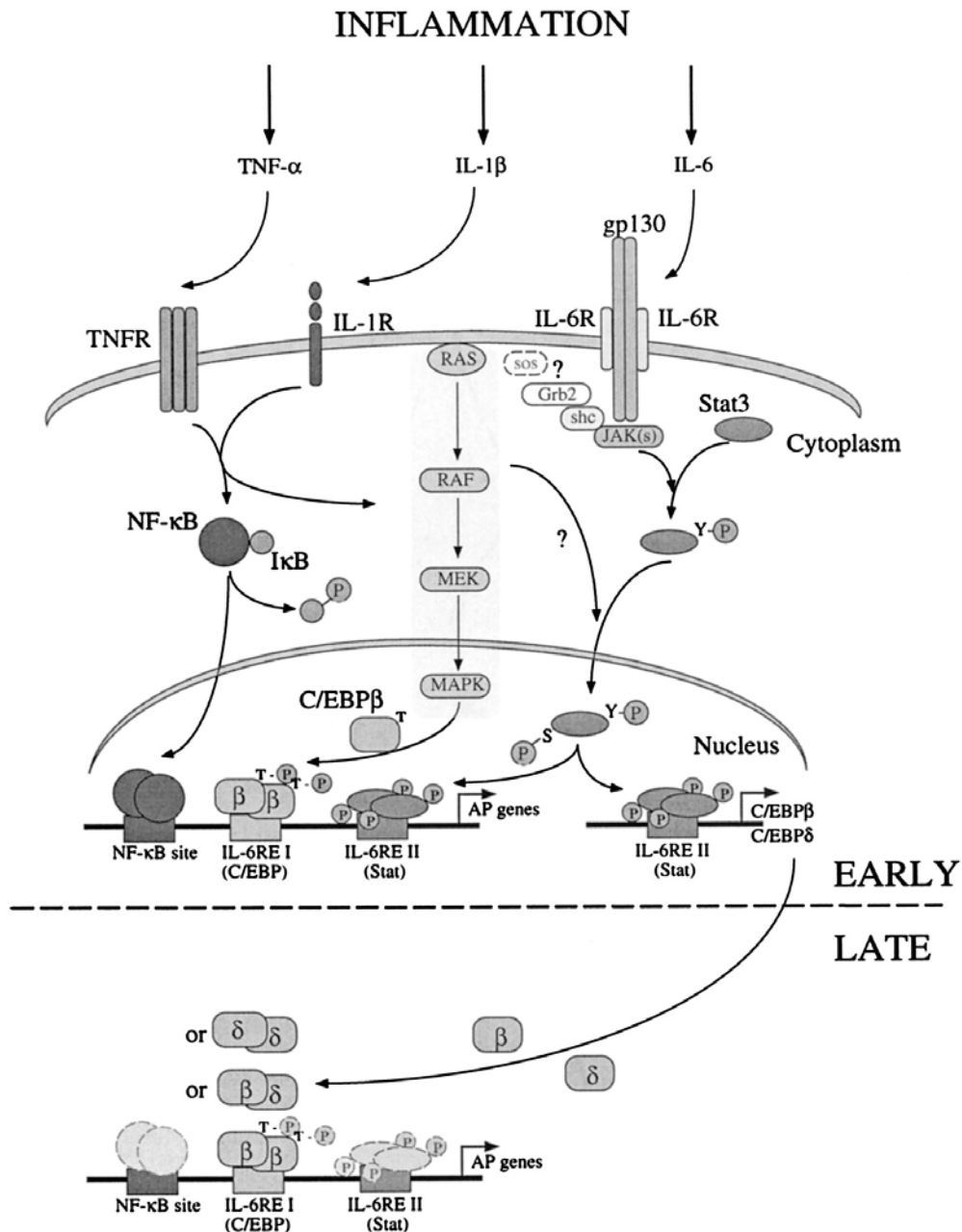


Figura 18. Inducció seqüencial del C/EBP β i δ en resposta a un estímul proinflamatori. Poli, 1998

El C/EBP β s'activa en resposta a estímuls proinflamatoris, i també està relacionat amb situacions patològiques. S'ha descrit un augment de C/EBP β en cervells de pacients de malaltia d'Alzheimer (Colangelo i cols. 2002), i també s'ha demostrat que a animals deficients en C/EBP β el dany causat per isquèmia i per excitotoxicitat és menor (Kapadia i cols. 2006; Cortes-Canteli i cols. 2008)

- C/EBP δ

El C/EBP δ només presenta una isoforma de 32 KDa. A diferència de C/EBP β , la seva expressió basal és gairebé indetectable, i es sintetitza *de novo* en resposta a un estímulo. El seu promotor té llocs d'unió per a STAT-3, NF- κ B i CREB per a la iniciació de la transcripció (Liu i cols. 2007) i per a Sp1, que regula l'expressió basal de C/EBP δ (Zhang i cols. 2007). També s'han descrit llocs d'unió per a C/EBPs, que s'han relacionat amb una resposta transcripcional més tardana (Yamada i cols. 1998). A nivell posttranscripcional s'ha descrit fosforilació per part de p38, però no està clar quin paper juga en la regulació de la proteïna (Svetelis i cols. 2005).

La funció de C/EBP δ al SNC es coneix molt poc. Es sap que està augmentat en cervells de pacients de malaltia d'Alzheimer (Li i cols. 2004), i el nostre grup ha demostrat que la seva expressió a la micròglia i els astròcits s'incrementa en resposta al LPS, unint-se al promotor de la COX-2 (Ejarque-Ortiz i cols. 2010).

1.3.5 LA RESPOSTA MICROGLIAL A LA MORT NEURONAL

La micròglia és l'encarregada de fagocitar les cèl·lules mortes al SNC. Se sap però que la fagocitosi de cèl·lules que han mort per necrosi o per apoptosi indueix respostes molt diferents a la micròglia.

Apoptosi

L'apoptosi és un procés de mort programada, altament regulat. Se l'anomena "mort neta", ja que no s'alliberen components intracel·lulars al medi, i s'activa un sistema de senyalització que promou la fagocitosi sense activació proinflamatòria de la cèl·lula fagocítica (macròfags o micròglia). Els clàssics marcadors de l'apoptosi són: l'arrodoniment de la cèl·lula, la formació de vesícules intracel·lulars (majoritàriament d'autofàgia), la condensació de la cromatina, la fragmentació del DNA i la translocació de la fosfatidilserina de la part interna a la part externa de la membrana cel·lular (Bredesen i cols. 2006). Tots aquests canvis estan regulats per l'activació de la cascada intracel·lular de les caspases.

Les caspases són enzims de la família de cisteïna proteases que es sintetitzen en forma de proenzim, i necessiten ser proteolitzades per esdevenir enzims actius; en alguns casos les caspases poden autoregular la seva activació. Les caspases es classifiquen en dos

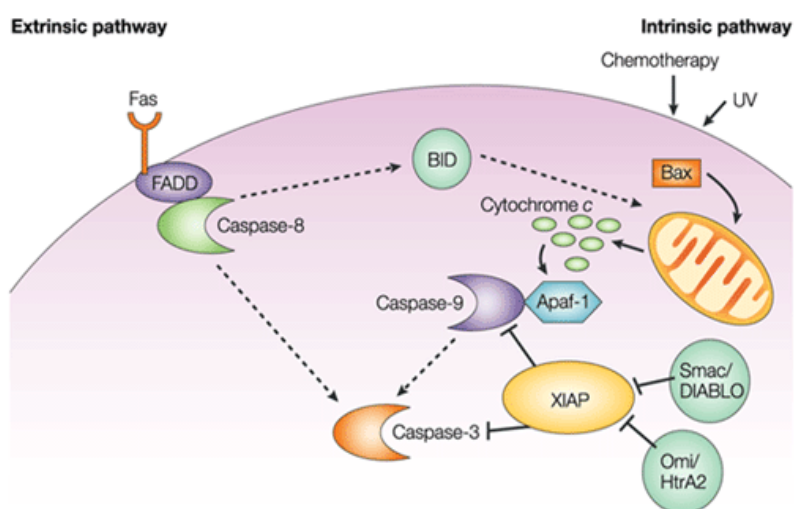


Figura 19. Vies de senyalització de l'apoptosi. Salvesen i Duckett, 2002.

tipus: les activadores i les efectores (Thornberry i Lazebnik, 1998). Quan hi ha un estímul proapoptòtic s'activa la via de les caspases (veure figura 19). Si l'estímul és degut a un dany a la pròpia cèl·lula (dany al DNA o a la cadena respiratòria mitocondrial) s'activarà la via intrínseca, si és per un senyal extern (com el FasL) s'activarà la via extrínseca. Totes dues vies, mitjançant proteïnes adaptadores, activaran les caspases iniciadores (la caspasa 9 en la via intrínseca i la 8 en la via extrínseca). Aquestes proteolitzaran les procaspases efectores (com la caspasa 3 i la caspasa 7), convertint-les en enzims actius, que s'encarregaran d'inactivar els inhibidors de l'apoptosi, de desassemblar les estructures cel·lulars i modular l'activitat d'algunes proteïnes cel·lulars (Thornberry i Lazebnik, 1998).

Moltes malalties neurodegeneratives cursen amb apoptosi neuronal, induïda per acumulacions proteiques extracel·lulars, inhibició de la cadena respiratòria mitocondrial, entrada massiva de calci, excitotoxicitat, o activació del receptor de mort (FADD), entre d'altres (Bredesen i cols. 2006). L'apoptosi al SNC, però, també es dona de forma fisiològica; un dels processos que impliquen apoptosi massiva és el desenvolupament. Durant la formació del SNC hi ha una alta densitat de població neuronal, però només aquelles neurones que formin sinapsis funcionals sobreviuran, i la resta entren en apoptosi. La micròglia és l'encarregada de fagocitar aquestes neurones, sense que hi hagi un augment en l'alliberament de factors proinflamatoris (Bessis i cols. 2007).

La micròglia expressa receptors *scavenger*, que són els encarregats d'iniciar la fagocitosi de les neurones apoptòtiques. Per la seva banda, les cèl·lules apoptòtiques expressen marcadors, coneguts com *eat-me signals*, que permeten a la micròglia reconèixer-les i fagocitar-les; a més, desapareixen les senyals inhibidores de fagocitosi, les *don't eat-me signals*. Una de les *eat-me signals* més coneguda és la fosfatidilserina, que pot ser detectada per diversos receptors microglicals, com la integrina de membrana vitronectina, el receptor de fosfatidilserina o el receptor tirosina cinasa MER (Witting i cols. 2000). Les parelles receptor microglial-ligand neuronal Fas/FasL i TNFR-1/TNF també juguen un paper en el reconeixement de les neurones apoptòtiques per part de la micròglia (Griffiths i cols. 2009). La fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques disminueix la resposta inflamatòria, disminuint la secreció de citocines proinflamatòries com la IL-1 β i el TNF- α , incrementant la secreció de citocines antiinflamatòries, com la IL-10 o el TGF β , a més de factors de creixement, promovent així al reparació tissular i reduint la inflamació (Huynh i cols. 2002; Golpon i cols. 2004; Chung i cols. 2006).

Necrosi

Al contrari que l'apoptosi, la necrosi és un procés de mort que s'associa amb un dany ràpid, que dona lloc a una desintegració de la cèl·lula i a l'alliberament del seu contingut al medi extracel·lular (Griffiths i cols. 2009). La figura 20 mostra una imatge de microscòpia electrònica d'una cèl·lula apoptòtica i una necròtica, i s'observen clarament les diferències entre ambdues.

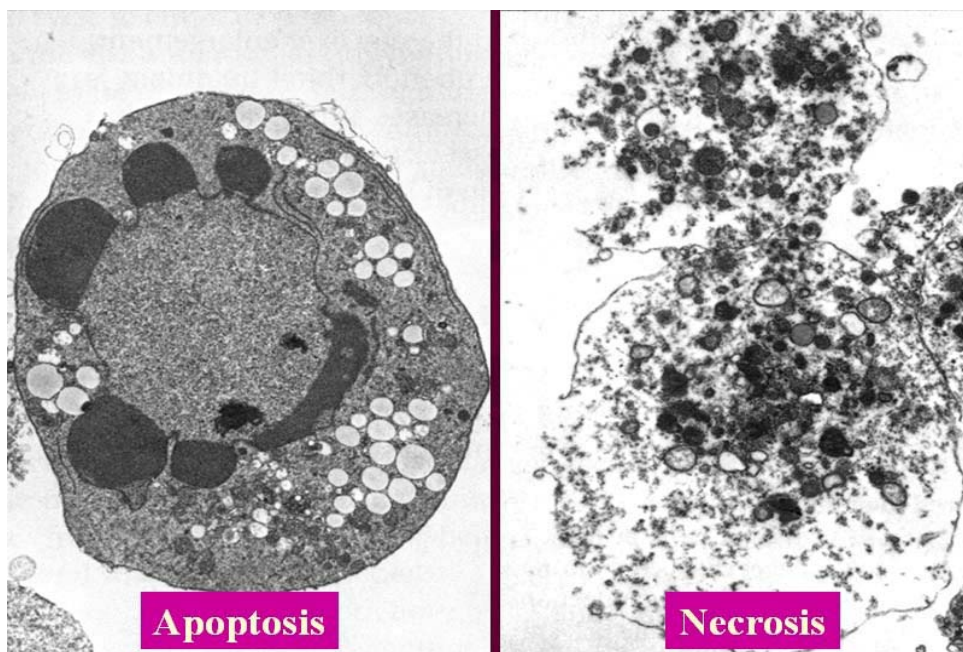


Figura 20. Imatges de microscopia electrònica d'una cèl·lula apoptòtica i una necròtica. Plana web Cell biology.

Donat que, com ja s'ha comentat anteriorment, l'apoptosi és un procés clarament caracteritzat, quan es donen alguns dels processos establerts com a marcadors apoptòtics (fragmentació de DNA, condensació de cromatina, vesícules d'autofàgia) es parla d'una mort apoptòtica. En absència d'aquests marcadors, s'acostuma a assumir que una mort no apoptòtica és necròtica. En la literatura però, hi ha molts autors reticents a parlar de necrosi, i freqüentment s'usen en canvi termes com mort per excitotoxicitat o mort per estrès oxidatiu. Donat que la necrosi no és un procés regulat, no s'esdevé un patró de resposta programat com el de l'apoptosi. Tot i això es poden observar alteracions similars a les que s'observen a la mort apoptòtica. A la necrosi es poden produir danys al mitocondri, es reorganitza el citoesquelet i s'exposen elements intracel·lulars a la membrana externa per tal de ser reconeguts pels receptors de la micròglia. També s'observa una condensació de la cromatina, però sense fragmentació del DNA (Bano i Nicotera, 2007).

Al SNC s'ha descrit la presència de neurones necròtiques després d'un dany isquèmic o d'un traumatisme cranial (Shear i cols. 2002; Knoblach i cols. 2004; Bano i Nicotera, 2007), així com en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (Suzuki, 1997).

El procés de reconeixement de les cèl·lules necròtiques per part de la micròglia no es coneix tant com en el cas de l'apoptosi. Les cèl·lules necròtiques secreten *heat shock proteins* i fibrinogen, que són lligands endògens dels TLRs (Li i cols. 2001). De fet, la micròglia de ratolins deficientes per a MyD88, la molècula adaptadora dels TLRs, tenen una activació disminuïda en resposta a la presència de cèl·lules necròtiques (Pais i cols. 2008). L'activació dels TLRs pels factors alliberats per les neurones necròtiques induïx una pujada de NF- κ B (Basu i cols. 2000), que dóna lloc a la transcripció de gens proinflamatoris. Així, la micròglia s'activa incrementant l'expressió de diversos marcadors proinflamatoris com el MHC II, el CD11b, IL-6, TNF- α , iNOS i COX-2.

Es creu que la mort per necrosi té conseqüències perjudicials per a les cèl·lules veïnes i que esdevé només quan no es pot posar en marxa el programa d'apoptosi, per exemple com a conseqüència d'un estímul molt fort i sobtat (McHugh i Turina, 2006).

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

Donat el seu efecte perjudicial i neurotòxic, l'activació microglial es contempla com una diana terapèutica en processos neuroinflamatoris crònics, com per exemple les malalties neurodegeneratives. La modulació de l'activació microglial es pot abordar com a mínim mitjançant dues estratègies; d'una banda es poden reforçar els senyals inhibidors que mantenen la micròglia en estat quiescent, de l'altra es poden inhibir els mecanismes implicats en l'activació proinflamatòria. En ambdós casos el resultat és la inhibició de l'activació microglial, el que pot ser molt útil en la teràpia dels trastorns neurològics que cursen amb neuroinflamació.

1.4.1 PREVENCIÓ DE L'ACTIVACIÓ GLIAL

Com s'ha explicat en anteriors apartats, al SNC en condicions fisiològiques hi ha un ambient immunodepressor, que manté la micròglia en un estat de vigilància però sense activació. Això és possible gràcies a la presència de senyals inhibidores *off*, com el CD200. En els darrers anys han aparegut diversos treballs en la literatura que es centaven en l'estudi d'aquestes molècules com a dianes terapèutiques. S'ha vist que activant la seva senyalització es pot inhibir l'activació microglial, fet que alleuja la simptomatologia i enlenteix la progressió de la patologia a models animals de malalties neurodegeneratives (Takahashi i cols. 2007; Liu i cols.2010).

Treballs realitzats *in vitro* amb macròfags cocultivats amb neurones demostren que la interrupció de la senyalització CD200-CD200R usant anticossos bloquejants del receptor augmenta la producció de IL-6 dels macròfags en resposta al IFN- γ , així com la neurotoxicitat associada (Meuth i cols. 2008). A més, Lyons i cols. (2007a) van demostrar que l'expressió del CD200 a l'hipocamp es troba disminuïda en ratolins envellits i aquesta baixada s'acompanya d'un augment de l'expressió de MHC II a la micròglia, és a dir, un augment de l'activació microglial. Aquests efectes també s'observen després del tractament amb A β , tan *in vivo* com *in vitro*. L'activació microglial induïda per l'A β (producció de IL-1 β , IL-6 i TNF- α) disminueix en presència de neurones. Aquest efecte és degut a la presència de CD200, ja que si aquest es bloqueja les neurones no són capaces d'inhibir l'activació glial. L'efecte proinflamatori de l'A β també es reverteix al tractar amb la interleucina antiinflamatòria IL-4 (Lyons i cols. 2007b). Una vegada més, CD200 està implicat en aquesta resposta, ja que la IL-4 augmenta la seva expressió (Lyons i cols. 2007a). Aquestes dades demostren la importància de CD200 en la modulació de la resposta microglial i de la neuroinflamació.

Hoek i cols (2000) van caracteritzar la resposta inflamatòria en ratolins deficients en CD200. En aquests ratolins hi ha més cèl·lules microgials i aquestes es troben basalment més activades (tenen una major expressió de CD45 i CD11b). Quan es secciona el nervi facial d'aquests animals la resposta de la micròglia és molt més ràpida, ja que la presència de micròglia activada envoltant a les neurones danyades es detecta molt abans als animals deficients en CD200 que en els no deficients. En aquest mateix sentit, en els ratolins deficients en CD200 als que s'indueix EAE, un model de malaltia autoimmune desmielinitzant, la malaltia progressa més ràpidament que als ratolins no deficients. Un altre model per estudiar el paper de CD200-CD200R és el bloqueig de la senyalització usant anticossos bloquejants del receptor. Al tractar amb aquests anticossos animals als que s'ha induït EAE s'observa un empitjorament de la simptomatologia de la patologia i un augment de la infiltració de limfòcits T i macròfags (Wright i cols. 2000; Meuth i cols. 2008). El paper del CD200 també s'ha estudiat usant ratolins *Wld^s*, els quals presenten una mutació al gen *Wld* que resulta en una alta resistència al dany neuronal (Mack i cols. 2001). Quan se'ls indueix EAE aquests ratolins presenten un retard en l'aparició dels símptomes i un curs menys sever de la patologia. A més, en un model de neurotoxicitat induïda per activació microglial (usant cocultius neurona-micròglia tractats amb LPS) la mort de les neurones *Wld^s* és molt menor a la de les neurones que no contenen la mutació. Aquesta resistència al dany neuronal està relacionada amb el CD200, ja que les neurones *Wld^s* tenen una major expressió de CD200 que les neurones que no contenen la mutació. El bloqueig de la senyalització CD200-CD200R usant anticossos bloquejants per a CD200 inhibeix la resistència de les neurones *Wld^s* a la neurotoxicitat induïda per micròglia activada i al dany axonal induït per la EAE (Chitnis i cols. 2007).

La interacció CD200-CD200R també es pot modular en sentit contrari, és a dir, es poden usar agonistes del receptor per incrementar la senyalització. El tractament de macròfags amb aquests agonistes redueix la producció de citocines proinflamatòries induïda per el IFN- γ , però no té efecte sobre la produïda amb LPS (Jenmalm i cols. 2006). L'administració d'anticossos agonistes de CD200R1 disminueix la capacitat presentadora d'antígens de la micròglia, així com la seva activació. Aquests efectes també s'observen a ratolins als que s'ha induït EAE, en els que a més, s'inhibeix la infiltració de micròglia i macròfags a la lesió, atenuant els símptomes de la patologia (Liu i cols.2010).

1.4.2 INHIBICIÓ DE L'ACTIVACIÓ GLIAL

L'activació de la micròglia es pot modular inhibint els mediadors proinflamatoris, ja siguin factors de transcripció com NF- κ B, C/EBPs o STATs, enzims com iNOS, COX-2 o NADPH oxidasa, o citocines com TNF- α , IL-1 β o IL-6. Per fer-ho, actualment es disposa d'inhibidors farmacològics, siRNAs o ratolins deficients per a la majoria d'aquests factors. A més dels inhibidors selectius, hi ha molècules presents a la natura que s'han usat en la medicina tradicional pel seu efecte antiinflamatori a nivell sistèmic que també poden actuar a nivell central inhibint l'activació de la micròglia. A nivell terapèutic aquests compostos presenten els avantatges de poder ser ingerits a la dieta i de poder inhibir la inflamació actuant de forma més global, ja que sovint inhibeixen l'activació de més d'un factor inflamatori.

Els flavonoides

Els flavonoides són un grup de compostos polifenòlics que es troben de forma ubiqua a les plantes. A la dieta humana els fonts principals de flavonoides són la fruita, les verdures, els cereals i el vi (Manach i cols. 2004). L'estructura química dels flavonoides consisteix en un anell benzènic (B) i 2 benzopirènic (A i C) amb diverses modificacions (veure figura 21). Els flavonoides es classifiquen en 6 grups, en funció del grau d'oxidació dels carbonis i la hidroxilació a la posició 3: flavonols, flavones, isoflavones, flavonones, flavonols i antocianines (Vafeiadou i cols. 2007). En ser ingerits els flavonoides són sotmesos al metabolisme intestinal i hepàtic, que permetrà la seva absorció a la sang arribant així als diferents teixits. En el cas del SNC, no tots els flavonoides poden travessar la barrera hematoencefàlica, ja que dependrà del grau de lipofilitat que presentin (Youdim i cols. 2003, 2004).

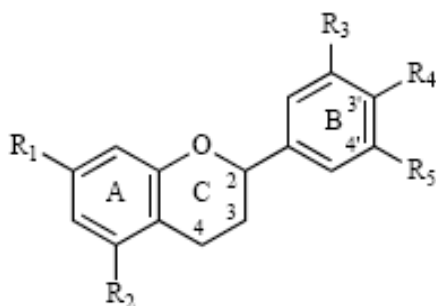


Figura 21. Estructura química genèrica dels flavonoides

Els flavonoides han estat clàssicament utilitzats pel seu efecte antioxidant i antiinflamatori, però és coneix molt poc sobre el mecanisme d'acció d'aquests compostos. Hi ha alguns treballs que proposen que aquest efecte podria estar mediat per la inhibició de COX-2 i iNOS (revisat per Yoon i Baek, 2005). Es desconeix quines serien les molècules

implicades en aquesta inhibició, però hi ha un estudi realitzat en macròfags de la línia RAW 264.7 que demostra que els flavonoides crisina, apigenina i caemferol inhibeixen

COX-2 i iNOS mitjançant l'activació dels receptors intracel·lulars PPARs (de l'anglès *peroxisome proliferator agonist receptors*) (Liang i cols. 2001).

Hi ha alguns treballs publicats sobre l'efecte dels flavonoides al SNC. Inaiami i cols. (1998) van demostrar que l'administració de catecina és neuroprotectora en un model de mort per estrès oxidatiu, i Luo i cols. (2002) van mostrar l'efecte beneficiós d'un flavonoide derivat del *Ginkgo biloba* a un model de malaltia d'Alzheimer. Treballs realitzats usant línies cel·lulars o cultius primaris de micròglia han mostrat que els flavonoides fisetina (Zheng i cols. 2008) i baicaleïna (Suk i cols. 2003; Chen i cols. 2004) inhibeixen l'activació microglial (TNF- α , NO, PGE₂ o COX-2). A més, la inhibició de l'activació microglial amb silimarina (Wang i cols. 2002), fisetina (Zheng i cols. 2008), wogonina (Lee i cols. 2003) o baicaleïna (Li cols. 2005) pot tenir efecte neuroprotector en diferents models de neurotoxicitat. No està clar quines vies de senyalització i factors de transcripció són els responsables dels efectes dels flavonoides sobre l'activació microglial. Alguns autors han mostrat l'efecte inhibitor d'alguns flavonoides sobre els factors de transcripció de les famílies AP-1 (Chen i cols. 2004) i NF- κ B (Wang i cols. 2002; Lee i cols. 2003; Suk i cols. 2003; Chen i cols. 2004). Dos treballs proposen un efecte dels flavonoides baicaleïna i crisina inhibint la unió al DNA dels C/EBPs, concretament de C/EBP β (Chen i cols. 2004; Woo i cols. 2005).

Crisina

La crisina és un flavonoide del grup de les flavones que s'extreu de l'*Oroxylum indicum* (veure figura 22). Tot i que s'usa de fa molts anys a la medicina tradicional pels seus efectes antiinflamatoris i antioxidants, s'han fet pocs estudis per avaluar el seus efectes i els mecanismes d'acció implicats. Els estudis realitzats amb aquesta molècula s'han centrat en el seu paper antitumoral (Tobin i cols. 2006; Khoo i cols. 2010), a més del seu efecte inhibitor de la inflamació, mediat pel decrement de COX-2 i iNOS a macròfags (Cho i cols. 2004). Només s'ha publicat un treball sobre l'efecte de la crisina a les cèl·lules de la micròglia, usant la línia cel·lular BV2, en el que observen una baixada de iNOS, TNF- α i IL-1 β induïts per LPS (Ha i cols. 2010).



Figura 22. *Oroxylum indicum*, planta de la que s'extreu la crisina. Plana web Wikipedia.

Es coneix molt poc sobre el mecanisme d'acció de la crisina. Se sap que aquesta molècula interacciona amb els receptors intracel·lulars PPARs (Liang i cols. 2001) i amb AhR (de l'anglès *aryl hydrocarbon receptor*), un factor de transcripció activat per lligand implicat en la inhibició de la resposta inflamatòria (Van der Heiden i cols. 2009). Un treball realitzat en macròfags mostra que la crisina inhibeix la unió de C/EBP β al DNA (Woo i cols. 2005) i recentment s'ha publicat un treball usant la línia microglial BV2 que mostra que la crisina pot inhibir l'activació de NF- κ B i JNK (de l'anglès *c-Jun N-terminal kinase*) (Ha i cols. 2010).

2. OBJECTIUS

El **primer objectiu** és establir i caracteritzar un model in vitro de neuroinflamació. Aquest objectiu inclou:

1a. Caracteritzar el patró d'activació microglial a cultius tractats amb un estímul proinflamatori a partir de la determinació de diferents paràmetres, com la producció d'òxid nítric i citocines proinflamatòries, i l'expressió d'enzims i factors de transcripció implicats en la resposta inflamatòria.

1b. Establir un model de cocultiu de neurones i micròglia on estudiar la neurotoxicitat induïda per activació microglial. Caracteritzar el model mitjançant l'avaluació de la viabilitat neuronal i la producció de factors proinflamatoris. Estudiar quins d'aquests factors són els principals mediadors de l'efecte neurotòxic.

El **segon objectiu** és estudiar el paper dels factors de transcripció C/EBPs en l'activació microglial i la neurotoxicitat associada. Els C/EBPs participen en la regulació de l'expressió de molts dels gens implicats en la resposta proinflamatòria de la micròglia activada. La nostra hipòtesi és que la inhibició d'aquests factors de transcripció disminuiria aquesta resposta i tindria un efecte neuroprotector. Per validar aquesta hipòtesi ens plantejem:

2a. Avaluar el possible efecte antiinflamatori i neuroprotector del flavonoide crisina. Estudiar la implicació dels C/EBPs en el mecanisme d'acció d'aquest compost.

2b. Estudiar l'efecte de l'absència de C/EBP β o C/EBP δ en la neurotoxicitat induïda per activació microglial, mitjançant la utilització de micròglia de ratolins deficientes en C/EBP β o C/EBP δ .

El **tercer objectiu** és estudiar d'una banda quins estímuls poden modular l'expressió de CD200 a les neurones i de l'altra quin és el paper de CD200 i CD200R en la modulació de l'activació microglial per part de les neurones. En condicions basals, l'activació de la micròglia és inhibida per una sèrie de senyals neuronals entre les que es troba la parella lligand-receptor CD200-CD200R. La nostra hipòtesi és que aquesta senyalització és important per establir si un determinat estímul indueix o no una resposta proinflamatòria a la micròglia, i que modulant l'activació de CD200R es pot inhibir la sobreactivació microglial que té com a conseqüència un efecte neurotòxic. Per abordar el present objectiu el que farem serà:

3a. Establir un model de mort neuronal apoptòtica i un model de mort neuronal necròtica per excitotoxicitat.

3b. Estudiar quins estímuls són capaços de modular l'expressió de CD200, centrant-nos d'una banda en fenòmens de mort neuronal i de l'altra en estímuls proinflamatoris.

3c. Estudiar l'efecte de la modulació de la senyalització CD200-CD200R sobre l'activació microglial i la neurotoxicitat associada.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 CULTIUS

3.1.1 PLAQUES I FLASCONS DE CULTIUS

Tipus de placa	Proveïdor	Referència	Volum
Placa de 96 pous	Nunc	167008	0,1 mL/pou
Placa de 48 pous	Nunc	150687	0,3 mL/pou
Placa de 6 pous	Nunc	40675	2 mL/pou
Flascó T25	TPP	90025	5 mL
Flascó T75	TPP	90075	15 mL
Flascó T150	TPP	90150	30 mL

3.1.2 CULTIU DE LA LÍNIA CEL·LULAR MICROGLIAL MURINA BV2

La línia murina de micròglia BV2 va ser cedida per la Dra. Elisabetta Blasi (Azienda Ospedaliero-Universitaria, Modena, Itàlia). Aquesta línia cel·lular va ser generada a partir de micròglia primària transfectada amb l'oncogen v-raf/v-myc (Blasi i cols. 1990).

a) Material

Reactius utilitzats

Tipus de producte	Producte	Proveïdor	Referència	Concentració final
Medi	RPMI 1640	Invitrogen	21875-034	---
Suplements	Sèrum fetal boví	Invitrogen	10270-106	10%
	Penicil·lina-estreptomicina	Invitrogen	15140-114	0.1%

-Medi de cultiu: RPMI 1640 complementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS, de l'anglès *foetal bovine serum*) i 0,1% de penicil·lina/estreptomicina (P/S, de l'anglès *peniciline/streptomycin*).

-Plaques de cultiu

- * per a manteniment de la línia: flascons T25
- * per a immunocitoquímica, ELISA i avaluació de nitrits: plaques de 48 pous
- * per a extracció de proteïnes totals i RNA: plaques de 6 pous
- * per a extracció de proteïnes nuclears i cocultiu: flascons T75 o T150

-Pipetes serològiques, tubs Falcon.

- Rascadors (TPP ref. 99003).
- Càmera de Neubauer.
- Dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma ref. D2650).
- Criotubs.

b) Procediment

Manteniment

Les BV2 són cèl·lules amb una taxa de divisió molt alta i un metabolisme molt actiu. Cal fer canvis de medi cada 2 dies i un pas de sembrat per manteniment com a mínim 2 cops per setmana, sinó es desenganxen de la placa. La figura 23 mostra un cultiu confluent de BV2. Les cèl·lules es mantenen a 37°C amb un 5% de CO₂.

Com a la majoria de les línies cel·lulars, les propietats de les BV2 poden variar segons el número de passos de sembrat, però no hi ha un criteri establert sobre quin seria el número òptim ni el màxim. Nosaltres les hem utilitzat entre 3 i 25 passos de sembrat.

*Per fer el pas de sembrat:

- 1-Canviar el medi.
- 2-Aixecar les cèl·lules pipetejant contra la superfície de sembrat amb una pipeta serològica (no cal tripsinitzar).
- 3-Diluir 0,5 mL de la suspensió cel·lular amb 4,5 mL de medi fresc i posar-ho a un flascó T25 nou.

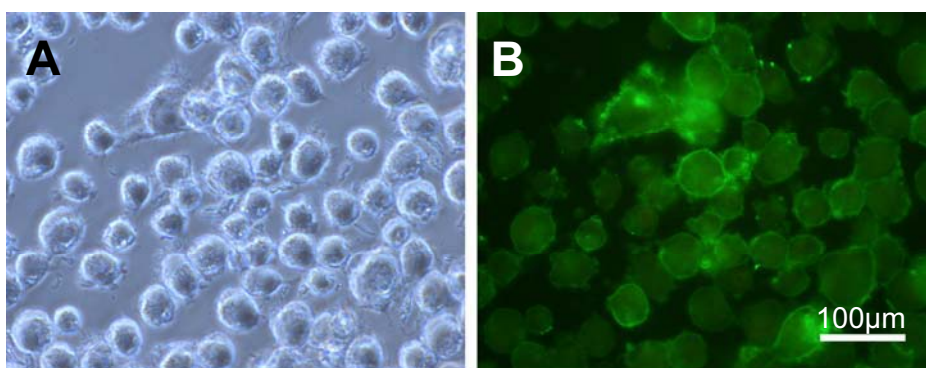


Figura 23. Imatge de les cèl·lules BV2 en camp clar (A) i marcades per immunofluorescència amb anticòs anti CD11b (B)

Sembrat

Per sembrar les cèl·lules en placa es van comptar i sembrar a una densitat coneguda: 10⁵ cèl·l/ml per a extracció de proteïnes i RNA, i 5x10⁴ cèl·l/ml per a avaluació del nitrit present al medi, ELISA i immunocitoquímica.

*Per sembrar:

- 1-Canviar el medi.
- 2-Aixecar les cèl·lules amb el rascador i resuspendre uniformement amb la pipeta serològica.
- 3-Posar 10 µL de suspensió cel·lular a cada una de les subcàmeres de la càmera de Neubauer.
- 4-Comptar els 4 quadrants de cada subcàmera
- 5-Calculat el número total de cèl·lules aplicant la fórmula:
$$\text{Núm. de cèl·lules} = (\text{promig de 8 quadrants}) \times 10^4 \times \text{mL de suspensió}$$
- 6-Ajustar a la densitat desitjada amb medi fresc i sembrar el volum corresponent (veure taula de l'apartat 3.1).

Congelació

- 1-Canviar el medi.
- 2-Preparar una suspensió cel·lular a 10^6 cèl·l/mL, seguint el protocol descrit a l'apartat de "sembrat".
- 3-Posar en un criotub 900 µL de suspensió cel·lular i 100 µL de DMSO. Posar-ho immediatament en gel.
- 4-Deixar 2 h a -80°C .
- 5-Passar els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

Descongelació

És molt important que una vegada tretes del tanc de nitrogen líquid les cèl·lules es mantinguin en neu carbònica fins la descongelació, i que una vegada descongelades el medi amb DMSO es canviï el més ràpid possible, ja que és molt tòxic i pot matar les cèl·lules.

- 1-Descongelar les cèl·lules en 25 mL de medi fresc temperat a 37°C .
- 2-Centrifugar 5 min a 200 g.
- 3-Resuspendre en 10 mL de medi fresc i sembrar en 2 T25.

*Una vegada descongelades, les cèl·lules tenen un metabolisme més actiu. Caldrà fer el canvi de medi i el pas de sembrat més sovint del que és habitual.

*Les cèl·lules es poden usar a partir del tercer pas de sembrat.

*És aconsellable recongelar cèl·lules del primer pas de sembrat per tal de conservar alíquotes emmagatzemades en nitrogen líquid.

3.1.3 CULTIUS PRIMARIS DE GLIA

Tots els experiments s'han dut a terme seguint les directrius del Consell de la Unió Europea (86/609/EU) i les regulacions del Govern Espanyol (BOE 67/8509-12, 1988) per a l'ús d'animals de laboratori, i van ser aprovats pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Reactius utilitzats

Tipus de producte	Producte	Proveïdor	Referència	Concentració final
Medi	DMEM:F-12	Invitrogen	31330-038	---
Suplements	Sèrum fetal boví (FBS)	Invitrogen	10270-106	10%
	Penicil·lina-estreptomicina	Invitrogen	15140-114	0,1000%
	<i>Fungizone</i> (AmfotericinaB)	Invitrogen	15290-018	0,1000%
Altres	Tripsina-EDTA 0,25% 1 mM	Invitrogen	25200-072	0,0625% / 0,2500%
	PBS	Sigma	P5368	---
	Desoxiribonucleasa I	Sigma	D5025	4 mg/mL

Cultiu de glia mixta de ratolí

Els cultius primaris de glia mixta s'obtenen a partir de ratolins C57BL/6 de 2-4 dies.

a) Material

- Material de dissecció.
- Plaques de Petri, tubs Falcon, pipetes serològiques, càmera de Neubauer.
- Placa de tefló i fulla Gillette.
- Ampolles de vidre de 100 mL.
- Filtres amb porus de 100 µm de diàmetre.
- Medi de cultiu DMEM:F-12 complementat amb un 10% de FBS, 0,1% de P/S i 0,1% de *Fungizone*.
- PBS estèril a 4°C.
- Tripsina-EDTA.
- Desoxiribonucleasa I (DNAsa).

b) Procediment

Els volums s'especifiquen per a 8 cervells.

1-Disseccionar el cervell per obtenir les escorces cerebrals. Descartar les meninges i el cervell mig. Mantenir els cervells en una placa de Petri en gel durant tot el procés.

2-Posar les escorces cerebrals a la placa de tefló i trossejar-los amb la fulla Gillette.

3-Transferir-ho a un tub Falcon i afegir 10 mL de PBS.

4-Centrifugar 2 min a 200 g.

5-Aspirar el PBS, resuspendre en 12 mL de Tripsina-EDTA i transferir-ho a una ampolla de vidre.

6-Incubar-ho durant 30 min en un bany en agitació a 37°C.

7-Afegir 12 mL de medi DMEM:F-12 complementat i 500 µL de DNAsa 4 mg/mL i transferir-ho a un tub Falcon.

8-Pipetejar contra la paret del tub entre 20 i 35 vegades per disgregar el teixit.

9-Filtrar amb un filtre de 100 µm de diàmetre de porus.

10-Centrifugar 7 min a 200 g.

11-Resuspendre en 30 mL de medi complementat.

12-Comptar amb la càmera de Neubauer i sembrar a una densitat de $3,5 \times 10^5$ cèl/mL.

13-Mantenir les cèl·lules a 37°C amb un 5% de CO₂, fent canvis de medi cada 7 dies.

El cultiu és confluent als 10-14 dies *in vitro* (DIV).

Obtenció d'un cultiu enriquit en micròglia a partir del de glia mixta

A partir d'un cultiu de glia mixta de 21 DIV es pot obtenir un cultiu enriquit de micròglia, seguint el protocol descrit per Saura i cols. (2003).

a) Material

-Medi DMEM:F-12 sense complementar.

-Medi DMEM:F-12 complementat amb un 10% de FBS, 0,1% de P/S i 0,1% de *Fungizone*.

-Tripsina-EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic).

-Pipetes serològiques, tubs Falcon.

b) Procediment

1-Aspirar el medi de les cèl·lules i guardar-lo a 37°C. Rentar les cèl·lules amb medi sense complementar.

2-Incubar les cèl·lules amb tripsina diluïda en DMEM:F12 1/4 entre 25 i 40 min a 37°C (els volums per a cada pou s'especifiquen a la taula de l'apartat 3.1).

3-Quan la capa d'astròcits s'hagi desenganxat del pou (com mostra la figura 24), aturar la tripsinització afegint un volum equivalent de medi complementat.

4-Aspirar tot el volum del pou, per emportar-se els astròcits.

5-Afegir medi condicionat que s'ha guardat al pas 1. La micròglia es manté a 37°C amb un 5% de CO₂. El cultiu enriquit de micròglia es pot fer servir fins a 3 dies després de l'obtenció, ja que l'absència d'astròcits redueix la viabilitat del cultiu.

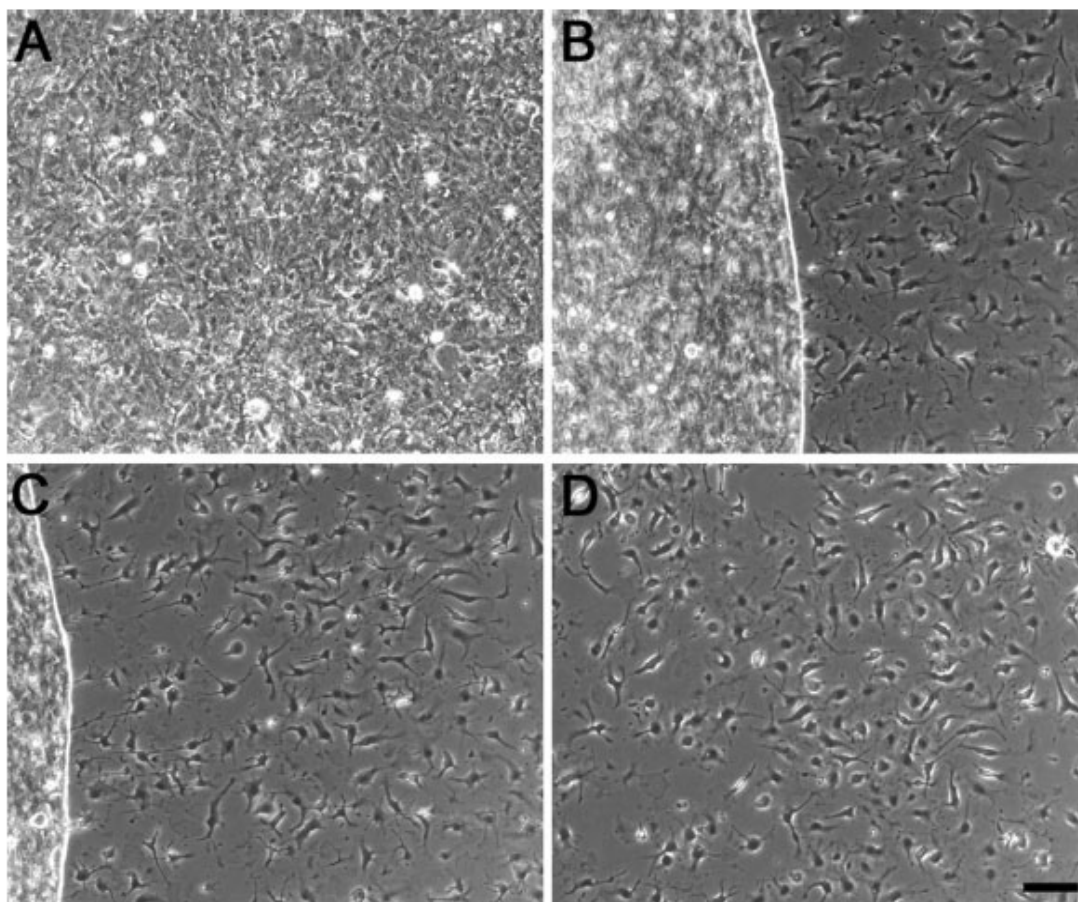


Figura 24. Seqüència fotogràfica de l'aïllament de la micròglia seguint el protocol aquí descrit. A) Cultiu de glia mixta, B i C) capa d'astròcits aixecant-se i deixant al descobert la micròglia de sota, i D) cultiu enriquit en micròglia. La barra representa 40 µm. Saura i cols. 2003.

3.1.4 CULTIU DE NEURONES CORTICALS RATOLÍ

Tots els experiments s'han dut a terme seguint les directrius del Consell de la Unió Europea (86/609/EU) i les regulacions del Govern Espanyol (BOE 67/8509-12, 1988) per a l'ús d'animals de laboratori, i van ser aprovats pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els cultius de neurones corticals s'obtenen a partir d'embrions de 16 dies de ratolí C57BL/6. S'ha seguit el protocol de Frandsen i Schousboe (1990) amb modificacions.

a) Material

Reactius utilitzats

Tipus de producte	Nom del producte	Proveïdor	Referència	Concentració final
Medi	DMEM 10X	Biochrom AG	F0455	---
Suplements	Àcid aminobenzoic	Sigma	A9878	0,1%
	Insulina	Sigma	I5500	3,5 ng/L
	Penicil·lina G	Sigma	P3032	0,6 mg/mL
	FBS	Invitrogen	10270-106	10%
	L-glutamina	Sigma	G8540	0,03 mg/mL
	D-glucosa	Sigma	G6152	1,2 mg/mL
	Tripsina	Sigma	T0303	0,2 mg/mL
	Inhibidor de tripsina (SBTI)	Sigma	T9128	0,52 mg/mL
	Desoxiribonucleasa I	Sigma	D5025	10 mg/mL
Reactius	NaHCO ₃	Sigma	S8875	25,5 mM
	NaCl	Sigma	S9625	120 mM
	KCl	Sigma	P4504	4,8 mM
	KH ₂ PO ₄	Sigma	P5379	1,22 mM
	Roig de fenol	Sigma	P3532	0,06 mg/mL
	Albúmina sèrica bovina (BSA)	Sigma	A6003	3 mg/mL
	MgSO ₄	Sigma	M2643	1,16 mM
	CaCl ₂	Sigma	C3306	1,26 mM
	MgCl ₂	Sigma	M2393	0,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	Sigma	S9763	0,35 mM
	Poli-D-lisina	Sigma	P1024	25 mg/L

- Medi DMEM.
- Solucions 1-4.
- PBS estèril a 4°C.
- Material de dissecció.
- Placa de tefló, fulla Gillette, cànula metàl·lica.
- Pipetes serològiques, tubs Falcon, xeringues 20 mL, plaques de Petri, càmera de Neubauer, ampolles de vidre.
- Plaques recobertes amb poli-D-lisina.

b) Preparació de les solucions, plaques i medi.

** Plaques amb poli-D-lisina:*

- 1-recobrir els pous amb solució estèril de poli-D-lisina 25 mg/L (volums especificats a la taula de l'apartat 3.1).
 - 2-Protegir les plaques de la llum cobrint-les amb paper d'alumini.
 - 3-Incubar-les tota la nit a 37°C.
 - 4-Aspirar tot el volum de poli-D-lisina i guardar-les a 4°C.
- Es poden fer servir fins a un mes després de la seva preparació.

** Medi de cultiu (250 mL):*

El DMEM 10X que s'utilitza no conté NaHCO₃, per el que se n'ha d'afegir. La concentració de NaHCO₃ final no és de 3,7 g/L (la que acostuma a tenir el DMEM estàndard) sinó de 2,2 g/L que és més indicada per controlar el pH del medi a cultius neuronals que es mantenen a incubadors amb 5% de CO₂.

- 1-Diluir 25 mL de DMEM 10X en 225 mL de H₂O milliQ.
- 2-Ajustar el pH a 7.
- 3-Afegir 295,75 mg de D-glucosa i 550 mg de NaHCO₃.
- 4-Descartar 25 mL.
- 5-Afegir 0,25 mL d'àcid aminobenzoic, 0,5 mL de penicil·lina G, 0,875 mL d'insulina i 7,3 mg de L-glutamina.
- 6-Filtrar a la campana de cultius per a esterilitzar el medi.
- 7-Afegir 25 mL de FBS.

Guardar a 4°C, es pot fer servir fins a un mes després de preparar-lo.

En alguns experiments s'ha usat medi amb KCl 25mM, que es prepara seguint el protocol especificat a dalt, però afegint 355 mg de KCl en el pas 3.

* Solucions

+ Solució de Krebs (1L):

7,070 g de NaCl

0,360 g de KCl

0,166 g KH_2PO_4 2,140 g NaHCO_3

2,570 g D-glucosa

0,015 g roig de fenol

- Ajustar el pH a 7.

- Guardar a 4°C, es pot fer servir fins a 6 mesos després de la preparació.

+ Solucions 1-4: Les solucions s'han de preparar al moment de fer-les servir. Cal filtrar-les i gasejar-les amb CO_2 abans d'usar-les.

Solució 1: 80 mL de solució de Krebs + 0,24 g BSA + 0,62 mL MgSO_4

Solució 2: 20 mL de solució 1 + 4 mg tripsina + 120 μL DNAsa

Solució 3: 20 mL de solució 1 + 10,4 mg STBI + 0,2 mL MgSO_4 + 120 μL de DNAsa

Solució 4: 3,2 mL de solució 3 portats a un volum total de 20 mL de solució 1.

c) Procediment (els volums s'han ajustat a 8 cervells)

1-Disseccionar el cervell dels embrions per obtenir les escorces cerebrals. Descartar les meninges i el cervell mig. Mantenir els cervells en gel durant tot el procés.

2-Posar les escorces cerebrals a la placa de tefló i trossejar-los amb la fulla Gillette.

3-Transferir-ho a un tub Falcon i afegir 10 mL de solució 1.

4-Centrifugar 1 min a 200 g.

5-Aspirar amb compte la solució 1, resuspendre en 20 ml de solució 2 i transferir-ho a una ampolla.

6-Incubar-ho durant 10 min en un bany en agitació a 37°C.

7-Transferir el tripsinitzat al tub que conté la solució 4.

8-Centrifugar 5 min a 200 g. Mentrestant, preparar la cànula i la xeringa, fent passar la solució 3.

9-Aspirar el sobrenedant amb molt de compte de no endur-se el DNA, ja que forma un precipitat molt dens en el que les cèl·lules queden adherides. Resuspendre en 4 mL de solució 3.

10-Triturar el teixit passant-lo per la cànula entre 10 i 12 vegades.

11-Equilibrar la suspensió cel·lular amb CO₂ i deixar precipitar els possibles agregats de cèl·lules no disgregats durant 5 min.

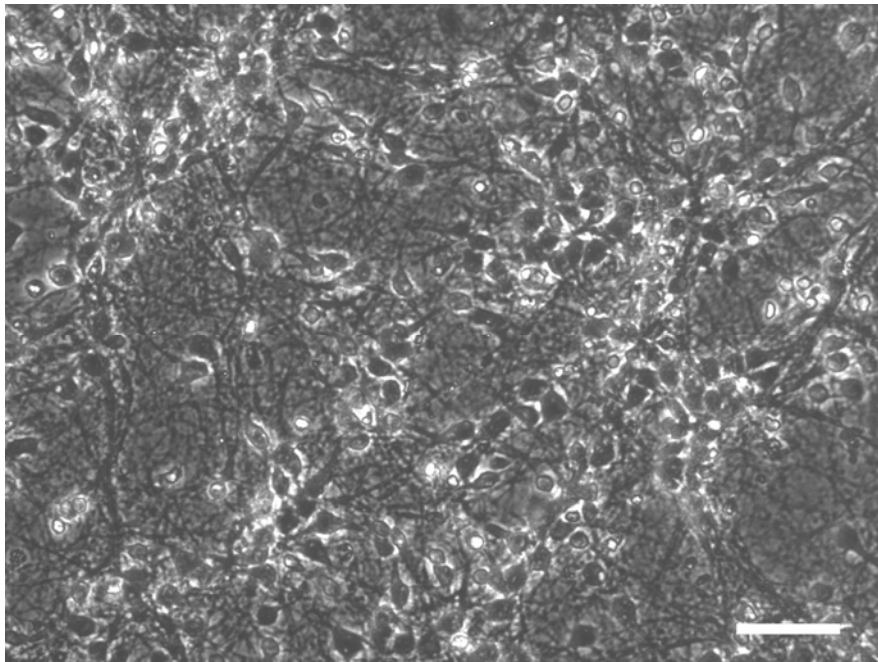
12-Transferir el sobrenedant (utilitzant una pipeta Pasteur) a un tub Falcon que contingui 6 ml de medi de cultiu fresc.

13-Centrifugar 5min a 200 g.

14-Resuspendre en 20-30 mL de medi de cultiu fresc.

15-Comptar amb la càmera de Neubauer i portar la suspensió cel·lular a una densitat de 8×10^5 cèl/mL.

15-Mantenir les cèl·lules a 37°C amb un 5% de CO₂. El cultiu és madur als 5DIV.



Imatge de contrast de fase d'un cultiu de neurones corticals de 6DIV. La barra representa 50 µm.

3.1.5 COCULTIUS

Els cocultius es realitzen sembrant la micròglia (primària o BV2) sobre el cultiu de neurones corticals quan aquest té 5 DIV.

Cocultiu de neurones i micròglia primària

Es parteix de cultius de neurones corticals de 5 DIV sembrades en plaques de cultiu i cultius de glia mixta de 3 setmanes sembrada en flascons obtinguts tal com es descriu a l'apartat 3.1.3. A partir de la glia mixta s'obtenen les cèl·lules de micròglia, que es sembren sobre el cultiu de neurones a una proporció 1:2 (micròglia:neurones).

a) Material

-Medi DMEM:F-12 complementat amb un 10% de FBS, 0,1% de P/S i 0,1% de *Fungizone*.

-Medi DMEM (de neurones corticals).

-Tripsina-EDTA.

-Tubs Falcon, pipetes serològiques, rascadors, càmera de Neubauer.

b) Procediment (volums especificats per a un flascó T75 de glia mixta)

1-Després d'incubar el cultiu de glia mixta amb tripsina diluïda durant 30 min per a què s'aixequi la capa d'astròcits, aspirar el volum (sense parar la reacció amb medi complementat).

2-Afegir 12 mL de tripsina-EDTA sense diluir.

3-Incubar 5-10 min a 37°C.

4-Aturar la tripsinització afegint 12 mL de medi DMEM:F-12 complementat.

5-Rascar suaument amb el rascador tota la paret inferior del flascó unes 3 vegades i recollir el medi. Pipetejar suaument tot el medi del flascó per assegurar que ens emportem totes les cèl·lules al recollir el volum. Transferir la suspensió a un tub Falcon.

6-Centrifugar 5 min a 200 g.

7-Aspirar el sobrenedant i resuspendre en 1 mL de DMEM.

8-Comptar amb la càmera de Neubauer, portar la suspensió a una densitat de 4×10^6 cèl/mL.

7-Sembrar les cèl·lules als pous del cultiu neuronal. El volum de suspensió del cultiu de micròglia que es sembra als pous de cultiu de neurones no ha de ser superior a 1/6 del volum final per evitar diluir massa el medi condicionat de les neurones. La densitat final de micròglia és de 4×10^5 cèl/mL. S'obtenen $5-8 \times 10^5$ cèl·lules de micròglia per cada flascó T75 de glia mixta.

*Normalment la suspensió de cèl·lules microglials està a una densitat $<4 \times 10^6$ cel/mL. Per concentrar-la s'ha de tornar a centrifugar 5 min a 200 g i resuspendre en el volum que calgui.

*Si s'han de processar diversos flascons és important no fer-ne més de 2 a la vegada, ja que es triga una mica en fer el pas 5 i no és recomanable que les cèl·lules estiguin gaire estona en tripsina, encara que la reacció s'hagi parat amb medi complementat.

Cocultiu de neurones i BV2

Es parteix de cultius de neurones corticals de 5 DIV sembrades en plaques de cultiu i cultius BV2, obtinguts tal com s'explica a l'apartat 3.1.2. Les BV2 es sembren sobre les neurones a una proporció 1:5 (BV2:neurones).

a) Material

-Medi RPMI complementat amb un 10% de FBS i un 0,1% de P/S.

-Medi DMEM (de neurones corticals).

-Tubs Falcon, pipetes serològiques, rascadors, càmera de Neubauer.

b) Procediment (volums especificats per a un flascó T75)

*Les BV2 es preparen tal com s'explica a l'apartat 3.1.2 *sembrat*.

1-Ajustar la suspensió de BV2 a una densitat de 9×10^5 cèl/mL.

2-Sembrar les cèl·lules als pous del cultiu neuronal. El volum de suspensió del cultiu de micròglia no ha de ser superior a 1/6 del volum final per evitar diluir massa el medi condicionat de les neurones. La densitat final de BV2 és de $1,5 \times 10^5$ cèl/mL.

3.1.6 TRACTAMENTS

Material

Tipus de producte	Producte	Proveïdor	Referència	Concentració final
Tractaments	LPS de E.coli 055:B5	Sigma	L6529	100 ng/mL
	IFN- γ de ratolí	Sigma	I4777	0.5-30 ng/mL
	Crisina	Aldrich	C8,0105	20 μ M
	Interleucina 10	Peprotech	210-10	50 ng/mL
	Dihidroclorur de 1400W	Tocris	1415	
	Pèptid agonista de CD200R	Servei de síntesi de pèptids (UPF)	-----	300 μ g/mL
	Àcid glutàmic	Sigma	G8415	5 mM
	Estaurosporina	Sigma	S4400	1 μ M
Productes	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	2382	0,185 g/L
	KCl	Sigma	P4504	0,4 g/L
	KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873	0,6 g/L
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma	M2393	0,1 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	M1880	0,1 g/L
	NaCl	Sigma	S9625	8 g/L
	Na ₂ HPO ₄	Sigma	S8875	0,048 g/L
	D-glucosa	Sigma	S0876	1 g/L

Preparació dels tractaments**LPS+IFN- γ*

La solució mare de LPS es prepara amb PBS a una concentració de 1 mg/mL. L' IFN- γ es prepara reconstituïnt-lo a una concentració de 1 μ g/mL en Na₂HPO₄ (10mM pH 8). Posteriorment es fa una dilució 1/100 d'aquesta solució en medi, obtenint així la solució mare de IFN- γ , que té una concentració de 10.000 ng/mL.

El tractament de LPS+IFN- γ es prepara en medi de cultiu. La concentració final de LPS és sempre 100 ng/mL, mentre que s'han fet servir diferents concentracions de IFN- γ : 0,5 i 5 ng/mL per a les BV2 i 15, 30 i 60 ng/mL per a la micròglia. Es prepara una solució concentrada 30 vegades i es dissol al pou.

Temps de tractament per a cada experiment:

proteïnes totals 12 h

proteïnes nuclears 4 h

immunofluorescència de proteïnes nuclears 4 h

immunocitoquímica de proteïnes citosòliques 24-48 h

RNA 3 h

viabilitat neuronal 24-48 h

ELISA i NO 24-48 h

**Crisina*

La solució mare de crisina es prepara a 60 mM en DMSO i es guarda a -20°C. S'afegeix al cultiu 1 h abans del tractament amb LPS+IFN- γ , a una concentració final de 20 μ M, sent la concentració final de DMSO <0,1%. Es prepara una solució entremitja diluint la solució mare 1/100 en medi i aquesta es dissol 30 vegades al pou. El tractament amb la crisina s'administra 1 h abans que el tractament amb LPS/IFN- γ .

**IL-10*

Primer es prepara una solució 100 μ g/mL reconstituïnt la IL-10 en H₂O milliQ filtrada. Seguidament es fa una dilució d'aquesta solució en medi de cultiu portant-la a una concentració de 50 μ g/mL. Aquesta és la solució mare de IL-10. La concentració de treball és 50 ng/mL, per tractar es prepara una solució en medi de cultiu concentrada 30 vegades i es dissol al pou. El tractament amb la IL-10 s'administra 1 h abans que el tractament amb LPS/IFN- γ .

**1400W*

La solució mare de 1400W es prepara a concentració 900 μ M en H₂O milliQ. La concentració de treball és 10 μ M, per tractar es prepara una solució en medi de cultiu concentrada 30 vegades i es dissol al pou. El tractament amb 1400W s'administra a la vegada que el tractament amb LPS/IFN- γ .

** Pèptid agonista de CD200R/ pèptid control*

Els pèptids es van sintetitzar al Servei de síntesi de pèptids de la Universitat Pompeu Fabra. La seqüència del pèptid agonista prové d'un treball de Gorczynski i cols. (2008), on es descriu l'efecte agonista d'aquest pèptid sobre el receptor CD200R. La seqüència aminoacídica és: SPENMVTYSKT. Com a control negatiu s'administra un pèptid de seqüència al·leatòria. La solució mare es prepara reconstituïnt els pèptids en H₂O milliQ a una concentració de 10 mg/mL i es guarda a -20°C. El tractament

s'administra a la vegada que el LPS+IFN- γ , fent una dilució 1/30 de solució mare al pou. El tractament amb el pèptid s'administra a la vegada que el tractament amb LPS/IFN- γ .

**Estaurosporina*

La solució mare d'estaurosporina té una concentració de 1 mM, que es dissol amb solució de Hanks amb Mg^{2+} fins a una concentració final de 1 μ M.

La solució de Hanks amb Mg^{2+} es prepara amb la següent recepta (per 500 mL):

0,0925 g de $CaCl_2$

0,2000 g de KCl

0,0300 g de KH_2PO_4

0,0500 g de $MgCl_2$

0,0500 g de $MgSO_4$

4 g de NaCl

0,0240 g de Na_2HPO_4

0,5000 g de D-glucosa

*La solució es filtra a cultius i es guarda a 4°C.

**Àcid glutàmic*

El glutamat es prepara el dia d'ús, a una concentració mare de 60 mM, dissolent el glutamat en H_2O milliQ, durant 1 h a 50°C. A partir d'aquesta solució mare es prepara una solució de treball a una concentració de 5mM en solució de Hanks sense Mg^{2+} . Aquesta es prepara seguint la recepta anterior, però sense $MgSO_4$ ni $MgCl_2$.

Pauta de tractament

**BV2*

24 h després del sembrat es canvia el medi de les cèl·lules. Un dia després es tracten amb LPS/IFN- γ .

**micròglia primària*

24 h després d'obtenir la micròglia enriquida les cèl·lules es tracten amb LPS/IFN- γ .

**cocultius neurona-BV2*

2 h després del sembrat de les BV2 sobre les neurones, el cultiu es tracta amb LPS/IFN- γ durant 24 h.

*cocultius neurona-micròglia primària

24 h després del sembrat de la micròglia sobre les neurones, el cultiu es tracta amb LPS/IFN- γ durant 48 h.

*cultius de neurones

els tractaments es realitzen quan el cultiu té 5 DIV (estaurosporina) o 7 DIV (glutamat).

1-Recollir el medi condicionat i guardar a 37°C.

2-Afegir solució de Hanks a 37°C als pous.

3-Afegir solució de Hanks amb el tractament amb estaurosporina 1 μ M o glutamat 5 mM durant 1 h.

4-Rentar els pous amb molta delicadesa amb solució de Hanks.

5-Tornar a posar el medi condicionat.

6-24 h després del tractament processar les plaques.

3.2 IMMUNOCITOQUÍMICA

En aquesta tesi s'han utilitzat diferents protocols d'immunocitoquímica, tant considerant el marcatge amb peroxidasa revelat amb diaminobenzidina i observació amb llum visible, com el marcatge amb fluorescència. En aquest darrer cas s'han realitzat tant marcatges senzills com dobles.

3.2.1 ANTICOSSOS I ALTRES REACTIUS

Tipus d'anticòs	Epítop	Font animal	Proveïdor	Referència	Dilució
Anticossos primaris	MAP2	ratolí	Sigma	M1406	1/4000
	CD11b	rata	Serotec	MCA711G	1/300
	GFAP	conill	Dako	Z0334	1/2000
	NF- κ B/p65	ratolí	Santa Cruz	sc-8008	1/250
	C/EBP β	ratolí	Santa Cruz	sc-150	1/2000
	C/EBP δ	ratolí	Rockland	600-401-A61	1/2000
	Caspasa 3	conill	Cell Signalling	9661	1/500
	CD200	cabra	R&D	AF3355	1/200
Anticossos secundaris fluorescents (Alexa)	IgG conill	cabra	Molecular Probes	A11010 546	1/1000
	IgG conill	cabra	Molecular Probes	A11070 488	1/1000
	IgG ratolí	cabra	Molecular Probes	A11017 488	1/1000
	IgG rata	cabra	Molecular Probes	A11006 488	1/500
Anticossos secundaris biotinitats	IgG conill	cabra	Vector	BA-1000	1/200
	IgG ratolí	cavall	Vector	BA-2000	1/200
	IgG rata	cabra	Vector	BA-9400	1/200

Altres Productes	Proveïdor	Referència
Timerosal	Sigma	T8784
PFA	Merck	1.04005
BSA	Sigma	A2153
Metanol	Panreac	131091.1214
Extravidina peroxidasa	Sigma	E2886
Diaminobenzidina (DAB)	Sigma	D5637
Sèrum de cabra	Vector	S-1000
Sèrum de cavall	Vector	S-2000

3.2.2 PROCEDIMENT

Pas 1: fixació

a) Material

- Paraformaldehyd (PFA) al 4%.
- PBS (Sigma D8537).
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal.

b) Preparació de les solucions

** PFA al 4% (per 1 L), sota campana extractora:*

- 1-diluir 40 g de PFA en 500 mL de tampó fosfat 0,1 M (pH 7,4).
- 2-Escalfor fins que quedi una solució transparent. Important que la temperatura no superi els 65°C.
- 3-Afegir unes gotes de NaOH 10 N per acabar de dissoldre el PFA.
- 4-Quan s'hagi refredat, filtrar.
- 5-Enrasar a 1 L amb tampó fosfat.

** PBS-timerosal 0,4 mg/mL:*

- 1-es prepara una solució mare a una concentració de 400 mg/mL, diluint el timerosal en H₂O destil·lada. La solució mare es guarda al·lquotada a -20°C.
- 2-Per preparar la solució de PBS-timerosal 0,4 mg/mL es fa una dil·lució 1/1000 de la solució mare en PBS. Aquesta solució es guarda a 4°C.

c) Procediment (sota campana extractora)

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

Pas 2: permeabilització

La permeabilització és un procés que permet l'accés de l'anticòs a l'interior de la cèl·lula, i en aquesta tesi s'han realitzat permeabilitzacions de forma rutinària amb tots els marcatges.

a) Material

- PBS.
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal.
- Metanol.
- H₂O₂.

b) Procediment

1a-En el cas que la detecció del marcatge es realitzi utilitzant peroxidasa i revelat amb DAB s'ha d'incubar 10 min a temperatura ambient amb metanol amb 3% de H₂O₂.

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

2-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.

Pas 3: bloqueig

a) Material

- PBS amb BSA al 1%.
- Sèrum. El sèrum ha de ser del mateix animal que l'anticòs secundari (veure taula d'anticossos).

b) Procediment

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

Pas 4: incubació amb anticossos i revelat

4.1 Revelat amb el sistema peroxidasa-DAB

a) Material

- PBS.
- PBS + 0,4 mg/mL de timerosal.
- PBS-BSA 1%.
- Sèrum.
- Anticossos primaris i secundaris.
- Extravidina peroxidasa.
- Solució mare de DAB (es prepara a 25 µg/mL en PBS).
- H₂O₂.

b) Procediment

- 1-Preparar l'anticòs primari a la concentració de treball (veure taula d'anticossos) diluint-lo en una solució de PBS-BSA 1% + 10% serum.
- 2-Incubar tota la nit a 4°C.
- 3-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.
- 4-Preparar l'anticòs secundari a la concentració de treball (veure taula d'anticossos) diluint-lo en una solució de PBS-BSA 1% + 10% serum.
- 5-Incubar 1 h en agitació a temperatura ambient.
- 6-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.
- 7-Incubar amb extravidina diluïda 1/500 en una solució de PBS-BSA 1% + 1% serum.
- 8-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.
- 9-Preparar la solució de DAB diluint 100 µL de la solució mare de DAB en 10 mL de PBS i afegir 10 µL de H₂O₂ diluïda al 30%.
- 11-Incubar 3 min amb la solució de DAB.
- 12-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min i guardar a 4°C en PBS-timerosal.

4.2 Revelat amb anticòs secundari fluorescent**a) Material**

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

b) Procediment

- 1-Preparar l'anticòs primari a la concentració de treball (veure taula d'anticossos) diluint-lo en una solució de PBS-BSA 1% + 10% serum.
- 2-Incubar tota la nit a 4°C.
- 3-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.
- 4-Preparar l'anticòs secundari a la concentració de treball (veure taula d'anticossos) diluint-lo en una solució de PBS-BSA 1% + 10% serum. Protegir-lo de la llum amb paper d'alumini.
- 5-Incubar 1 h en agitació a temperatura ambient, protegint la placa de la llum.
- 6-Rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min i guardar a 4°C en PBS-timerosal.

3.3 TINCIONS

3.3.1 HOECHST 33258 (bisbenzimidazol) (bisbenzimidida)

Els compostos Hoechst són agents intercalants del DNA que emeten fluorescència, i per tant es poden detectar al microscopi al excitar amb llum ultravioleta. El Hoechst 33258 no és capaç de travessar les membranes cel·lulars, el que fa necessari permeabilitzar les cèl·lules abans de realitzar la tinció. En aquesta tesi s'ha realitzat la tinció amb Hoechst 33258 per avaluar la morfologia nuclear i la fragmentació i condensació de la cromatina. Aquestes característiques s'han utilitzat com a marcadors per determinar si la mort neuronal presentava característiques d'apoptosi o necrosi.

a) Material

-PBS.

-Solució mare de Hoechst 33258 (Sigma ref. B1155) 100 µg/mL preparada en H₂O milliQ. Es guarda a -20°C.

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

b) Procediment

Es parteix de cèl·lules fixades i permeabilitzades, tal com s'explica en l'apartat 3.2.2 passos 1 i 2.

1-Incubar amb Hoechst 33258 1 µg/mL en PBS 5 min a temperatura ambient protegint-ho de la llum.

2-Rentar 2 vegades amb PBS 5 min en agitació a temperatura ambient.

3-Guardar a 4°C amb PBS-timerosal .

3.3.2 HEMATOXILINA

L'hematoxilina és un compost que s'uneix als components àcids, i al oxidar-se adquireix una coloració violeta. En histologia es fa servir per marcar els nuclis de les cèl·lules, ja que aquests són rics en components àcids degut a la presència dels àcids nucleics. La tinció clàssica amb hematoxilina consta de diversos passos per virar el marcatge. En aquesta tesi hem usat un compost d'hematoxilina modificada (*modified Mayer's formula*) que permet realitzar la tinció de forma més ràpida. El marcatge de nuclis amb hematoxilina, combinat amb immunocitoquímiques per a GFAP, CD11b i MAP2 s'ha utilitzat per marcar astròcits, micròglia i neurones i establir la composició del cultiu de neurones corticals de ratolí.

a) Material

-PBS.

-Hematoxilina (Vector ref. H3404).

-PBS+timerosal 0,4mg/mL (Sigma ref. T8784).

b) Procediment

Es parteix de cèl·lules fixades tal com s'explica a l'apartat 3.2.2 pas 1.

1-Incubar amb hematoxilina 10 seg a temperatura ambient.

2-Rentar amb aigua corrent 10 seg a temperatura ambient.

3-Rentar amb PBS 5 min en agitació a temperatura ambient.

4-Guardar a 4°C en PBS-timerosal.

3.4 PCR EN TEMPS REAL

En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de PCR en temps real per determinar l'expressió del mRNA de C/EBP δ als cultius de BV2.

Pas 1: extracció de RNA

L'extracció de RNA es fa amb el kit *High Pure RNA isolation kit* (Roche ref. 11 828 665 001). La preparació de les solucions i el protocol es fan seguint les instruccions del fabricant. A cultius de BV2 es fa servir un pou de placa de 6 pous per cada condició experimental.

a) Material

Tot el material necessari està disponible al *kit*.

b) Preparació de les solucions

- *DNase I solution*.

Dissoldre el volum del vial en 0,55 mL de *Elution buffer*.

- *Wash buffer I*.

Afegir 20 mL d'etanol absolut i mesclar bé.

- *Wash buffer II*.

Afegir 40 mL d'etanol absolut i mesclar bé.

c) Procediment (volums indicats per a un pou de placa de 6 pous)

1-Aspirar el medi de cultiu dels pous i resuspendre les cèl·lules en 200 μ L de PBS per pou. Transferir el volum de tots els pous d'una mateixa condició a un Eppendorf de 2 mL.

2-Afegir 400 μ L de *Lysis binding buffer* i agitar amb el vòrtex durant 15 seg.

3-Transferir el volum a un tub amb filtre de la següent manera: inserir un filtre a un tub Eppendorf de 1,5 mL i pipetejar tot el volum a dins del tub. La capacitat màxima del filtre és 700 μ L, si es processés un volum superior, caldria repetir el pas 3 i 4 les vegades que fos necessari.

4-Tapar el tub i centrifugar 15 seg a 8.000 g.

5-Descartar el volum filtrat i transferir el filtre a un altre tub Eppendorf de 1,5 mL.

6-Preparar el tampó d'incubació de DNAsa mesclant 90 μ L de *DNase I solution* amb 10 μ L de *DNase I*.

7-Pipetejar els 100 μ L de tampó al filtre.

8-Incubar 15 min a 25°C.

9-Afegir 500 μL de *Wash buffer I* i centrifugar 15 seg a 8.000 g descartar el volum filtrat.

10-Afegir 500 μL de *Wash buffer II* i centrifugar 15 seg a 8.000 g. Descartar el volum filtrat.

11- Afegir 500 μL de *Wash buffer II* i centrifugar 2 min a 13.000 g. Descartar el volum filtrat.

12-Transferir el filtre a un tub Eppendorf nou.

13-Eluir el RNA afegint 50 μL de *Elution buffer*.

14-Centrifugar 1 min a 8.000 g.

15-Quantificar el RNA al *Nanodrop* i guardar-lo a -80°C .

Pas 2: transcripció inversa

a) Material

-H₂O milliQ autoclavada.

-Tubs Eppendorf estèrils.

-Barreja de desoxinucleòtids trifosfat (Promega ref. 27917904).

-Inhibidors de *RNase* (Invitrogen ref. P/N 1000000840).

-Tampó de reacció (Roche ref. 03 531 325 001).

-Transcriptasa inversa (Roche ref. 03 531 287 001).

-*Primers* aleatoris (Invitrogen ref. P/N 58875).

b) Preparació de les mostres i les *premix*.

S'indiquen els volums per mostra. Preparar un volum final un 10% superior al necessari per al nombre de mostres que es tenen.

	Quantitat	$\mu\text{L}/\text{mostra}$
Premix 1		
H ₂ O autoclavada	-	5,8
Primers aleatoris (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,6 μg	0,2
Premix 2		
Tampó de reacció (5x)	1x	4
Inhibidors de <i>RNase</i> (40 U/ μl)	20 U	0,5
Mix de dNTP (5 mM cada un)	1mM cada un	4
Transcriptasa inversa (20 U/ μL)	10 U	0,5
Volum total		20

c) Procediment

1-Preparar les mostres ajustant la concentració a 1,5 µg en 5 µL finals usant H₂O milliQ autoclavada.

2-Preparar la *premix* 1 seguint les indicacions de la taula de l'apartat b).

3-Afegir 6 µL de *premix* 1 a cada mostra.

4-Iniciar el protocol de la transcripció inversa al termociclador. Es realitzarà el primer pas consistent en una incubació de 10 min a 65°C.

5-Durant els 10 min preparar la *premix* 2 seguint les indicacions de la taula de l'apartat b).

6-Passats els 10 min deixar les mostres en gel.

7-Afegir 9 µL de *premix* 2 a cada mostra. Agitar les mostres amb el Vòrtex.

8-Posar les mostres al termociclador i seguir el protocol.

a) 10 min a 25°C.

b) 30 min a 55°C.

c) 5 min a 85°C.

9-Guardar les mostres a -20°C.

Pas 3: PCR en temps real**a) Material**

-H₂O milliQ autoclavada.

-Tubs Eppendorf autoclavats.

-IQ SYBRGREEN SuperMix (Bio-Rad ref. 170-8882).

-Plaques de 96 pous (Bio-Rad ref. HSS9601).

-Primers (Roche):

C/EBPδ	<i>forward</i> 5'-CTCCACGACTCCTGCCATGT-3'
	<i>reverse</i> 5'-GAAGAGGTTCGGCGAAGAGTTC-3'
actina	<i>forward</i> 5'-CAACGAGCGGTTCCGATG-3'
	<i>reverse</i> 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3'

b) Preparació de les mostres i la *premix*.

Les mostres de cDNA es dilueixen 1/5 en H₂O milliQ autoclavada en tubs Eppendorf de 200 µL

Preparació de la premix

Premix	Concentració inicial	Concentració final	Volum (µl/mostra)
H ₂ O autoclavada	--	--	3,60
<i>Forward primer</i>	10 µM	300 nM	0,45
<i>Reverse primer</i>	10 µM	300 nM	0,45
<i>2x Univ SYBR Green PCR Mix</i>	2x	1x	7,50

c) Procediment

1-Preparar la *premix* amb els primers i la *SYBR Green PCR Mix*.

2-Carregar 3 µL de cada mostra diluïda 1/5 per triplicat a la placa de 96 pous.

3-Carregar 12 µL de *premix* a cada pou.

4-Agitar la placa amb el Vòrtex.

5-Centrifugar la placa 1 min a 800 g.

6-Posar al termociclador (*Bio-Rad IQ Cycler*) i córrer el programa:

50 cicles

95°C durant 15 s

60°C durant 30 s

72°C durant 15 s

7-Els resultats s'analitzen amb el *Bio-Rad IQ Cycler software 2.0* usant el mètode comparatiu $\Delta\Delta Ct$ (Livak i Schmittgen, 2001), i normalitzant les dades amb l'expressió d'actina.

3.5 WESTERN BLOT

En aquesta tesi s'ha utilitzat la tècnica de western blot per determinar l'expressió de proteïnes de membrana, citoplasmàtiques o nuclears en diferents situacions experimentals. Les proteïnes de membrana i citoplasmàtiques s'han determinat en extractes de proteïna total i les proteïnes del nucli en extractes de proteïna nuclear.

3.5.1 ANTICOSSOS I ALTRES REACTIUS

Producte	Proveïdor	Referència
Tris	Bio-Rad	161-0719
Dodecil sulfat sòdic (SDS)	Fluka	71729
Blau de bromofenol	Sigma	B8626
Glicina	Sigma	G8998
Glicerol	Fluka	49781
Metanol	Panreac	131091.1214
Tween 20	Sigma	P7949
Acrilamida	Bio-Rad	161-0158
Igepal	Sigma	I3021
Na-desoxicolat	Merck	6504
Sal sòdica HEPES	Sigma	H7006
NaCl	Sigma	S9625
KCl	Sigma	P4508
Àcid tetraacètic etilenglicol (EDTA)	Sigma	E4884
EGTA	Sigma	E4378
Ditrioteitol (DTT)	Sigma	D9163
Tetrametil-etilenamida (TEMED)	Bio-Rad	161-0801
Perisulfat amònic (PSA)	Bio-Rad	161-0700
<i>Kit de determinació de proteïnes Micro-Lowry</i>	Sigma	TP0300
Paper Whatman	Whatman Internat.	3030335
Membranes de PVDF	Millipore	IPVH00010
Inhibidor de proteases <i>Complete</i>	Roche	1836145
Marcador de pes molecular <i>Fullrange Rainbow</i>	Amersham	RPN800E
Sistema de detecció de western blot per quimioluminiscència <i>ECL-plus</i>	Amersham	RPN2132

Anticossos utilitzats

Tipus d'anticòs	Epítóp	Font animal	Proveïdor	Referència	Dilució
Anticossos primaris	NF-κB/p65	conill	Santa Cruz	sc-372	1/500
	C/EBPα	ratolí	Santa Cruz	sc-61	1/500
	C/EBPβ	ratolí	Santa Cruz	sc-150	1/500
	C/EBPδ	ratolí	Santa Cruz	sc-151	1/300
	Caspasa 3	conill	Cell Signalling	9661	1/300
	CD200	cabra	R&D	AF3355	1/500
	iNOS	conill	Chemicon	AB1604	1/300
	COX-2	conill	Santa Cruz	sc-1747	1/2000
	Tubulina	ratolí	Sigma	T4026	1/50.000
Actina	ratolí	Sigma	A1978	1/60.000	
Anticossos secundaris conjugats amb HRP	IgG ratolí	cabra	Santa Cruz	A9452	1/5000
	IgG conill	ase	Amersham	sc-2055	1/5000
	IgG cabra	ratolí	Sigma	A9452	1/2000

HRP: peroxidasa de rave, de l'anglès *Horseradish peroxidase*

3.5.2 PROCEDIMENTPas 1: preparació de les solucions mare i els tampons concentrats*RIPA+Complete (per 50 mL)*

- 50 mL de PBS
- 50 µL de Igepal
- 250 mg de Na-desoxicolat
- 50 mg de SDS
- 1 pastilla de *Complete*

Solució A (per 40 mL)

- 104 mg d'HEPES
- 400 µL de KCl 1M
- 8 µL de EDTA 0,5M
- 40 µL de EGTA 0,1M
- Afegir 40 mL de H₂O milliQ.
- Ajustar el pH a 7,9 i filtrar.
- Guardar a 4°C durant màxim 2 setmanes.

Tampó de càrrega 4X (per a 20 mL)

1,6 mL de tampó fosfat 0,5 M pH 7
8 mL de glicerol
2 g de SDS
13,3 mg de blau de bromofenol
Enrasar a 20 mL amb H₂O milliQ.
Guardar a -20°C.

Tampó d'electroforesi 10X (1 L)

144,1 g de glicina
30,3 g de Tris
10 g de SDS
Dissoldre en 1 L de H₂O.
Guardar a 4°C.

Tampó de transferència (4 L)

57,68 g de glicina
12,08 g de Tris
0,8 g de SDS
3,2 L de H₂O
800m L de metanol
Guardar a 4°C.

TBS 10X (2 L)

48,44 g de Tris
1,6 L de H₂O
ajustar el pH a 7,4-7,6
Afegir 175,32 g de NaCl.
Enrasar a 2 L .
Guardar a 4°C.

TBS-T (1 L)

100 mL de TBS 10X
900 mL de H₂O destil·lada
2,5 mL de Tween-20

Solució 1: 0,75 M Tris-HCl pH 8,8 / 0,2% SDS (200 mL)

18,2 g Tris en 200 mL de H₂O milliQ

Portar a pH 8,8 amb HCl 5 N.

Afegir 0,4 g de SDS.

Solució 3: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 / 0,2% SDS (200 mL)

6,1 g de Tris en 200 mL de H₂O milliQ

Portar fins a pH 6,8 amb HCl 2 N.

Afegir 0,4 g de SDS.

Complete 25X

1 pastilla de complete en 2 mL de H₂O milliQ

Pas 2: extracció de proteïnes

2.1 Extracció de proteïnes totals

Es fan servir 2 pous de placa de 6 per condició a cultius de BV2 i 3 pous a cultius de micròglia.

a) Material

-PBS fred.

-RIPA + *Complete*.

-Rascadors.

b) Procediment

És important mantenir les mostres en gel durant tot el procés.

1-Rentar els pous amb PBS fred.

2-Afegir RIPA+*Complete*: 100 µL en cultius de BV2 o 25 µL en cultius primaris de micròglia.

3-Aixecar les cèl·lules amb el rascador.

4-Recollir el volum dels pous agrupant en un mateix tub Eppendorf els pous corresponents a la mateixa condició experimental.

5-Sonicar 10 cicles a un 80% d'amplitud.

6-Centrifugar 5 min a 10.400 g.

7-Guardar el sobrenedant a -20°C.

2.2 Extracció de proteïnes nuclears

Es fan servir 3 pous de placa de 6 per condició a cultius de BV2 i 6 pous a cultius de microglia primària.

a) Material

-PBS fred.

-PBS+*Complete*.

-Solució A complementada: amb *Complete* i 5% de DTT.

-Solució A complementada +10% Igepal.

-RIPA + *Complete*.

-Rascadors.

b) Procediment

1-Rentar els pous am PBS.

2-Afegir 400 µL/pou de PBS+*Complete* i rascar.

3-Recollir el volum dels pous agrupant en un mateix tub Eppendorf els pous corresponents a la mateixa condició experimental.

4-Centrifugar 4 min a 4.000 g.

5-Resuspendre en 400 µL de solució A complementada, pipetejant amb força 10 vegades.

6-Deixar 15 min en gel.

7-Afegir 25 µL de solució A complementada + 10% Igepal.

8-Agitar amb el Vòrtex durant 10 seg.

9-Deixar 5 min en gel.

10-Centrifugar 5 min a 10.400 g.

11-Resuspendre el precipitat nuclear en 50-100 µL de RIPA.

12-Sonicar 10 cicles a un 80% d'amplitud.

13-Centrifugar 5 min a 10.400 g.

14-Guardar el sobrenedant a -20°C.

Pas 3: quantificació de la concentració de proteïnes (Mètode de Lowry)

Per quantificar la concentració de proteïnes es fa servir el *kit* comercial *Total Protein kit micro-Lowry*. La preparació de solucions i el protocol es fan seguint les instruccions del fabricant.

a) Material

-Placa de 96 pous.

-Mostres.

-Solucions de Lowry.

- H₂O.

b) Preparació de les solucions

- *Solució de Lowry*: reconstituir el pols en 40 mL d'H₂O

- *Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent*: dissoldre en 90 mL d'H₂O i posar-ho en una ampolla opaca.

- *Protein standard*: reconstituir el pols en 5 mL d'H₂O

c) Procediment

1-Preparar la recta patró fent dilucions seriades ½ de la solució mare concentrada (40 mg/mL):

40 - 20 - 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0 mg/mL.

2-Preparar les mostres diluint 5 µL de mostra en 95 µL de H₂O.

3-Afegir 200 µL de solució de Lowry a cada mostra i als estàndards.

4-Incubar 20 min a temperatura ambient.

5-Afegir 100 µL de *Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent* a cada mostra i als estàndards.

6-Agitar amb el Vòrtex durant 10 seg i incubar 20 min a temperatura ambient.

7-Carregar 150 µL de cada mostra per duplicat a una placa de 96 pous.

8-Llegir la placa a 620 nm amb l'espectrofotòmetre de plaques.

Pas 4: preparació de les mostres

a) Material

-Tampó de càrrega 4X.

-H₂O milliQ.

-DTT.

b) Procediment

1-Ajustar la concentració.

Totes les mostres s'ajusten a la mateixa concentració de proteïna amb H₂O milliQ. Donat que amb l'extracció de proteïnes s'acostuma a obtenir mostres a diferents concentracions, totes s'ajusten la concentració de la mostra més diluïda.

2-Afegir tampó de càrrega.

Afegir un 10% de DTT 100 mM al tampó de càrrega 4X. Diluir el tampó de càrrega 4X en mostra fins que sigui 1X.

3-Escalpar les mostres 3 min a 100°C.

4-Centrifugar 1 min a 10.400 g. Si les mostres no s'han de processar immediatament es poden guardar a -20°C.

Pas 5: electroforesi

a) Material

- Cubeta d'electroforesi i adaptadors.
- Vidres, pinta, pinces i suports per preparar els gels.
- Tampó d'electroforesi.
- Marcador de pes molecular.

b) Procediment

- 1-Muntar els vidres i comprovar amb aigua que el muntatge no perd.
- 2-Preparar el gel separador al percentatge d'acrilamida desitjat (veure taula inferior). A major pes molecular de la proteïna d'estudi, menor percentatge d'acrilamida ha de tenir el gel.

	7%	10%	15%
Solució 1	5 mL	5 mL	5 mL
Acrilamida	2,4 mL	3,4 mL	5 mL
H₂O	2,6 mL	1,6 mL	0 mL
TEMED	14 µL	14 µL	14 µL
PSA 13% (en H₂O milliQ)	50 µL	50 µL	50 µL

- 3-Abocar-lo dins del vidre, deixant uns 2 cm de marge per al gel *stacking*. Afegir 500 µL d'isopropanol per evitar que quedin irregularitats a la part superior del gel. Esperar a que el gel polimeritzi.
- 4-Preparar el gel *stacking* mesclant 0,55 mL d'acrilamida, 2 mL de solució 3 i 1,5 mL de H₂O milliQ.
- 5-Una vegada el gel *stacking* ha polimeritzat, descartar l'isopropanol i abocar el gel *stacking* al vidre i posar la pinta. Esperar a que polimeritzi.
- 6-Preparar 1 L de tampó de transferència 1X (900 mL de H₂O+100 mL de tampó 10X).
- 7-Muntar els vidres al suport de plàstic, posar-ho dins de la cubeta i abocar-hi el tampó de transferència.
- 8-Treure la pinta amb cura.
- 9-Carregar 10 µL del marcador de pes molecular a un dels carrils.
- 10-Carregar les mostres als altres carrils.
- 11-Córrer el gel entre 70 i 90 min a 100 V.

Pas 6: transferència

a) Material

- cubeta de transferència, esponges, suports de plàstic i paper Whatman.
- Gel.
- Tampó de transferència.
- Membrana de PVDF.
- Metanol.

b) Procediment

1-Mullar la membrana amb metanol.

2-Sumergir la membrana i el gel en tampó de transferència durant 10 min.

3-Muntar el *sandwich* de la següent manera:

- a.part negra del suport de plàstic
- b.esponja
- c.paper Whatman
- d.gel
- e.membrana
- f.paper Whatman
- g.esponja
- h.part vermella del suport de plàstic

al muntar-ho cal evitar que quedin bombolles d'aire entre el gel i la membrana.

4-Muntar el suport a la cubeta, cobrir-ho amb tampó de transferència, i col·locar la cubeta a una safata amb gel.

5-Córrer durant 2 h a 60V.

Pas 7: immunoblot

a) Material

- TBS.
- TBS-T.
- Llet en pols.
- Anticossos primaris i secundaris (conjugats amb *horseradish peroxidase*).
- Metanol.

b) Procediment

1-Rentar la membrana amb TBS 5 min a temperatura ambient en agitació.

2-Activar la membrana mullant-la amb metanol i deixar-la assecar.

3-Preparar l'anticòs primari a la concentració adient (veure taula d'anticossos) diluït amb TBS-T+ 5% de llet en pols.

4-Incubar la membrana amb l'anticòs primari a un tub Falcon tota la nit a 4°C en rotació.

5-Rentar 2 vegades amb TBS-T durant 5 min a temperatura ambient en agitació.

6-Preparar l'anticòs secundari diluint-lo a la concentració que s'escaigui en TBS-T +5% de llet en pols.

7-Incubar la membrana 1 h amb l'anticòs secundari a un tub Falcon a temperatura ambient en rotació.

8-Rentar 1 h en TBS-T a una cubeta a temperatura ambient en agitació.

Pas 8: revelat

a) Material

-TBS.

-TBS-T.

- Sistema de detecció de western blot per quimioluminiscència *ECL-plus*.

-Transparències de plàstic.

b) Procediment

1-Rentar la membrana en TBS 4 min a temperatura ambient en agitació.

2-Preparar la reacció de quimioluminiscència mesclant les solucions del kit *ECL*: 2 mL de solució A + 20 µL de solució B.

3-Incubar la membrana 5 min amb la mescla a temperatura ambient en agitació. Assegurar-se que aquesta cobreix la membrana.

4-Posar la membrana entre dos trossos de plàstic de transparència i netejar l'excés de líquid amb un paper.

5-Detectar la senyal de quimioluminiscència usant el sistema VersaDoc (Bio-Rad). Aquest sistema permet mesurar la intensitat de senyal per àrea de cada banda. Els resultats s'expressen normalitzant amb el control de càrrega.

La figura 25 mostra un esquema del procés.

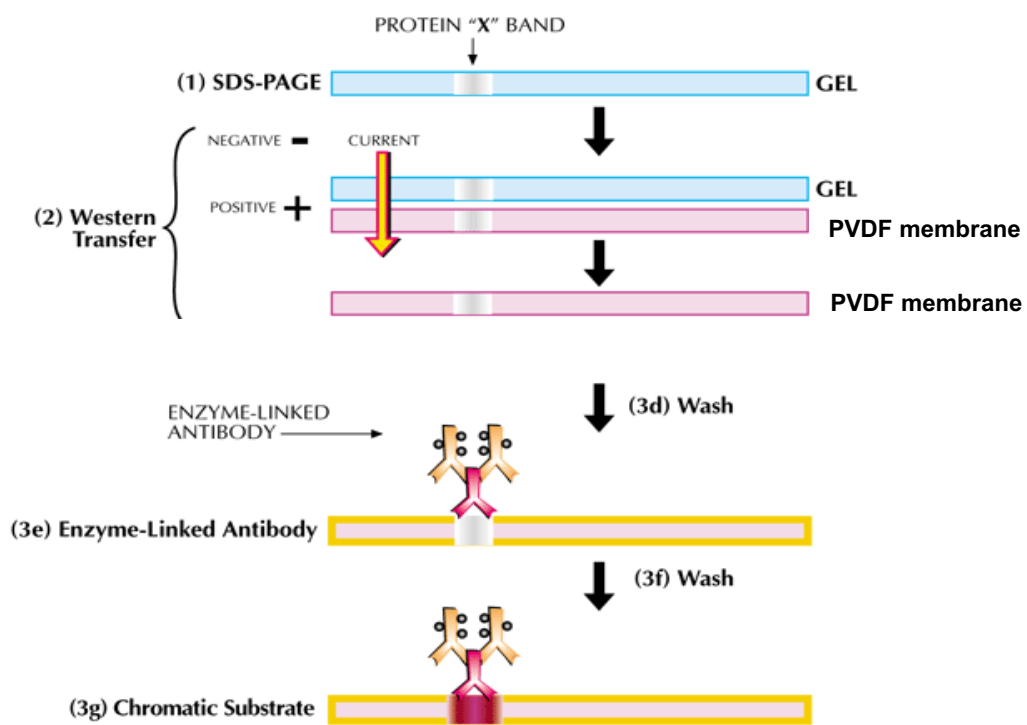


Figura 25. Esquema de procés de transferència i immunoblot. Plana web de PeprtechUS.

3.6 ASSAIG D'UNIÓ DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ AL DNA

Per avaluar la unió dels factors de transcripció NF- κ B/p65, C/EBP β i C/EBP δ al DNA s'ha fet servir els kits comercials *TransAM DNA-binding assay* d'Active Motif (C/EBPs ref. 100143 / NF- κ B ref. 102092). Aquests kits es basen en l'avaluació de la unió d'un determinat factor de transcripció, present a les mostres d'extractes proteics, a les seves seqüències consens d'unió al DNA, presents als pous d'una placa d'ELISA. La detecció i quantificació es fa mitjançant un assaig immunològic colorimètric, usant anticossos primaris específics per al factor de transcripció i anticossos secundaris conjugats a HRP que desenvolupen una reacció colorimètrica al incubar la placa amb el substrat de la HRP. Amb aquest assaig es determina la unió d'un factor de transcripció al DNA, el que permet avaluar la funcionalitat del factor de transcripció. L'especificitat de la unió es determina usant un assaig de competició en el que s'afegeix a la placa un excés d'oligonucleòtid consens i mutat. El color de fons es pot eliminar restant a l'absorbància dels pous amb mostra l'absorbància de pous de blanc, on hi ha tots els reactius però no hi ha mostra. Per a un esquema de la tècnica, veure figura 26. La preparació de solucions i el protocol es fan seguint les instruccions del fabricant.

Pas 1: extracció de proteïnes nuclears

Es fa servir un flascó T75 per cada condició experimental.

a) Material

Producte	Proveïdor	Referència
NaF	Sigma	S6521
β -glicerolfosfat	Merck	1.04168
Nitrofenil fosfat (PNPP)	Sigma (biochemika)	71770
NaVO ₃	Sigma	S6508
HEPES	Sigma	H7006
Na ₂ MoO ₄	Sigma	M1003
Complete	Roche	1836145

b) Preparació de solucions

PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) per a 20 mL

104 mg de NaF

1,1 g de β -glicerolfosfat

2,3 g de PNPP

62 mg de NaVO₃

Una vegada barrejat tot en un volum inferior a 20 mL de H₂O destil·lada, escalfar a 50°C 5 min, tornar a barrejar, ajustar el volum a 20 mL i fer alíquotes i guardar a -20°C.

HB (Hypotonic Buffer) per a 20 mL

96 mg d'HEPES

4,8 mg de NaF

48 mg de Na₂MoO₄

Una vegada barrejat s'ha d'ajustar el pH a 7,5, el volum a 20 mL i filtrar la solució. Es guarda a 4°C un màxim de 2 setmanes.

Solucions d'extracció:

- PBS/PIB amb *Complete*: 70 mL PBS +3 mL *Complete* + 3,5 mL de PIB
- HB amb *Complete*: 5 mL + 200 µL de *Complete*
- Igepal 10%: 270 µL de HB+ 30 µL de Igepal
- *Lysis buffer* amb *Complete*: 500 µL de tampó concentrat + 6 µL de DTT + 20 µL de *Complete*

c) Procediment

1-Rentar els pous amb 7,5 mL de PBS/PIB amb *Complete*.

2-Afegir 10 mL de PBS/PIB amb *Complete* i rascar.

3-Recollir en un tub Falcon de 15 mL, centrifugar a 4°C 5 min a 300 g.

4-Resuspendre el pellet en 1 mL de HB amb *Complete* i passar-ho a un tub Eppendorf de 1,5 mL.

5-Deixar les cèl·lules en gel 15 min.

6-Afegir 50 µL d'Igepal 10% i pipetejar fort.

7-Centrifugar 30 min a màxima velocitat.

8-Resuspendre el pellet en 100 µL de *Lysis buffer* amb *Complete*.

9-Agitar en plataforma en gel 30 min.

10-Centrifugar 10 min a 10.400 g.

11-Guardar el sobrenedant a -80°C.

Pas 2: quantificació de la concentració de les proteïnes (Mètode de Bradford)

Per a aquest assaig la determinació de proteïnes es realitza mitjançant el mètode de Bradford perquè el *Lysis buffer* interfereix amb la mesura quan s'usa el mètode de quantificació de Lowry.

a) Material

-H₂O.

-Reactiu de Bradford (Bio-Rad ref. 500-0006).

-BSA (Sigma ref. A2153) 1 mg/mL.

b) Procediment

1- Preparar la recta patró diluint la solució mare de BSA 1 mg/mL en H₂O tal com s'indica a la taula inferior.

Concentració (mg/mL)	BSA (µL)	H ₂ O (µL)
20	100	700
12	80	720
8	60	740
6	40	760
4	20	780
2	10	790
1	5	795
0	0	800

2-Diluir 5 µL de mostra en 795 µL d' H₂O.

3-Afegir 200 µL de reactiu de Bradford a les mostres i a la recta patró.

4-Incubar 10 min.

5-Carregar 200 µL de mostra en duplicat a una placa de 96p.

6-Llegir a 595 nm a l'espectrofotòmetre de plaques.

Pas 3: assaig d'unió al DNA de C/EBPβ, C/EBPδ, i NF-κB/p65**a) Material**

-Pipeta multicanal.

-Anticòs primari de C/EBPδ (Santa Cruz ref. sc-636X). Aquest anticòs no està disponible al *kit*, ja que el *kit* d'unió al DNA de C/EBPs només està posat a punt per C/EBPα i C/EBPβ. L'assaig d'unió al DNA de C/EBPδ es va posar a punt al laboratori.

Es va usar l'anticòs secundari proporcionat pel *kit*.

b) Solucions utilitzades (volums necessaris per a una placa de 96 pous). Tots els productes i solucions mare estan disponibles al *kit* comercial.

- *Complete lysis buffer*

2,128 mL de *Lysis buffer stock*

10,8 µL de DTT

21,6 µL de *Protease inhibitor cocktail*

- *Complete binding buffer*

4,224 mL de *Binding buffer stock*

8,6 µL de DTT

85,5 µL de *Herring sperm*

- *Antibody binding buffer*

2,16 mL de *Antibody binding buffer stock*

19,44 mL de H₂O milliQ

- *Wash buffer*

21,6 mL de *Wash buffer stock*

194,4 mL de H₂O milliQ

- *Developing solution* 10 mL

- *Stop solution* 10 mL

c) Procediment

1-Afegir *Complete binding buffer* a cada pou.

*Als pous en els que es farà l'assaig de competició, afegir l'oligonucleòtid consens o mutat. Aquest assaig permet assegurar l'especificitat de la unió. L'oligonucleòtid consens competirà amb l'oligonucleòtid de la placa per la unió del factor de transcripció, i al estar en excés evitarà que la mostra s'uneixi a la placa; l'oligonucleòtid mutat en canvi no tindrà cap efecte.

2-Afegir la mostra:

-Pous de mostres: mostra diluïda en *Complete lysis buffer*

-Pous de blanc: *Complete lysis buffer* sense mostra

-Pous de control positiu: extracte nuclear concentrat proporcionat pel *kit* diluït en *Complete lysis buffer*

3-Cobrir la placa amb plàstic adhesiu i incubar 1 h a temperatura ambient amb agitació suau.

- 4-Rentar 3 vegades amb *Wash buffer* sense agitació.
- 5-Afegir l'anticòs primari diluït en *Antibody binding buffer* fins un volum final de 100 µL.
- 6-Incubar 1 h a temperatura ambient sense agitació.
- 7-Rentar 3 vegades amb *Wash buffer* sense agitació.
- 8-Afegir l'anticòs secundari dilució 1/1000 1 h a temperatura ambient sense agitació.
- 9-Rentar 4 vegades amb *Wash buffer* sense agitació.
- 10-Afegir 100 µL de *Developing solution* i incubar a les fosques el temps que s'indiqui al protocol per a aquell lot en concret.
- 11-Afegir 100 µL de *Stop solution*.
- 12-Llegir l'absorbància a 450 nm i 655 nm a un espectrefotòmetre de plaques. Restar les lectures 450 nm-655 nm per obtenir la mesura neta.

Anticossos utilitzats

Proteïna d'estudi	Concentració d'anticòs primari	µg control positiu	µL de <i>Complete lysis buffer</i>	µL de mostra	pg de DNA cons/mut
C/EBPβ	1/1500	1	40	10	40
C/EBPδ	1/500	1	40	10	40
NF-κB/p65	1/1000	2,5	30	20	20

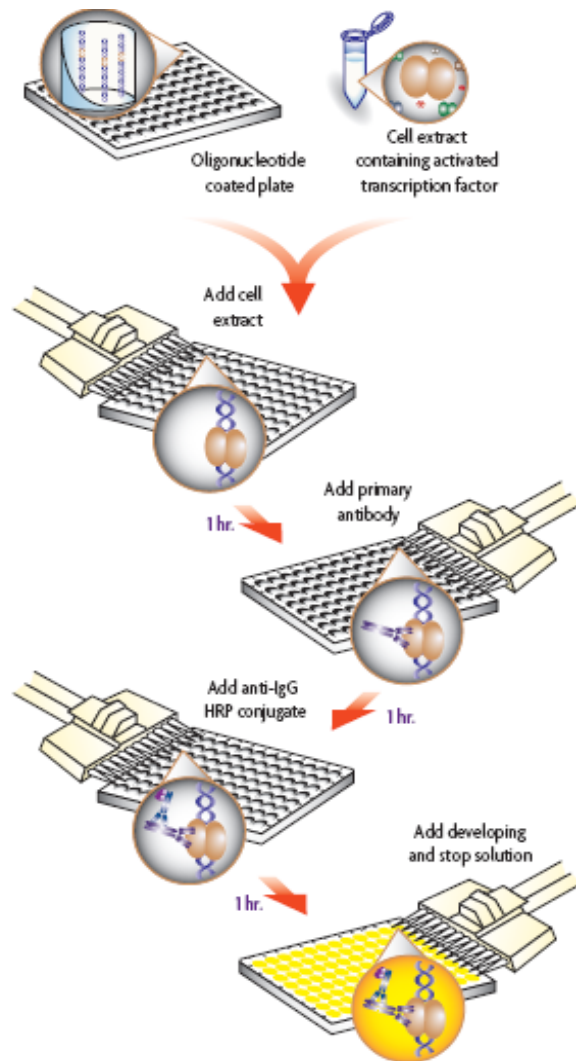


Figura 26. Representació esquemàtica del funcionament del kit d'unió al DNA

3.7 ASSAIG D'ELISA

3.7.1 ASSAIG D'ELISA DE TNF- α

El TNF- α és una de les principals citocines proinflamatories i juga un paper molt important en l'activació microglial. La quantificació de l'alliberació de TNF- α al medi de cultiu s'ha realitzat mitjançant l'assaig immunològic lligat a enzim ELISA (de l'anglès *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Per fer-ho s'ha usat el *kit* comercial *Mouse TNF α ELISA Ready-SET-Go kit* (eBioscience ref. 88-7324). Tots els tampons s'han preparat seguint les indicacions del fabricant. El protocol usat és el que s'especifica al *kit*.

a) Material

- Plaques de 96 pous per ELISA *immuno-plate* (Nunc ref. 093258).
- Pipeta multicanal.
- BSA (Sigma A2153).
- Tween 20 (Sigma P7949).
- tabletes de PBS (Sigma P4417).

b) Preparació de solucions i tampons

Tampons necessaris (per 1 placa)

- *Washing buffer* (PBS + Tween 0.05%): 1 L PBS + 500 μ L de Tween
- *Coating buffer* (es reconstitueix quan arriba el *kit*): dissoldre el sobre en 1 L H₂O.
- *Assay diluent buffer* (75 ml 1X): 15 ml del solució mare 5X + 60 ml H₂O destil·lada
- *Stop solution* : 6 ml de H₂SO₄ 1 M
- Estàndards : vials (d'un sol ús) 1 μ g/mL. S'han de dissoldre 1/1000 en *Diluent buffer* per tenir la concentració més alta de la corba (1000 pg/mL). Corba patró de dilucions seriades (1000 - 500 - 250 -125 - 62,5 - 31,25 - 0 pg/ml)

Reactius (per 1 placa)

- Anticòs de captura: 42 μ L + 10,5 mL de *Coating buffer*
- Anticòs de detecció: 42 μ L + 10,5 mL de *Diluent buffer*
- Avidin-HRP: 42 μ L + 10,5 mL de *Diluent buffer*
- Estàndards: 1 vial
- TMB: 11 mL

b) Procediment (2 dies)

- 1-Recobrir la placa amb 100 µL/pou d'anticòs de captura. Incubar tota la nit a 4°C.
- 2-Aspirar els pous i fer 5 rentats de 1 min amb 250 µL/pou de *Washing buffer*. Picar suaument la placa sobre un paper absorbent per eliminar al màxim el líquid dels pous.
- 3-Bloquejar amb 200 µL/pou de *Diluent buffer* 1 h a temperatura ambient.
- 4-Aspirar els pous i fer 5 rentats de 1 min amb 250 µL/pou de *Washing buffer*. Picar suaument sobre un paper absorbent per assecar bé la placa.
- 5-Diluir els estàndards, posar 100 µL/pou d'estàndard o de mostra diluïda (diluir les mostres directament al pou). Cobrir la placa i incubar 2 h a temperatura ambient .
- 6-Aspirar els líquid dels pous i fer 5 rentats de 1 min amb 250 µL/pou de *Washing buffer*. Picar suaument la placa sobre un paper absorbent.
- 7- Afegir 100 µL/pou d'anticòs de detecció i incubar 1 h a temperatura ambient.
- 8-Aspirar els pous i fer 5 rentats de 1 min amb 250 µL/pou de *Washing buffer*. Picar suaument la placa sobre un paper absorbent.
- 9-Afegir 100 µL/pou de *Avidin-HRP*. Incubar 30 min a temperatura ambient, segellant la placa amb Parafilm.
- 10-Aspirar els pous i fer 7 rentats de 2 min amb 250 µL/pou de *Washing buffer*. Picar suaument sobre un paper absorbent per assecar bé la placa.
- 11-Afegir 100 µL/pou de *Substrate solution* (1xTMB). Incubar a temperatura ambient durant 15 min, protegint la placa de la llum.
- 12-Afegir 50 µL/pou de H₂SO₄ per parar la reacció.
- 13-Llegir la placa a 560 nm i 450 nm a l'espectrofotòmetre de plaques. Restar les lectures 450 nm-560 nm. La lectura resultant s'interpol·la a la recta patró per obtenir el resultat de l'assaig en pg/mL.

3.7.2 ASSAIG D'ELISA DE IL-6

La IL-6 és una citocina proinflamatòria implicada en l'activació microglial. Per a quantificar l'alliberació de IL-6 al medi de cultiu s'ha utilitzat el *kit* comercial *Murine IL-6 Eli-pair* (Diaclone 861. 020. 010). El protocol usat és el que s'especifica al *kit*.

a) Material

- Plaques de 96 pous per ELISA *immuno-plate* (Nunc ref. 093258).
- Pipeta multicanal.
- BSA (Sigma A2153).
- Tween 20 (Sigma P7949).
- PBS (Sigma P4417).

b) Preparació de solucions i tampons*Tampons necessaris (per 1 placa)*

- Solució per al recobriment de la placa. PBS pH 7,2-7,4. Dissoldre 5 capsules de PBS en 1 L de H₂O destil·lada.
- Solució de rentat. PBS + Tween 20 0,05%. 300 mL de PBS + 150 µL de Tween 20
- Solució de saturació. PBS + BSA 5%: 60 mL de PBS + 3 g de BSA.
- Solució de dilució del estàndard. PBS + BSA 1%: 40 mL de PBS + 0,4 g de BSA
- Solució de dilució de l'anticòs biotinitat. PBS + BSA 1%: 40 mL de PBS + 0,4 g de BSA
- Solució de dilució de la estreptavidina-HRP. PBS + BSA 1% + Tween 20 0,1%: 20 mL de PBS + 0,2 g de BSA + 10 µL de Tween 20
- Solució per aturar la reacció. 20 mL H₂SO₄ 1M
- Estàndards: resuspendre tot el contingut del vial en el volum de solució de dilució del estàndard que s'indica al vial. La concentració final de l'estàndard serà 500 pg/mL. Per preparar la recta patró es fan dilucions seriades ½ a partir de la solució 500 pg/mL. La corba patró de dilucions seriades consta dels punts 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 0 pg/ml.

Reactius (per 1 placa)

- Anticòs de captura: 20 µL + 10 mL de solució per al recobriment de la placa.
- Anticòs de detecció: 100 µL + 5 mL de solució de dilució de l'anticòs biotinitat.
- Estreptavidina-HRP: 5 µL + 500 µL solució de dilució de la estreptavidina-HRP. Diluir 150 µL d'aquesta dilució en 10 mL de solució de dilució de la estreptavidina-HRP
- Estàndards: 1 vial
- TMB: 11 mL

b) Procediment (3 dies)

1-Recobrir la placa amb 100 µL/pou d'anticòs de captura. Incubar tota la nit a 4°C.

2-Aspirar els pous i fer 2 rentats de 1 min amb 250 µL/pou de solució de rentat. Picar suaument la placa sobre un paper absorbent per eliminar al màxim el líquid dels pous.

3-Bloquejar amb 250 µL/pou de solució de saturació 2 h a temperatura ambient.

4-Picar suaument la placa sobre un paper absorbent per eliminar al màxim el líquid dels pous. Deixar assecar durant 24 h.

5-Diluir els estàndards, posar 100 µL/pou d'estàndard o de mostra diluïda (diluir les mostres directament al pou).

7- Afegir 100 µL/pou d'anticòs de detecció i incubar 3 h a temperatura ambient.

8-Aspirar els pous i fer 3 rentats de 5 min amb 250 µL/pou de solució de rentat. Picar suaument la placa sobre un paper absorbent.

9-Afegir 150 µL/pou de estreptavidina-HRP. Incubar 20 min a temperatura ambient.

10-Aspirar els pous i fer 3 rentats de 5 min amb 250 µL/pou de solució de rentat. Picar suaument sobre un paper absorbent per assecar bé la placa.

11-Afegir 100 µL/pou de TMB. Incubar a temperatura ambient durant 10-15 min, protegint la placa de la llum.

12-Afegir 100 µL/pou de H₂SO₄ per parar la reacció.

13-Llegir la placa a 560 nm i 450 nm al espectrefotòmetre de plaques. Restar les lectures 450 nm-560 nm. La lectura resultant s'interpol·la a la recta patró per obtenir el resultat de l'assaig en pg/mL.

3.8 DETERMINACIÓ DE NITRIT

La producció de NO dels cultius es va estimar a partir de la mesura de l'acumulació de l'ió nitrit (NO_2^-) al medi de cultiu. Per fer-ho es va utilitzar la reacció de Griess. La producció de NO és un procés molt important en l'activació microglial i en aquesta tesi hem utilitzat aquest paràmetre com a indicador de l'estat d'activació de la microglia.

a) Material

- NaNO_2 (Sigma ref. S3421).
- Medi de cultiu.
- Placa de 96 pous.
- Solucions de Griess A i B.

b) Preparació de solucions i estàndards

- Solució A (per a 150 mL)

1,5 g de sulfanilamida (Sigma ref. S9251)

7,5 mL d'àcid fosfòric (Sigma ref. S6560)

Enrasar fins a 150 mL amb aigua.

Guardar a 4°C, és estable durant 3 mesos.

- Solució B (per a 150 mL)

150 mg de N-1-dihidroclorid de naptilendiamida (Sigma ref. N5889)

Enrasar fins a 150 mL amb aigua.

Guardar a 4°C, és estable durant 3 mesos.

- Estàndards i recta patró

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

*El primer punt es prepara diluint 4 μL de la solució 20 mM de NaNO_2 en 800 μL de medi. La resta es prepara fent dilucions seriades $\frac{1}{2}$ en medi.

c) Procediment

1-Posar 50 μL de cada mostra per duplicat a la placa de 96p.

2-Posar 50 μL de cada punt de la recta patró per duplicat a la placa de 96p.

3-Barrejar quantitats iguals de solució A i solució B (3 mL de cada un per a una placa de 96p).

4-Afegir 50 μL de la solució A+B a cada pou i incubar 10 min a temperatura ambient.

5- Llegir a l'espectrofotòmetre de plaques a 540 nm. La lectura resultant s'interpol·la a la recta patró per obtenir el resultat de l'assaig en concentració μM .

3.9 TÈCNIQUES D'AVUACIÓ DE MORT CEL·LULAR

3.9.1 TINCIÓ AMB IODUR DE PROPIDI

La tinció amb iodur de propidi és una tècnica per mesurar la mort cel·lular basada en el fet que aquest agent només travessa la membrana de les cèl·lules mortes. El marcatge es pot detectar al microscopi de fluorescència i també es pot quantificar a un lector de fluorescència. En aquesta tesi aquesta tècnica s'ha usat per avaluar l'efecte tòxic per als cultius de micròglia primària del medi de neurones apoptòtiques.

a) Material

-Iodur de propidi (Molecular Probes P1304).

b) Procediment

1-Afegir el iodur de propidi a una concentració final de 7,5 µg/mL. Incubar 1 h a 37°C (a l'incubador de cultius).

2-Observar al microscopi.

3.9.2 ELISA MAP2-ABTS

Per a avaluar la viabilitat neuronal es fa una immunocitoquímica amb peroxidasa per MAP2 i el marcatge es solubilitza amb el substrat ABTS (àcid 3-etilbenzotiazolina-6-sulfònic). Per fer-ho s'ha usat el *kit Peroxidase Substrate ABTS* (Vector, ref. SK-4500), d'acord amb el protocol de Brooke i cols (1999) amb algunes modificacions. Per calcular el percentatge de viabilitat, a l'absorbància dels pous amb mostra se li resta l'absorbància del blanc, que correspon a pous on hi ha tots els reactius excepte l'anticòs primari anti-MAP2, el que permet obviar el marcatge inespecífic.

a) Material

-*kit* d'ABTS.

-PBS.

-SDS (Fluka ref. 71729).

b) Procediment

1-Fer una immunocitoquímica per a MAP2 seguint el protocol especificat a l'apartat 3.2 i dins d'aquest el *pas 4.1 (Revelat amb diaminobenzidina)*. Realitzar tot el protocol fins a la incubació amb extravidina peroxidasa.

2-Després de la incubació amb extravidina, rentar amb PBS 3 vegades en agitació durant 5 min.

3-Preparar el reactiu d'ABTS: per cada 5 ml de H₂O milliQ afegir 2 gotes de cada una de les tres solucions del *kit*, agitant bé abans de posar-ho al pou.

- 4-Afegir el reactiu d'ABTS: 200 µL/pou de placa de 48p - 67 µL/pou de placa de 96p.
- 5-Incubar 15-30 min protegint la placa de la llum.
- 6-Parar la reacció amb SDS 1% (en H₂O).
- 7-Llegir a l'espectrefotòmetre de plaques a 405 nm.

Els resultats s'expressen com a percentatge de viabilitat respecte al control aplicant la fórmula:

$$\frac{(\text{absorbància mostra} - \text{absorbància blanc})}{(\text{absorbància control} - \text{absorbància blanc})} \times 100$$

3.10 TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

Els resultats s'expressen com la mitjana +/- l'error estàndard de la mitjana (SEM). Per analitzar les diferències entre dos grups s'usa el test de la t de *Student*, amb dades aparellades o no aparellades en funció del tipus d'experiment. Per analitzar les diferències entre més de dos grups s'usa l'anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor o de dos factors, amb dades aparellades o no aparellades en funció del tipus d'experiment. Les diferències es consideren significatives quan $p \leq 0,05$. Les dades s'han analitzat usant el programa GraphPad Prim 4.0 (GraphPad software).

4. RESULTATS

4.1 POSTA A PUNT I CARACTERITZACIÓ DEL MODEL DE NEUROTOXICITAT MEDIADA PER ACTIVACIÓ GLIAL

INTRODUCCIÓ

L'activació glial és un procés clau als processos neurodegeneratius. La resposta microglial, en desencadenar-se, té generalment un efecte beneficiós, ja que promou el retorn del SNC a la seva homeòstasi, però quan es cronifica els efectes poden ser negatius, ja que pot acabar sent neurotòxica *per se*. El nostre propòsit és estudiar l'efecte neurotòxic de la micròglia activada com a diana terapèutica en processos neurodegeneratius. Per fer-ho, calia posar a punt dos models, d'una banda, un model d'activació microglial on avaluar la producció de molècules potencialment neurotòxiques, com la COX2, el TNF α , el NO i la IL-6. D'altra banda, per avaluar un possible efecte neuroprotector de la inhibició de l'activació glial, calia un model de neurotoxicitat induïda per activació glial, on a més de mesurar patrons inflamatoris, es pogués quantificar la mort neuronal.

Per posar a punt aquests models s'han usat cèl·lules microgials provinents de cultius primaris de ratolí o de la línia cel·lular murina BV2. Al treballar amb línies cel·lulars es disposa d'un major nombre de cèl·lules, el que d'una banda permet obtenir més quantitat de mostra, i de l'altra resulta molt útil per provar diferents condicions experimentals. Els cultius primaris, per la seva part, permeten confirmar en un paradigma experimental més fisiològic els resultats obtinguts a les línies cel·lulars.

En aquest primer apartat de resultats es presenten d'una banda la posta a punt dels models experimentals, en la qual s'han provat diferents concentracions i temps de tractament proinflamatori, i diferents densitats de micròglia als cocultius. D'altra banda, una vegada escollides les condicions de treball, es presenten els resultats de la caracterització de cada un dels models, avaluant la producció de factors proinflamatoris i l'efecte neurotòxic del tractament. Per últim es presenten dades que permeten determinar quin paper juguen els diferents factors proinflamatoris produïts en l'efecte neurotòxic del tractament.

4.1.1 EL TRACTAMENT AMB LPS/IFN- γ INDUEIX UN PATRÓ D'ACTIVACIÓ PROINFLAMATÒRIA A LES CÈL·LULES MICROGLIALS

Per posar a punt un model d'activació microglial proinflamatori es van tractar cèl·lules BV2 i de micròglia primària amb l'estímul LPS/IFN γ , i es van mesurar diversos paràmetres inflamatoris.

En les cèl·lules BV2 el tractament (LPS 100 ng/mL + IFN- γ 0,5 ng/mL) va induir un augment en l'expressió proteica de iNOS i COX-2 a les 12 h (figura 27). Aquest efecte s'acompanyà d'un augment, 24 h després del tractament, de l'alliberament dels factors inflamatoris NO i TNF- α , i a més s'observà una tendència a augmentar la secreció de IL-6 (figura 28)

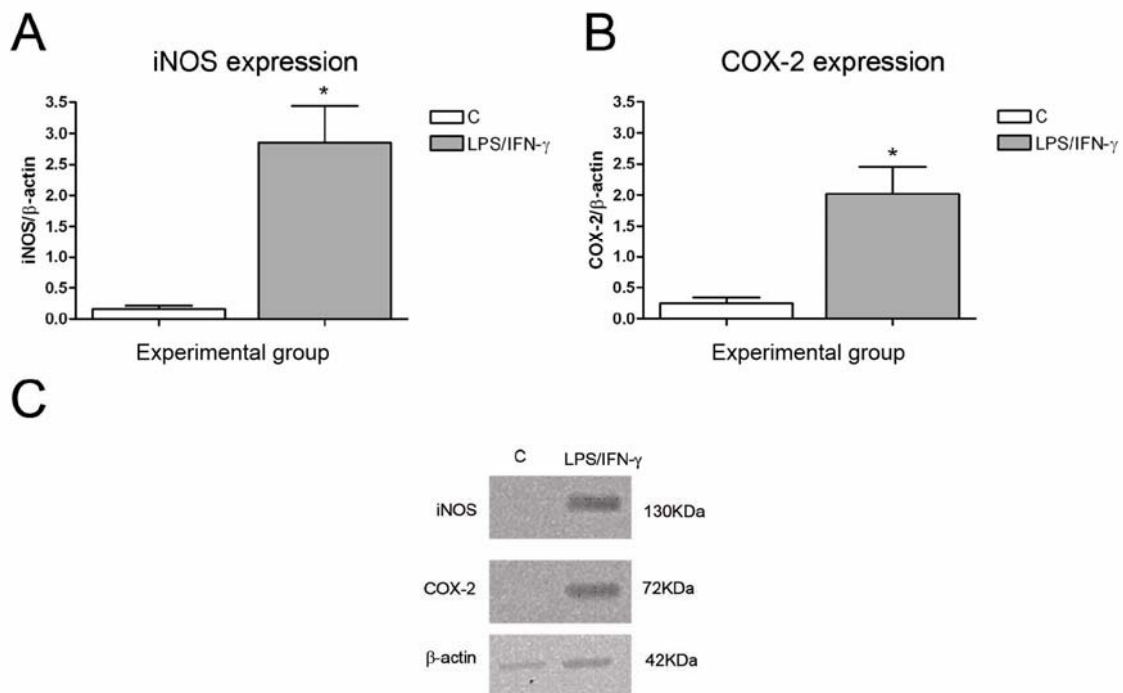


Figura 27. Expressió de iNOS (A) i COX-2 (B) a cultius de BV2 en condició control o 12 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. * $p < 0,05$ vs C. Test de la *t* de Student amb dades aparellades. (C) Imatge d'un western blot representatiu.

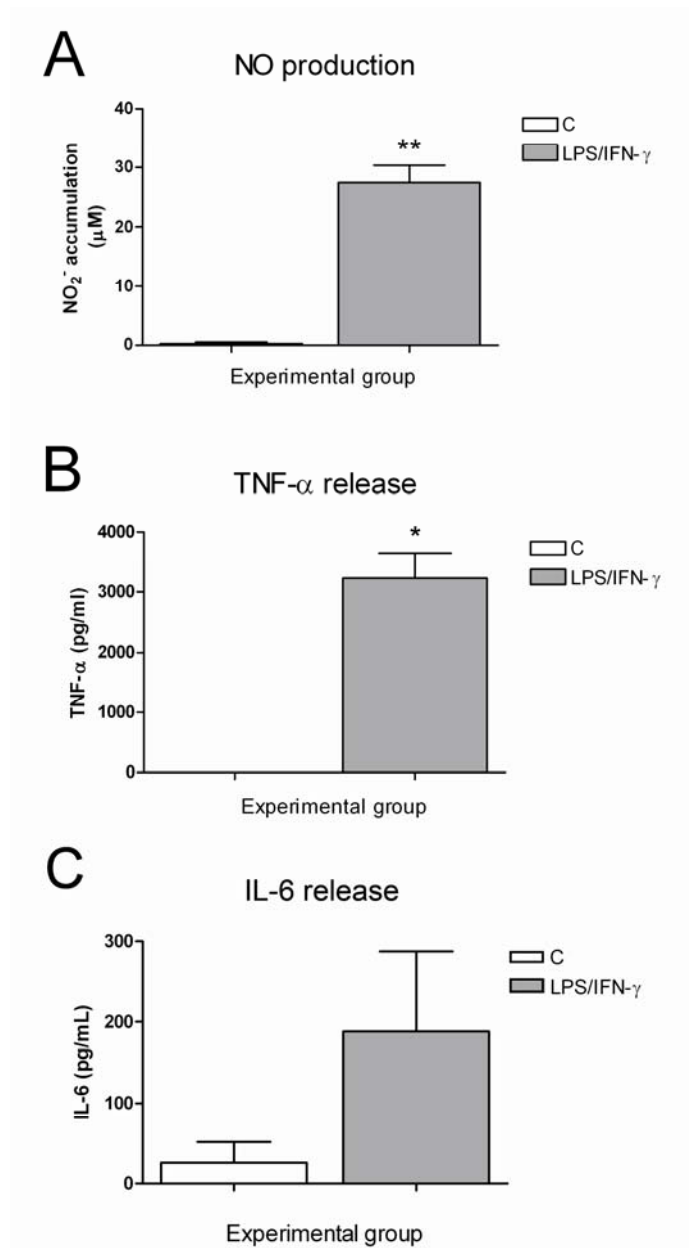


Figura 28. Producció de de NO (A), TNF- α (B) i IL-6 (C) a cultius de BV2, en situació control o 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 6 experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs C. Test de la t de Student amb dades aparellades.

Paral·lelament es va posar a punt el model d'inflamació amb cultius de micròglia primària activant-los amb LPS/IFN- γ (LPS 100 ng/mL + IFN- γ 30 ng/mL). En aquest cas es va usar una concentració de IFN- γ més elevada que en cultius de BV2. La raó és que necessitàvem una concentració capaç d'induir no només activació microglial sinó també neurotoxicitat, i tal com s'explicarà més endavant concentracions de tractament inferiors a 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL d'IFN- γ no causen una neurotoxicitat significativa. Tal com succeïa als cultius de BV2, el tractament va induir un augment en l'expressió de iNOS i COX-2 12 h després de tractar (figura 29), que es va acompanyar d'un increment en l'alliberament de NO, TNF- α i IL-6 a les 24 h del tractament (figura 30).

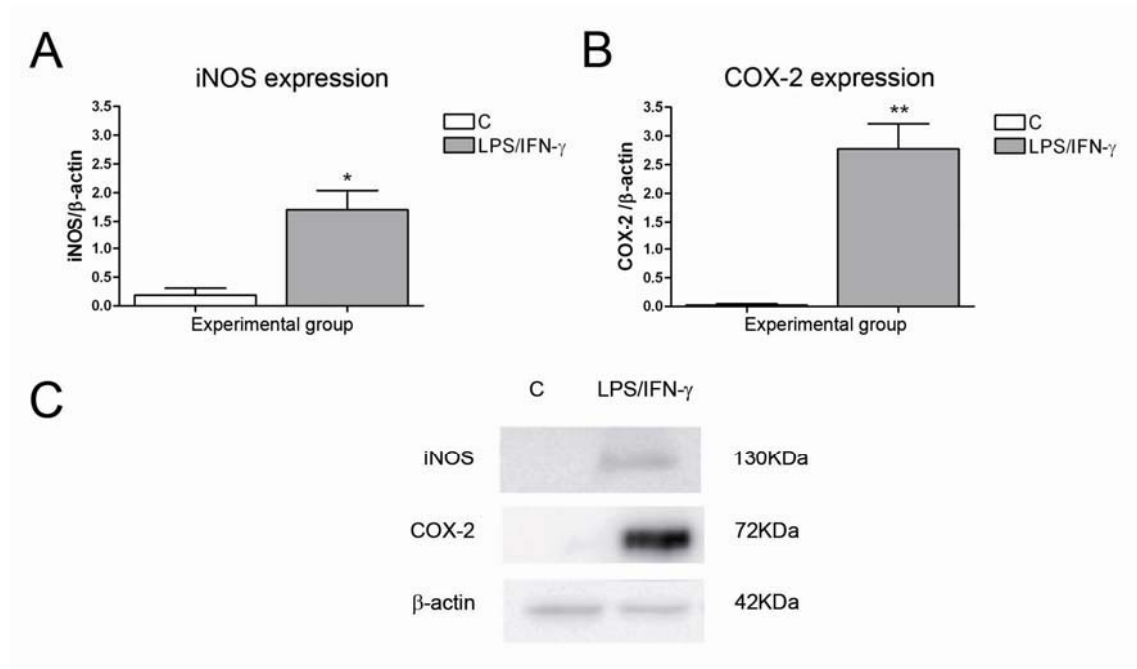


Figura 29. Expressió de iNOS (A) i COX-2 (B) a cultius de micròglia primària en condició control o 12 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 6 experiments. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs C. Test de la t de Student amb dades aparellades. (C) Imatge d'un western blot representatiu.

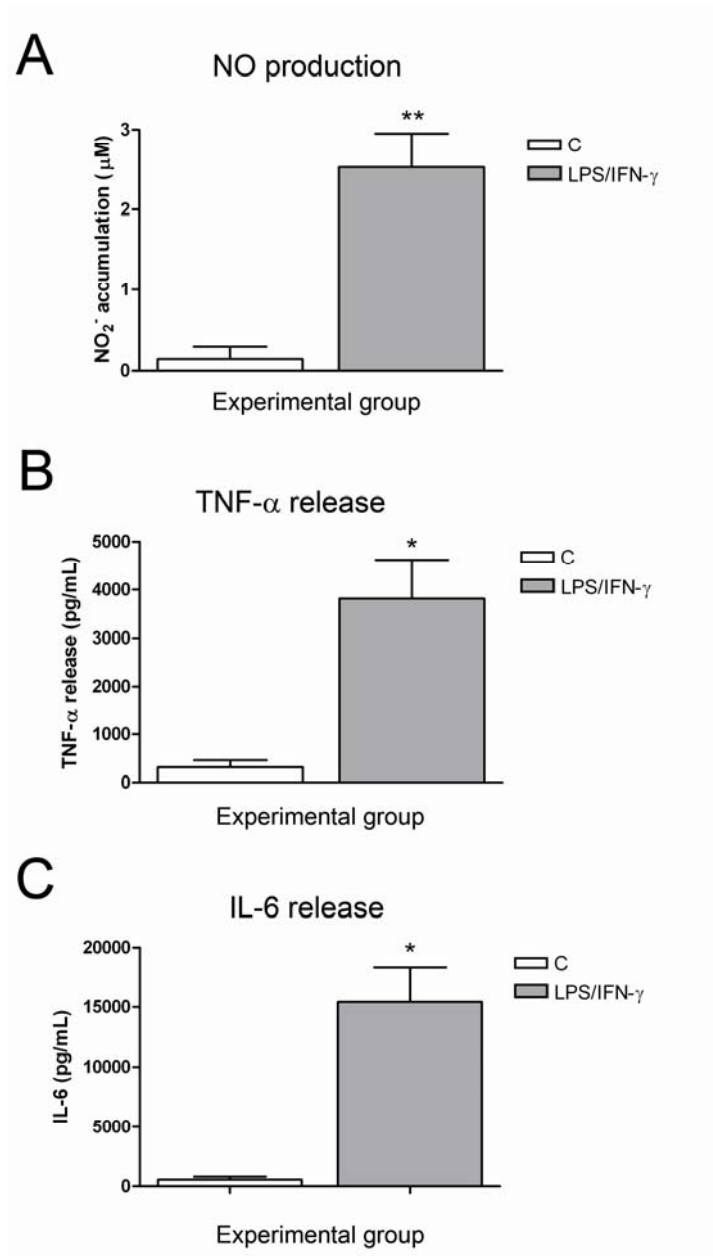


Figura 30. Producció de NO (A), TNF- α (B) i IL-6 (C) a cultius de microglia primària, en situació control o 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 4 i 6 experiments.
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs C. Test de la t de Student amb dades aparellades.

4.1.2 POSTA A PUNT I CARACTERITZACIÓ DEL MODEL DE COCULTIU DE NEURONES CORTICALS DE RATOLÍ I CÈL·LULES DE LA LÍNIA MICROGLIAL BV2

Per a disposar d'un model de mort neuronal induïda per activació glial, es va posar a punt un cocultiu de neurones corticals de ratolí i cèl·lules microgials murines de la línia cel·lular BV2. Els cultius de neurones corticals es van obtenir a partir d'embrions de ratolí de 16 dies. No es van utilitzar agents antimitòtics, per tant no eren cultius purs de neurones sinó que contenien també cèl·lules gials. La composició del cultiu es va caracteritzar realitzant comptatges dels diferents tipus cel·lulars presents al cultiu. Per fer-ho es van realitzar dobles marcatges usant hematoxilina (que tenyeix els nuclis) i un anticòs específic de cada tipus cel·lular. Els resultats van mostrar que el cultiu de neurones contenia aproximadament un 76% de neurones (cèl·lules MAP2 positives, figura 31 A), un 16% d'astròcits (cèl·lules GFAP positives, figura 31 B), menys d'un 1% de micròglia (cèl·lules CD11b positives, figura 31 C) i un 6% d'altres tipus cel·lulars. Per simplificar la terminologia, denominaré aquests cultius "cultius neuronals", però cal tenir en compte que eren cultius enriquits en neurones que també contenien astròcits. Pel que fa a la micròglia, la seva presència en aquests cultius era inferior al 1%, per tant podem afirmar que pràcticament tota la micròglia que contenien els cocultius va ser la que es sembrà *a posteriori*.

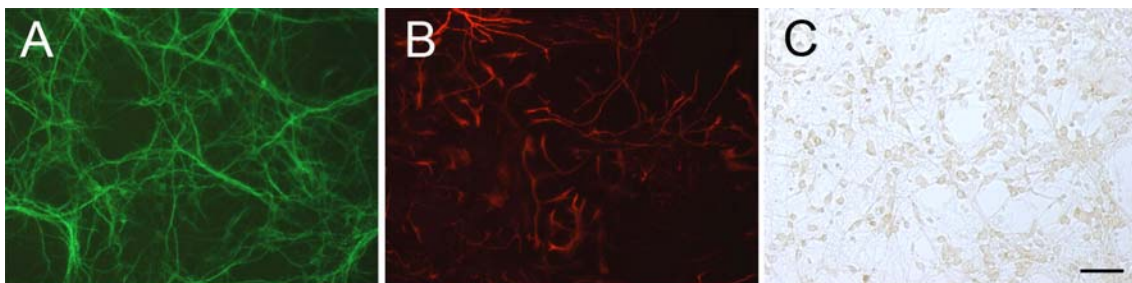


Figura 31. Triple immunocitoquímica de (A) MAP2 per marcar neurones, (B) GFAP per marcar astròcits, i (C) CD11b per marcar micròglia d'un cultiu de neurones corticals de ratolí de 5 DIV. La barra representa 50 μ m.

El primer pas en la posta a punt dels cocultius va ser testar diferents densitats de BV2 per determinar les condicions experimentals òptimes on poder estudiar l'efecte neurotòxic de la micròglia activada. Per determinar aquestes condicions es van sembrar cèl·lules BV2 sobre un cultiu de neurones corticals de 5 DIV. A 5 DIV els cultius neuronals eren morfològicament madurs, ja que expressaven la isoforma 2a de la proteïna MAP, isoforma present a les neurones madures però no en estadis previs. Dues hores després de sembrar les BV2, els cocultius es van tractar amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ i 24 h després es va avaluar la mort neuronal mitjançant

l'assaig ELISA de MAP2 usant el *kit* ABTS. Les BV2 es van sembrar a una proporció neurona: BV2 d'entre 11:1 i 4:1, observant que (en absència de tractament) al incrementar la densitat de BV2 al cocultiu hi havia una tendència a incrementar la mort neuronal (figura 32 A), efecte que s'accentuava amb el temps de cocultiu. Al tractar els cocultius amb LPS/IFN- γ durant 24 h, s'observà un efecte neurotòxic estadísticament significatiu (aproximadament un 40% de mort), però aquest efecte no s'observà al augmentar la concentració de BV2 (figura 32 B). En conseqüència, la proporció escollida va ser 5:1.

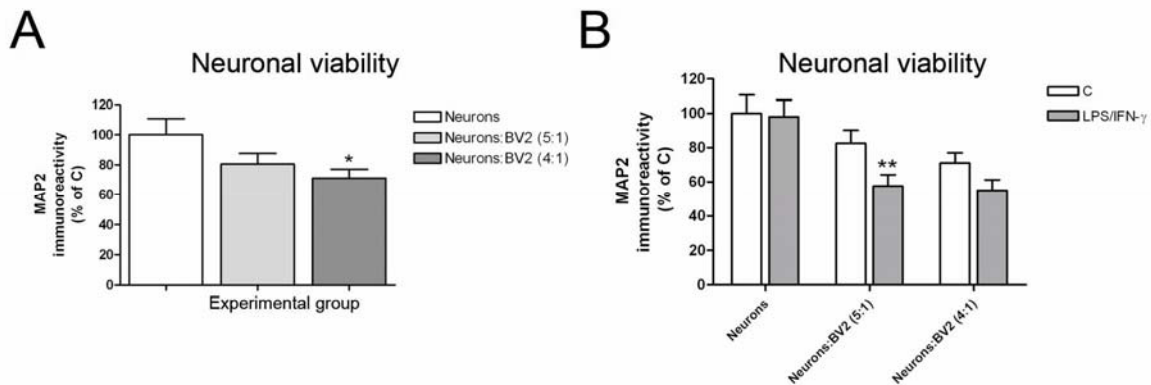


Figura 32. Cocultius de neurones i BV2. (A) Efecte sobre la viabilitat neuronal (24 h) de l'addició de cèl·lules BV2 a diferents densitats. (B) Efecte sobre la viabilitat neuronal (24 h) del tractament amb LPS/IFN- γ a cultius de neurones o de neurones i BV2 a diferents densitats. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. (A) ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls i (B) ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs C.

Una vegada establertes les condicions de treball es va caracteritzar el model avaluant a cultius neuronals i en cocultius de neurones i BV2 l'efecte del LPS/IFN- γ (24 h) en la viabilitat neuronal, la producció de NO i l'alliberació al medi de TNF- α . Tal com mostra la figura 33, en cultius de neurones sense BV2 el tractament amb LPS/IFN- γ no va resultar neurotòxic (figura 33 A-B i E), i no va induir la producció de NO ni TNF- α (figura 33 F-G). Als cocultius de neurones i BV2 en canvi, el tractament va disminuir significativament la viabilitat neuronal (figura 33 C-E), efecte que s'acompanyà d'un increment de la producció de NO i TNF- α (figura 33 F-G).

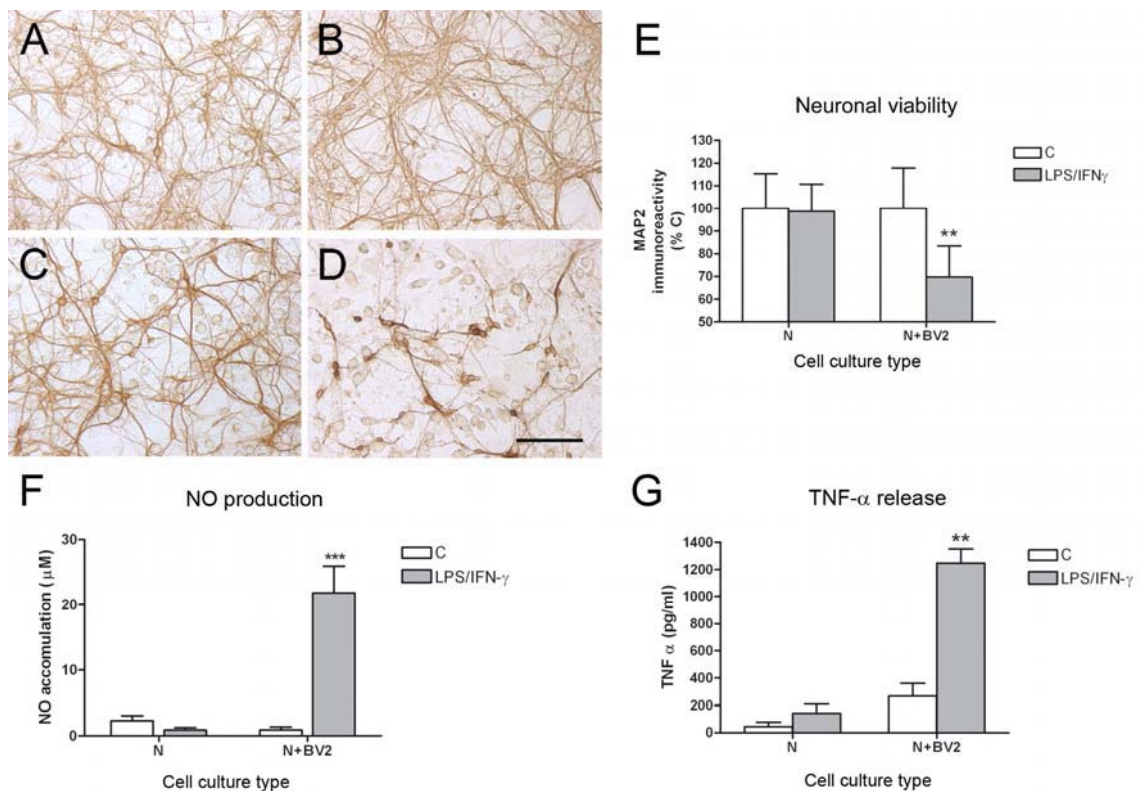


Figura 33. Viabilitat neuronal i paràmetres inflamatoris a cocultius neurona-BV2 en situació control o 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Marcatge amb MAP2 a cultius neuronals controls (A) i tractats amb LPS/IFN- γ (B), i a cocultius de neurones i BV2 controls (C) i tractats amb LPS/IFN- γ (D). La barra representa 100 μ m. (E) Viabilitat neuronal, (F) producció de NO i (G) de TNF- α als cultius de neurona o als cocultius de neurones i BV2 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

Els efectes descrits fins ara es van observar en cultius neuronals preparats amb una concentració de KCl de 25 mM al medi de cultiu. Aquesta concentració és superior a la que s'usa normalment als cultius de neurones corticals, i s'ha descrit que nivells elevats de potassi al medi incrementen la sensibilitat de cultius corticals de neurona-glia a l'efecte del LPS (Chang i cols. 2000). Seguidament es va passar a avaluar si al

cultivar les neurones en 5 mM de KCl (concentració habitual als cultius de neurones corticals) seguïem observant l'efecte neurotòxic del tractament. Tal com s'observa a la figura 34, vam comprovar que al disminuir la concentració de potassi al medi la viabilitat dels cocultius en condicions control no va variar però les neurones van esdevenir més resistents a la neurotoxicitat induïda per activació glial. Mentre que en cultius amb 25 mM de KCl el tractament induí una mort de gairebé el 40%, en cocultius amb 5 mM de KCl no s'observà efecte del tractament.

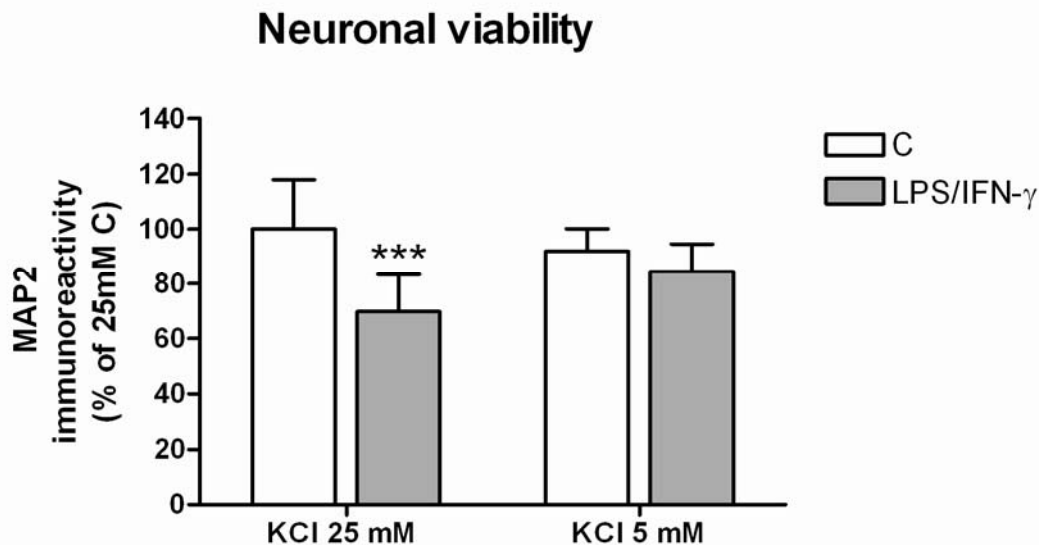


Figura 34. Efecte de la concentració de potassi a la viabilitat neuronal a cocultius de neurones i BV2 en situació control i 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. *** $p < 0,001$ vs C. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

Donat que havíem perdut l'efecte neurotòxic del tractament al cultivar les neurones en 5 mM de KCl, vam determinar si incrementant el temps de tractament o la concentració de IFN- γ del tractament es recuperava l'efecte neurotòxic. Així, vam tractar els cocultius amb el tractament usat fins ara (T1:100 ng/mL LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ) i un amb una major concentració de IFN- γ (T2:100 ng/mL LPS + 5 ng/mL de IFN- γ) mesurant la viabilitat neuronal en cada cas a 24 h i 48 h. Tal com mostra la figura 35, cap dels dos tractaments va produir un efecte neurotòxic a 24 h. Al mantenir el tractament durant 48 h T1 tampoc produí neurotoxicitat, però T2 sí que disminuï significativament la viabilitat neuronal. Per tant, al incrementar la concentració de IFN- γ i el temps de tractament vam recuperar l'efecte neurotòxic.

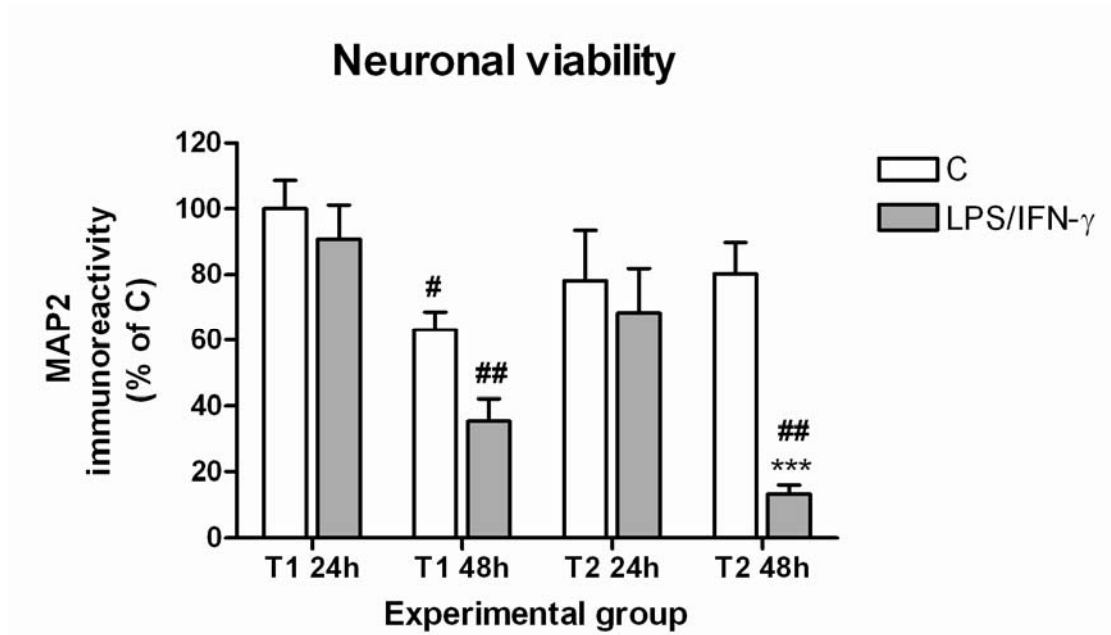


Figura 35. Viabilitat neuronal de cocultius de neurona i BV2 tractats amb 100 ng/mL LPS+0,5 ng/mL de IFN- γ (T1) o 100 ng/mL LPS+5 ng/mL de IFN- γ (T2) durant 24 o 48h. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 5 experiments. *** p <0,001 vs el seu C; # p <0,05; ## p <0,01 vs la mateixa condició a 24 h. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

4.1.3 POSTA A PUNT I CARACTERITZACIÓ DEL MODEL DE COCULTIU DE NEURONES CORTICALS DE RATOLÍ I MICRÒGLIA PRIMÀRIA

En paral·lel al model descrit a l'apartat anterior i amb el mateix objectiu, es va posar a punt un model de cocultiu de neurones corticals i micròglia primària de ratolí on es va induir neurotoxicitat per activació glial amb LPS/IFN- γ . Es van testar diferents proporcions de neurona:micròglia, entre 11:1 i 2:1. A diferència del que passava als cultius de neurones i BV2, el sembrat de cèl·lules de micròglia primària no va induir neurotoxicitat en situació control (figura 36 A), i en resposta al tractament només s'observà efecte neurotòxic a la densitat major de micròglia, 400.000 cèl·lules/mL, proporció neurones: micròglia 2:1 (figura 36 B).

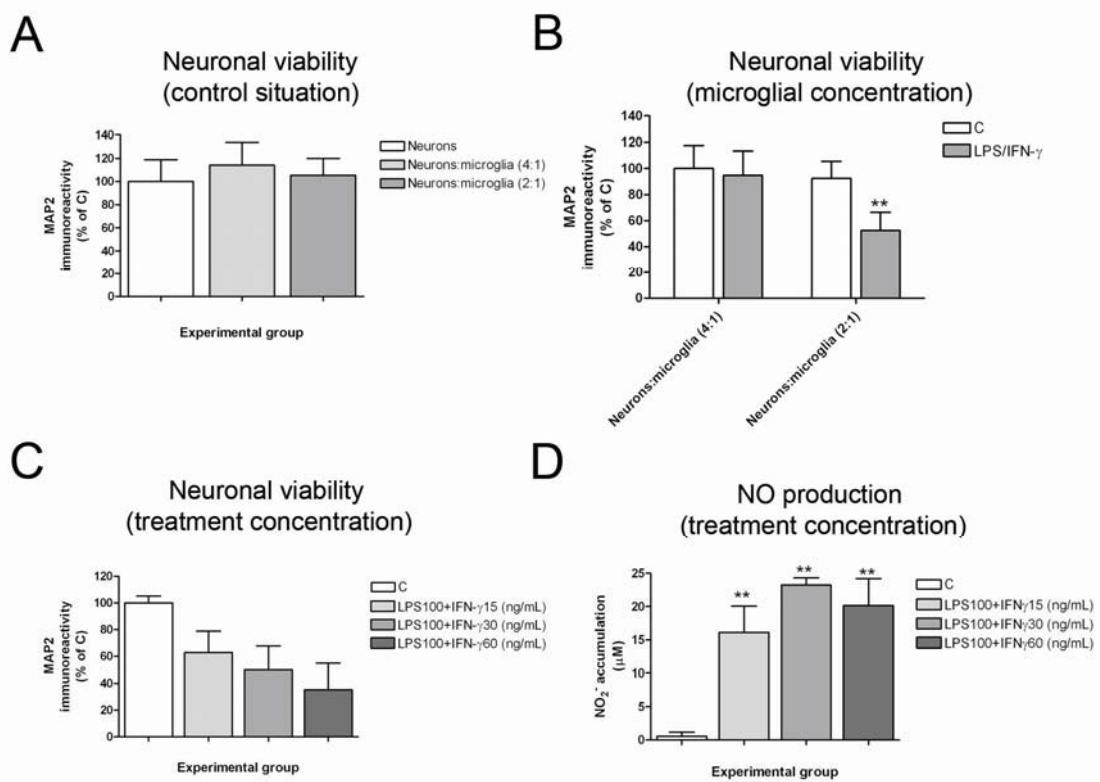


Figura 36. (A) Viabilitat neuronal de cultius de neurones i cocultius de neurones i micròglia sembrada a diferents densitats en condicions control. Les dades s'han calculat com a percentatge del control dels cultius de neurona. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls. (B) Viabilitat neuronal en cocultius de neurones i micròglia sembrada a diferents densitats, tractats amb LPS 100 ng/mL + 30 ng/mL IFN- γ durant 48 h. Les dades s'han calculat com a percentatge del control dels cultius de neurona:micròglia (4:1). Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 6 experiments. ** $p < 0,01$ vs C. ANOVA de dos factors seguida de test de Bonferroni. (C) Viabilitat neuronal i (D) producció de NO a cocultius de neurones corticals i micròglia primària 48 h després de tractar amb LPS+IFN- γ a diferents concentracions. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments. ** $p < 0,01$ vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls

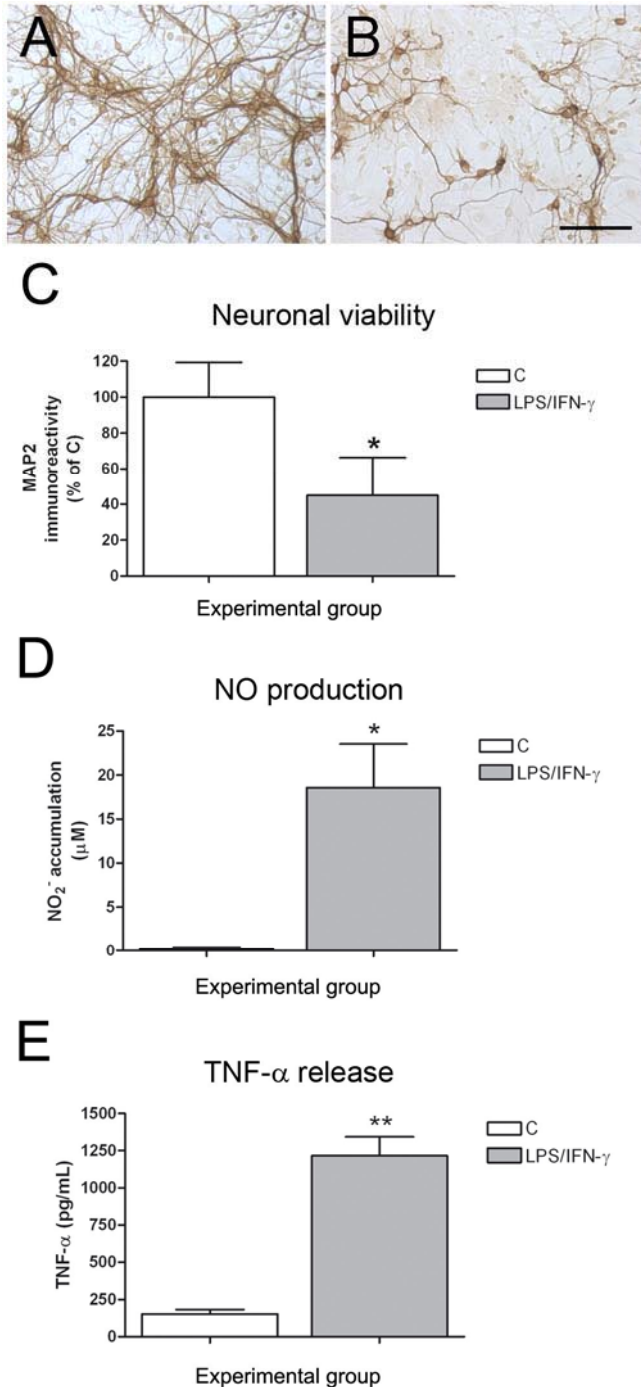


Figura 37. Immunocitoquímica per MAP2 a un cocultiu de neurones i micròglia primària en condicions control (A) i 48 h després de tractar amb 100 ng/mL LPS + 30 ng/mL IFN- γ (B). La barra representa 100 μ m. (C) Avaluació de la viabilitat neuronal en cocultius controls i tractats durant 48 h amb LPS/IFN- γ . Producció de NO (D) i TNF- α (E) en cocultius control i tractats amb LPS/IFN- γ durant 24 h. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. Test de la t de Student amb dades aparellades.

Es va establir 400.000 cèl·lules/mL com a densitat de treball, i cocultius de neurona i micròglia a aquesta concentració es van tractar amb 100 ng/mL de LPS + IFN- γ a diferents concentracions. L'efecte obtingut va ser una concentració resposta de l'efecte neurotòxic del tractament (figura 36 C). A més, es va avaluar la producció de NO a aquests cocultius (figura 36 D), observant un increment en resposta als tres tractaments, i la concentració de NO arriba a un màxim amb 30 ng/mL de IFN- γ . Els tractaments no va tenir efecte sobre la viabilitat neuronal ni sobre la producció de NO en absència de micròglia (dades no mostrades).

Donat que l'efecte usant una concentració de IFN- γ de 30 ng/mL era prou contundent, i per evitar treballar a concentracions massa elevades, es va triar 100 ng/mL de LPS+30 ng/mL de IFN- γ com a concentració de treball. La figura 37 mostra la caracterització del model final de cocultiu, amb l'expressió de MAP2 per immunocitoquímica (figura 37 A-B), quantificació de la viabilitat neuronal (figura 37 C), i producció de NO i TNF- α (figura 37 D-E).

El cocultiu de neurones i micròglia es va posar a punt usant una concentració de 25 mM de KCl, però al igual que el cocultiu de neurones i BV2, seguidament es va provar el model usant cultius neuronals cultivats amb 5 mM de KCl. Com mostra la figura 38, a les dues concentracions de potassi es va produir un efecte neurotòxic del tractament. Per tant, en els cocultius de neurones i micròglia primària la concentració de potassi no és tan rellevant com als cocultius de neurones i BV2.

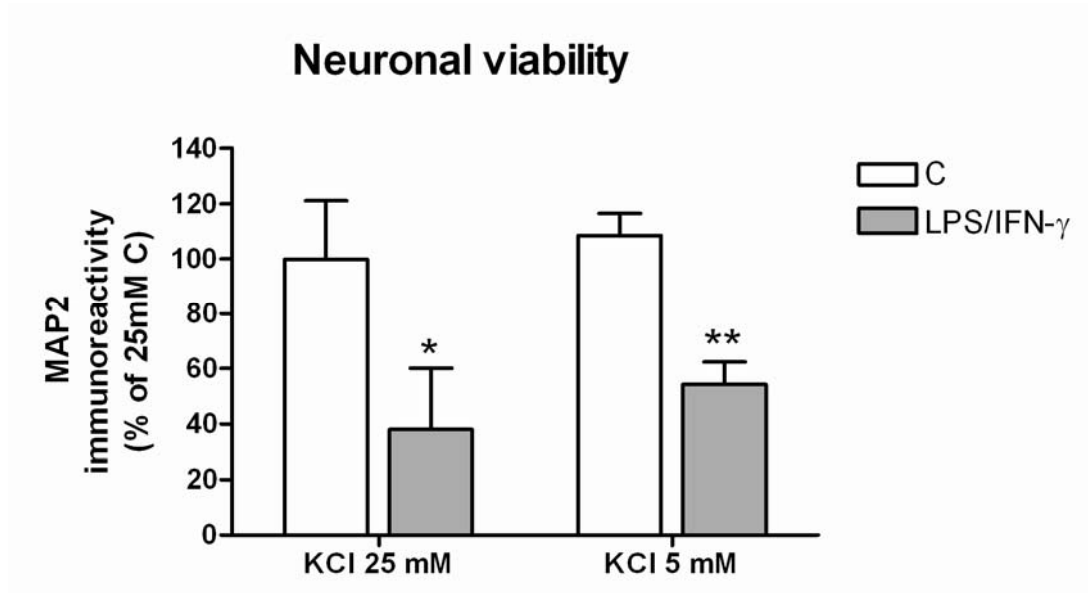


Figura 38. Efecte de la concentració de potassi en la viabilitat neuronal a cocultius de neurones i micròglia primària en situació control i 48 h després de tractar amb 100 ng/mL LPS + 30 ng/mL IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 4 i 9 experiments. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs C. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

4.1.4 L'EFECTE NEUROTÒXIC DE LA MICRÒGLIA ACTIVADA ESTÀ MEDIAT PER LA PRODUCCIÓ DE NO

Vam comprovar que l'activació de la micròglia amb LPS/IFN- γ va induir una pujada dels marcadors proinflamatoris iNOS, COX2, IL-6, NO i TNF- α (figures 29 i 30), i que en cocultius de neurona i micròglia aquesta activació va induir a més un efecte neurotòxic. Després vam voler estudiar si l'efecte neurotòxic de l'activació microglial es podia revertir utilitzant un agent antiinflamatori clàssic, la citocina antiinflamatòria IL-10. Així, es van tractar cocultius de neurona i micròglia primària amb LPS/IFN- γ en presència o absència de IL-10 (50 ng/mL). En cultius de micròglia primària el pretractament amb IL-10 va inhibir els increments de TNF- α i IL-6 induïts per LPS/IFN- γ , però no va tenir efecte sobre la producció de NO (figura 39 A-C). A més, va inhibir pràcticament del tot l'expressió de COX-2 però no va tenir cap efecte sobre l'expressió de iNOS induïda pel tractament (figura 39 D-F). Malgrat el seu efecte inhibitori en la majoria de paràmetres proinflamatoris testats el pretractament amb IL-10 no va inhibir la neurotoxicitat induïda per LPS/IFN- γ (figura 39 G). A més, tal com ja havíem vist en cultius de micròglia primària, la IL-10 no va tenir cap efecte sobre la producció de NO als cocultius (figura 39 H).

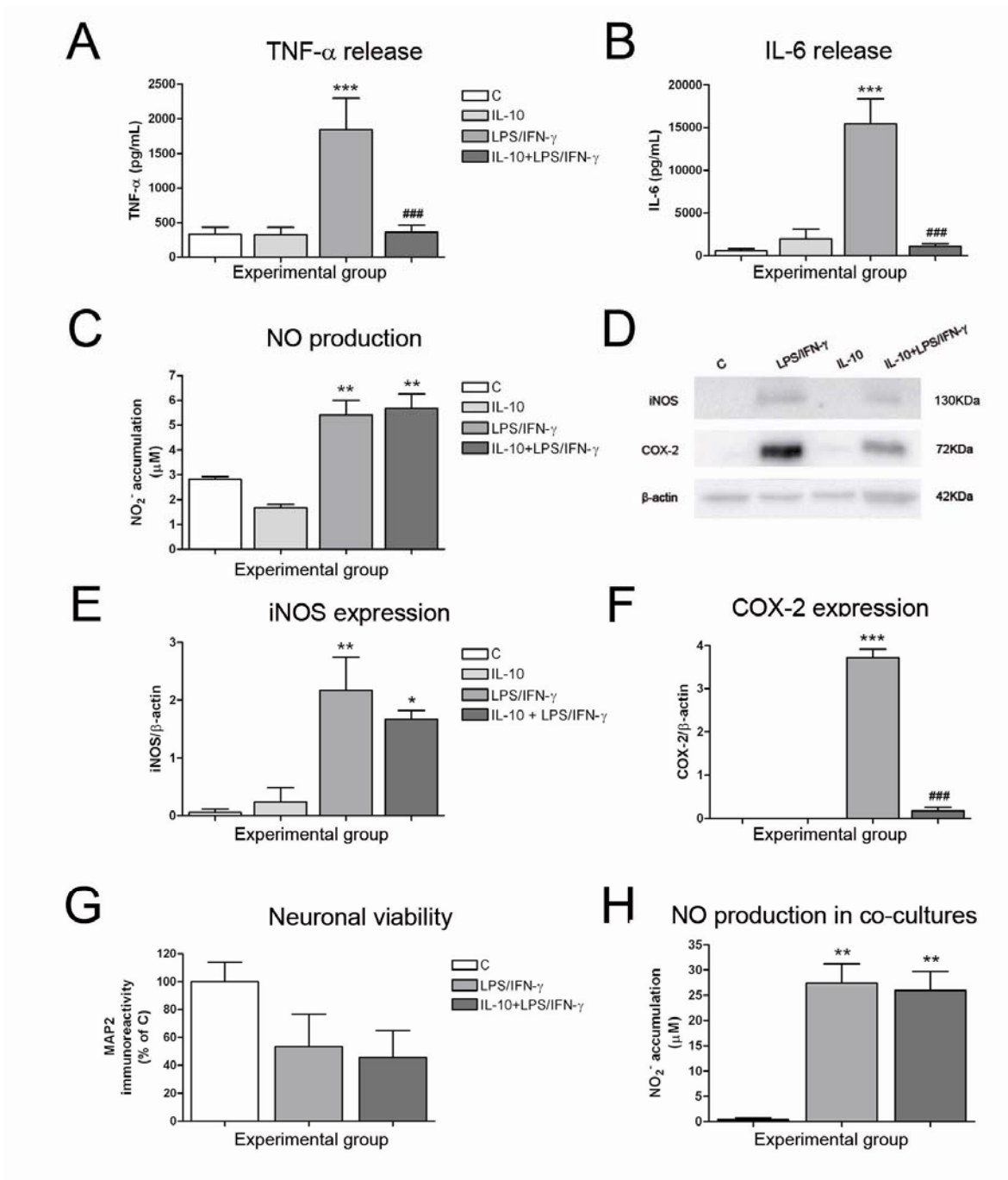


Figura 39. Producció de TNF- α (A), IL-6 (B) i NO (C), i expressió de iNOS (E) i COX-2 (F) a cultius de micròglia primària en condicions control o 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ en presència o absència de IL-10. (D) Imatge d'un western blot representatiu. Viabilitat neuronal (G) i producció de NO (H) a cocultius de neurones i micròglia primària control o 48 h després de tractar amb LPS/IFN- γ en presència o absència de IL-10. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs C. ### $p < 0,001$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

Donat que diversos treballs destaquen la importància del NO i el peroxinitrit en l'efecte neurotòxic de la micròglia activada, vam voler avaluar quin paper jugava el NO enfront la resta de mediadors proinflamatoris en el nostre model. Per fer-ho vam tractar cocultius de neurona i micròglia primària amb LPS/IFN- γ en presència o absència d'un inhibidor selectiu de la iNOS, el 1400W (10 μ M). El tractament amb 1400W va inhibir l'efecte neurotòxic del LPS/IFN- γ (figura 40 A). Per comprovar que el 1400W actuava sobre la seva diana (iNOS) es va avaluar la producció de NO als cocultius, i com s'observa a la figura 40 B aquesta s'inhibí en resposta al 1400W.

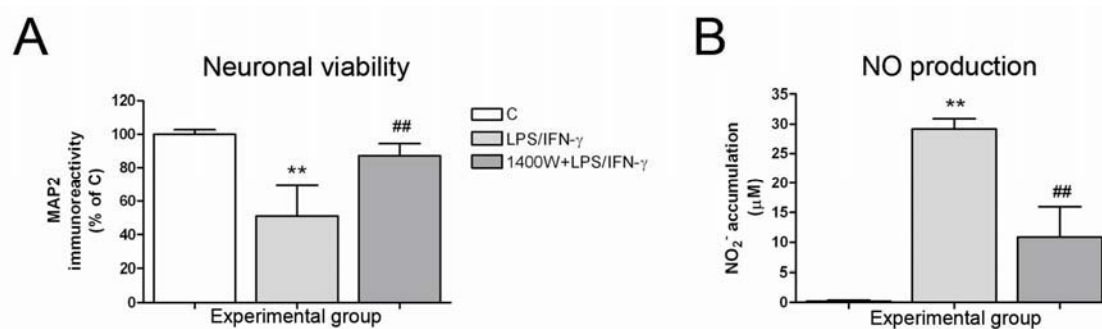


Figura 40. Efecte del pretractament amb 1400W a cocultius de neurones i micròglia primària. Viabilitat neuronal (A) i producció de NO (B) en situació control, 48 h després del tractament amb LPS/IFN- γ en presència o absència de 1400W. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments. ** $p < 0,01$ vs C, ## $p < 0,01$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

DISCUSSIÓ

Posta a punt dels models experimentals

En aquest capítol es presenta un model d'activació microglial induïda per LPS/IFN- γ i un model de neurotoxicitat induïda per activació microglial, ambdós posats a punt amb una línia cel·lular (BV2) i cultius primaris. En el model del cocultiu cal tenir en compte que els nostres cultius neuronals contenen un 16% d'astròcits. Durant la posta a punt del model es van realitzar proves preliminars administrant un inhibidor de la mitosi, l'arabinòsid de citosina (araC) a 10 μ M 24 h després del sembrat, per tal d'eliminar la glia del cultiu, però vam observar que el cultiu neuronal esdevenia molt més sensible al cocultiu amb BV2 i la mort neuronal als controls augmentava. A més, la presència d'astròcits fa que el model s'acosti més a la situació *in vivo*, on hi són presents neurones, micròglia i astròcits (a més d'altres cèl·lules), i on la comunicació entre els tres tipus cel·lulars pot condicionar la resposta als estímuls inflamatoris. Per tot això vam decidir mantenir el cultiu amb astròcits. Els astròcits tractats amb LPS/IFN- γ secreten citocines inflamatòries (revisat a Farina i cols. 2007). A més, hi ha treballs que demostren que la presència d'astròcits pot exacerbar la resposta proinflamatòria de la micròglia augmentant la secreció de NO (Yang 1998; Solà i cols. 2002). En aquesta línia, observacions del nostre grup demostren que en presència d'astròcits la micròglia produeix més NO i TNF- α . Per comprovar que la presència dels astròcits no explicava per sí mateixa els efectes obtinguts als cocultius, en tots els experiments es van fer controls en els que es van tractar en paral·lel els cultius de neurones amb astròcits en presència o absència de la micròglia. Com s'observa a la figura 33, el tractament amb LPS/IFN- γ en absència de micròglia no va produir un efecte neurotòxic ni va induir la producció de NO ni TNF- α . Això indica que la micròglia és necessària per a obtenir resposta al tractament en els paràmetres avaluats i probablement és la principal responsable d'aquesta resposta. Tot i això, no s'ha de descartar un efecte indirecte dels astròcits en els resultats observats.

En la posta a punt del cocultiu es va usar medi de cultiu amb una concentració de KCl de 25 mM. En la literatura hi ha treballs en els que usen aquesta concentració de potassi als cultius neuronals, però majoritàriament es tracta de cultius de neurones cerebel·lars mentre que als treballs de neurones corticals s'acostuma a treballar a 5 mM de KCl (D'Mello i cols. 1993; Moldrich i cols. 2001; Chen i cols. 2008). Al disminuir la concentració de potassi als nostres cultius vam comprovar que aquests esdevenien més resistents a la toxicitat induïda per activació de les cèl·lules BV2 (figura 34). L'augment de la concentració de potassi al medi fa que les neurones baixin el llindar

d'excitabilitat (Gou-Fabregas i cols. 2009; Grilli i cols. 2009), el que les podria fer més susceptibles als estímuls neurotòxics. Chang i cols. (2000) van descriure usant cocultius de neurones i micròglia corticals de ratolí que l'augment de concentració de potassi al medi de cultiu augmenta la neurotoxicitat induïda per activació glial. Aquests autors ho atribueixen a un efecte proinflamatori del potassi sobre la micròglia (augmentant la producció de NO i TNF- α) però nosaltres no hem observat aquest efecte, i creiem que la disminució en la viabilitat neuronal és deguda a que el potassi fa les neurones vulnerables, com defensen altres autors (Andreeva i cols. 1996; Kaiser i cols. 2006; Gou-Fabregas i cols. 2009). Als nostres models l'efecte del potassi sobre la susceptibilitat de les neurones en resposta a l'activació microglial es va observar sobretot en el cas de cocultius de neurones i BV2. Aquest fet pot ser degut a què les BV2 tenen una taxa metabòlica més alta, i per tant consumeixen més nutrients i acidifiquen el medi més ràpidament que la micròglia primària, el que afecta a la viabilitat del cultiu neuronal. D'acord amb això, els nostres resultats mostren que al afegir concentracions creixents de micròglia en condicions control no s'indueix neurotoxicitat, mentre que al afegir concentracions creixents de BV2 s'indueix mort a les neurones també a condicions control (figures 32 A i 36 A).

Per avaluar la mort neuronal calia usar una tècnica que permetés quantificar de forma específica la mort de les neurones sense interferències dels altres tipus cel·lulars presents al cultiu. Tècniques com el iodur de propidi, el LDH o el MTT es basen en la permeabilitat de la membrana o en l'activitat metabòlica per discriminar si una cèl·lula és viva o morta. Aquestes tècniques poden donar una mesura inexacta de la viabilitat neuronal en un cocultiu on hi ha diferents tipus cel·lulars, on a més uns tipus cel·lulars tenen un metabolisme més actiu que altres. Una altra estratègia clàssica d'avaluar la mort és la tinció de les cèl·lules amb un marcador específic de tipus cel·lular i realitzar comptatges, assumint que les cèl·lules marcades estan vives. Aquesta aproximació és complexa en els nostres models, donada l'alta densitat de sembrat i el gran nombre de condicions experimentals a avaluar. A més, quan s'ha intentat fer-ho usant el marcador neuronal NeuN no totes les cèl·lules marcades semblaven neurones vives, i per tant les imatges obtingudes no eren prou fiables per a realitzar comptatges. En aquesta tesi per avaluar la neurotoxicitat dels cocultius s'ha usat la tècnica del ELISA-MAP2-ABTS (Brooke i cols. 1999). Amb aquest mètode es marquen les neurones amb un anticòs específic neuronal (MAP2) i el marcatge es solubilitza i mesura a l'espectrofotòmetre, sent així una mesura objectiva i semi-quantitativa: els resultats s'expressen en percentatge de variació del marcatge de les diferents condicions respecte la condició control. Cal tenir en compte però que es tracta d'una tècnica semi-quantitativa, i que

una baixada d'un 40% en l'expressió de MAP2 no té perquè significar que hi hagi un 40% menys de neurones, però ens dóna una mesura relativa de mort neuronal en comparació a la condició control.

Per induir activació glial s'ha utilitzat una combinació de LPS 100 ng/mL i IFN- γ a diferents concentracions. La producció de NO es pot mesurar de manera senzilla i ràpida, i és un molt bon indicador de l'estat d'activació de la micròglia. Resultats del grup mostren que el tractament de cultius primaris de micròglia de ratolí amb LPS sol produeix NO, però calen concentracions molt elevades de LPS per obtenir concentracions de NO mesurables amb la tècnica de Griess. En canvi la combinació de LPS i IFN- γ permet treballar a concentracions més baixes de LPS i obtenir una producció de NO mesurable i reproduïble. A més, el tractament amb LPS no induïa neurotoxicitat en el nostre model. En conseqüència, vam decidir utilitzar la combinació LPS/IFN- γ com a tractament. Diversos autors han descrit una sinèrgia entre ambdós tractaments, de manera que al afegir IFN- γ alguns efectes del LPS es potencien, com és el cas de la producció de NO (revisat a Schroder i cols. 2006). L'efecte del LPS està principalment mediat pel receptor TLR4 activant MAP cinases, i el de l'IFN- γ pel receptor d'interferó, activant JAK1-STAT1. Aquestes dues vies de senyalització tenen punts en comú, ja que alguns elements poden ser activats per ambdues cascades. El fet d'estar activant dues vies de senyalització que a més es potencien, pot resultar problemàtic a l'hora de establir quin mecanisme és el responsable dels efectes observats. Tot i això, creiem que tractar amb LPS/IFN- γ és convenient ja que l'efecte d'ambdues molècules va en el mateix sentit i a més fa que l'efecte observat tingui una magnitud més fàcilment avaluable.

Caracterització dels models

En aquest treball utilitzem dos models *in vitro* de micròglia: la línia murina BV2 i els cultius primaris de micròglia de ratolí. En la literatura s'han descrit diferències entre aquests tipus cel·lulars (Horvath i cols. 2008), però nosaltres hem observat en ambdós models un increment en resposta al tractament amb LPS/IFN- γ en tots els paràmetres avaluats, és a dir, la producció de NO, IL-6 i TNF- α , i l'expressió de iNOS i COX-2. Les línies cel·lulars permeten treballar amb molta quantitat de proteïna, i RNA; a més són molt útils per posar a punt les condicions de treball, ja que es disposa d'una gran quantitat de cèl·lules per provar diverses condicions experimentals. Els cultius primaris per la seva banda són un model més fisiològic, i permeten confirmar els resultats obtinguts en línies a un model més proper a l'animal. Als cocultius de neurones i BV2

s'observa que, en condicions control, al incrementar la densitat de BV2 s'indueix neurotoxicitat (figura 32 A) fet que no es dona en cocultius de neurones i micròglia (figura 36 A). A més, a cocultius de neurona-BV2 la concentració d'IFN- γ a partir de la qual s'indueix neurotoxicitat és molt menor a la dels cocultius de neurona i micròglia primària. Això suggereix que les neurones són més vulnerables en cocultiu amb la línia cel·lular BV2 que no pas amb primaris. Per això, al cocultiu de neurones i BV2 la proporció de neurones:micròglia i la concentració de IFN- γ del tractament són menors que al cocultiu de neurones i micròglia primària (taula 5).

	Neurones i micròglia primària	Neurones i BV2
Proporció neurona:micròglia	2:1	5:1
Concentració de tractament (ng/mL)	LPS 100 + IFN- γ 30	LPS 100 + IFN- γ 0,5
Temps de tractament	48 h	24 h

Taula 5. Condicions experimentals dels dos models de cocultiu.

L'efecte antiinflamatori de la IL-10 està clarament establert. Aquest efecte està mediat per la unió de IL-10 al seu receptor IL-10R, activant la via de JAK2/STAT-1. L'efecte d'aquesta activació és per una banda una competició amb NF- κ B per la disponibilitat de la via JAK/STAT, i per altra banda l'activació de SOCS-3 (de l'anglès *Supressor of Cytokine Signaling*), que actua com a regulador negatiu de les citocines proinflamatòries (revisat a Moore i cols. 2001). Diversos treballs a la literatura descriuen que la IL-10 inhibeix la producció de citocines proinflamatòries (com la IL-1 β , la IL-6 i el TNF- α entre d'altres), a més de disminuir l'expressió del MHCII i la COX-2 (revisat a Moore i cols. 2001 i Schroeter i Jander 2005). L'efecte de IL-10 sobre la producció de NO en canvi no és clar. Alguns autors han descrit un efecte inhibitori de la IL-10 sobre la producció de NO induïda per LPS en micròglia (Ledeboer i cols. 2000) i una neuroprotecció derivada d'aquest efecte inhibitori de NO (Quian i cols. 2006; Park i cols. 2007), però es postula que aquest efecte pot ser conseqüència de la inhibició de factors proinflamatoris que regulen NO, en comptes de ser una inhibició directa (Moore i cols. 2001); altres autors descriuen (en cèl·lules microglials) una manca d'efecte de IL-10 sobre la producció de NO (Lieb i cols. 2003). En el nostre model, la IL-10 inhibeix la producció de TNF- α , IL-6 i l'expressió COX-2 induïdes per LPS/IFN- γ , però no té efecte sobre la iNOS ni la producció de NO (figura 39). Tot i aquest efecte

antiinflamatori, el pretractament amb IL-10 no és neuroprotector en el nostre model de neurotoxicitat induïda per activació microglial (figura 39 G). En canvi, la inhibició de la producció de NO mitjançant un inhibidor selectiu de la iNOS (1400W) inhibeix totalment la mort neuronal induïda pel tractament amb LPS/IFN- γ (figura 40 A). En els dos models de cocultiu que presentem s'observa que la neurotoxicitat induïda per l'activació de la micròglia sempre s'acompanya d'un augment en la producció de NO. El NO és un dels majors mediadors de neurotoxicitat, ja que produeix nitrosilació de proteïnes, dany al DNA i disrupció de la cadena respiratòria mitocondrial, entre altres efectes (per a revisió Minguetti i Levi 1998 i Vafeiadou i cols. 2007). A més, el NO reacciona amb l'ió superòxid formant peroxinitrit, un agent altament tòxic (Babior 2004). L'enzim encarregat de produir superòxid és la NADPH oxidasa. En el nostre model no s'ha avaluat l'expressió de la NADPH oxidasa ni la presència de peroxinitrit al medi, però és d'esperar que es trobin augmentats en resposta al LPS/IFN- γ , i que contribueixin a l'efecte neurotòxic del tractament.

En resum, en aquest capítol es presenten un model d'activació microglial induïda per LPS/IFN- γ i un model de neurotoxicitat induïda per activació microglial. El tractament amb LPS/IFN- γ activa la micròglia, produint una sèrie de factors proinflamatoris. La producció d'aquests factors, en especial el NO, té un efecte tòxic sobre les neurones corticals.

4.2 INHIBICIÓ DELS C/EBPs: EFECTES ANTIINFLAMATORIS I NEUROPROTECTORS

INTRODUCCIÓ

El control de la neuroinflamació és una diana potencial a tenir en compte en el tractament de les malalties neurodegeneratives. Per tant, és important trobar fàrmacs antiinflamatoris i estudiar noves dianes que inhibeixin la neuroinflamació. Usant el model de neurotoxicitat induïda per activació glial que hem posat a punt com es descriu a l'apartat 4.1, hem estudiat si la inhibició dels C/EBPs (factors de transcripció implicats en la regulació de gens relacionats amb la resposta inflamatòria) té com a conseqüència un efecte antiinflamatori i neuroprotector.

Per inhibir els C/EBPs s'han usat diverses aproximacions experimentals. D'una banda, i donada la manca d'un inhibidor farmacològic dels C/EBPs, s'ha usat la crisina, un flavonoide amb propietats antiinflamatòries, que podrien estar mediatees per inhibició de la unió de DNA de C/EBP β (Woo i cols. 2005). En aquest estudi hem avaluat l'efecte antiinflamatori i neuroprotector de la crisina, així com la implicació de C/EBP α , C/EBP β i C/EBP δ en el seu mecanisme d'acció. D'altra banda, per avaluar el paper de C/EBP β i C/EBP δ en l'activació microglial i la neurotoxicitat associada, s'han realitzat cocultius de neurones corticals amb micròglia primària de ratolins deficientes en C/EBP β o C/EBP δ . En aquesta aproximació experimental tant les neurones com els astròcits són no deficientes, podent així estudiar quin és l'efecte de la pèrdua dels C/EBPs només a la micròglia.

Els resultats que es presenten demostren com una baixada en l'expressió de C/EBP β o C/EBP δ és capaç per sí sola d'induir un efecte antiinflamatori i neuroprotector, remarcant la importància d'aquests factors de transcripció en l'activació microglial i la neurotoxicitat associada. Aquests resultats permeten postular els C/EBPs com a dianes terapèutiques addicionals en les malalties neurodegeneratives.

4.2.1 LA CRISINA TÉ EFECTE ANTIINFLAMATORI EN CULTIUS DE MICRÒGLIA PRIMÀRIA

Per comprovar si la crisina reproduïa en el nostre model els efectes antiinflamatoris descrits per altres grups, es va avaluar l'efecte d'aquest flavonoide en cultius primaris de micròglia activats. Per induir activació microglial es va tractar la micròglia primària amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ . L'efecte proinflamatori del tractament així com l'efecte de la crisina es van avaluar mesurant la producció de NO, l'alliberament de TNF- α i l'expressió dels enzims iNOS i COX-2. En resposta al tractament es va produir un augment en la producció de NO i TNF- α , detectable tant a 24 h com a 48 h (figura 41 A-D), així com en l'expressió de iNOS i COX-2 a 12 h (figura 41 E-G). El pretractament amb crisina 20 μ M 1 h abans del LPS/IFN- γ va inhibir la producció de NO (tant a 24 h com a 48 h) i de l'expressió de la iNOS. El pretractament amb crisina també va induir una inhibició de TNF- α 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ , però aquest efecte va ser transitori, doncs desapareixia a les 48 h del tractament (figura 41 C-D). L'expressió de COX-2 no es va inhibir en resposta a la crisina. La crisina per si sola no va produir cap efecte sobre els paràmetres avaluats.

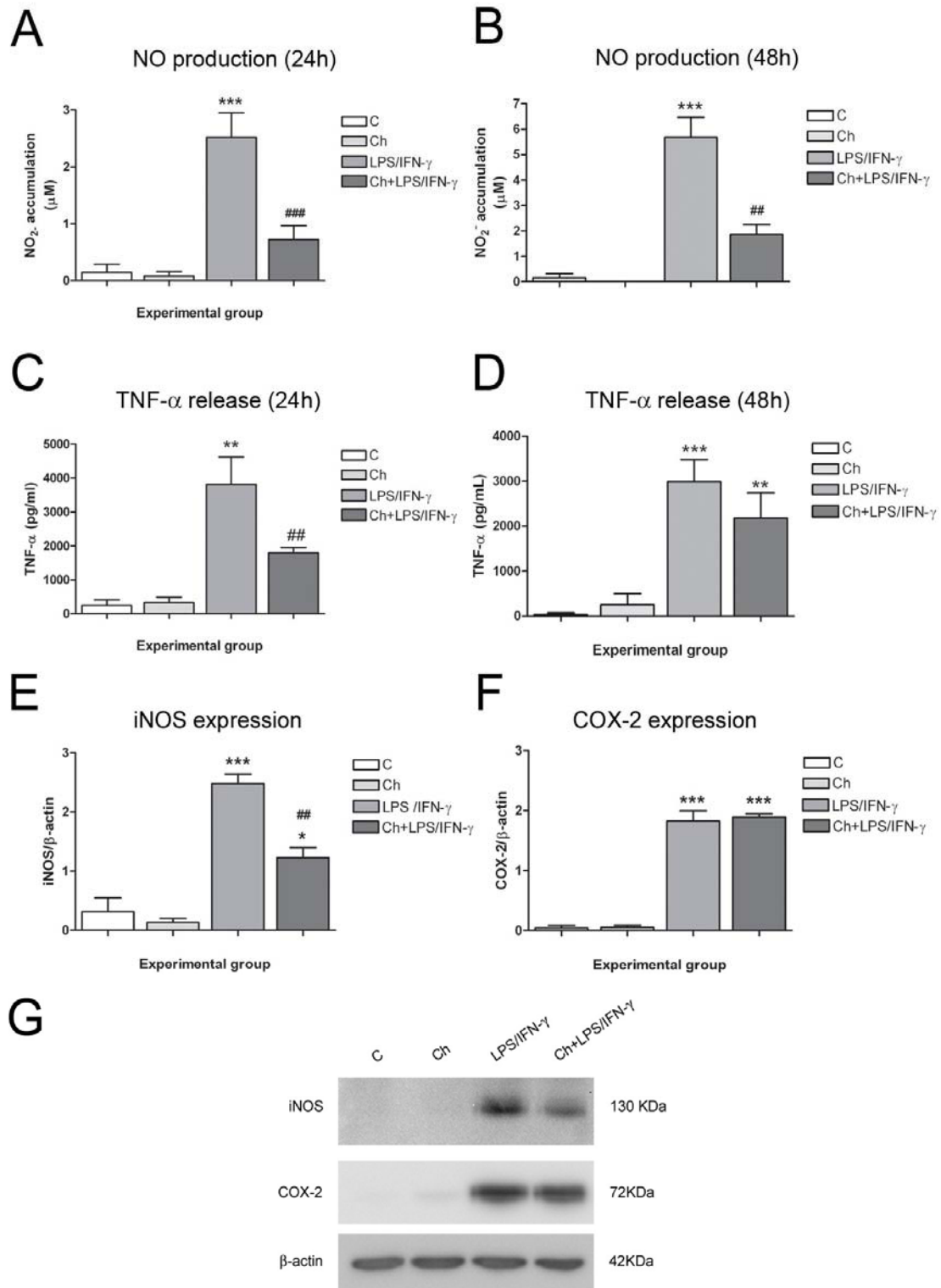


Figura 41. Efecte antiinflamatori del pretractament amb crisina a cultius de microglia primària tractats amb LPS/IFN-γ. (A-B) producció de NO, (C-D) producció de TNF-α, (E) expressió de iNOS i (F) expressió de COX-2 en cultius controls, tractats amb crisina (Ch), tractats amb LPS/IFN-γ i tractats amb Ch + LPS/IFN-γ. Avaluacions realitzades a 24 h i 48 h (NO i TNF-α) o 12 h (iNOS i COX-2) després de tractar amb LPS/IFN-γ. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. *p < 0,05; **p < 0,01 i ***p < 0,001 vs C; ##p < 0,01 i ###p < 0,001 vs LPS/IFN-γ. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls. (G) Imatge d'un western blot representatiu.

4.2.2 LA CRISINA TÉ EFECTE NEUROPROTECTOR EN COCULTIUS DE NEURONA I MICRÒGLIA

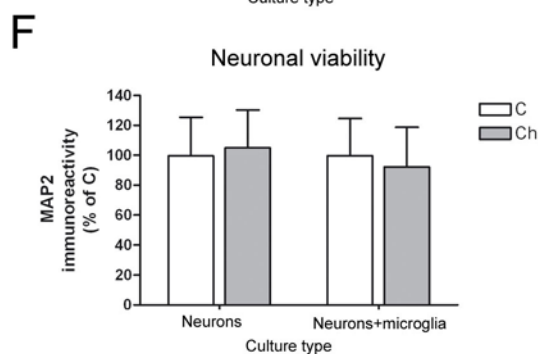
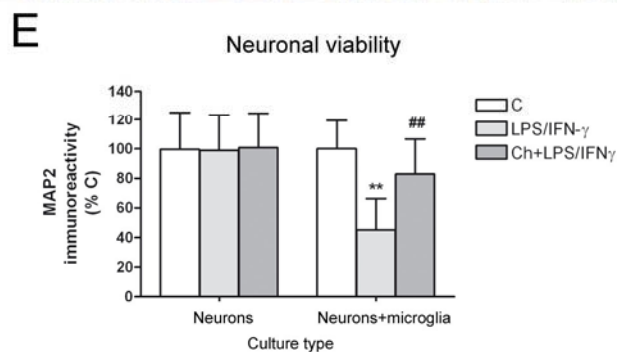
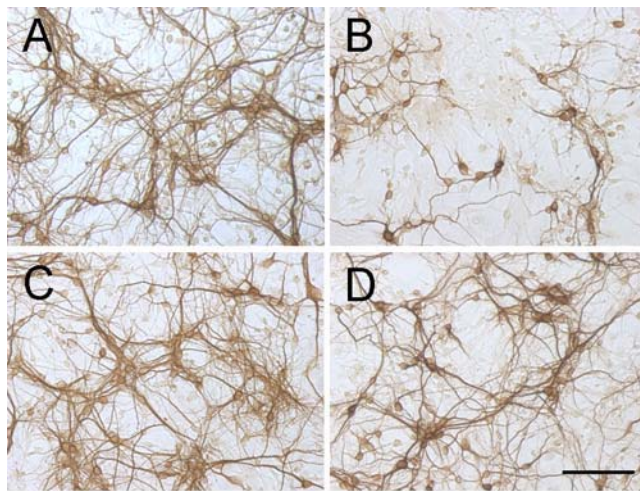


Figura 42. Viabilitat neuronal a cocultius de neurona i micròglia primària. Immunocitoquímica per MAP2 a cocultius control (A), tractats amb LPS/IFN- γ (B), crisina (Ch) (C) o Ch+LPS/IFN- γ (D). La barra representa 100 μ m. (E) Viabilitat neuronal de cultius controls, tractats amb LPS/IFN- γ o amb Ch+LPS/IFN- γ i (F) de cultius control o tractats amb Ch. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. ** $p < 0,01$ vs C; ## $p < 0,01$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

Donat que el pretractament amb crisina inhibia l'activació proinflamatòria de la micròglia, ens vam preguntar si aquesta inhibició podia tenir un efecte neuroprotector en el nostre model de neurotoxicitat induïda per activació microglial. Per testar-ho, cocultius de neurones corticals i micròglia primària van ser tractats amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ durant 48 h. El tractament va induir la mort d'aproximadament el 40% de les neurones (figura 42 A-B i E), efecte que no s'observà en absència de micròglia (figura 42 E). El pretractament amb crisina va induir neuroprotecció (figura 42 D-E). La crisina per si sola no va tenir cap efecte ni a cultius de neurones ni a cocultius de neurona i micròglia (figura 42 C i F). En aquest model el tractament amb LPS/IFN- γ va induir un augment en la producció de NO tant a 24 h com a 48 h, augment que va ser inhibit per la crisina a ambdós temps (figura 43 A-B). El tractament també va incrementar la producció de TNF- α a 24 h i 48 h, augment que va ser inhibit a 24 h però no a 48 h per la crisina (figura 43 C-D).

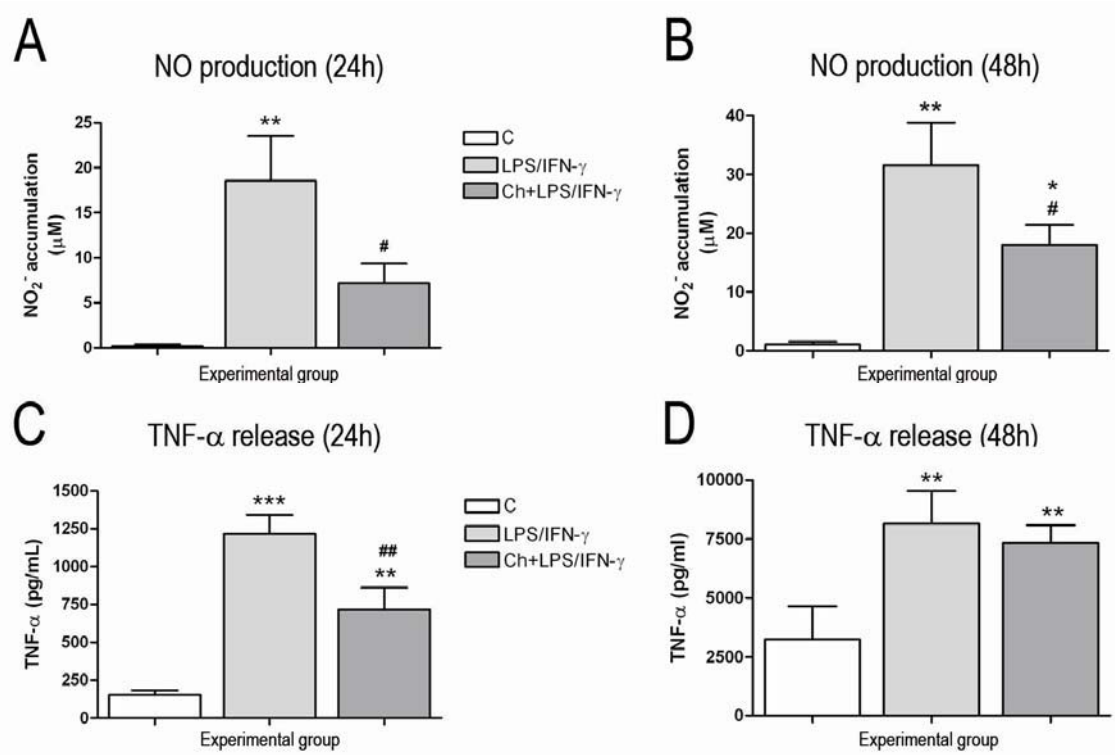


Figura 43. Producció de NO (A-B) i TNF- α (C-D) a cocultius de neurones i micròglia primària en condicions control o després de tractar amb LPS/IFN- γ en presència o absència de Ch. La producció es va mesurar 24 h (A i C) o 48 h (B i D) després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ vs C, # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

4.2.3 LA CRISINA INHIBEIX L'EXPRESSIÓ NUCLEAR DE C/EBP δ

Una vegada establert l'efecte antiinflamatori i neuroprotector de la crisina, vam voler estudiar el paper de C/EBP β , C/EBP δ i NF- κ B/p65 en el seu mecanisme d'acció, ja que aquests factors de transcripció estan implicats en la regulació de la resposta inflamatòria, que es troba inhibida per la crisina. Per fer-ho, es van tractar cultius primaris de micròglia amb LPS/IFN- γ en presència o absència de crisina i 4 h després del tractament es va avaluar l'expressió d'aquests 3 factors de transcripció per immunofluorescència (figura 44). En resposta al tractament, es va produir un augment en l'expressió nuclear de C/EBP β i C/EBP δ , i una translocació al nucli de NF- κ B/p65. El pretractament amb crisina va inhibir l'augment d'expressió nuclear de C/EBP δ , però no va tenir efecte sobre l'expressió nuclear de C/EBP β ni NF- κ B/p65.

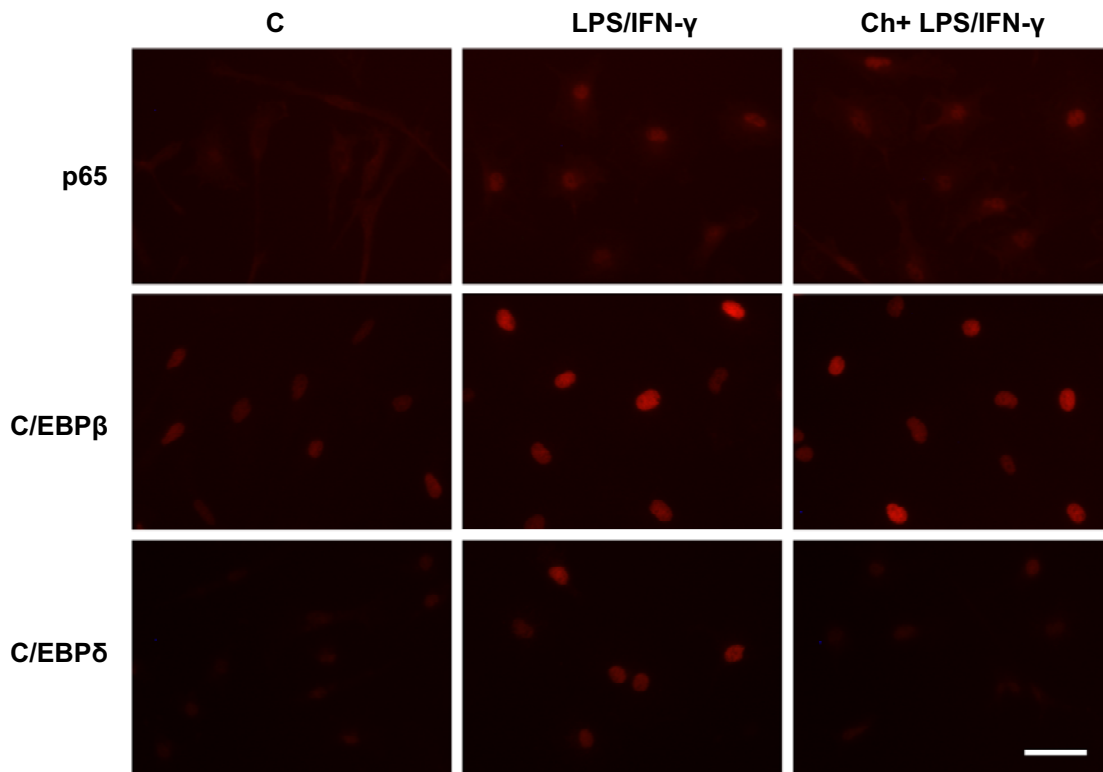


Figura 44. Immunofluorescència de NF- κ B/p65, C/EBP β i C/EBP δ a micròglia primària en situació control, 4 h després del tractament amb LPS/IFN- γ o després de pretractar 1 h amb crisina (Ch) i tractar 4 h amb LPS/IFN- γ . La barra representa 30 μ m.

4.2.4 LES BV2 SÓN UN BON MODEL PER ESTUDIAR EL MECANISME D'ACCIÓ DE LA CRISINA

Per tal d'estudiar amb més detall i de forma més quantitativa el paper de NF-κB i els C/EBPs en el mecanisme d'acció de la crisina, vam determinar la seva expressió i la

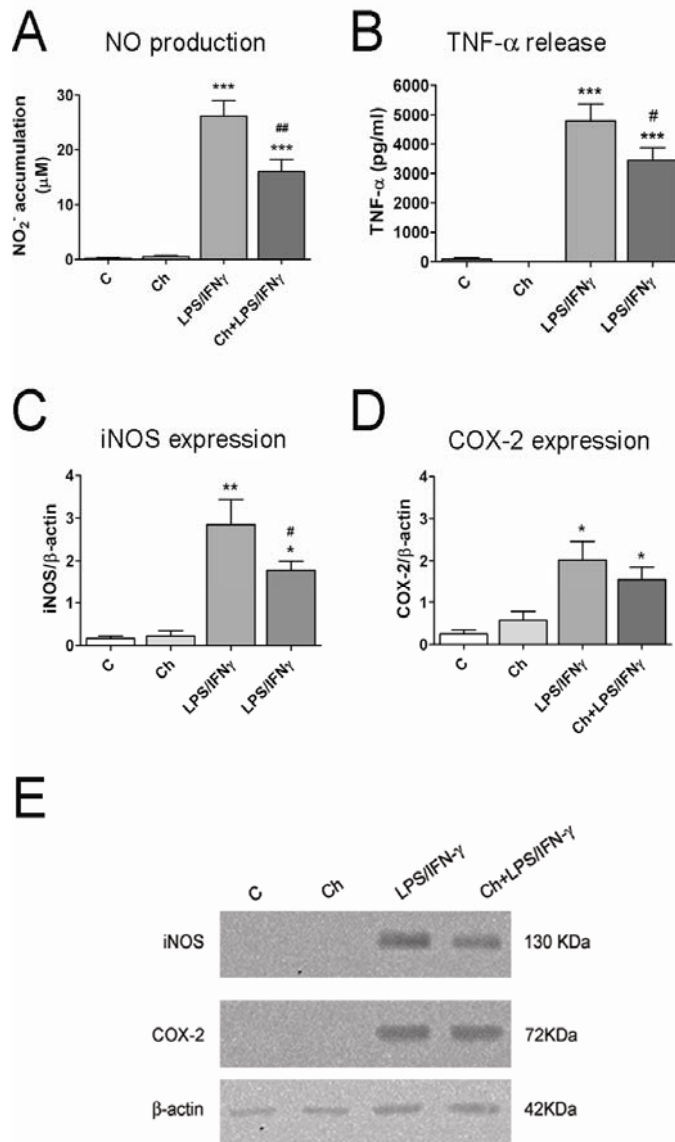


Figura 45. Efecte antiinflamatori del pretractament amb crisina a cultius de BV2 tractats amb LPS/IFN- γ . (A) producció de NO, (B) producció de TNF- α , (C) expressió de iNOS i (D) expressió de COX-2 en cultius controls, tractats amb crisina (Ch), tractats amb LPS/IFN- γ en presència o absència de crisina. Avaluacions realitzades a 24 h (iNOS i TNF- α) o 12 h (iNOS i COX-2) després de tractar. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ vs. C # $p < 0,05$ i ### $p < 0,01$ vs. LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida de test de Newman-Keuls. (E) Imatge d'un western blot representatiu.

seva capacitat d'unió al DNA a les diferents situacions experimentals. Així, vam realitzar western blots de proteïna nuclear, PCR en temps real i assajos d'unió al DNA. Per a realitzar aquests tipus d'estudis calien grans quantitats de mRNA i proteïna, difícils d'obtenir en cultius primaris de micròglia, que tenen un rendiment molt baix. Per això vam decidir utilitzar la línia murina de micròglia BV2. Donat que les línies cel·lulars tenen algunes característiques diferents als cultius primaris, prèviament vam avaluar si amb les cèl·lules BV2 s'obtenien efectes similars als observats amb la micròglia primària i per tant aquesta línia era un bon model de treball per a aquest estudi.

Primer, es va avaluar l'efecte antiinflamatori de la crisina en un cultiu de cèl·lules BV2 activades. Per induir activació, es van tractar els cultius amb 100 ng/mL de

LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ . Tal com s'ha explicat al capítol 4.1 de resultats, aquesta concentració de tractament és la que es va usar per posar a punt el model de neurotoxicitat induïda per activació glial als cocultius de neurones i BV2. Com s'havia observat a la micròglia primària, en resposta al tractament amb LPS/IFN- γ es va

produir un augment en la producció de NO i TNF- α a 24 h així com un increment en l'expressió de iNOS i COX-2 (figura 45). El pretractament amb crisina va inhibir l'augment de TNF- α , iNOS i NO, però no va tenir efecte sobre l'expressió de COX-2 (figura 45).

Una vegada comprovat que l'efecte antiinflamatori de la crisina observat a micròglia es reproduïa a les BV2 en tots els paràmetres mesurats, vam avaluar a cocultius de neurones corticals primàries i BV2 si també es reproduïa l'efecte neuroprotector. Per fer-ho es van tractar els cocultius amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. El tractament amb LPS/IFN- γ va induir la mort d'aproximadament el 30% de les neurones (figura 46 A-B i E), i aquest no va tenir efecte en absència de BV2 (figura 46 E). La neurotoxicitat s'acompanyà d'un augment de la producció de NO i TNF- α (figura 46 F-G). El pretractament amb crisina va inhibir pràcticament del tot la neurotoxicitat, així com l'augment de producció de NO i TNF- α . Per

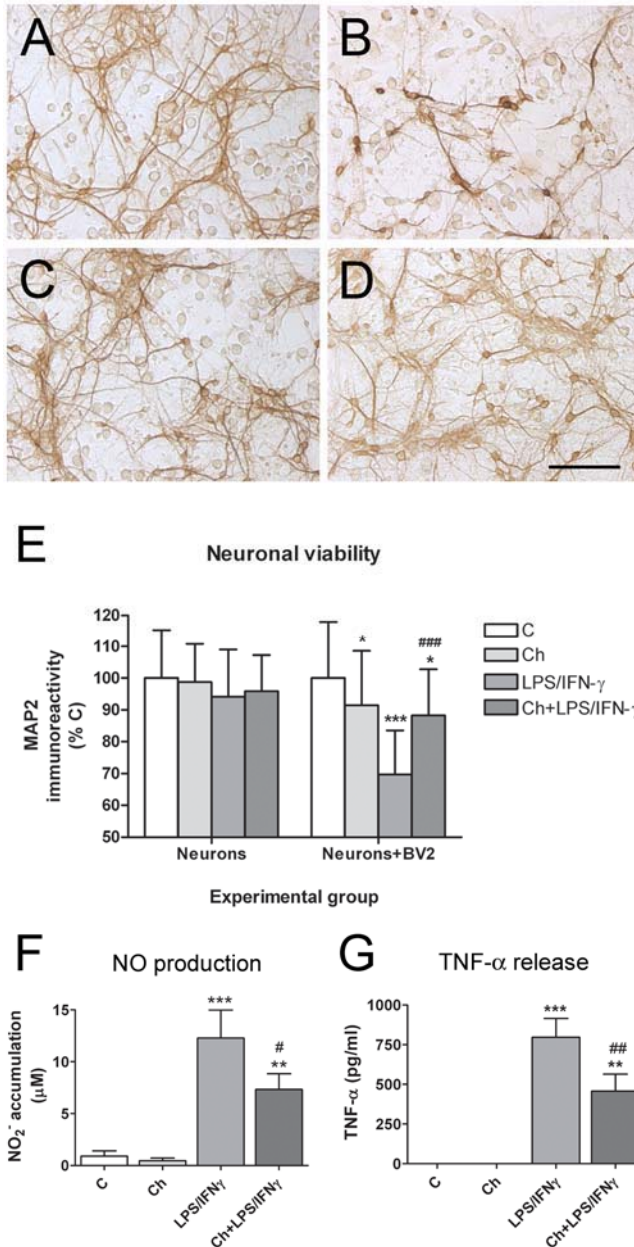


Figura 46. Marcatge amb MAP2 a cocultius de neurona i BV2 en situació control (A), tractats amb LPS/IFN- γ (B), crisina (Ch) (C) o Ch+LPS/IFN- γ . La barra representa 100 μ m. Viabilitat neuronal (E), producció de NO (F) i TNF- α (G) de cultius control, tractats amb Ch i tractats amb LPS/IFN- γ en absència o presència de Ch, mesurats 24 h després del tractament amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 5 experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ vs control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

tant els resultats observats als cocultius de neurones i BV2 eren comparables als observats a cocultius de neurones i micròglia primària.

4.2.5 LA CRISINA INHIBEIX C/EBP δ , PERÒ NO TÉ EFECTE SOBRE C/EBP β , C/EBP α NI NF- κ B/p65.

Per confirmar les dades obtingudes per immunocitoquímica a cultius primaris, on s'havia observat que la crisina inhibia l'expressió al nucli de C/EBP δ però no de C/EBP β ni NF- κ B/p65, es van realitzar western blots de proteïnes nuclears per a aquests tres factors de transcripció. Les cèl·lules BV2 es van tractar amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. Quatre hores després del tractament es van avaluar els nivells d'expressió nuclear de NF- κ B/p65, C/EBP β i C/EBP δ . El tractament va induir un augment d'expressió dels 3 factors de transcripció (figura 47 A-C). Tal com s'havia observat per immunofluorescència a cultius primaris, el pretractament amb crisina no va tenir cap efecte sobre l'expressió de NF- κ B/p65 ni C/EBP β , però va induir una forta inhibició de l'expressió de C/EBP δ . Per estudiar si la regulació de la crisina sobre C/EBP δ es produïa a nivell transcripcional o posttranscripcional, es va estudiar l'expressió del mRNA de C/EBP δ . Així, es va realitzar PCR en temps real en cèl·lules BV2 tractades amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. L'expressió del mRNA es va determinar a les 3 h del tractament, en què els nivells de mRNA per C/EBP δ són màxims (Ejarque-Ortiz i cols. 2010). El tractament amb LPS/IFN- γ va induir una pujada del mRNA de C/EBP δ , efecte que es va inhibir al pretractar amb crisina (figura 47 D).

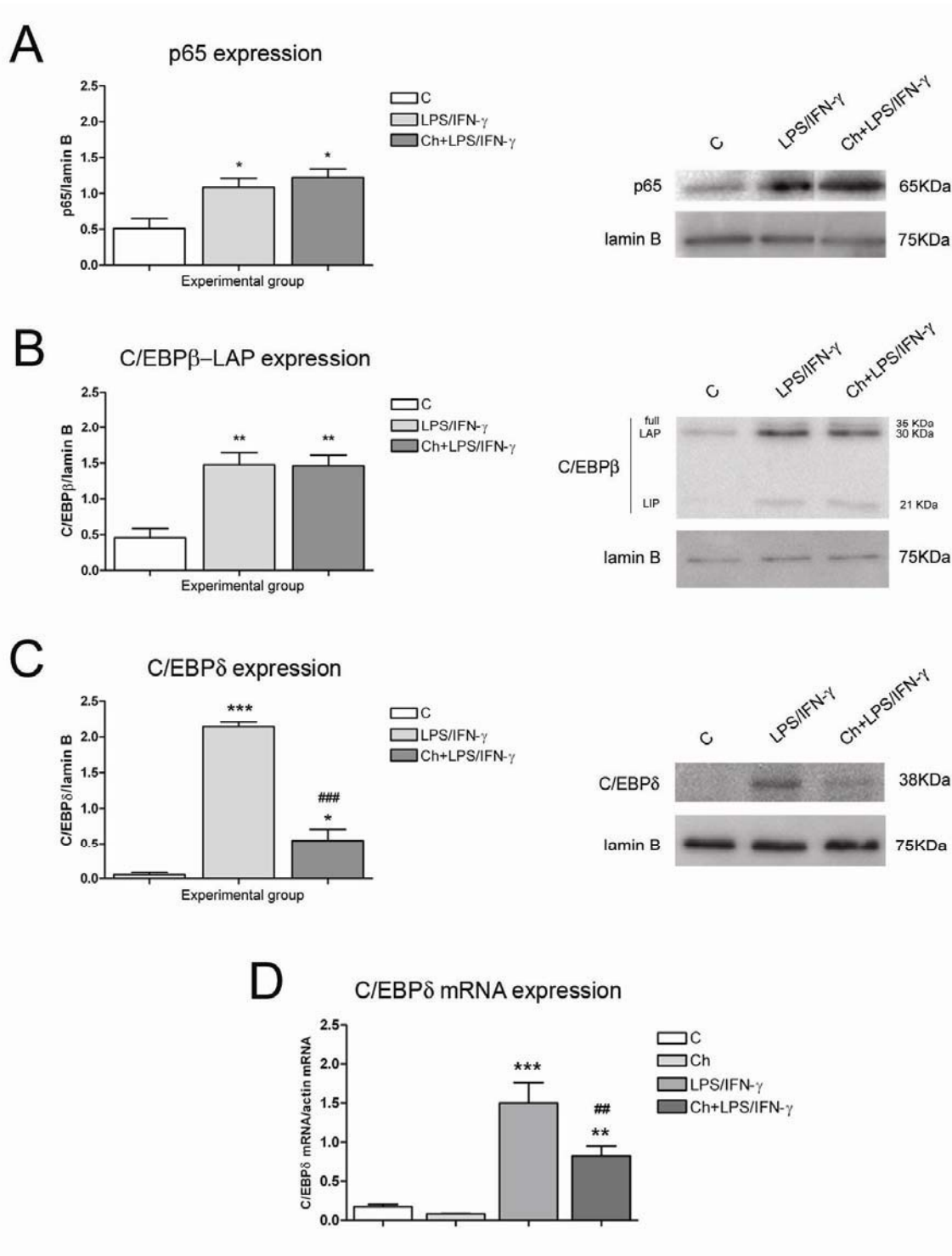


Fig. 47 Efecte de la crisina (Ch) sobre l'expressió nuclear de NF- κ B/p65 (A), C/EBP β -LAP (B) i C/EBP δ (C) a cèl·lules BV2 control, tractades amb LPS/IFN- γ o amb Ch+LPS/IFN- γ durant 4 h. Les imatges mostren western blots representatius. (D) efecte de la Ch en l'expressió de mRNA de C/EBP δ 3 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ vs C; ### $p < 0,01$ i #### $p < 0,001$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

El fet que la crisina no mostrés un efecte sobre expressió nuclear de C/EBP β i NF- κ B/p65 no permetia descartar una implicació d'aquests factors de transcripció en el

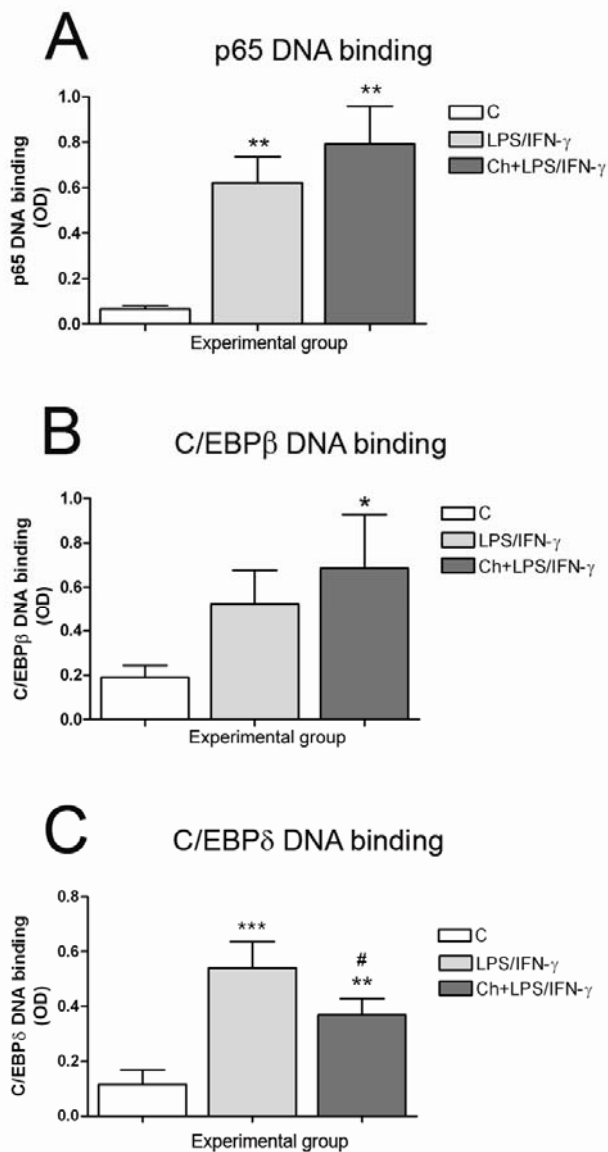


Fig. 48 Efecte de la crisina (Ch) sobre la unió al DNA de NF- κ B/p65 (A), C/EBP β (B) i C/EBP δ (C) en cèl·lules BV2 control, tractades amb LPS/IFN- γ i amb Ch+LPS/IFN- γ durant 4 h. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 5 experiments. * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C; # $p < 0.05$ vs LPS/IFN- γ . ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

mecanisme d'acció de la crisina, ja que aquesta podria estar alterant l'activitat dels factors de transcripció sense variar-ne els nivells d'expressió. Per avaluar aquest possible efecte, es va determinar la unió de NF- κ B/p65, C/EBP β i C/EBP δ a seqüències de DNA específiques per a cada família de factors de transcripció a les diferents situacions experimentals mitjançant un assaig d'unió al DNA. Les cèl·lules BV2 es van tractar amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. L'activitat d'unió al DNA dels tres factors de transcripció es va avaluar 4 h després del tractament. El tractament amb LPS/IFN- γ va induir un augment significatiu en la unió al DNA de NF- κ B/p65 i C/EBP δ , i C/EBP β també mostrà una tendència a augmentar. El pretractament amb crisina no va inhibir la unió de NF- κ B/p65 ni C/EBP β al DNA, però sí que va inhibir significativament la unió al DNA de C/EBP δ (figura 48).

C/EBP α és, juntament amb C/EBP β i C/EBP δ , un dels C/EBPs que juga un paper en l'activació de la micròglia. La seva regulació en resposta a estímuls proinflamatoris *in vitro* és diferent a la de C/EBP β i C/EBP δ . El C/EBP α es troba constitutivament expressat al nucli de la micròglia, i en resposta a un estímul proinflamatori es produeix una baixada en la seva expressió nuclear. Per descartar un efecte de la crisina sobre C/EBP α , és a dir, una inhibició de la baixada dels nivells de C/EBP α nuclear en resposta al tractament, es va determinar l'expressió de C/EBP α . Per fer-ho es van realitzar western blots d'extractes de proteïnes nuclears de cèl·lules BV2 tractades amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. Els nivells nuclears de C/EBP α es van mesurar 8 h després del tractament, temps al que ja s'observa la baixada de C/EBP α en resposta al tractament. El tractament amb LPS/IFN γ va induir una baixada de C/EBP α -p30, efecte que no es va revertir amb el pretractament amb crisina (figura 49). L'expressió de C/EBP α -p42 va respondre de la mateixa manera (dades no mostrades).

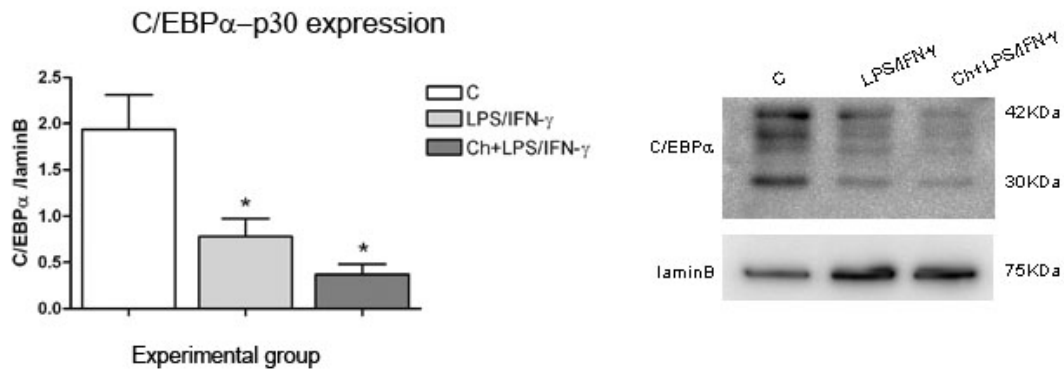


Figura 49. Expressió nuclear de C/EBP α -p30 a cultius de BV2 en situació control, 8 h després de tractar amb LPS/IFN- γ o després de 1 h de pretractament amb crisina (Ch) seguit de 8 h de tractament amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments. *p < 0,05 vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls. La imatge mostra un western blot representatiu.

4.2.6 LA CRISINA INHIBEIX C/EBP δ EN COCULTIUS DE NEURONES I MICRÒGLIA PRIMÀRIA

A continuació es va voler estudiar si la crisina inhibia C/EBP δ també al model de cocultiu de neurones corticals i micròglia primària, on s'havia observat l'efecte neuroprotector de la crisina. En aquest cas no es podien usar tècniques com la PCR o el western blot, ja que els C/EBPs s'expressen també a astròcits i neurones i ens hauria estat impossible discriminar l'efecte de la crisina sobre la micròglia de l'efecte sobre els altres tipus cel·lulars. Així, l'expressió proteica de C/EBP δ es va avaluar mitjançant una doble immunofluorescència per a C/EBP δ i CD11b (marcador de micròglia) en cocultius tractats durant 4 h amb 100 ng/mL de LPS + 0,5 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina. El tractament amb LPS/IFN- γ va induir una pujada en l'expressió de C/EBP δ en les cèl·lules de la micròglia i aquesta pujada s'inhibí al pretractar amb crisina (figura 50).

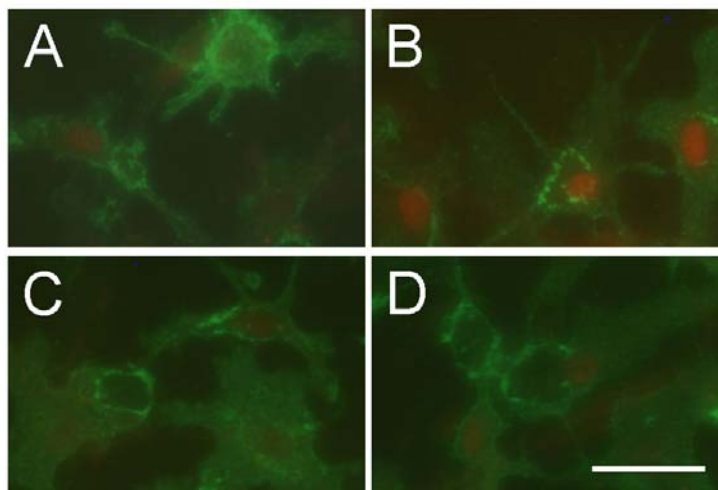


Figura 50. Efecte del pretractament amb crisina (Ch) en l'expressió de C/EBP δ a cocultius de neurona i micròglia primària. Immunofluorescència doble per C/EBP δ (en vermell) i CD11b (en verd) en cocultius control (A), tractats amb LPS/IFN- γ (B), amb Ch (C) o amb Ch+LPS/IFN- γ (D). La immunofluorescència es va realitzar 4 h després del tractament amb LPS/IFN- γ . La barra representa 30 μ m.

4.2.7 LA MANCA DE C/EBP β I C/EBP δ TÉ EFECTES NEUROPROTECTORS

Per confirmar el paper de C/EBP δ en l'activació glial i la neurotoxicitat induïda per la glia activada, es van utilitzar cèl·lules de micròglia primària de ratolins deficientes en

C/EBP δ . Es van realitzar cultius primaris de micròglia no deficient i deficient en C/EBP δ , que es van tractar durant 24 h amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ . L'augment en la producció de NO induït pel tractament va ser significativament inferior als cultius deficientes que als cultius no deficientes (figura 51 A). Per confirmar el paper de C/EBP δ en la neurotoxicitat induïda per activació glial, es van realitzar en paral·lel cocultius de neurona i micròglia no deficient i cocultius de neurones no deficientes amb micròglia primària de ratolins deficientes en C/EBP δ . Als cocultius amb micròglia no deficient el tractament amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ va induir una mort d'aproximadament 40% de les neurones, mentre que als cocultius amb micròglia deficient per a C/EBP δ el tractament no va causar mort neuronal (figura 51 B). En els cocultius però, aquesta inhibició de la neurotoxicitat no s'acompanyà d'una inhibició en la producció de NO (figura 51 C).

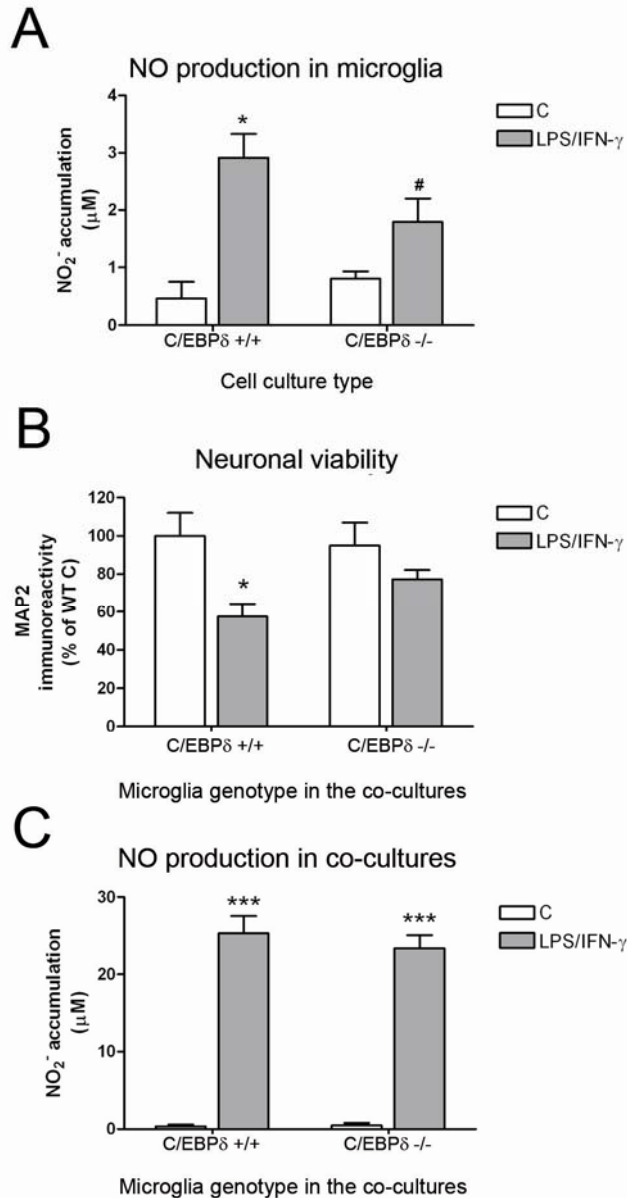


Figura 51. (A) Producció de NO a micròglia primària no deficient o deficient en C/EBP δ 24 h després de tractar amb LPS/IFN- γ . (B) Viabilitat neuronal i (C) producció de NO en cocultius de neurones no deficientes i micròglia no deficient o deficient en C/EBP δ , en situació control o després de 48 h de tractament amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana d'entre 3 i 4 experiments. * $p < 0,05$ i *** $p < 0,01$ vs C # $p < 0,05$ vs WT LPS/IFN- γ . ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

Per confirmar la implicació del C/EBP δ en el mecanisme d'acció de la crisina, es van tractar cocultius de neurones i micròglia no deficient o deficient per a C/EBP δ amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ en presència o absència de crisina durant 48 h i es va mesurar la producció de NO. Com ja s'havia observat, la producció de NO en resposta a LPS/IFN- γ augmentà tant en cocultius amb micròglia no deficient com amb micròglia deficient, sense diferències significatives. El pretractament amb crisina va inhibir significativament la producció de NO als cocultius amb micròglia no deficient, però no als cocultius amb micròglia deficient per a C/EBP δ (figura 52).

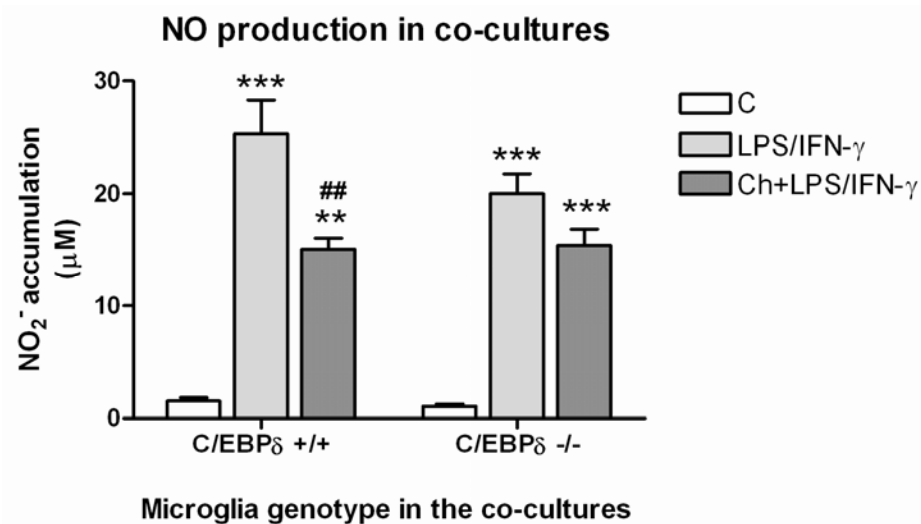


Figura 52. Producció de NO a cocultius de neurones i micròglia no deficient o deficient en C/EBP δ tractats amb LPS/IFN- γ en presència o absència de crisina (Ch). La producció de NO es va mesurar 48 h després del tractament amb LPS/IFN- γ . Les barres representen l'error estàndard de la mitjana. ** p <0,01, i *** p <0,001 vs C; ## p <0,01 vs LPS/IFN- γ . ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

El C/EBP β està implicat en la regulació de l'activació de la micròglia i és per tant interessant conèixer el seu paper en la neurotoxicitat induïda per activació microglial. Donat que els estudis amb crisina no van mostrar un efecte d'aquesta molècula sobre C/EBP β , i que no es coneixen inhibidors farmacològics, per poder estudiar l'efecte de la seva inhibició vam usar cultius de micròglia deficient en C/EBP β . Cocultius de neurones amb micròglia no deficient i cocultius amb micròglia deficient en C/EBP β van ser tractats amb 100 ng/mL de LPS + 30 ng/mL de IFN- γ . Mentre que als cocultius amb micròglia no deficient el tractament va induir una mort d'aproximadament el 50% de les neurones, als cocultius amb micròglia deficient la mort neuronal va ser inexistente (figura 53 A-E). Aquesta pèrdua de la capacitat neurotòxica de la micròglia deficient s'acompanyà d'una producció de NO significativament menor (figura 53 F).

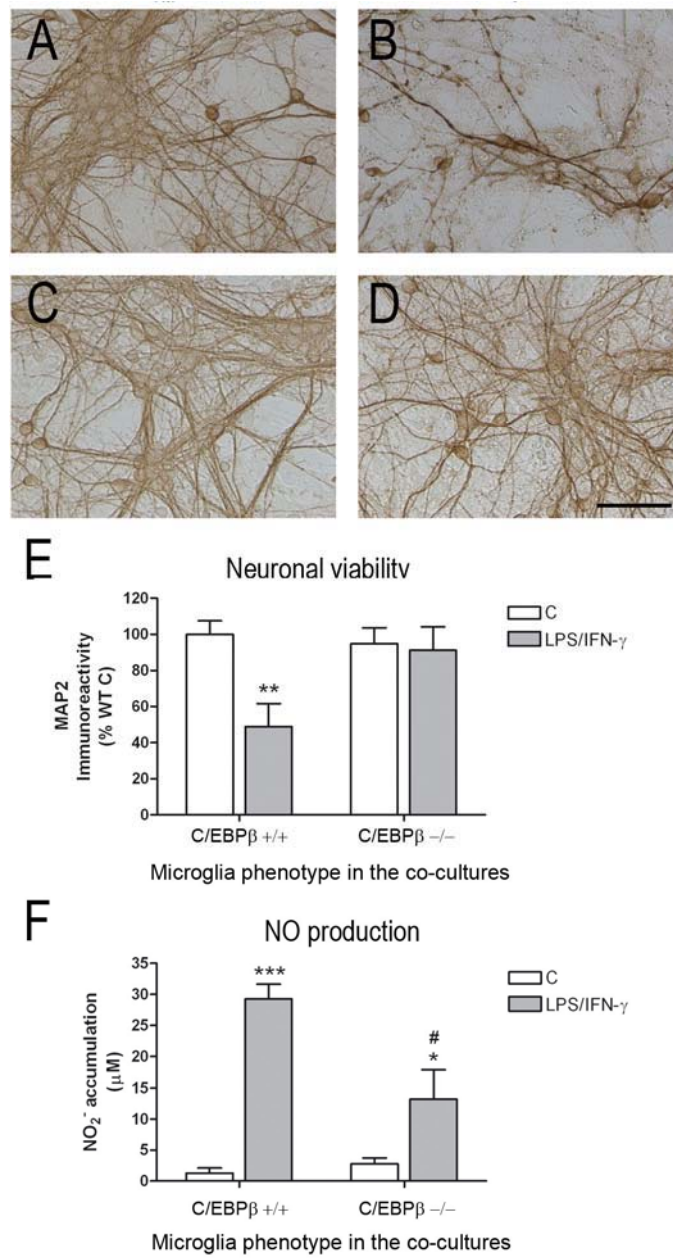


Figura 53. Cocultius de neurones i micròglia deficient en C/EBPβ. Marcatge amb MAP2 a cocultius amb micròglia no deficient (A-B) i deficient en C/EBPβ (C-D) en situació control (A i C) o després de tractar 48 h amb LPS/IFN-γ (B i D). La barra representa 100 μm. (E) Avaluació de la viabilitat neuronal. (F) Producció de NO en totes les condicions. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 5 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs C; #p<0.05 vs WT LPS/IFN-γ. ANOVA de dos factors seguida del test de Bonferroni.

DISCUSSIÓ

C/EBPδ està implicat en el mecanisme d'acció de la crisina sobre la micròglia activada

La crisina forma part de la família de compostos dels flavonoides. Aquests compostos tenen efectes antioxidants i antiinflamatoris (revisat a Vafeiadou i cols. 2007). Alguns treballs també han descrit un efecte neuroprotector d'alguns flavonoides (Wang i cols. 2002; Li i cols. 2005; Zheng i cols. 2008). En aquest capítol presentem resultats que demostren que la crisina té efecte antiinflamatori sobre les cèl·lules microgials en cultiu, inhibint la iNOS, la producció de NO i TNF- α però sense inhibir l'expressió de COX-2. A més, descrivim per primera vegada que la crisina té efecte neuroprotector, ja que inhibeix la neurotoxicitat induïda per activació microglial, i demostrem també per primera vegada la implicació de *C/EBPδ* en el mecanisme d'acció de la crisina.

Els nostres resultats indiquen que els efectes antiinflamatoris i neuroprotectors de la crisina estan mediat, si més no en part, per la inhibició de *C/EBPδ*. L'efecte de la crisina és molt ràpid (a 3 h ja hi ha inhibició de la inducció del mRNA en resposta al LPS/IFN- γ , el que suggereix que es tracta d'un efecte directe de la crisina sobre els factors de transcripció encarregats de la regulació de *C/EBPδ* o sobre l'estabilitat del mRNA de *C/EBPδ*. El promotor de *C/EBPδ* conté llocs d'unió per a CREB, NF κ B i STAT3 que indueixen la pujada inicial del mRNA de *C/EBPδ* en resposta a un estímul proinflamatori, així com llocs d'unió per a *C/EBPs* que jugarien un paper d'autoregulació en una resposta més tardana (Yamada i cols. 1998; Liu i cols. 2007). Woo i cols. (2005) van estudiar el mecanisme d'acció de crisina a cèl·lules RAW 264.7 (línia murina de macròfags) i no van trobar cap efecte d'aquesta molècula sobre CREB. Pel que fa a STAT3, tot i que no hi ha dades al respecte en micròglia o macròfags, un estudi recent realitzat en cèl·lules de venes umbilicals humanes demostra que el tractament amb crisina inhibeix l'efecte angiogènic de la IL-6 mitjançant la inhibició de la fosforilació i unió al DNA de STAT3 (Lin i cols. 2010). Aquest factor de transcripció doncs, podria ser un bon candidat per mediar l'efecte inhibitori de crisina sobre *C/EBPδ*. Aquesta inhibició a més, evitaria l'increment en l'expressió de *C/EBPδ* que es dona per autoregulació. Un altre factor que s'ha involucrat recentment en el mecanisme d'acció de la crisina és el AhR (de l'anglès "*Aryl hydrocarbon Receptor*"). Aquest receptor es troba implicat en la inhibició de la resposta inflamatòria (Sekine i cols. 2009) i la crisina pot modular la seva activitat, funcionant com a agonista o antagonista (Zhang i cols. 2003; Van der Heiden i cols. 2009). Es desconeixen les vies de transducció que s'activen quan la crisina interacciona amb AhR, però els nostres resultats suggereixen que *C/EBPδ* hi podria estar implicat.

En el nostre model, l'efecte de la crisina sobre els C/EBPs sembla ser específic per a C/EBP δ . Tot i que Woo i cols. (2005) van descriure que la crisina inhibia la unió de C/EBP β al DNA en macròfags RAW 264.7, en el nostre model no hem observat un efecte inhibitori de la crisina sobre C/EBP β , ni en l'expressió nuclear de la proteïna ni en la unió al DNA. Aquestes diferències poden ser degudes al tractament, ja que el treball de Woo i cols. està fet usant LPS 50 ng/mL mentre que nosaltres hem usat LPS 100 ng/mL en combinació amb IFN- γ . Pel que fa a C/EBP α (l'altre C/EBP majoritari al SNC juntament amb C/EBP β i C/EBP δ) els nostres resultats demostren que el pretractament amb crisina no varia els nivells d'expressió nuclear de C/EBP α .

Els resultats d'aquesta tesi suggereixen que la inhibició de C/EBP δ pot ser un dels principals mecanismes d'acció de la crisina. En primer lloc, demostrem que la crisina inhibeix C/EBP δ però no té efecte sobre C/EBP α , C/EBP β ni NF- κ B/p65. En segon lloc, els resultats obtinguts en micròglia deficient en C/EBP δ van en el mateix sentit que els obtinguts al tractar amb crisina. A més, en absència de C/EBP δ la crisina no inhibeix la producció de NO. Tot i això, la neuroprotecció observada al tractar amb crisina és major que la que s'observa en absència de C/EBP δ , el que indicaria que una part de l'efecte de la crisina és independent de C/EBP δ .

La inhibició dels C/EBPs té efectes antiinflamatoris

La inhibició dels C/EBPs (al tractar amb crisina o utilitzant micròglia de ratolins deficients en C/EBP β o C/EBP δ) inhibeix parcialment el patró proinflamatori induït pel tractament de LPS/IFN- γ , produint una baixada en la producció de NO. A més, el pretractament amb crisina inhibeix la producció de TNF- α a les 24 h primeres hores, tot i que aquesta inhibició es perd a les 48 h. L'expressió de COX-2 en canvi no pateix canvis en resposta a la crisina. Aquests resultats poden explicar-se per un paper diferent dels C/EBPs, i en especial C/EBP δ , en la regulació de iNOS, TNF- α i COX-2. Els nostres resultats suggereixen que C/EBP β i C/EBP δ juguen un paper fonamental en la regulació de la iNOS, ja que la seva manca inhibeix la producció de NO a la micròglia a tots els temps avaluats. Pel que fa al TNF- α , la crisina inhibeix la seva alliberació a les 24 h, però aquest efecte es perd a les 48 h. Això suggereix que el C/EBP δ juga un paper en la regulació de TNF- α a la resposta inicial d'aquesta citocina al tractament, però que no és tan important en la seva regulació posterior. A cocultius de neurones i micròglia primària la producció de TNF- α induïda pel tractament és molt superior a les 48 h que a les 24 h, mentre que aquest efecte no s'observa a cultius

enriquets de micròglia. Aquest efecte pot ser degut a la presència de neurones i sobretot astròcits; com s'ha discutit en l'apartat 4.1, en resposta a un estímul proinflamatori els astròcits secreten TNF- α i a més poden incrementar la secreció microglial de citocines proinflamatòries. En el cas de la COX-2, aquesta no es troba inhibida per crisina. Diversos treballs mostren una implicació dels C/EBPs en la regulació d'aquest enzim (Wadleigh i cols. 2000; Caivano i cols. 2001), i suggereixen la importància de la coordinació de C/EBP β i C/EBP δ tant per l'expressió basal com per a la inducció de l'expressió i manteniment d'aquesta en resposta a LPS. El nostre grup va demostrar que en cèl·lules de la micròglia C/EBP δ s'uneix al promotor de COX-2 al tractar les cèl·lules amb LPS, i que C/EBP δ forma dímers amb C/EBP β (Ejarque-Ortiz i cols. 2010). La crisina no inhibeix ni l'expressió ni l'activitat de C/EBP β al nostre model, i aquesta podria ser una de les raons per les quals la crisina no inhibeix COX-2, donada la importància de C/EBP β en la regulació d'aquest enzim. Tot i que C/EBP δ pot unir-se al promotor de COX-2, en absència de C/EBP δ , C/EBP β podria jugar un paper compensatori.

La inhibició dels C/EBPs té efectes neuroprotectors

Els resultats obtinguts tant pretractant amb crisina com utilitzant micròglia deficient en C/EBP β o C/EBP δ demostren la importància dels C/EBPs en la neurotoxicitat induïda per activació glial. Amb els tres models experimentals s'observa que la manca de C/EBP β o C/EBP δ a la micròglia és suficient per inhibir la neurotoxicitat induïda pel tractament dels cocultius amb LPS/IFN- γ . Com s'ha discutit en l'apartat 4.1 dels resultats, al nostre model de neurotoxicitat hi juga un paper molt important la producció de NO. Tant el pretractament amb crisina com la manca de C/EBP β inhibeixen la producció de NO als cocultius, i això comporta una menor neurotoxicitat. En el cas de la micròglia deficient per a C/EBP δ , aquesta inhibició de la producció de NO es dona en cultius enriquets en micròglia (figura 53) i en cultius mixtes de glia (dades no mostrades). En canvi, en cocultius de neurones i micròglia deficient per a C/EBP δ , no hi ha inhibició de la producció de NO (hi ha una tendència que s'observa en tots els cocultius avaluats, però que no és significativa). Aquesta manca d'efecte pot ser causada per la presència d'astròcits no deficients, ja que la presència d'astròcits potencia la producció de NO per part de la micròglia (Sola i cols. 2002). Així, en cultius enriquets en micròglia la manca de C/EBP δ inhibiria la producció de NO i en cultius de glia mixta deficient C/EBP δ la micròglia produiria menys NO i els astròcits, al no tenir tampoc C/EBP δ no potenciarien aquesta producció. En canvi, als cocultius de neurona

i micròglia deficient la micròglia produiria menys NO, però com els astròcits són no deficients, potenciarien aquesta producció fins pràcticament equiparar-la a la d'un cocultiu no deficient. En aquest context en el que no tenim inhibició de NO sí que s'observa una neuroprotecció, fet que podria semblar sorprenent tenint en compte que en el nostre model de neurotoxicitat el NO és el principal mediador de mort neuronal. Diversos treballs demostren que el NO es combina amb l'ió superòxid per produir peroxinitrit, i que és aquest radical el que té un potent efecte neurotòxic (revisat a Minguetti i Levi, 1998 i Vafeiadou i cols. 2007). C/EBP δ regula l'expressió de NOX-1 (Maitra i cols. 2009), el complex enzimàtic que sintetitza l'ió superòxid. Així doncs, pot ser que la micròglia deficient per a C/EBP δ produeixi menys ió superòxid comportant una menor producció de peroxinitrit, i per tant una menor toxicitat, tal com s'observa en els cocultius.

En resum, els nostres resultats demostren que la inhibició de C/EBP β o C/EBP δ té un efecte antiinflamatori i neuroprotector. Aquests efectes posen de manifest la rellevància dels C/EBPs en l'activació de la micròglia i la neurotoxicitat associada i assenyalen els C/EBPs com a una diana addicional a tenir en compte pel tractament de les malalties neurodegeneratives.

4.3 REGULACIÓ DE CD200 I MODULACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ CD200-CD200R

INTRODUCCIÓ

Al SNC en condicions basals s'expressen de forma constitutiva una sèrie de senyals inhibidors que mantenen a la micròglia en estat de repòs. Dins d'aquests senyals trobem la parella lligand-receptor CD200-CD200R, que s'expressen a les neurones i la micròglia respectivament. Diversos treballs han demostrat la funció immunomoduladora d'aquesta senyalització fora del SNC. L'activació de la micròglia amb un fenotip proinflamatori es pot inhibir usant com a mínim dues estratègies: la inhibició dels factors proinflamatoris que s'han produït en resposta a l'activació microglial o la potenciació dels mecanismes inhibidors de l'activació. Si en l'anterior capítol s'ha usat la primera estratègia, inhibint els C/EBPs, en aquest capítol s'estudia com inhibir l'activació proinflamatòria de la micròglia mitjançant la modulació de la senyalització CD200-CD200R.

Es coneix poc sobre la regulació de l'expressió de CD200 i CD200R, i de com l'activació de la senyalització CD200-CD200R inhibeix el fenotip inflamatori de la micròglia. Aquest capítol de resultats es centra en avaluar si la presència de mort neuronal, tant apoptòtica com necròtica, o d'estímuls pro o antiinflamatoris regulen l'expressió de CD200 a les neurones. A més, s'estudia el paper de la senyalització CD200-CD200R en la neuroinflamació, més concretament en la neurotoxicitat induïda per activació microglial.

En aquest capítol s'usen diversos models experimentals. En primer lloc, dos models de mort neuronal, un de mort apoptòtica induïda per estaurosporina i un de mort excitotòxica (necròtica) induïda per glutamat, i es mostren resultats tant de la posta a punt com de la caracterització. En segon lloc es mostren dos models de cocultiu de micròglia primària amb neurones apoptòtiques o necròtiques, on s'estudia també l'efecte de la l'apoptosi i la necrosi neuronal sobre la viabilitat de la micròglia. A més, es presenten resultats preliminars referents a l'efecte d'estímuls pro i antiinflamatoris a l'expressió de CD200 i a l'efecte de modular la senyalització CD200-CD200R sobre la neurotoxicitat induïda per activació microglial.

4.3.1 POSTA A PUNT D'UN MODEL DE MORT APOPTÒTICA I D'UN MODEL DE MORT PER EXCITOTOXICITAT (NECRÒTICA)

En aquest estudi es van posar a punt dos models de mort neuronal: un model de mort apoptòtica induïda amb estaurosporina i un de mort excitotòxica (necròtica) induïda amb glutamat. Posteriorment es volien realitzar estudis utilitzant cocultius de neurones necròtiques o apoptòtiques i micròglia primària. Donat que aquests dos agents tòxics podien tenir un efecte no només sobre les neurones sinó també sobre la micròglia, calia establir unes condicions de treball amb les que es poguessin tractar les neurones, i eliminar l'estímul tòxic abans de sembrar-hi la micròglia. Això es va aconseguir reemplaçant temporalment (durant 1 h) el medi de cultiu de les neurones per solució de Hanks i afegint el tractament en aquesta solució. Seguidament, després d'un rentat amb solució de Hanks, es tornà a posar el medi de cultiu neuronal. Per descartar un efecte tòxic *per se* d'aquest procediment (ja que les neurones són molt sensibles a canvis de medi), neurones control es van processar seguint aquest protocol però sense estaurosporina ni glutamat, i es va comparar la viabilitat d'aquestes neurones amb la de neurones a les que no s'havia realitzat cap canvi de medi. Com indica la figura 54, no es van observar diferències entre aquestes dues condicions, i per tant el protocol de tractament no induïa un efecte neurotòxic *per se*.

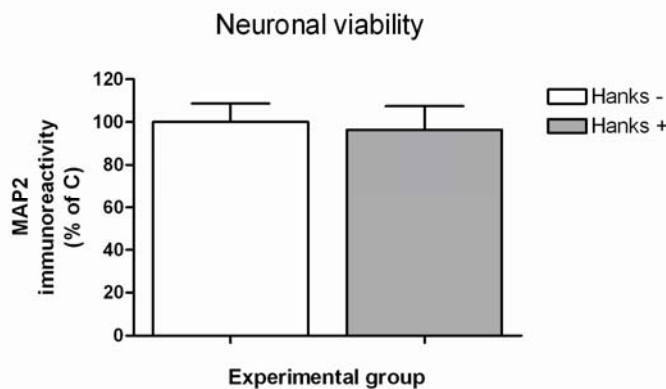


Figura 54 Viabilitat neuronal a cultius de neurones control (Hanks -) o cultius als que s'ha substituït durant 1h el medi de cultiu per solució de Hanks (Hanks +). Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. Test de la *t* de Student amb dades aparellades.

El primer pas va ser avaluar l'efecte del tractament amb estaurosporina o glutamat sobre la viabilitat neuronal, per determinar la magnitud i el patró temporal de la mort neuronal en ambdós models. Per tal efecte es van tractar cultius neuronals en solució de Hanks durant 1 h amb estaurosporina 1 μ M o glutamat 5 mM i 2 h, 4 h, 8 h o 24 h després es va avaluar la viabilitat neuronal. El tractament amb estaurosporina va mostrar una tendència a disminuir la viabilitat neuronal 8 h després del tractament, però no va ser fins a les 24 h que aquest efecte va esdevenir significatiu, induint aproximadament un 40% de mort neuronal (figura 55 A). El tractament amb glutamat va produir una resposta similar: a les 8 h va haver una tendència en l'efecte neurotòxic, i a 24 h l'efecte va ser significatiu, induint una mort d'aproximadament el 50% de les neurones (figura 55 B).

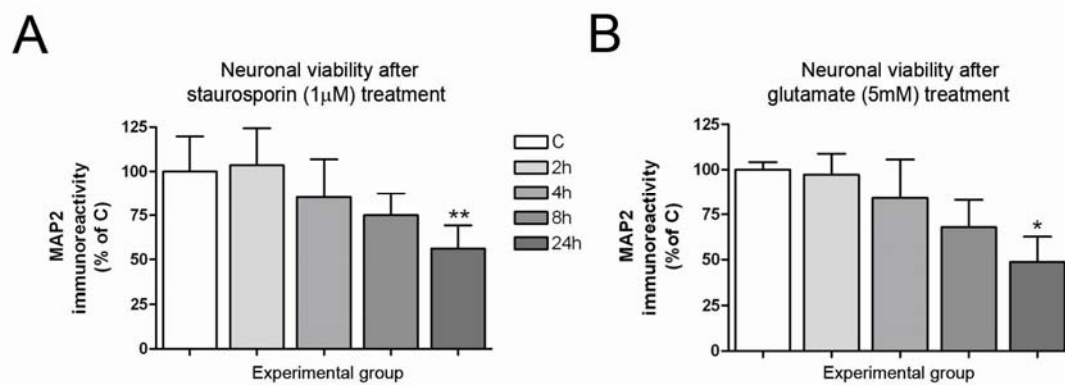


Figura 55. Avaluació de la viabilitat neuronal després de tractar un cultiu de neurones corticals durant 2 h, 4 h, 8 h o 24 h amb estaurosporina 1 μ M (A) o glutamat 5 mM (B). Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Neuman-Keuls.

Seguidament es va caracteritzar el patró de mort induït per cada un dels factors neurotòxics. Per fer-ho es va avaluar l'expressió de marcadors clàssics d'apoptosi: la fragmentació de la cromatina formant els anomenats "cossos apoptòtics" i l'expressió de caspasa 3 activada (proteolitzada). Primer es va caracteritzar la morfologia nuclear mitjançant una tinció de Hoechst 33258 24 h després de tractar amb estaurosporina o glutamat. En resposta als dos tractaments es van observar cèl·lules amb una condensació de la cromatina, que indicava mort cel·lular, però només l'estaurosporina va induir la formació de cossos apoptòtics (figura 56 A, panell central). Seguidament es va avaluar la presència de caspasa 3 activada mitjançant immunofluorescència. Com mostra la figura 56 B, només s'observà caspasa 3 activada a les neurones tractades amb estaurosporina, però no a les tractades amb glutamat. Aquests resultats es van confirmar per western blot. El tractament amb estaurosporina va induir un augment de

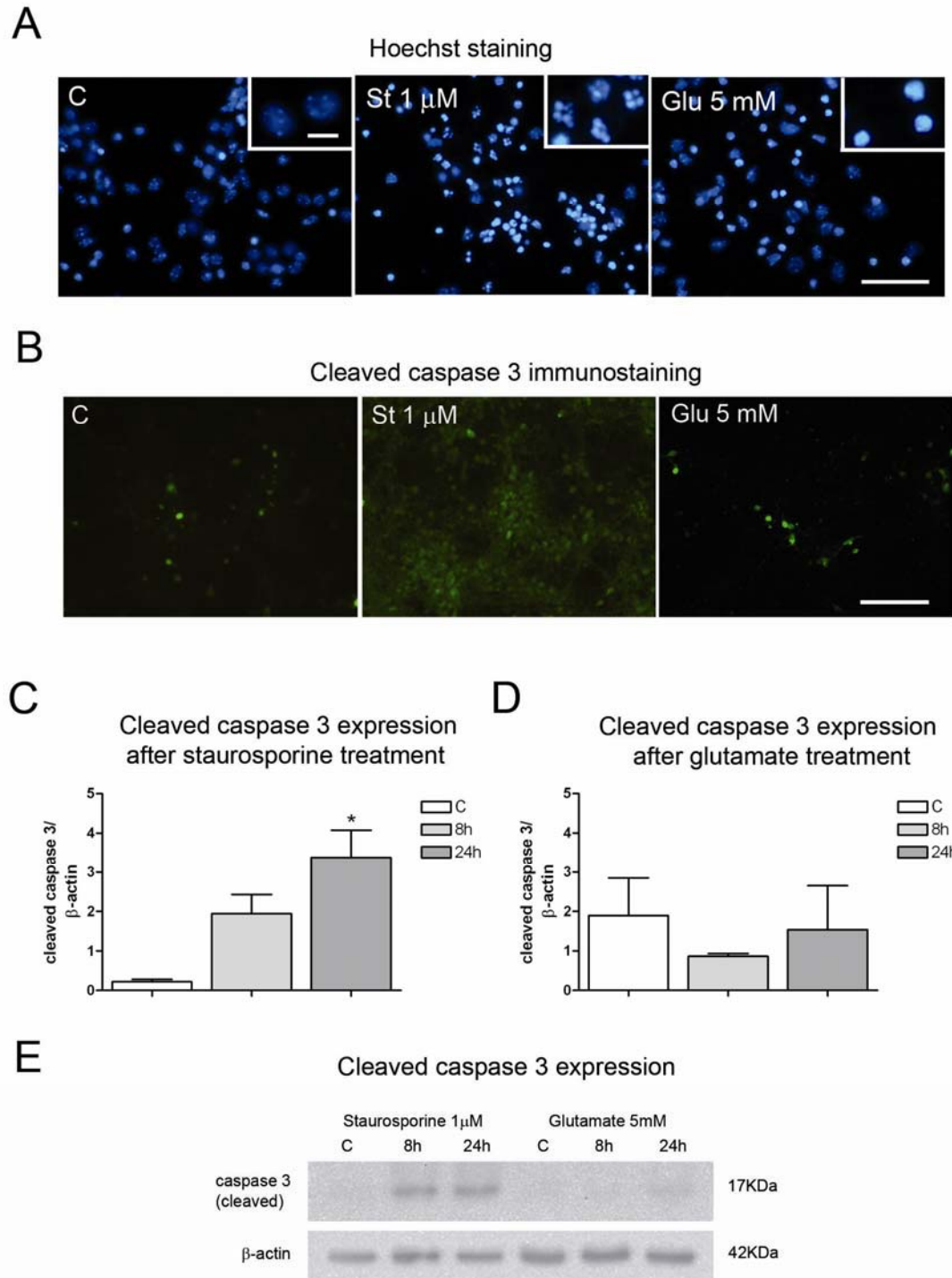


Figura 56. (A) Tinció nuclear amb Hoechst 33258 en cultius neuronals control i 24 h després de tractar amb estaurosporina (St) o glutamat (Glu). La barra és representativa de 10 μm (requadre superior) o 50 μm. (B) Immunofluorescència de caspasa 3 en cultius neuronals control i 24 h després de tractar amb estaurosporina o glutamat. La barra representa 50 μm. Expressió de caspasa 3 a cultius neuronals en situació control i 8 h o 24 h després de tractar amb estaurosporina (C) o glutamat (D). Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. * $p < 0,05$ vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls. (E) Imatge d'un western blot representatiu.

l'expressió de la caspasa 3 activada que ja era observable a 8 h però no va esdevenir significatiu fins les 24 h, mentre que el glutamat en canvi no va induir canvis en l'expressió de la caspasa 3 activada (figura 56 C-E). Així doncs l'estaurosporina però no el glutamat va induir mort apoptòtica.

4.3.2 EXPRESSIÓ DE CD200 EN RESPOSTA A LA MORT NEURONAL

Donat que els nostres cultius contenen un 16% d'astròcits, abans d'avaluar l'efecte de la mort neuronal en l'expressió de CD200, vam voler comprovar que aquesta proteïna només s'expressa a les neurones, i que per tant la presència dels astròcits no interferiria en el resultat. Per fer-ho vam realitzar dobles marcatges CD200/MAP2 (marcador neuronal) i CD200/GFAP (marcador d'astròcits) en cultius control. Com mostra la figura 57, el marcatge de CD200 col·localitzava amb MAP2, i no amb GFAP, per tant als nostres cocultius CD200 s'expressa només a neurones.

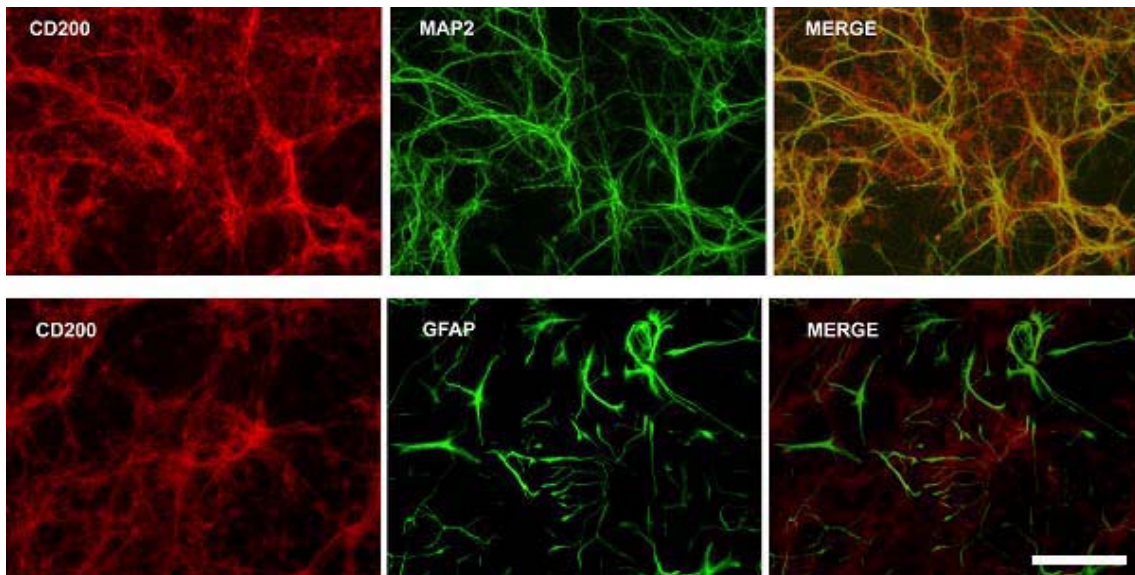
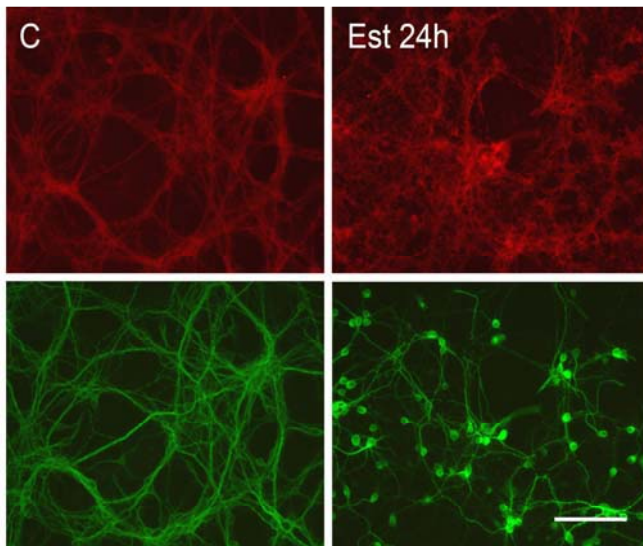


Figura 57. Immunofluorescència de cultius controls de neurona-astrocít de 5 DIV. Fila superior: doble immunofluorescència per CD200 (vermell) i el marcador neuronal MAP2 (verd), i la combinació d'ambdós marcatges (merge). Fila inferior: doble immunofluorescència per CD200 (vermell) i el marcador d'astrocít MAP2 (verd), i la combinació d'ambdós marcatges (merge). La barra representa 30 μ m.

La mort per apoptosi s'ha descrit clàssicament com una mort "neta" que no allibera factors intracel·lulars al medi i que per tant no indueix una activació proinflamatòria de les cèl·lules immunològiques, sinó que aquestes fagociten les cèl·lules apoptòtiques sense activar-se (Witting i cols. 2000; De Simone i cols. 2004). La mort necròtica en canvi es produeix de forma sobtada i sovint implica l'alliberament del contingut intracel·lular al medi, desencadenant una resposta inflamatòria. La senyalització CD200-CD200R té un paper immunomodulador, evitant una activació del sistema immunitari en resposta a estímuls fisiològics. Per això ens vam plantejar que el CD200

podia modular la resposta de la micròglia a la mort apoptòtica, inhibint la seva activació. Així, esperàriem que l'expressió de CD200 augmentés en les cèl·lules apoptòtiques però no en les necròtiques. Per testar aquesta hipòtesi es va realitzar un primer estudi de l'expressió proteica de CD200 en condicions control i en resposta a un estímul neurotòxic.

A



Així, es va realitzar una doble immunofluorescència CD200/MAP2 de cultius neuronals en situació control o 24h després de tractar amb estaurosporina o glutamat. Aquest experiment va mostrar que el marcatge de CD200 es mantenia o fins i tot augmentava lleugerament en resposta a la mort neuronal, mentre que el marcatge amb MAP2 (proteïna que vam utilitzar per estimar la viabilitat neuronal) disminuïa (figura 58).

B

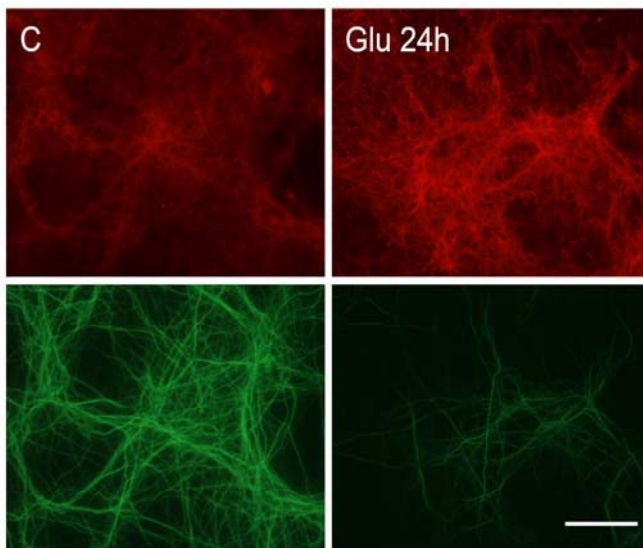


Figura 58. Immunofluorescència de CD200 (en vermell) i MAP2 (en verd) de cultius neuronals control i 24 h després de tractar amb estaurosporina 1 μ M (A) o glutamat 5mM (B). Les barres representen 100 μ m.

Per estudiar de forma més quantitativa si la mort apoptòtica i necròtica modulaven de forma diferent l'expressió proteica de CD200, es van avaluar els nivells d'expressió d'aquesta proteïna mitjançant western blot. Es van avaluar dos temps: 8 h, temps en el que encara no hi havia mort significativa i per tant era possible que es donés síntesi proteica, i 24 h, temps al que vèiem mort neuronal significativa. En condicions control, tal com esperàvem, hi ha una expressió basal de CD200 a les neurones (figura 59). El tractament amb estaurosporina va induir un increment de l'expressió del CD200 a les 24 h, en canvi no s'observà efecte a les 8 h (figura 59 A). El tractament amb glutamat va tenir un efecte similar, augmentant l'expressió de CD200 a les 24 h però no a les 8 h (figura 59 B). Així, tant la mort apoptòtica com la mort necròtica van induir un increment en l'expressió de CD200.

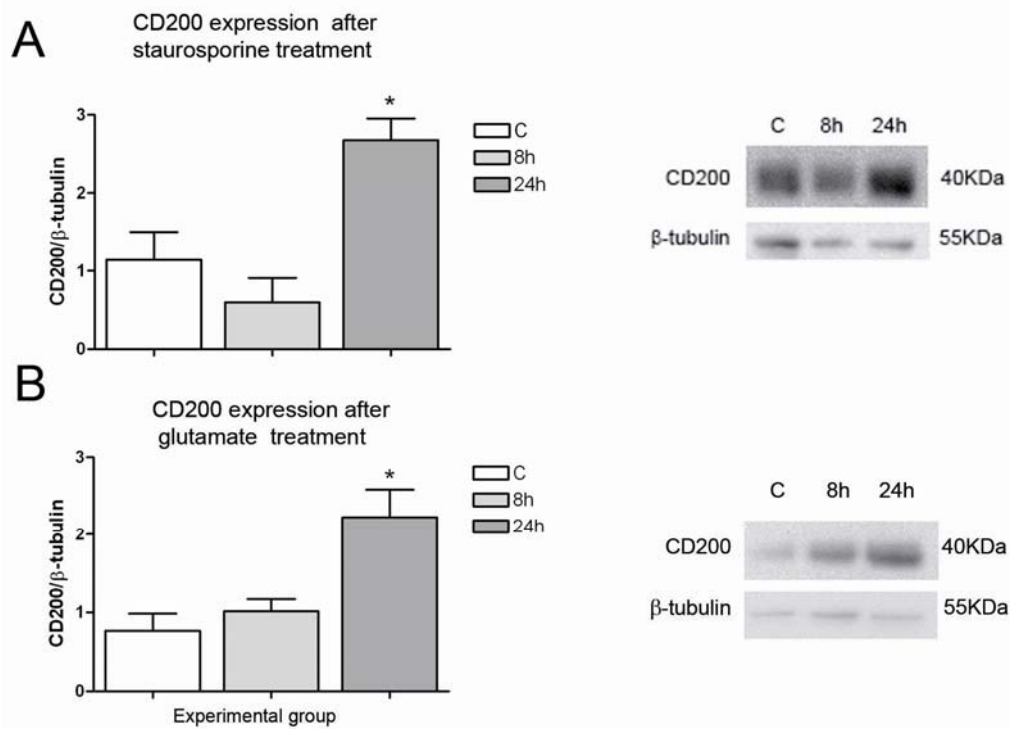


Figura 59. Expressió de CD200 a cultius neuronals en situació control, 8 h i 24 h després de tractar amb estaurosporina (A) o glutamat (B). Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 4 experiments. * $p < 0,05$ vs C. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls. Les imatges mostren western blots representatius.

4.3.3 LES NEURONES TRACTADES AMB ESTAUROSPORINA I GLUTAMAT TENEN DIFERENT EFECTE SOBRE LA VIABILITAT DE LA MICRÒGLIA

Per tal d'avaluar si l'augment de CD200 induït per la mort neuronal, tant apoptòtica com necròtica, tenia un efecte inhibitori sobre l'activació de la micròglia, ens vam plantejar posar a punt un model de cocultiu de neurones apoptòtiques o necròtiques sobre les que es sembraria micròglia primària que posteriorment s'activaria amb LPS/IFN- γ . Per fer-ho es va sembrar la micròglia sobre cultius de neurones tractades amb estaurosporina o glutamat. Per avaluar l'estat del cocultiu 48 h després del sembrat de la micròglia es va realitzar una immunocitoquímica per a CD11b, un marcador microglial. En els cocultius control s'observà un marcatge homogeni per tot el camp que mostrà la micròglia amb fenotip no activat (figura 60 A). En els cocultius de micròglia i neurones apoptòtiques pràcticament no hi havia cèl·lules microgials marcades, i s'observaren restes cel·lulars (figura 60 B). Això no s'observà als sembrar la micròglia sobre cèl·lules necròtiques (figura 60 C).



Figura 60. Immunocitoquímica per a CD11b en cocultius de micròglia i neurones control (A), apoptòtiques (B) i necròtiques (C). La micròglia es sembla a les 24 h d'induir mort neuronal, les imatges corresponen a les 48 h del cocultiu. La barra representa 50 μ m.

Per estudiar si l'efecte tòxic de les neurones apoptòtiques era degut a un contacte cèl·lula-cèl·lula o a un factor alliberat al medi, es van tractar cultius de micròglia primària amb medi condicionat de cultius neuronals control, tractats amb estaurosporina o amb glutamat. El medi de neurones control no va induir toxicitat a la micròglia (figura 61, panells de l'esquerra). En imatges captades amb contrast de fase s'observà com el cultiu es troba en bones condicions i no hi havia restes cel·lulars. El marcatge amb iodur de propidi mostrà poques cèl·lules mortes (marcades en vermell). Les cèl·lules de micròglia tractades amb medi de neurones apoptòtiques (figura 61, panells centrals) van mostrar amb contrast de fase una morfologia més vacuolada i amb restes cel·lulars, i el marcatge amb iodur de propi mostrà un gran nombre de cèl·lules mortes, fet que demostrà que el medi de les neurones apoptòtiques contenia factors tòxics per a la micròglia. La micròglia tractada amb medi condicionat de

neurones necròtiques en canvi mostrarà un aspecte similar al control, sense pràcticament marcatge amb iodur de propidi (figura 61, panells de la dreta).

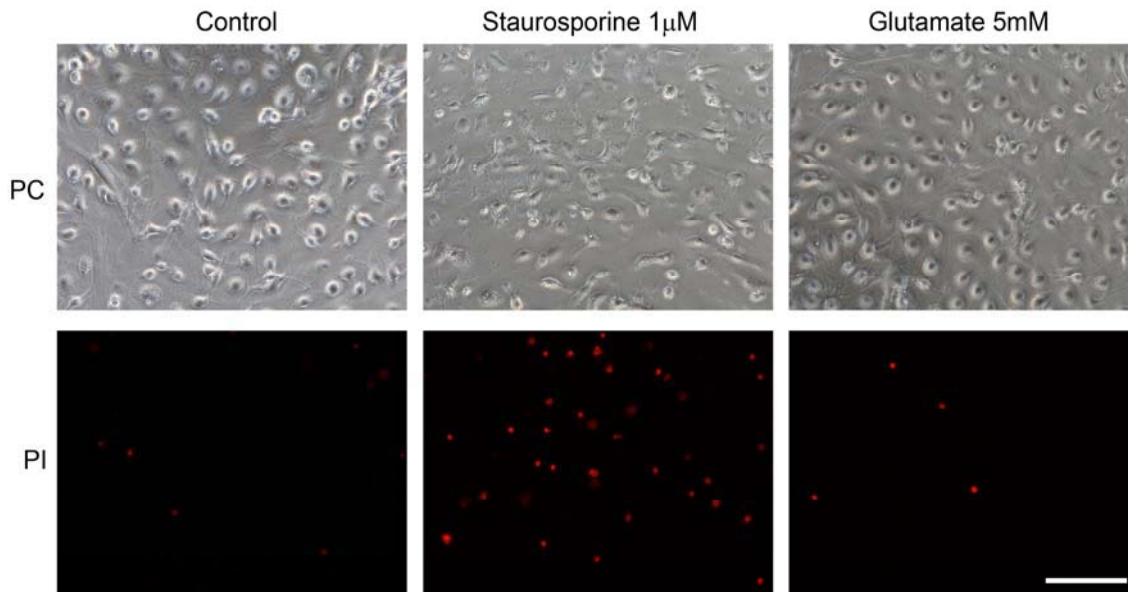


Figura 61. Cultiu de micròglia primària resembrada tractada 24 h amb medi condicionat de neurones corticals control i tractades 24 h amb estaurosporina 1 μ M o glutamat 5 mM. Imatges a contrast de fase (PC) o marcatge amb iodur de propidi (PI). La barra representa 100 μ m.

4.3.4 LA SENYALITZACIÓ CD200-CD200R EN LA NEUROINFLAMACIÓ

La senyalització CD200-CD200R es troba implicada en la modulació de l'activació de les cèl·lules mieloides (com la micròglia). És per això que ens vam preguntar si en el nostre model de neurotoxicitat induïda per activació microglial CD200-CD200R podien estar jugant un paper. En aquest apartat es presenten resultats preliminars sobre el paper de CD200-CD200R en la neuroinflamació.

El primer que ens vam plantejar és si estímuls pro o antiinflamatoris podien modular l'expressió de CD200 a les neurones. Per avaluar-ho es van tractar durant 24 h cultius de neurones amb estímuls proinflamatoris (LPS, IFN- γ i la combinació d'ambdós) i antiinflamatoris (IL-4 i IL-10). Com es pot observar a la figura 62, cap dels tractaments va induir canvis significatius en l'expressió proteica de CD200.

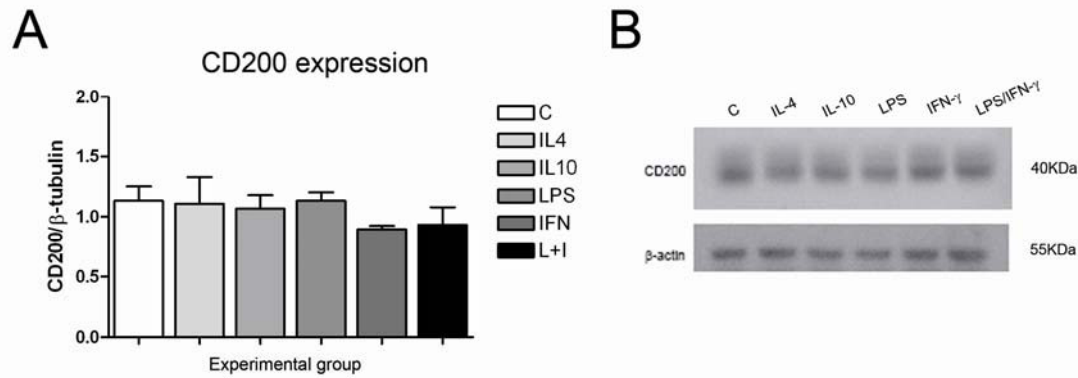


Figura 62. (A) Expressió de CD200 24 h després de tractar amb estímuls pro i antiinflamatoris. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments independents. ANOVA d'un factor, $p > 0,05$. (B) Imatge d'un western blot representatiu.

Per tan, vam comprovar que estímuls pro i antiinflamatoris no tenen efecte sobre CD200. De tota manera, experiments fets al nostre grup mostren que al tractar cèl·lules microgials amb LPS o LPS/IFN- γ hi ha una inhibició de l'expressió del seu receptor, CD200R.

Seguidament vam voler estudiar si l'activació de CD200R podia inhibir la resposta inflamatòria de la micròglia als cocultius i en conseqüència reduir la neurotoxicitat associada. No hi ha agonistes comercials de CD200R, però Gorczynski i cols. (2008) havien descrit que diferents fragments de CD200 podien actuar com agonistes del CD200R. Vam fer sintetitzar un d'aquests pèptids i vam tractar cocultius de neurones i micròglia primària amb LPS/IFN- γ en presència o absència d'aquest pèptid agonista de CD200R1. El tractament amb el pèptid no va inhibir la neurotoxicitat induïda per LPS/IFN- γ (figura 63 A). El pèptid agonista tampoc va tenir un efecte sobre la producció de NO induïda per LPS/IFN- γ (figura 63 B), que com hem demostrat té un paper important en la inducció de neurotoxicitat al nostre model experimental.

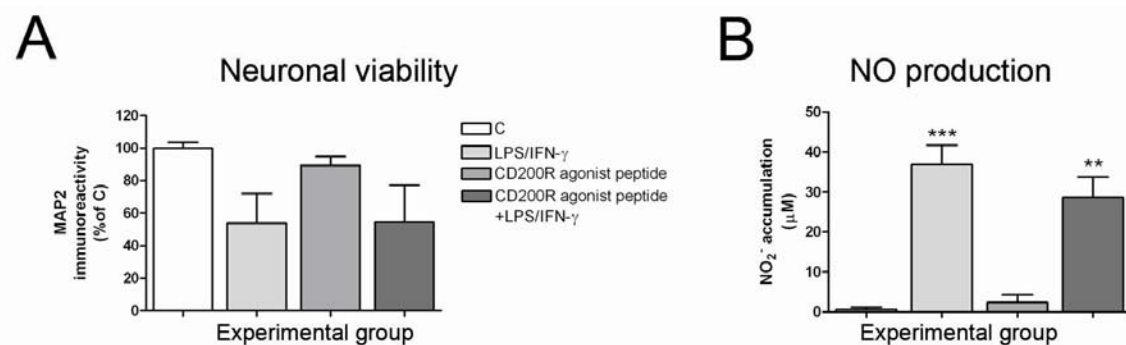


Figura 63. Viabilitat neuronal (A) i producció de NO (B) en cocultius de neurones i micròglia primària controls o tractats durant 48 h amb LPS/IFN- γ en presència o absència del pèptid agonista de CD200R. Les barres representen l'error estàndard de la mitjana de 3 experiments. ANOVA d'un factor seguida del test de Newman-Keuls.

DISCUSSIÓ

Posta a punt del model

En aquest capítol es presenten dos models de mort neuronal, un model de mort apoptòtica induïda amb estaurosporina 1 μM i un de mort necròtica induïda amb glutamat 5 mM. Hem caracteritzat la mort neuronal en aquests models mitjançant dos marcadors clàssics d'apoptosi: la presència de cossos apoptòtics al nucli de les cèl·lules (marcant la cromatina amb la tinció de Hoechst 33258) i l'activació de caspasa 3, caspasa efectora tant de la via extrínseca com intrínseca de les caspases. Malgrat que els dos tractaments indueixen un percentatge de mort similar a les 24 h, el patró de mort és diferent. En el cas de l'estaurosporina presenta característiques apoptòtiques ja que es detecta l'activació de caspasa 3 i la formació de cossos apoptòtics (figura 56). La mort induïda pel tractament amb glutamat no presenta característiques d'apoptosi, ja que no hi ha activació de caspasa 3 ni presència de cossos apoptòtics (figura 56).

Tot i que l'apoptosi i la necrosi són termes que s'han usat des de fa molts anys, encara no hi ha uns patrons clars per establir si un tipus de mort és apoptòtic o necròtic. Un exemple d'aquest fet és que la condensació de la cromatina (nuclis picnòtics) s'usa en alguns treballs com a marcador de necrosi i en altres com a marcador d'apoptosi (Leon i cols. 2009; Witting i cols. 2000). Mentre que el model d'estaurosporina és un model clàssic de mort apoptòtica (Koh i cols. 1995), el model de glutamat pot ser més controvertit. En la literatura pocs treballs parlen de mort necròtica, sinó que sovint es s'anomena la mort segons el tipus d'agent tòxic (excitotòxic, per estrès oxidatiu...). En el nostre model hem usat glutamat 5 mM per induir mort neuronal. El glutamat produeix mort per excitotoxicitat (revisat a Hara i Snyder, 2007) induint mort apoptòtica a concentracions baixes o necròtica a concentracions elevades com la que fem servir al nostre model (Ankarcrona i cols. 1995; Rubin, 1997; Nicotera i cols. 1999).

Al realitzar cocultius de micròglia amb neurones apoptòtiques i necròtiques es va observar que la presència de neurones apoptòtiques, però no necròtiques, és tòxica per a la micròglia (figura 60). Aquest efecte tòxic es reproduïx al tractar micròglia primària amb medi condicionat de neurones apoptòtiques (figura 61); per tant, la toxicitat està mediada (si més no en part) per un factor soluble. A la literatura hi ha alguns treballs que descriuen un efecte tòxic de les neurones apoptòtiques sobre les cèl·lules immunitàries en models de dany agut, fet que s'atribueix a un mecanisme fisiològic per eliminar l'excés d'activació i una resposta inflammatòria exacerbada (Gehrmann i Banati, 1995; Kohji i Matsumoto, 2000; Kuhlmann i cols. 2001). Polazzi i

Contestabile (2003) van estudiar l'efecte del medi condicionat de neurones cerebel·lars apoptòtiques sobre la viabilitat de la micròglia, i van descriure que aquest medi condicionat indueix apoptosi a la micròglia tractada amb LPS però no a la micròglia control. A més, van determinar que el factor soluble responsable de l'efecte tòxic és de naturalesa proteica, ja que al bullir 30 min el medi (tractament que desnatura les proteïnes) aquest perd el seu efecte tòxic. Per esbrinar quin és aquest factor els autors van pretractar els cultius de micròglia amb anticossos bloquejants per a algunes molècules candidates, com els factors de creixement NGF, BDNF i neurotrofina 3, per veure si prevenien l'efecte tòxic del medi condicionat de neurones apoptòtiques, però no van observar un efecte protector en cap dels casos. Liu i cols. (2010) van descriure que l'administració de CD200 Fc indueix apoptosi de la micròglia activada amb IFN- γ . En el nostre model el CD200 no sembla ser la molècula responsable de l'efecte tòxic del medi condicionat, ja que els nostres resultats mostren un augment de CD200 tant a les cèl·lules apoptòtiques com a les necròtiques (figura 59) però només les cèl·lules apoptòtiques indueixen mort de la micròglia. Donat que l'efecte també s'observa a micròglia tractada amb medi condicionat, el factor responsable ha de ser una molècula soluble alliberada al medi per les neurones apoptòtiques però no necròtiques. La mort per apoptosi s'ha descrit clàssicament com una mort neta, en la que no s'alliberen factors intracel·lulars al medi, tot i això si les cèl·lules apoptòtiques no són fagocitades ràpidament es produeix un procés de necrosi secundària, que inclou la permeabilització de la membrana cel·lular i l'alliberació al medi de components intracel·lulars (revisat a Rock i Kono, 2008) i eleva la concentració extracel·lular de molècules com els neurotransmissors (Gallo i cols. 1982; Schousboe i cols. 1989; Holopainen i Kontro, 1989), substàncies que en conjunt poden induir una resposta a la micròglia.

Regulació de CD200 i modulació de la senyalització CD200-CD200R

Els resultats mostren que el CD200 augmenta en els dos models de mort, apoptòtica i necròtica (figura 59). Rosenblum i cols. (2004) van descriure un augment de CD200 a cèl·lules dendrítiques apoptòtiques, però aquest treball és la primera demostració al SNC de què el CD200 augmenta en presència de mort neuronal. Clàssicament es parla de que en resposta a la mort apoptòtica la micròglia s'activa amb un fenotip antiinflamatori mentre que en resposta a una mort necròtica s'activa amb un fenotip proinflamatori (revisat a Rock i Kono, 2008). Si la senyalització CD200-CD200R inhibeix l'activació proinflamatòria de la micròglia, un augment de CD200 hauria d'induir una repressió en la resposta inflamatòria, fenomen que es dona en l'apoptosi però no en la necrosi. El fet que nosaltres observem una pujada de CD200 en ambdós

tipus de mort pot indicar diverses coses. D'una banda, observacions realitzades per immunofluorescència mostren que CD200 es manté tot i que les neurones estiguin morint (figura 58). Una hipòtesi és que la neurona al morir manté els nivells d'expressió de CD200 però que són altres molècules les que marquen la diferència d'activació de la micròglia quan aquesta respon a la presència d'una cèl·lula apoptòtica o necròtica. D'altra banda podria ser que el CD200 augmenti en ambdós condicions però que canvis o nivells del receptor microglial CD200R determinin la funcionalitat del sistema CD200-CD200R en cada situació. Es desconeix el tipus de molècules que regulen l'expressió de CD200R, però pot ser que hi hagi diferències entre apoptosi i necrosi.

Donat que la senyalització CD200-CD200R modula l'activació microglial, es podria hipotetitzar que els estímuls anti i proinflamatoris que regulen l'activació de la micròglia també estiguin modulant aquesta senyalització. Així, un estímul antiinflamatori com la IL-4 o la IL-10 augmentaria l'expressió de CD200, el que inhibiria la resposta inflamatòria microglial, mentre que estímuls proinflamatoris com el LPS o l'IFN- γ disminuirien l'expressió de CD200. Els nostres resultats mostren una manca de regulació de l'expressió de CD200 en resposta a aquests estímuls (figura 62). A la literatura no hi ha gaires estudis sobre l'efecte dels estímuls pro o antiinflamatoris sobre l'expressió de CD200, i encara menys si ho restringim al SNC; a més els resultats publicats són sovint contradictoris. Pel que fa a estímuls antiinflamatoris, un sol grup ha descrit un efecte de IL-4 sobre l'expressió de CD200. Aquests autors van descriure que el tractament amb IL-4 induïx l'expressió proteica de CD200 tant *in vivo* com *in vitro* (Lyons i cols. 2007); estudis del mateix grup demostren que ratolins deficients per a IL-4 tenen una menor expressió de mRNA de CD200, tot i que no avaluen l'expressió proteica de CD200 (Lyons i cols. 2009). Pel que fa als estímuls proinflamatoris, Chen i cols. (2009) van tractar diferents línies de cèl·lules endotelials, limfòcits, macròfags i neurones i van caracteritzar-ne l'expressió del mRNA de CD200 en condicions control o estimulades amb TNF- α i/o IFN- γ . Aquest treball mostra com l'expressió de CD200 augmenta en resposta al tractament a les línies cel·lulars de limfòcits T, però no a les neurones. Masocha (2009) va realitzar un estudi *in vivo* avaluant l'expressió de mRNA de CD200 i CD200R a ratolins control i tractats amb LPS. Aquest estudi mostra un augment en l'expressió de CD200 1 dia després de l'administració de LPS, però un decrement 1 any post injecció; pel que fa al CD200R, el LPS en disminueix l'expressió tant a 1 dia com a 1 any postinjecció.

A més d'avaluar l'expressió proteica de CD200 en resposta a estímuls inflamatoris en cultius neuronals, vam voler estudiar si la senyalització CD200-CD200R està implicada en la mort neuronal induïda per activació microglial (produïda per estímuls proinflamatoris), usant el nostre model de cocultiu de neurona i micròglia. Per fer-ho ens vam plantejar tractar cocultius de neurona i micròglia amb LPS/IFN- γ en presència o absència d'agonistes de CD200R. Donada la falta d'agonistes comercials, vam fer sintetitzar un pèptid de CD200 descrit com agonista de CD200R per Gorczynski i cols. (2008). Aquests autors van mostrar que diferents fragments de CD200 poden funcionar com agonistes o antagonistes de CD200R en cèl·lules no microglials. En el seu treball van tractar ratolins amb LPS i el pèptid agonista per a CD200R. Al mesurar el TNF- α al sèrum dels animals van observar que el LPS induïa una pujada de TNF- α que es revertia al tractar amb el pèptid; el pèptid no va tenir efecte en ratolins KO per a CD200R. Al promoure aquesta senyalització, esperàvem inhibir l'activació de la micròglia, i disminuir la neurotoxicitat derivada d'aquesta activació. Tal com mostra la figura 63 el tractament amb el pèptid no va inhibir la neurotoxicitat, ni tampoc la producció de NO, que com ja s'ha discutit anteriorment és un dels principals mediadors de la neurotoxicitat al nostre model experimental. Les diferències observades entre els nostres resultats i els d'aquests autors poden ser degudes a les diferències de model experimental. De tota manera no es pot descartar que el pèptid no estigui funcionant en el nostre model experimental, doncs no tenim cap seguretat que el pèptid estigui activant la cascada de transducció de senyal associada a CD200R. El problema però és que aquesta es coneix molt poc, i les molècules a les que se'ls ha atribuït un paper en aquesta senyalització no són específiques d'aquesta via.

En resum, en aquest capítol es mostren dos models de mort neuronal, un d'apoptosi induïda per estaurosporina i un de mort necròtica induïda per glutamat. A més, es mostra l'efecte de diversos estímuls sobre l'expressió de CD200, demostrant que la mort neuronal modula l'expressió de CD200 però els estímuls pro o antiinflamatoris no semblen tenir efecte sobre els nivells d'aquesta proteïna.

5. DISCUSSIÓ GENERAL

La micròglia constitueix el sistema immunitari resident del SNC. Les cèl·lules microgials s'activen en resposta a una gran varietat d'estímuls per tal d'eliminar patògens, substàncies tòxiques, acumulacions proteiques extracel·lulars anòmales, etc... i retornar el SNC a l'homeòstasi. Hi ha casos però on es produeix una activació microglial exacerbada o crònica, com per exemple quan l'estímul proinflamatori no es pot eliminar (com succeeix amb les plaques d'amiloide a la malaltia d'Alzheimer). En aquests casos l'activació de la micròglia pot desencadenar una resposta inflamatòria que es caracteritza per la producció de factors que són potencialment tòxics. Així, un fenomen que té normalment un efecte beneficiós pot esdevenir perjudicial i empitjorar el curs de determinades patologies (Polazzi i Contestabile, 2002; Allan i Rothwell, 2003).

L'activació de la micròglia és un procés altament regulat que pot donar lloc a diversos patrons de resposta (Hanish i Kettenman, 2007). Conèixer els mecanismes i les molècules implicades en la regulació microglial és de gran importància per tal de ser capaços de modular-la en les patologies on es creu que la neuroinflamació té un paper nociu en el progrés de la malaltia. La inhibició de la resposta inflamatòria de la micròglia activada es pot abordar com a mínim des de dos plantejaments. D'una banda es poden inhibir els factors que formen part d'aquesta resposta (factors de transcripció, enzims, receptors ...). De l'altra, es pot potenciar l'acció de les molècules que actuen inhibint la resposta microglial. En aquesta tesi s'han abordat les dues estratègies per aconseguir un mateix objectiu, inhibir la sobreactivació microglial que indueix neurotoxicitat. Així, una part dels estudis correspon a la inhibició dels C/EBPs, factors de transcripció que regulen a l'alça l'expressió de gens proinflamatoris, mentre que una altra part correspon a la modulació de CD200-CD200R, senyalització implicada en inhibir la resposta de la micròglia.

Per tal d'abordar aquestes dues estratègies *in vitro* ens calia disposar d'un model d'activació microglial, i un model de cocultiu de neurones i micròglia que ens permetés avaluar l'efecte neurotòxic d'aquesta activació. Com a estímul proinflamatori hem usat el tractament amb LPS combinat amb IFN- γ . Aquest tractament indueix l'activació de diverses vies de senyalització. El LPS s'uneix al receptor TLR4 activant la via de IRAKs/TRAFs, induint d'una banda les MAP cinasa cinasa (MKK)3 i 6, que regulen p38. D'altra banda poden activar MKK1-2, que regulen JNK i ERK1-2. JNK, ERK i p38 s'han relacionat amb l'increment de C/EBP β i C/EBP δ en resposta al LPS (Bradley 2003; Ejarque-Ortiz 2007, 2010). Per la seva banda, l'IFN- γ s'uneix al receptor

d'interferó activant la via JAK-2/STAT-1. STAT-1 dimeritza i transloca al nucli unint-se a les seqüències GAS dels promotors dels gens diana de l'IFN- γ . Tot i que aquesta és la via clàssica i més ben caracteritzada, en els darrers anys s'ha descrit una via independent de STAT-1 per la qual l'IFN- γ activa gens amb una seqüència GATE al seu promotor (Roy i cols. 2000; Meng i cols. 2005). Aquesta via s'activa quan l'IFN- γ s'uneix al receptor d'interferó activant la cascada de senyalització de MAPKs MEKK1/MEK1-2/ERK1-2, i aquesta darrera cinasa fosforila C/EBP β induint un canvi de conformació que li permet unir-se a la seqüència GATE (Hu i cols. 2001; Roy i cols. 2002; Kalvakolanu i Roy 2005). L'activació tant del receptor TLR4 mediada per LPS, com del receptor d'interferó mediada per l'IFN- γ indueix en una primera fase l'activació de C/EBP β (expressat a les cèl·lules en condicions basals) i també de factors de transcripció de les famílies AP-1 i NF- κ B entre d'altres. Aquests factors de transcripció s'uneixen als promotors de gens proinflamatoris com IL-6, IL-1 β , TNF- α , iNOS i COX-2 activant-ne la transcripció. La resposta inflamatòria desencadenada indueix una segona onada d'activació dels C/EBPs, en la que es sintetitzen *de novo* C/EBP β i C/EBP δ . En aquesta segona onada hi juga un paper important el C/EBP β ja existent, donat que els promotors de C/EBPs tenen seqüències d'unió C/EBP per autoregular-se. Els C/EBPs sintetitzats *de novo* es poden unir al promotor de gens prèviament activats per mantenir-ne i reforçar-ne l'expressió (revisat a Poli, 1998 i Medzhitov i Horng, 2009).

La producció per part de la micròglia dels diferents factors proinflamatoris indueix una retroalimentació positiva que fa que la resposta desencadenada sigui de major magnitud. Les citocines IL-1 β , IL-6 i TNF- α activen la transcripció de gens proinflamatoris, augmentant l'activació desencadenada per LPS/IFN- γ (revisat a John i cols. 2003). L'augment d'expressió de COX-2 en resposta a LPS/IFN- γ comporta la síntesi de prostaglandines que poden tenir un efecte proinflamatori, regulant a l'alça l'activació de la micròglia. La producció de factors proinflamatoris té també efectes sobre altres tipus cel·lulars. La producció d'IL-1 β i TNF- α a la micròglia indueix astrogliosi reactiva (revisat a John i cols. 2003). A més, quan l'activació de la micròglia és exacerbada, pot induir neurotoxicitat per diversos mecanismes. D'una banda el TNF- α es pot unir al receptor de Fas desencadenant mort per apoptosi (MacEwan, 2002; Taylor i cols. 2005). D'altra banda l'activació de la iNOS augmenta la producció de NO. El NO a concentracions elevades és neurotòxic *per se*, (ja que difon cap a les neurones veïnes, inhibint-ne la cadena respiratòria mitocondrial), però a més es pot

combinar amb l'ió superòxid, produït per la NADPH oxidasa, formant peroxinitrit. El peroxinitrit té un gran efecte tòxic sobre les neurones (revisat a Vafeiadou i cols. 2007). D'una banda n'inhibeix la cadena respiratòria mitocondrial. A més, indueix modificacions com la S-nitrosilació a les proteïnes el que provoca que aquestes perdin funcionalitat. També activa les caspases, causant mort per apoptosi, i indueix l'alliberament de glutamat, que causa mort per excitotoxicitat a les neurones circumdants. La rellevància del NO en el dany neuronal s'ha demostrat *in vivo* usant models animals de patologia en la que es dona mort neuronal. Així, s'ha demostrat que l'absència de iNOS és neuroprotectora en models de malaltia de Parkinson (Liberatore i cols. 1999; Dehmer i cols. 2000), de mort neuronal induïda per àcid caínic (Martínez-Palma, 2003; Byun i cols. 2009) i també de dany per traumatisme cerebral (Foley i cols. 2007).

El paper dels C/EBPs en la neurotoxicitat induïda per activació microglial és clau, ja que tal com mostren els resultats d'aquesta tesi, la inhibició de C/EBP β o C/EBP δ té efecte neuroprotector. Per estudiar el paper dels C/EBPs en l'efecte neurotòxic de la microglia activada hem usat dues aproximacions: els ratolins deficients per a C/EBP β o C/EBP δ i el pretractament amb crisina. Mentre que la inhibició dels C/EBPs en els ratolins deficients és específica i directa, el mecanisme pel qual la crisina inhibeix C/EBP δ no està establert. Tot i desconèixer quin és el mediador d'aquest l'efecte de la crisina, podem afirmar que la inhibició es dona a nivell transcripcional, traduccional i funcional, ja que redueix l'expressió de mRNA, de proteïna al nucli i la unió al DNA. Dins la família dels C/EBPs l'efecte de la crisina és específic per a C/EBP δ , ja que no hi ha canvis en l'expressió nuclear de C/EBP α o en l'expressió nuclear, ni en la unió al DNA de C/EBP β . D'altra banda, tampoc s'observen canvis en l'expressió nuclear ni en la funcionalitat de NF- κ B/p65, un dels factors de transcripció més importants en la regulació de gens proinflamatoris (O'Neill i Kaltschmidt, 1997).

La reducció dels nivells de C/EBP β o C/EBP δ inhibeix l'activació microglial i la neurotoxicitat associada. Com s'ha comentat prèviament, donat que diversos gens proinflamatoris tenen als seus promotors llocs d'unió per a C/EBPs, és esperable que la inhibició dels C/EBPs disminueixi l'expressió d'aquests gens. La magnitud de la baixada d'expressió dependrà de la importància que tingui cada C/EBP en la regulació de cada gen. A més, pot haver-hi mecanismes compensatoris pels quals altres membres de la família dels C/EBPs o altres factors de transcripció implicats en la

regulació dels gens proinflamatoris compensin la manca de C/EBP β o C/EBP δ . Al inhibir C/EBP δ amb crisina s'observa una disminució en l'expressió d'iNOS i en la producció de NO que es manté al llarg del temps. També es produeix una baixada en la producció de TNF- α a les primeres hores posttractament, però aquest efecte es perd al llarg del temps. Aquests resultats semblen indicar que en la resposta inicial de la micròglia el C/EBP δ té una gran importància, regulant la producció de NO i TNF- α , mentre que en etapes més tardanes manté la regulació sobre la iNOS però no sobre el TNF- α . Pel que fa a la COX-2, al inhibir C/EBP δ amb crisina no s'observa una disminució en l'expressió de COX-2. Es coneix que el C/EBP β està implicat en la resposta de COX-2 al LPS (Wadleigh i cols. 2000) però no hi ha consens sobre el paper de C/EBP δ . Mentre que alguns autors defensen que el C/EBP δ és important tant per a l'expressió basal com induïda pel LPS, altres autors afirmen que és el C/EBP β el que fa augmentar l'expressió de la COX-2 en resposta al LPS, i el C/EBP δ té un paper en el manteniment de l'expressió (Wadleigh i cols. 2000; Caivano i cols. 2001). El nostre grup ha descrit que el C/EBP δ s'uneix al promotor del gen de la COX-2 en resposta al LPS però no en condicions basals (Ejarque-Ortiz i cols. 2010). El fet que en disminuir l'expressió de C/EBP δ seguim observant un augment de COX-2 en resposta a LPS/IFN- γ podria ser degut a què sigui el C/EBP β qui s'uneixi al promotor de la COX-2 activant-ne la transcripció en resposta al tractament.

La manca tant de C/EBP β com de C/EBP δ indueix neuroprotecció als cocultius de neurona i micròglia tractats amb LPS/IFN- γ . Al nostre model el NO és un dels principals mediadors de neurotoxicitat. Els nostres resultats demostren que la inhibició de la producció de NO inhibeix totalment la neurotoxicitat del LPS/IFN- γ , mentre que la inhibició conjunta de TNF- α , COX-2 i IL-6 que es produeix al tractar amb IL-10 no té efecte neuroprotector. La reducció dels nivells de C/EBP β i C/EBP δ indueix una baixada en la producció de NO, i en conseqüència una baixada en la formació de peroxinitrit. La disminució d'aquests dos factors és el mecanisme més plausible per explicar la neuroprotecció observada en absència dels C/EBPs.

Com ja he comentat a l'inici d'aquesta discussió, la inhibició de l'activació microglial també es pot assolir potenciant les senyals inhibidores que actuen com a fre de la resposta de la micròglia. El sistema de senyalització lligand-receptor CD200-CD200R és un d'aquests mecanismes inhibidors, si bé hi ha pocs estudis sobre la funció d'aquest sistema de senyalització al SNC. Es coneix que el CD200 s'expressa

majoritàriament a neurones mentre que CD200R s'expressa a les cèl·lules de la micròglia (Hoek i cols. 2000; Wright i cols. 2000, 2001). Aquestes molècules s'expressen en condicions basals, però la seva expressió es pot modular en resposta a alguns estímuls anti o proinflamatoris (Lyons i cols. 2007; Chen i cols. 2009; Masocha, 2009). Mitjançant aquesta senyalització l'organisme pot evitar que la micròglia s'activi en resposta a estímuls que podrien ser interpretats per la micròglia com a perill quan en realitat no ho són, i també inhibir una sobreactivació de la micròglia que pugui tenir efectes perniciosos. Un exemple d'aquests estímuls seria la mort neuronal. La micròglia reconeix les neurones que estan morint, ja sigui per apoptosi o per necrosi. Davant d'una neurona apoptòtica la micròglia respon activant-se per fagocitar-la sense induir una resposta inflamatòria, en canvi, si la neurona experimenta mort per necrosi, s'alliberen diversos continguts extracel·lulars al medi que la micròglia reconeix com estranys, activant-se amb un fenotip proinflamatori (revisat a Rock i Kono, 2008). Rosenblum i cols. (2004) van descriure que en cèl·lules dendrítiques apoptòtiques augmentava l'expressió de CD200, però no hi ha treballs al SNC sobre l'efecte de la mort, apoptòtica o necròtica, sobre l'expressió de CD200. Nosaltres demostrem per primera vegada que en resposta als dos tipus de mort s'observa un augment en l'expressió de CD200, el que indicaria la presència d'estímuls inhibidors per a la micròglia en els dos tipus de mort neuronal, per impedir que la resposta desencadenada sigui exacerbada. La diferent resposta microglial observada en funció del tipus de mort dependria doncs d'altres senyals neuronals.

És coneix poc sobre la regulació de CD200 i CD200R, però donat que aquestes proteïnes regulen la resposta inflamatòria de la micròglia, esperariem que estímuls pro o antiinflamatoris que modulen l'activació de la micròglia regulessin també CD200 i CD200R. Els nostres resultats mostren una manca d'efecte d'ambdós tipus d'estímuls sobre l'expressió de CD200, el que ens porta a pensar que l'efecte d'aquests estímuls es doni sobre CD200R, present a les cèl·lules microglials, que expressen majors concentracions de receptors de ILs, receptors de IFN- γ i TLR. Així, el que modularien aquests estímuls seria l'expressió de CD200R i no la de CD200; estudis preliminars del nostre grup així semblen indicar-ho. Seria d'esperar que la modulació d'aquest receptor, incrementant la senyalització amb agonistes inhibís l'activació microglial i la neurotoxicitat que se'n deriva. Els nostres resultats mostren que el pèptid utilitzat com agonista pel receptor CD200R no inhibeix la producció de NO ni efecte neurotòxic de la micròglia activada. Cal tenir en compte que per activar CD200R, donada la manca d'un agonista comercial, vam sintetitzar un pèptid que segons un treball de Gorczynski i cols. (2008) actua com a agonista de CD200R. Al no disposar d'un control positiu no podem assegurar que en el nostre model aquest pèptid actuï com a agonista de

CD200R. Per tant no podem afirmar que els nostres resultats descartin un efecte neuroprotector de l'activació de CD200R. De fet, alguns autors han mostrat la importància de la senyalització CD200-CD200R en processos neuropatològics on l'activació microglial té un paper pernicios. El bloqueig d'aquesta senyalització s'associa a un empitjorament de la simptomatologia mentre que en activar la senyalització s'obtenen efectes beneficiosos (Hoek i cols. 2000; Wright i cols. 2000; Meuth i cols. 2008; Liu i cols.2010).

En resum, en aquesta tesi es presenta un model *in vitro* de neuroinflamació, on s'indueix neurotoxicitat mitjançant activació microglial amb un estímul proinflamatori, i es proposen dues estratègies per tractar d'inhibir aquesta activació microglial neurotòxica. En una fase inicial, es caracteritza el model de neurotoxicitat, identificant els principals mediadors de l'efecte. Seguidament, es mostra per primera vegada que l'efecte antiinflamatori de la crisina sobre la micròglia comporta propietats neuroprotectores, i que aquests efectes estan mediat, si més no en part, per la inhibició de C/EBP δ . També es presenten dades que demostren la importància dels C/EBPs en la regulació de l'activació microglial i l'efecte neurotòxic d'aquesta activació. En conjunt, aquests resultats permeten postular els C/EBPs com a dianes terapèutiques addicionals en patologies neurodegeneratives. D'altra banda s'estudien els efectes de diferents estímuls sobre l'expressió de CD200. Mentre que estímuls pro o antiinflamatoris no semblen regular directament CD200, la mort neuronal, tant apoptòtica com necròtica, n'incrementa l'expressió. Aquest resultat suggereix que CD200 juga un paper en la comunicació entre la micròglia i les neurones que han entrat en un procés de mort cel·lular.

Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi es proposa el model experimental il·lustrat a la figura 64. El tractament amb LPS/IFN- γ indueix a la micròglia l'activació de C/EBP β i C/EBP δ , que formen homodímers o heterodímers i s'uneixen al promotor dels gens diana, com iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β i TNF- α , activant-ne la transcripció. L'activació d'aquests gens indueix l'alliberació de citocines proinflamatòries, i la producció de NO. Quan aquests factors s'alliberen a concentracions elevades poden induir neurotoxicitat. L'efecte neurotòxic al nostre model està principalment mediat pel NO que és neurotòxic *per se* a altes concentracions, però que també pot combinar-se amb l'ió superòxid formant peroxinitrit (ONOO-), una espècie reactiva d'oxigen altament tòxica per a les neurones. La disminució dels nivells d'expressió de C/EBP β o C/EBP δ en cocultius de neurones i micròglia (ja sigui perquè la micròglia és deficient

en aquests factors, o pel tractament amb crisina) inhibeix parcialment la resposta inflammatòria de la micròglia, induint neuroprotecció. Per altra banda, la senyalització CD200-CD200R inhibeix la resposta inflammatòria microglial. En condicions basals CD200 s'expressa a les neurones. Els nostres resultats mostren que la mort neuronal, tant apoptòtica com necròtica, incrementa els nivells de CD200 a les neurones, actuant com un mecanisme de control en l'activació microglial induïda per mort neuronal.

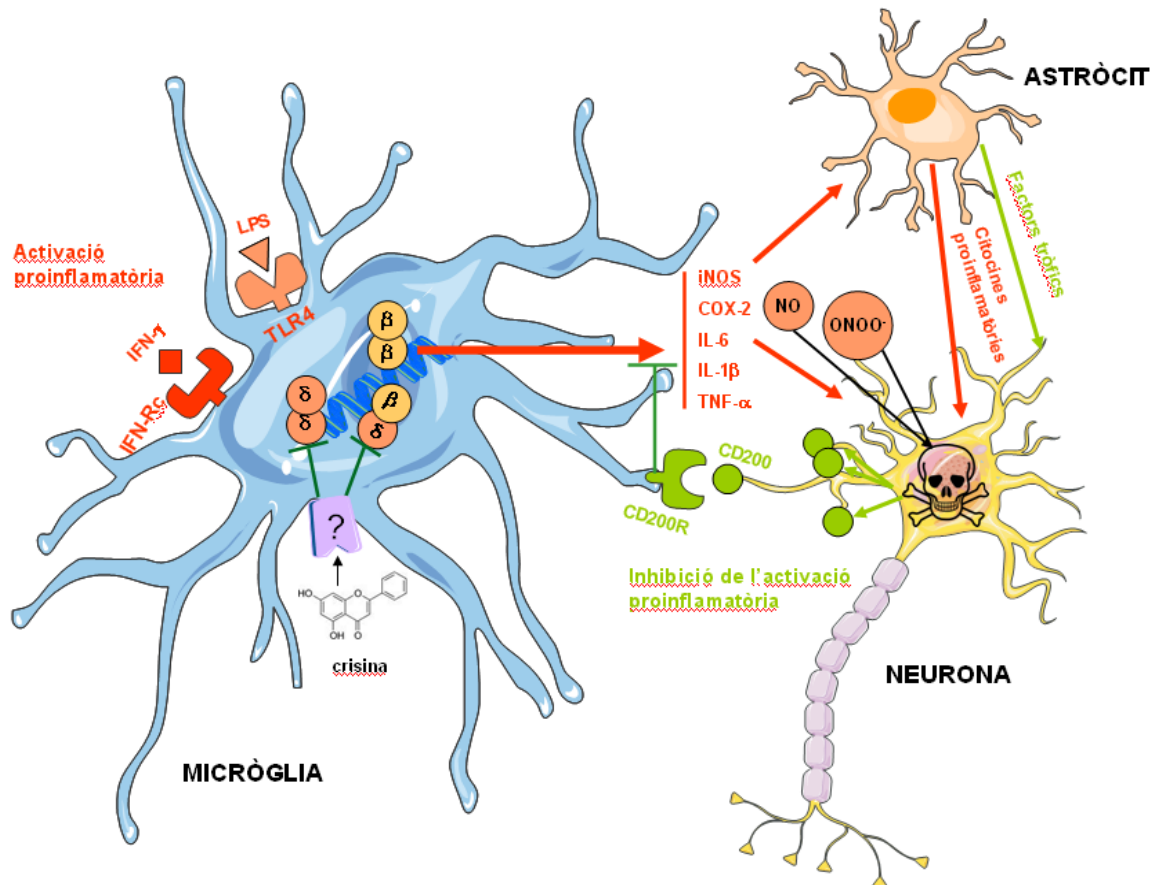


Figura 64. Model proposat

6. CONCLUSIONS

1. La micròglia estimulada amb LPS/IFN- γ s'activa amb un patró de resposta proinflamatori que es caracteritza per un increment en l'expressió dels enzims iNOS i COX-2 i en la producció de NO, TNF- α i IL-6.
2. En cocultius de neurona i micròglia l'activació de les cèl·lules microglijals en resposta al tractament amb LPS/IFN- γ té efecte neurotòxic. La producció de NO és un dels principals mediadors d'aquest efecte, mentre que el TNF- α , la IL-6 i la COX-2 tenen un paper secundari.
3. La crisina té un efecte antiinflamatori i neuroprotector. El seu efecte està mediat, si més no en part, per la inhibició de C/EBP δ .
4. L'absència de C/EBP β o C/EBP δ inhibeix l'activació microglial i la neurotoxicitat associada. Els C/EBPs per tant són una possible diana terapèutica addicional per al tractament de patologies que cursen amb neuroinflamació.
5. L'expressió de CD200 augmenta en neurones que estan morint, ja sigui per apoptosi com per necrosi, constituint un mecanisme de control de l'activació microglial en presència de mort neuronal. No podem descartar que l'efecte observat sigui degut a què CD200 sigui més estable que altres proteïnes neuronals.
6. Les neurones apoptòtiques però no les necròtiques indueixen mort a la micròglia. Aquest efecte és independent de CD200 i està mediat, si més no en part, per un factor soluble.
7. L'expressió proteica de CD200 a neurones no es modula per estímuls antiinflamatoris com la IL-4 i la IL-10 ni proinflamatoris com el LPS i l'IFN- γ .

Els resultats d'aquesta tesi mostren la utilitat dels models experimentals *in vitro* per estudiar la resposta inflamatòria de la micròglia i la neurotoxicitat resultant. Amb aquests models hem pogut establir la importància de la família de factors de transcripció C/EBPs en la regulació de la resposta inflamatòria microglial i els assenyalen com a possible diana a tenir en compte en les malalties neurodegeneratives. A més s'ha caracteritzat la resposta de CD200 a diversos estímuls mostrant que, mentre que els estímuls inflamatoris no regulen CD200 de

forma directa, la mort neuronal sí regula la seva expressió. Aquest resultat permet suggerir la rellevància de CD200 en la comunicació entre la micròglia i les neurones que han entrat en un procés de mort cel·lular.

7. BIBLIOGRAFIA

A

Abbott NJ, Ronnback L and Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* (2006)7:41-53.

Aderem A. Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* (2003)187 Suppl: S340-5.

Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M et al. Effects of rofecoxib or naxopren vs placebo on Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* (2003)289:2819-26.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout life. *Nat Neurosci* (2007)10:1538-43.

Akira S. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* (1997)29:1401-18.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* (2000)21:383-421.

Allan SM and Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* (2001)2:734-44.

Allan SM and Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci* (2003)358:1669-77.

Allen NJ and Barres BA. Glia - more than just brain glue. *Nature* (2009)457:675-7.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* (1995)15:961-73.

Andreeva N, Ungethüm U, Heldt J, Marschhausen G, Altmann TH et al. Elevated potassium enhances glutamate vulnerability of dopaminergic neurons developing in mesencephalic cell cultures. *Exp Neurol* (1996)137:255-62.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP and Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* (1999)22:208-15.

B

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* (2004)16:42-7.

Bal-Price, Matthias A and Brown GC. Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem* (2002)80:73-80.

Bano D and Nicotera P. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* (2007)38:674-6.

Barclay AN, Wright GJ, Brooke G and Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* (2002)23:285-90.

Basu S, Binder RJ, Suto R and Anderson KM. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int Immunol* (2000)12:1539-46.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* (1997)385:640-4.

Bertram L, Lill CM and Tanzi RE. The genetics of Alzheimer Disease: back to the future. *Neuron* (2010)68:270-81.

Bessis A, Béchade C, Bernard D and Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* (2007)55: 233-8.

Bhaskar K, Koneth M, Kokiro-Cochran ON, Cardona A and Ransohoff RM. Regulation of Tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* (2010)68:19-31.

Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D et al. A role for P2x in microglia proliferation. *J Neurochem* (2006)99:745–758.

Biber K, Neumann H, Inoue K and Boddeke H. Neuronal "On" and "Off" signals control microglia. *Trends Neurosci* (2007)30:596-602.

Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry HV et al. Interleukin-1 beta-induced changes in blood brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient and cerebral blood flow in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci* (2000)20:8153-9.

Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R and Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* (1990)27:229-37.

Block ML and Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* (2005)76:77-98.

Block ML, Zecca L and Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* (2007)8:57-69.

Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB and Conlon PJ. The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol*.(2000) 165:397-403.

Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger C, Coperland NG, Jenkins NA et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* (2006)312:1389-92.

Boissonneault V, Filali M, Lessard M, Relton J, Wong G et al. Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* (2009)132:1078-92.

Böttner M, Krieglstein K and Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* (2000)75:2227-40.

Boudakov I, Liu J, Fan N, Gulay P, Wong K et al. Mice lacking CD200R1 show absence of suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and mixed leukocyte culture responses by CD200. *Transplantation* (2007)84:251-7.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* (2003)24:197-211.

Bradl M and Lassmann H. Oligodendocytes: biology and pathology. *Acta Neurophatol.* (2010)119:37-53.

Bradley MN, Zhou L and Smale ST. C/EBP β regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol Cell Biol* (2003)23:4841-58.

Brendesen DE, Rammohan VR and Melhen P. Cell death in the nervous system. *Nature* (2006)443:796-802.

Bromberg J and Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* (2000)19:2468-73.

Brooke SM, Bliss TM, Franklin LR and Sapolsky RM. Quantification of neuron survival in monolayer cultures using an enzyme-linked immunosorbent assay approach rather than by cell counting. *Neurosci Lett* (1999)267:21-4.

Brown GC and Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate and mitochondria. *Mol Neurobiol* (2003)3:325-55.

Brown GC and Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglia killing of neurons. *Mol Neurobiol* (2010)41:242-7.

Butovsky O, Talpalar AE, Been-Yaakov K and Schwartz M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas INF-gamma and IL-4-render them protective. *Mol Cell Neurosci* (2005)29:381-93.

Butt AM. Structure and function of oligodendrocytes. In: Kettenmann H and Ransom BR, eds. *Neuroglia*. Oxford: Oxford University Press; 2005.36-47.

Byun JS, Lee SH, Jeon SH, Kwon YS, Lee HJ et al. Kainic acid-induced neuronal death is attenuated by aminoguanidine but aggravated by L-NAME in mouse hippocampus. *Korean J Physiol Pharmacol* (2009)13:265-71.

C

Caivano M, Gorgoni B, Cohen P and Poli V. The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein β (C/EBP β) and C/EBP δ transcription factors. *J Biol Chem* (2001)276:48693-701.

Cardinaux JR, Allaman I and Magistretti PJ Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes. *Glia* (2000)29:91-7.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* (2006)9:917-24.

Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM et al. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics* (2007)4:571-9.

Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG and Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* (1998)22:72-85.

Chan WY, Kohsaka S and Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia- New concepts. *Brain Res Rev.* (2007)53:344-54.

Chang RCC, Hudson PM, Wilson BC, Liu B, Abel H et al. High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia-neuron mixed cultures. *Neuroscience* (2000)97:757-64.

Chang JY and Liu LZ. Catecholamines inhibit microglial nitric oxide production. *Brain Res Bull* (2000)52:525-530.

Chao CC, Hu S, Ehrlich L and Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun* (1995)9:355-65.

Chapman GA, Moores K, Harrison D, Campbell CA, Stewart BR et al. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitatory brain damage. *J Neurosci* (2000)20:RC87.

Chen Z, Chen DX, Kai Y, Khatri I, Lamptey B et al. Identification of and expressed truncated form of CD200, CD200_{tr}, which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression. *Transplantation* (2008)86:1116-24.

Chen G and Goedde DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* (2002)296:1634-5.

Chen Z, Marsden PA and Gorczynski RM. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Mol Immunol* (2009)46:1951-63.

Chen CJ, Raung SL, Liao SL and Chen SY. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Biochem Pharmacol* (2004)67:957-65.

Chen HM, Wang L and D'Mello SR. A chemical compound commonly used to inhibit PKR, {8-(imidazol-4-ylmethylene)-6H-azolindino[5,4-g]benzothiazol-7-one}, protects neurons by inhibiting cyclin-dependent kinase. *Eur J Neurosci* (2008)28:2003-16.

Chitnis T, Imitola J, Wang Y, Elyaman W, Chawla P et al. Elevated neuronal expression of CD200 protects Wld^s mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *Am J Pathol* (2007)5:1695-712.

Cho H, Yun CW, Park WK, Kong JY, Kim Ks et al. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res* (2004)49:37-43.

Choi SH, Aid S and Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci* (2009)30:174-81.

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* (2005)120:421-33.

Chung EY, Kim SJ and Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* (2006)16:154-61.

Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Bazan G, Palacios Pelaez R et al. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signalling. *J Neurosci Res* (2002)70:462-73.

Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* (2003)3:445-53.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS and Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes:long-range glial signalling. *Science* (1990)247:470-3.

Cortes-Canteli, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A et al. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* (2008)121:1224-34.

Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI et al. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* (2006)60:22-31.

D

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* (2005)8:752-8.

Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, Chen TT, Tchao NK et al. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J Immunol* (2003)171:594-9.

Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J and Schulz JB. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem* (2000)74:2213-6.

De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G et al. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* (2007)130:1083-94.

De Simone R, Ajmone-Cat MA and Minguetti L. Atypical antiinflammatory activation of microglia induced by apoptotic neurons. *Mol Neurol* (2004)29:197-212.

Del Rio-Ortega P. La microglia en estado normal. *Bol Soc Esp Biol* (1919)9:68-120.

Del Rio-Hortega P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *Mem. Real Soc Esp Hist Nat* (1928)14:5-122.

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T and Calissano P. Induction of apoptosis in cerebelar granule neurones by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993)90:10989-93.

E

Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Pérez-Gonzalez AP, Serratosa J and Saura J Up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein β in activated astrocytes and microglia. *Glia* (2007a)55:178–88.

Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J and Saura J CCAAT/enhancer binding protein- α is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial cells. *J Neurosci Res* (2007b)85:985–93.

Ejarque-Ortiz A, Gresa-Arribas N, Straccia M, Mancera P, Solà C., Tusell JM, Serratosa J and Saura J CCAAT/enhancer binding protein delta in microglial activation. *J Neurosci Res* (2010)88:1113–23.

F

Farber K, Pannasch U and Kettenmann H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci* (2005)29:128-38.

Farfara D, Lifshitz V and Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* (2008)12:762-80.

Farina C, Aloisi F and Meinl E. Astrocytes are active players in the cerebral innate immunity. *Trends Immunol* (2007)28:138-45.

Farooqui AA. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* (2007)101:577-99.

Foley LM, Hitchens TK, Melick JA, Bayir H, Ho C et al. Effect of inducible nitric oxide synthase on cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* (2008)25:299-310.

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF and Sedgwick JD. 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* (1995)154:4309-21.

Foster SL, Hargreaves DC, and Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* (2007)447:972-978.

Frandsen A and Schousboe A. Development of excitatory aminoacid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci* (1990)8:209-16.

Franklin A and Stella N. Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB₂ and abnormal-cannabinoid-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol* (2003)474:195-8.

Fuhrmann M, Bittner T, Jung CKE, Burgold S, Page RM et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neurosci* (2010)13:411-3.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology and paths to treatment. *Gens Dev* (2007)21:2683-710.

G

Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F and Levi G. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Prot Natl Acad Sci USA*. (1982)79:7919-23.

Ganter S, Northoff H, Mannel D and Gebicke-Harter PJ. Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* (1992)33:218–230.

Gao HM, Liu B, Zhang W and Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends pharmacol Sci* (2003)24:395-401.

Gehrmann J and Banati RB. Microglial turnover in the injured CNS: activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* (1995)54:680-8.

Gibbons HM and Dragunow M. Microglia induce neuronal cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res* (2006)1084:1-15

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (2010)330:841-5.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC and Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* (2010)140:918-34.

Golpon HA, Fadok VA, Taraseviciene-Steward L, Scerbavicius R, Sauer C et al. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *FASEB J* (2004)18:1716-8.

Gorczyński R, Boudakov and Khatri I. Peptides of CD200 modulate LPS-induced TNF- α induction and mortality in vitro. *J Surg Res* (2008)145:87-96.

Gou-Fabregas M, Garcera A, Mincheva S, Perez-Garcia MJ, Comella JX et al. Specific vulnerability of mouse spinal cord motoneurons to membrane depolarization. *J Neurochem* (2009)110:1842-54.

Gowing G, Dequen F, Soucy G and Julien JP. Absence of tumor necrosis factor- α does not affect motor neuron disease caused by superoxid dismutase 1 mutations. *J Neurosci* (2006)26:11397-402.

Graeber MB and Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* (2010)119:89-105.

Grathwohl SA, Kalin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G et al. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci* (2009)12:1361-3.

Griffiths MR, Gasque P and Neal JW. The multiple roles of innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J Neurophatol Exp Neurol* (2009)68:217-26.

Grilli M, Zappettini S, Zanardi A, Lagomarsino F, Pittaluga A et al. Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the pre-synaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus. *J Neurochem* (2009)110:1598-606.

H

Ha SK, Moon E and Kim SY. Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. *Neurosci Lett* (2010)485:143-7.

Haas AH, Boddeke H and Biber K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* (2008)56:888-94.

Hagino Y, Kariura Y, Manago Y, Amano T, Wang B et al. Heterogenicity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured microglia. *Glia* (2004)47:68-77.

Hamilton NB and Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* (2010)11:227-38.

Hanisch UK. Effects of interleukin-2 and interferon on the nervous system. In: Ader R, Felteb DL, Cohen N, eds. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press. (2001)585-631.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* (2002)40:140-55.

Hanisch UK and Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. (2007)10:1387-94.

Hara MR and Snyder SH. Cell signalling and neuronal death. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* (2007)47:117-41.

Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC and Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* (2005)25:25–39.

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME et al. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* (2006)12:1512-9.

Herdegen T and Waetzig V. AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* (2001)20:2424-37.

Hirsch EC i Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* (2009)8:382-97.

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* (2000)290:1768-71.

Holopainen I and Kontro P. Uptake and release of glycine in cerebellar granule cells and astrocytes in primary culture: potassium-stimulated release from granule cells is calcium-dependent. *J Neurosci Res* (1989)24:374-83.

Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Aalkaitis MS, Deleo JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* (2008)107: 557-69.

Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T and Chen-Kiang S. Fos and Jun repress transcriptional activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* (1994)14:268-76.

Hu J, Roy SK, Shapiro PS, Rodig SR, Reddy SP et al. ERK1 and ERK2 activate CCAAT/enhancer-binding protein- β -dependent gene transcription in response to interferon- γ . *J Biol Chem* (2001)276:287-97.

Huynh ML, Fadok VA and Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* (2002)109:41-50.

I

Inanami O, Watanabe Y, Syuto B, Nakano M, Tsuji M et al. Oral administration of (-) catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free Radic Res* (1998)29:359-65.

In 'T Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, Van Duijn CM et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *New Engl J Med* (2001)345:1515-21.

J

Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Zurawski SM et al. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol* (2006)176:191-9.

John GR, Lee SC and Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* (2003)9:10-22.

John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M and Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* (2005)49:161-76.

K

Kaiser M, Maletzki I, Hülsmann S, Holtmann B, Schulz-Schaeffer W et al. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* (2006)99:900-12.

Kalvakolanu DV and Roy SK. CCAAT/enhancer binding proteins and interferon signaling pathways. *J Interferon Cytokine Res* (2005)25:757-69.

Kang J and Rivest S. MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biol* (2007)179:1219-30.

Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF et al. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* (2006)98:1718-31.

Kho JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LMT et al. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol* (1995)135:153-9.

Khoo BY, Chua SL and Balaram P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int J Mol Sci* (2010)11:2188-99.

Kim SU and de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* (2005)81:302-13.

Kitazawa M, Yamasaki TR and LaFerla FM. Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann N Y Acad Sci* (2004)1035:85-103.

Klunemann HH, Ridha BH, Magy L, Wherrett JR, Hemelsoet DM et al. The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia and cyst: DAP12 and TREM2. *Neurology* (2005)64:1502-7.

Knobloch SM, Alroy DA, Nikolaeva M, Cernak I, Stoica BA et al. Caspase inhibitor z-DEV-fmk attenuates calpain and necrotic cell death in vitro after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* (2004)24:1119-32.

Kohji T and Matsumoto Y. Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (2000)106:165-71.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K et al. UDP acting at P2Y₆ receptor is a mediator of microglial phagocytosis. *Science* (2007)446:1091-5.

Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* (2008)255 Suppl 6:2-6.

Kriegler M, Perez C, De Fay K, Albert I and Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* (1988)53:45-53.

Kuhlmann T, Bitsch A, Stadelmann C, Siebert H and Brück W. Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. *J Neurosci* (2001)21:3401-8.

Kuhn SA, van Landeghem FK, Zacharias R, Farber K, Rappert A et al. Microglia express GABA_B receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci* (2004)25:312-322.

L

Lawson LJ, Perry VH, Dri P and Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* (1990)39:151-70.

Ledeboer A, Brevé JJP, Poole S, Tilders FJH and Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* (2000)30:134-42.

Lee SC, Liu W, Brosnan CF and Dickson DW. GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* (1994)12:309–18.

Lee H, Kim YO, Kim SY, Noh HS, Kang SS et al. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *FASEB J* (2003)17:1943-4.

Lee S, Varvel NH, Konerth ME, Xu G, Cardona AE et al. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol* (2010)177:2549-62.

Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* (2010)58:253-63.

Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C et al. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. *J Neurosci Res* (2009)87:1185-94.

Levi G, Minghetti L and Aloisi F. Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions. *Biochimie* (1998)80: 899–904.

Levin JM, Reynolds R and Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in Neurosci* (2001) 24:39-47.

Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* (2001)166:7128:35.

Li Q and Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* (2002)2:725-34.

Li R, Strohmeyer E, Liang Z, Lue LF and Rogers J CCAAT/ enhancer binding protein delta (C/EBPd) expression and elevation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* (2004)25:991–9.

Li FQ, Wang T, Pei Z and Hong JS. Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalein attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons. *J Neural Transm* (2005)112:331-47.

Liang YC, Tsai SH, Tai DC, Lin-Shiau SY and Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-atticator receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* (2001)496:12-8.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Med* (1999)5:1403-9.

Lieb K, Engels S and Fiebich BL. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int* (2003)42:131-7.

Lin CM, Shyu KG, Wang BW, Chang H, Chen YH et al. Chrysin suppresses IL-6-induced angiogenesis via down-regulation of JAK1/STAT3 and VEGF: an in vitro and in ovo approach. *J Agric Food Chem* (2010)58:7082-7.

Ling EA and Wong WC. The origin and nature of ramified and ameboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* (1993)7:9-18.

Liu S, Croninger C, Arizmendi C, Harada-Shiba M, Ren J et al. Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBP β gene. *J Clin Invest* (1999)103:207-13.

Liu YW, Chen CC, Wang JM, Chang WC, Huang YC et al. Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel and c-Jun in LPS-induced C/EBP δ gene expression of mouse macrophages. *Cell Mol Life Sci* (2007)64:3282–94.

Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S and Fassbender K. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TKR2. *J Biol Chem* (2009)284:3691-9.

Liu Y, Bando Y, Vargas-Lowy D, Elyaman W, Khoury SJ et al. CD200R1 agonist attenuates mechanisms of chronic disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* (2010)30:2025-38.

Liu Z, Condello C, Schain A, Harb R and Grutzendler J. CXCR3 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β -phagocytosis. *J Neurosci* (2010)30:17091-101.

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. *Methods* (2001)25:402-8.

Lobsiger C and Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* (2007)10:1355-60.

López-Redondo F, Nakajima K, Honda S and Kohsaka S. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* (2000)76:429-35.

Lucas SM, Rothwell NJ and Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* (2006)147:S232-40.

Lucin KM and Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* (2009)64:110-22.

Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Prot Natl Acad Sci USA* (2002)99:12197-202.

Lyons A, Downer Ej, Crotty S, Nolan YM, Mills KH et al. CD200 ligand-receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. *J Neurosci* (2007a)27:8309-13.

Lyons A, Griffin RJ, Costelloe CE, Clarke RM and Lynch MA. IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro. *J Neurochem* (2007b)101:771-81.

Lyons A, McQuillan K, Deighan B, O'Reilly JA, Downer EJ et al. Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* (2009)23:1020-7.

M

MacEwan DJ. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* (2002)14:477-92.

Mack TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M et al. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci* (2001)4:1199-1206.

Maitra U, Singh N, Gan L, Ringwood L and Li L. IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. *J Biol Chem* (2009)284:35403-11.

Manach C, Scalabert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* (2004)79:727-47.

Martinez-Palma L, Pehar M, Cassina P, Peluffo H, Castellanos R et al. Involvement of nitric oxide on kainate-induced toxicity in oligodendrocyte precursors. *Neurotox Res* (2003)5:399-406.

Masocha W. Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *J Neuroimmunol* (2009)214:78-82.

Matyash V and Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* (2010)63:2-10.

May M and Ghosh S. Rel/NF- κ B/I κ B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* (1997)8:63-73.

Mayr B. and Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001)2:599–609.

McGeer PL and McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* (2002)26:459-70.

McGeer PL and McGeer EG. Inflammatory processes in Alzheimer disease. *Prog Neuropharmacol Biol Psychiatry* (2003)27:441-9.

McHugh P and Turina M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. *Surg Infect* (2006)7:53-68.

Medzhitov R and Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* (2009)9:692-703.

Meng Q, Raha A, Roy S, Hu J and Kalvakolanu DV. IFN- γ -stimulated transcriptional activation by IFN- γ -activated transcriptional element-binding factor 1 occurs via an inducible interaction with CCAAT/enhancer-binding protein- β . *J Immunol* (2005)174:6203-11.

Meuth SG, Simon OJ, Grim A, Melzer N, Herrmann AM et al. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol* (2008)194:62-9.

Migliore L and Coppede F. Genetics, environmental factors and emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* (2009)667:82-97.

Miller RH and Mi S. Dissecting demyelination. *Nat Neurosci.* (2007)10:1351-4.

Minas K and Liversidge J. Is the CD200/CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal? *Crit Rev Immunol* (2006)26:213-20.

Minghetti L and Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* (1998)54:99-125.

Moldrich RX, Giardina SF and Beart PM. Group II mGlu receptor agonists fail to protect against various neurotoxic insults induced in murine cortical, striatal and cerebellar granular pure neuronal cultures. *Neuropharmacol* (2001)41:19-31.

Moore KW, Waal Melefyt R, Coffman RL and O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol* (2001)19:683-765.

Mosser DM and Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* (2008)226:205-18.

Mott RT, Ait-Ghezala G, Town T, Mori T, Vendrame M et al. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia* (2004)46:369-79.

N

Nagatsu T and Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for the cytokines. *Curr Pharm Des* (2005)11:999-1016.

Nedergaard M. Direct signalling from astrocytes to neurons in culture of mammalian brain cells. *Science* (1994)369:1768-71.

Nerlov V. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol* (2008)20:180-5.

Ness JK, Valentino M, McIver SR and Goldberg MP. Identification of oligodendrocytes in experimental disease models. *Glia* (2005)50:321-8.

Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia* (2001)36:191-9.

Nguyen MD, Julien JP and Rivest S. Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Ann Neurol* (2001)50:630-9.

Nicotera P, Leist M and Manzo L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* (1999)20:46-51.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F and Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (2005)308:1314-8.

O

Ohnishi H, Yamada M, Kubota M, Hatanaka H and Sano S. Tyrosine phosphorylation and association of BIT with SHP-2 induced by neurotrophins. *J Neurochem* (1999)72:1402-8.

Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K et al. Involvement of P2X₄ and P2Y₁₂ receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* (2007)55:604-16.

Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi H, Tomizawa T et al. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol* (2005)174:2004-11.

O'Neill LA and Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* (1997)20:252-8.

Ovansesov MV, Ayhan Y, Wolbert C, Moldovan, Sauder C et al. Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infectin. *J Neuroinflammation* (2008)5:50-3.

P

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S et al. Dominant negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Gen* (2001)27:263-70.

Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, Braz MH and Chatterjee S. Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by MyD88-dependent pathway. *J Neuroinflammation* (2008)5:43-55.

Paloneva J, Autti R, Raininko J, Partanen O, Salonen M, et al. CNS manifestations of Nasu-Hakola disease: a frontal dementia with bone cysts. *Neurology* (2001)56:1552–1558.

Paloneva J, Manninen G, Christman K, Hovanes J, Mandelin R et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* (2002) 71:656–662.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S et al. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* (1994)369:744-7.

Paquin A, Barnabe-Heider F, Kageyama R and Miller FD. CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. *J Neurosci* (2005)25:10747-58.

Park KM and Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* (2010)22:977-83.

Park KW, Lee HG, Jin BK and Lee YB. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Exp Mol Med* (2007)39:812-9.

Pasinelli P and Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* (2006)7:710-23.

Pérez-Capote K, Saura J, Serratosa J and Solà C. Expression of C/EBPalpha and C/EPBbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci Lett* (2006)410:25-30.

Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* (2004)18:407-13.

Persson M, Bantefjord M, Hansson E and Rönnbäck L. Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF- α . *Glia* (2005)51:111-20.

Piccio L, Buonsanti C, Cella M, Tassi I, Schmidt RE et al. Identification of soluble TREM-2 in the cerebrospinal fluid and its association with multiple sclerosis and CNS inflammation. *Brain* (2008)131:3081-91.

Pocock JM and Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* (2007)30:527-35.

Polazzi E and Contestabile A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* (2002)13:221-42.

Polazzi E and Contestabile A. Neuron-conditioned media differentially affect the survival of activated or unstimulated microglia: evidence for neuronal control on apoptotic elimination of activated microglia. *J Neuropathol Exp Neurol* (2003)62:351-62.

Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* (1998)273:29279-82.

Q

Qian L, Block ML, Wei SJ, Lin CF, Reece J et al. Interleukin-10 protects lipopolysaccharide in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* (2006)319:44-52.

R

Ramji DP and Foka P. CCAAT/enhancer binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* (2002)365:561-75.

Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* (1911) Paris: Maloine.

Ransohoff RM and Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchima. *Nature* (2010)468:253-62.

Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DV, deLapeyriere O et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* (2002)35:1067-83.

Rock KL and Kono H. The inflammatory response to cell death. *Ann Rev Pathol* (2008)3:99-126.

Roodveldt C, Christodoulou J and Dobson CM. Immunological features of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Mol Med* (2008)12:1820-9.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P et al. Mutations in Cu/Zn superoxid dismutase gene are associated with familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* (1993)362:59-62.

Rosenblum KD, Olasz E, Woodliff JE, Johnson BD, Konkol MC et al. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* (2004)103:2691-8.

Rothwell NJ and Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* (2000)23:618-25.

Roy SK, Hu J, Meng Q, Xia Y, Shapiro P et al. MEKK1 plays a critical role activating the transcription factor C/EBP- β -dependent gene expression in response to IFN- γ . *Prot Natl Acad Sci USA* (2002)99:7945-50.

Roy SK, Wachira SJ, Wihua X, Hu and Kalvakolanu DV. CCAAT/enhancer-binding protein- β regulates interferon-induced transcription through a novel element. *J Biol Chem* (2000)275:12626-32.

Rubin LL. Neuronal cell death: when, why and how. *Br Med Bull* (1997)53:617-31.

S

Saha RN and Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antiox Redox Signal* (2006)8:929-47.

Salvesen GS and Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002)3:401-10.

Sastre M, Walter J and Gentelman SM. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* (2008)18:5-25.

Saura J, Tusell JM and Serratosa J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* (2003)44:183-9.

Schilling T and Eder C. A novel physiological mechanism of glycine-induced immunomodulation: Na⁺-coupled amino acid transporter currents in cultured brain macrophages. *J Physiol* (2004) 559:35-40.

Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW et al. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem* (2002)83:1309-20.

Schousboe A, Frandsen A and Drejer J. Evidence for evoked release of adenosine and glutamate from cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res* (1989)14:871-5.

Schrem H, Klempnauer J and Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev* (2004)56:291-330.

Schroder K, Sweet MJ and Hume DA. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* (2006)211:511-24.

Schroeter M and Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neuronal damage and repair. *Neuromolecular Med* (2005)7:183-95.

Schwartz M, Butovsky O, Brück W and Hanish UK. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* (2006)29:68-74.

Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J et al. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell Biol* (2009)29:6391-400.

Shear DA, Galani R, Hoffman SW and Stein DG. Progesterone protects against necrotic damage and behavioral abnormalities by traumatic brain injury. *Exp Neurol* (2002)178:59-67.

Silver J and Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev. Neurosci.* (2004)5:146-56.

Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* (2009)32:638-47.

Sofroniew MV and Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Act Neuropathol* (2010)119:7-35.

Solà C, Casal C, Tussell JM and Serratosa J. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci* (2002)16:1275-83.

Stefano L, Racchetti G, Bianco F, Passini N, Gupta RS et al. The surface-exposed chaperone, Hsp60, is an agonist of the microglial TREM2 receptor. *J Neurochem* (2009)110:284-94.

Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* (2002)40:122-9.

Streit WJ. Microglial cells. In: Kettenmann H and Ransom BR, eds. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press (2005)60-84.

Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? Trends Neurosci (2006)29:506-10.

Streit WJ, Braak H, Xue QS and Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol (2009)118:475-85.

Streit WJ, Walter SA and Penell NA. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol (1999)57:563-81.

Suk K, Lee H, Kang SS, Cho GJ and Choi WS. Flavonoid baicalein attenuates activation-induced cell death of brain microglia. J Pharmacol Exp Ther (2003)305:638-45.

Suzuki. Amyloid- β -protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells. Exp Cell Res (1997)234:507-11.

Svetelis A, Doyon G, Bernatchez G, Desilets A, Rivard N, Asselin C. IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun (2005)328:461-70.

T

Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O and Neumann H. TREM-2 Transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. PLOS medicine (2007)4:675-88.

Takahashi K, Rochford R and Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. J Exp Med (2005)201:647-57.

Tan J, Town T and Mullan M. CD45 inhibits CD40L-induced microglia activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. J Biol Chem (2000)275:37224-31.

Tansey MG, McCoy MK and Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* (2007)208:1-25.

Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B and Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nat Neurosci* (2001)4:813-8.

Taylor DL, Diemel LT and Pocock JM. Activation of microglial metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci* (2003)15:2150-60.

Taylor DL, Jones F, Kubota ES and Pocock JM. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor, mGlu2 triggers TNF- α -induced neurotoxicity in concert with microglial derived FasL. *J Neurosci* (2005)25:2952-64.

Thal DR, Schultz C, Dehgani F, Yamaguchi H et al. Amyloid beta-protein containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated A β deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* (2000)100:608-17.

Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* (1998)281:1312-6.

Tichauer J, Saud K, von Bernhardi R. Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* (2007)14:168-74.

Tobin PJ, Beale P, Noney L, Liddell S, Rivory LP et al. A pilot study on the safety combining chrysin, a non-absorbable inducer of UGT1A1m and irinotecan (CTP-11) to treat metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* (2006)57:309-16.

Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W et al. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* (2007)55:360-8.

Trika TM and Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* (2001)166:7527-33.

Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M et al. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* (2006)177:3520-4.

U

Underhill DM and Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol* (2002)20:825-52.

Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R and Julien JP. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neurosci* (2006)9:108-18.

V

Vafeiadou K, Vauzour D and Spencer JPE. Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* (2007)7:211-24.

Van der Heiden E, Bechoux N, Muller M, Sergent T, Schneider YJ et al. Food flavonoid aryl hydrocarbon receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays. *Anal Chim Acta* (2009)637:337-45.

Verma IM, Stevenson JK, Schwartz EM, Antwerp D and Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* (1995)9:2723-35.

Villagra A, Cheng F, Wang HW, Suarez I, Glozak M et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* (2009)10: 92-100.

W

Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S and Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* (2000) 275:6259-66.

Waetzig V and Herdegen T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett* (2004)361:64-7.

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S and Nabejura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* (2009)29:3974-80.

Wang DD and Bordey A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* (2008)86:342-67.

Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Ou HC, Kuo JS et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur J Neurosci* (2002)16:2103-12.

Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* (2007)150:963-76.

Williams A, Piaton G and Lubetzki C. Astrocytes- Friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* (2007)55:1300-12.

Witting A, Müller P, Herrmann A, Kettenmann H and Nolte C. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* (2000)75:1060-70.

Wolf F and Kirchhoff F. Imaging astrocyte activity. *Science* (2008)320:1597-9.

Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW and Kwon TK. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA binding activity. *FEBS Lett* (2005)579:705-11.

Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ et al. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* (2003)171:3034-46.

Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH and Barclay AN. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* (2001)102:173-9.

Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD et al. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* (2000)13:233-242.

Y

Yamada T, Tsuchiya T, Osada S, Nishihara T and Imagawa M CCAAT/enhancer binding-protein d gene expression is mediated by autoregulation through downstream binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* (1998)242:88–92.

Yamada K, Chun SJ, Boillée S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* (2008)3:251-3.

Yang L, Tanaka J, Zhang B, Sakanaka M and Maeda N. Astrocytes modulates nitric oxide production by microglial cells through secretion of serine and glycine. *Biochem Biophys Res Commun* (1998)251:277-82.

Yoon JH and Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med* (2005)46:585-96.

Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ et al. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* (2003)85:180-92.

Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA and Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Rad Biol Med* (2004)36:592-604.

Z

Zak DE, Hao H, Vadigepalli R, Miller GM, Ogunnaike BA et al. Systems analysis of circadian time-dependent neuronal epidermal growth factor receptor signaling. *Genome Biol* (2006)7:R48.

Zhang S, Qin C and Safe SH Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* (2003)111:1877-82.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* (2005)19:533-42.

Zhang L, Dawson VL and Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* (2006)109:33-41.

Zheng LT, Ock J, Kwon BM and Suk K. Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity. *Int Immunopharmacol* (2008)8:484-94.

Zhou J, Gurates B, Yang S, Sebastian S and Bulun SE. Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. *Cancer Res* (2001)61:2328-34.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* (2008)57:178–201.

Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C and Taupin V. Fractalkin modulates TNF- α secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* (2000)29:305-15.

Zujovic V, Schussler N, Jourdain D, Duverger D and Taupin V. In vivo neutralization of endogenous brain fractalkine increases hippocampal TNF α and 8-isoprostane production induced by intracerebro-ventricular injection of LPS. *J Neuroimmunol* (2001)115:135-43.

PLANES WEB

Plana web de Biocare medical. Arxiu: microglia

Disponible a: <http://biocare.net/antigen/iba1/>

Consultat el 11 de gener de 2011.

Plana web Cell biology. Arxiu: Cell senescence and apoptosis

Disponible a: [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail13.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail13.htm)

Consultat el 8 d'octubre de 2010.

Plana web Cosmo Bio Co. Ltd. Arxiu: full tècnic de l'anticòs GFAP.

Disponible a:

http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/antibodies/products_sml_20061213_3.asp?entry_id=4082

Consultat el 11 de gener de 2011.

Plana web Neurophilosophy. Arxiu: time-lapse movies of oligodendrocyte progenitor migration. Disponible a: <http://neurophilosophy.wordpress.com/?s=oligodendrocytes>

Consultat el 8 d'octubre de 2010.

Plana web PeprotechUS. Arxiu: ELISA and Western blot protocols. Disponible a: <http://www.peprotech.com/content/information.htm?id=68>

Consultat el 14 d'octubre de 2010.

Plana web Wikipedia. Arxiu: Oroxyllum indicum Blanco1.219.png.

Disponible a: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Oroxylum_indicum_Blanco1.219.png

Consultat el 7 d'octubre de 2010.