



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Implicació dels sistemes glutamatèrgic i
GABAèrgic en la mort per excitotoxicitat en
cultius de cèl·lules granulars de cerebel.
Alteracions d'aquests sistemes pel contaminant
orgànic persistent dieldrín.

Tesi doctoral presentada per
Zoila Babot i Riera
Barcelona, 2006

La interesada:
Zoila Babot i Riera

Vist-i-plau del tutor:

Dr. Jordi Alberch i Vié

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Vist-i-plau de la directora:

Dra. Cristina Suñol Esquirol

Departament de Neuroquímica

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

CSIC-IDIBAPS

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Neuroquímica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Institut d'Investigacions Biomèdiques Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Aquest treball ha estat realitzat amb l'ajut d'una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación y Ciencia entre els anys 2002 i 2005 i ha estat finançat pels projectes:

“Papel de los aminoácidos glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) en la toxicidad neuronal en cultivos primarios de células granulares de cerebelo” (FIS 01/1318)

“Desarrollo de sistemas in vitro alternativos al uso de animales en farmacología” (SAF2003-04930)

**Als pares
A en Xevi**

Quan surts per fer el viatge cap a Itaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls
ignoraven,
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben...

Ll: Konstandinos Kavafis (Grècia)
Versió catalana: Carles Riba
Adapt. de la v.c. per Lluís Llach

Agraïments

Amb aquestes línies voldria agrair a tota aquella gent que m'ha ajudat d'una manera l'altre en la realització d'aquesta tesi doctoral. Durant aquests quatre anys he pensat moltes vegades en aquesta pàgina, i és que el camí que avui condueix a la presentació d'aquesta tesi doctoral no l'he fet sola. Així, gràcies a tots als que avui no citaré però que he tingut presents en molt moments i especialment:

A la Cristina Suñol per haver-me dirigit aquesta tesi, per tot el que m'ha ensenyat i sobretot per haver-me fet confiança i haver-me ajudat a créixer.

A la Rosa Cristòfol, per totes les estones de microscopi, per haver-me "apadrinat" durant el DEA, per la seva sempre gran amabilitat i ajuda. A la Coral Sanfeliu pel seu ajut i a l'Eduard Rodríguez-Farré, perquè la seva passió per la neurotoxicologia s'encomana. A en Joan Serratosa, per la seva paciència i gran pedagogia, per totes les vegades que ha vingut a ajudar-nos amb el microscopi i per totes les explicacions sobre fluorescència i demés.

A en Jordi Alberch, per haver actuat de tutor de la tesi. A totes les "secres" que m'han fet la vida una mica més fàcil, sobretot en aquests últims mesos fatídics!

Als senyors del Departament de Neuroquímica, pels cops de mà, i per crear un bon ambient al departament. Especialment voldria agrair a en Paco Artigas per demostrar que ser un molt bon científic no està renyit en ser una persona propera que sempre ha tingut un moment per a mi en el seu despatx. I a l'Albert Adell, per haver-me donat la possibilitat de col·laborar amb ells aquests últims temps i contribuir així a conèixer una mica més lo complicat que és el cervell!

Als companys de laboratori, el que hi són i els que hi han estat: a l'Elena, per la benvinguda, a la Susana per l'aire fresc i renovat i pels tips de riure! A en Daniel, pel que he après d'ell i no només de ciència, i per saber escoltar-me i fer-me veure les coses des d'una altra perspectiva. I de manera molt especial, a la Iolanda, amb qui he tingut la sort de compartir-hi 4 anys d'amistat. Gràcies pels bons moments i també per aquells que no han estat tant bons i ens em fet costat. No hagués pogut demanar una companya de viatge millor que tu. Gràcies lol!

A les estudiants en pràctiques que han passat pel laboratori. A la Cesca. A en Ruben per la paciència que és la mare de la ciència! Gràcies per ajudar-me amb la meva relació amb els anticossos i ordenadors!

A la Leticia, per totes les vegades que ha aparegut amb la seva caixa de claus disposada a arreglar la HPLC, però sobretot, per a ser com ets. Per a haver actuat d'amiga, mare i consellera en tot moment, i per ser per a mi un referent de persona. Grazie mille!!

A l'Analia i la Ceci. Muchas gracias por estar las dos ahí en los momentos bajos, dando soluciones, etc. Gracias Ceci porqué no olvidaré que cuando se hacia de noche aún estabas ahí al lado, escuchando mis charlas en horrible español, el DEA en catalán, o lo que hiciera falta!!! Per ser dues grans amigues.

Als meus amiguets del laboratori veí: la Mercè, en Llorenç i la Noe, perquè sense ells això no hagués tingut res a veure. Per lo bé que ens ho hem passat, pels congressos, pels cursos, pels sopars, cervesetes, per taaaaantes coses que no acabaria i que com diria la Mercè "no procedeix". Perquè vosaltres heu estat molt importants, aquesta tesi us la dedico també a vosaltres (i a la lol!!)

A la "jovenalla" del departament de Neuroquímica i de Farmaco, pels congressos, cursos, sopars....pel bon ambient! I als del pis de dalt per les xerrades a la cantina.

To the people of the Molecular Cell Biology and Immunology Department of Amsterdam, specially to Charlotte Teunissen. Thanks Charlotte for teaching me, for the dinners and for the nice day at your home, dank je well! Y gracias también a la gente que me hizo sentir como en casa, gracias a Maria, Miriam, Marta, Juan, Nacho....por todos vienes tarde, paseos en bici, fiestas...Por acogerme tan calidamente en tan frío país!

A qui més ha conviscut amb mi tot aquest temps, la Mireia. Per ser una gran amiga i per tots els rolls que has aguantat sobre la tesi! Als amics de Girona, per ser-hi sempre. Per tots els caps de setmana, per la Calma, pels viatges, per quan m'heu trucat, per les correccions ortogràfiques, perquè tenir amics com vosaltres és una sort!

Als pares, per haver-me fet costat.

I finalment i de manera molt especial, a qui sense cap intenció ha viscut (i patit!) la tesi molt de prop. Gràcies Xevi per haver estat sempre al meu costat, inclòs quan ens separaven tants kilòmetres. Gràcies pel suport moral i el logístic, per la teva paciència, estima i optimisme.

ÍNDEX

1.-Introducció	1
1.1.- La transmissió de l'impuls nerviós	3
1.2.- La distribució de l'ió clorur	4
1.3.- La neurotransmissió per aminoàcids	7
1.3.1.- La neurotransmissió excitadora: sistema glutamatèrgic	7
1.3.2.- La neurotransmissió inhibidora: sistema GABAèrgic	15
1.4.- Excitotoxicitat	21
1.5.- Els plaguicides organoclorats i la neurotoxicitat	25
1.5.1.- El dieldrín	26
1.6.- Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel	33
2.- Objectius	37
3.- Materials i mètodes	39
3.1.- Materials	39
3.2.- Mètodes	40
3.2.1.- Cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí.....	40
3.2.2.- Cultius primaris de neurones corticals de ratolí	41
3.2.3.- Tractament dels cultius neuronals.....	41
3.2.4.- Determinació de la concentració de plaguicides organoclorats en el medi de cultiu.....	42
3.2.5.- Quantificació de glutamat i GABA alliberat	43
3.2.6.- Degradació enzimàtica de glutamat.....	43
3.2.7.- Quantificació del glutamat, aspartat i GABA present en els cultius.....	44
3.2.8.- Anàlisi de la viabilitat cel·lular	44
3.2.9.- Determinació de peroxidació lipídica	45
3.2.10.- Quantificació de proteïnes dels cultius cel·lulars.....	46
3.2.11.- Flux de clorur	46
3.2.12.- Captació de [³ H]aspartat	47
3.2.13.- Tècniques d'unió a receptors	47
3.2.14.- Mesura de la radioactivitat unida/captada en els cultius.....	48
3.2.15.- Determinació del calci intracel·lular.....	48
3.2.16.- Fotografies dels cultius exposats a alta concentració	

de potassi	49
3.2.17.- Immunocitoquímiques.....	49
3.2.18.- Anàlisi de dades	50
4.- Resultats	53
4.1.- Obtenció d'un model d'excitotoxicitat <i>in vitro</i> per alliberament de glutamat endogen.....	53
4.2.- Caracterització del model d'excitotoxicitat per exposició a alta $[K^+]_e$	59
4.3.- Concentracions baixes de glutamat causen mort per excitotoxicitat en condicions despolaritzants	61
4.4.- Relació entre l'homeòstasi de clorur, l'alliberament de glutamat i la mort excitotòxica	63
4.5.- La mort neuronal induïda per l'exposició a alta concentració de glutamat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, és dependent de receptors NMDA i GABA _A i de canals de Cl ⁻ sensibles a àcid niflúmic i a NPPB	67
4.6.- Importància de la neurotransmissió GABAèrgica en la mort excitotòxica.....	68
4.7.- Efecte de l'àcid kaínic sobre els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.....	70
4.8.- El plaguicida organoclorat dieldrín és altament persistent en medi de cultiu	74
4.9.- El dieldrín disminueix l'alliberament de glutamat i protegeix de neurotoxicitat produïda per alta $[K^+]_e$	75
4.10.- Tractaments perllongats amb una concentració subcitotòxica de dieldrín disminueixen l'alliberament de glutamat i protegeixen de la neurotoxicitat induïda per alta $[K^+]_e$	75
4.11.- L'exposició perllongada dels cultius primaris de cèl·lules granulars a dieldrín produeix canvis en els receptors NMDA.....	80
4.12.- L'efecte de l'exposició perllongada a dieldrín en la resposta a l'estímul excitotòxic és un efecte mediat inicialment pel bloqueig del receptor GABA _A	83
5.- Discussió	85
6.- Conclusions.....	99

7.- Treball Annex	101
7.1.- Introducció	101
7.1.1.- Els cultius primaris reagregats	101
7.2.- Objectius	102
7.3.- Metodologia	102
7.3.1.- Cultius primaris reagregats de cervell de rata	102
7.3.2.- Estudi de la viabilitat cel·lular amb el WST-1	103
7.3.3.- Homogeneïtzació dels cultius cel·lulars	103
7.3.4.- Quantificació de proteïnes	104
7.3.5.- Assaigs enzimàtics	104
7.3.6.- Immunohistoquímica contra GFAP	104
7.3.7.- Immunohistoquímica contra la proteïna bàsica de la mielina (MBP22)	105
7.4.- Resultats i discussió	105
7.4.1.- Utilització del WST-1 per a l'estudi de la viabilitat dels cultius primaris reagregats de cervell de rata	105
7.4.2.- Caracterització d'altres marcadors de toxicitat en cultius primaris reagregats de cervell de rata	108
7.4.3.- Toxicitat induïda per dieldrin	111
7.5.- Conclusions	114
8.- Bibliografia	115

ABREVIACIONS

AMPA	Àcid 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil)propionic
BSA	Albúmina de sèrum boví
CNPase	2', 3'-Nucleòtid cíclic 3'-Fosfodiesterasa
D-AP5	D-2-amino-5-fosfopentanoic
DDT	2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetà
DIDS	Àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic
DMSO	Dimetilsulfòxid
EAAT	Transportador d'aminoàcids excitadors
E_i	Potencial d'equilibri per a l'espècie iònica i
EPA	Agència de protecció mediambiental d'Estats Units d'Amèrica
GAD	Descarboxilasa de l'àcid glutàmic
GAT	Transportador de membrana de GABA
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
GPT	Glutamat-piruvat transaminasa
GS	Glutamina sintetasa
HBS	Solució salina tamponada amb HEPES
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
KA	Àcid kaínic
LDH	Lactat deshidrogenasa
L-tPDC	L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílic
MBP22	Proteïna bàsica de la mielina (clon 22)
MDMA	3,4-metilendioximetamfetamina (èxtasi)
NMDA	Àcid N-metil-D-aspàrtic
NPPB	Àcid 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoic
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
MTT	bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazoli

SEM	Error estàndar de la mitjana
TBOA	DL-treo- β -benziloxiaspartat
TBPS	<i>t</i> -butilbiciclofosforotinat
V_m	Potencial de membrana
VSOAC	Canal d'osmolits i anions estimulat per volum
WST-1	4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolij]-1,3-benzé