



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

IDIBAPS



RESPUESTA DE LAS CÉLULAS GLIALES AL DAÑO NEURONAL *IN VITRO*

Tesis doctoral presentada por
Kamil Pérez Capote
Barcelona, febrero 2006

La interesada:

KAMIL PÉREZ CAPOTE

Vº Bº del tutor:

Dr. JORDI ALBERCH I VIÉ

Profesor Titular de la Universidad

Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona, IDIBAPS

Vº Bº de los directores:

Dra. CARME SOLÀ SUBIRANA

Científico Titular del CSIC

Departamento de Farmacología y Toxicología

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona.

CSIC, IDIBAPS

Dr. JOAN SERRATOSA SERDÀ

Investigador Científico del CSIC

Departamento de Farmacología y Toxicología

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona.

CSIC, IDIBAPS



“El hombre, fuera de su patria, es como un árbol en la mar.”

“Prefiero ser yo extranjero en otras patrias, a serlo en la mía.”

José Martí

(patriota y escritor cubano, 1853-1895)

A mi *Aya*.
A *Elvys* y *Joan*.
Y en especial a mi madre, *Karelia*.

A ustedes, que han tenido que vivir esta historia en la distancia y que será la primera vez que no disfruten a mi lado de un logro tan importante en mi vida.

Hace seis años me emprendí en una aventura que de cierta manera no sabía como terminaría, y aquí estoy, sin poder dar crédito de que otra etapa de mi vida se está terminando. Muchos son los que de una manera u otra me han ayudado y apoyado durante la realización de esta tesis y quisiera aprovechar estas páginas para dejar plasmados mis más sinceros agradecimientos.

Quien diría que aquella primera sensación novata de respirar aire gélido al pisar tierras asturianas pasaría a ser tan entrañable como un cálido día de sol en el malecón de La Habana. Sin lugar a dudas mi primer tributo indiscutiblemente es para mis amigos asturianos. Para quienes cuando el viento no sopló a mi favor me apoyaron a izar velas en busca de otros mares, a pesar de que habrían preferido no dejarme marchar: Iván, Ingrid y Ángel, Mariloca, Marian y Kiko, Belén y José. Ojalá que durante estos años les haya demostrado cuánto significan para mí y lo importante que ha sido siempre saber que estaban al otro lado del teléfono. Gracias por todas las mini vacaciones que he pasado con ustedes en Asturias, escapando del estrés de la ciudad blaugrana.

Cuando toqué puerto en tierras catalanas nunca imaginé ser tan afortunada y encontrar a gente tan valiosa que me acogiera incondicionalmente con los brazos abiertos. A *José María* y sus hijas, *Delia* y *Nadia*, por vuestra amistad y por todo lo que me han ayudado en estos años para no perder el contacto con mi familia en Cuba.

A *Tere*, la brujaaaaaaa! Por abrirme las puertas al descubrimiento de grandes amigos, a la belleza de Cadaqués y a maravillosas veladas en el Rosebud: a David, Natalia, Keny, Montse, Sandra y Sergio, Cristina “La barbie”, Cristina y muy en especial al Jaumet.

A *Nuria* e *Iván*: *ey nois, que sous els millors “flat mates” i que m’ho passo molt bé amb vosaltres!!! Moltes gràcies per totes les nostres xerrades nocturnes, las birres estivals i els tintes d’hivern. De veritat, no sé què hauria sigut de mi sense vosaltres aquells mesos “chungos” després de l’accident d’esquí. Us mereixeu una medalla per la paciència que heu tingut per aguantar-me aquests últims mesos mentre escrivia la tesi.*

A *Eugenia*, no sabes cuanto agradezco que te hayas cruzado en mi camino. Gracias por ayudarme en cada momento a decidir que carga debía dejar o sacar de mi pesada mochila, por tus enseñanzas para la preparación de una entrevista, por ser el cojín donde he apoyado la cabeza en mis caídas, por tirarme de las orejas cuando me lo he merecido, por aceptar mi egocentrismo. Echaré de menos aparecerme en tu casa con una botella de vino y charlar hasta las tantas de lo que en verdad merece la pena en esta vida (al menos para nosotras) Me siento muy afortunada por haberte tenido como consejera en el recorrido final de este trayecto.

A *Victoria*, *Reiko*, *Caryl* y *Fred*, por todos los buenos momentos que hemos disfrutado juntos, por los consejos y por dejarme llorar en vuestros hombros cada vez que lo necesité. A *David* (Victoria’s boyfriend), *thank you so much for the perfect tour during my stay in LONDON.*

También quiero agradecer al Dr. Jordi Alberch por haber aceptado ser mi tutor cuando me trasladé desde Asturias y decidí continuar mi doctorado en la UB, por toda

la ayuda, los consejos y el apoyo que me ha brindado en los horribles trámites burocráticos que comportan una tesis. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona August Pi i Sunyer (IDIBAPS) por la oportunidad del disfrute de una beca predoctoral durante el período 2002-2005, así como a los diferentes proyectos de la Red Cien, del FIS y el SAF2001-2240 del MCYT, que han financiado la realización de esta tesis.

Quiero dejar constancia lo difícil que resulta para mí dejar el que ha sido mi hogar los últimos cinco años. A toda la familia del IIBB os agradezco la paciencia que habéis tenido para soportar a este *huracán caribeño*. Muchas gracias a todos de corazón de esta cubanita que les rompió sus esquemas y escandalizó con sus disfraces en carnaval. Y la verdad, es que no sé si me aguantarías por más tiempo.

Al personal de administración y gerencia: *Teresa Solans, Montse Roig, Juani y Amparo* por su interés y ayuda en trámites burocráticos. A las Señoras de la Limpieza, en especial a *Loli*, por su eficiente labor en el mantenimiento del material del laboratorio (por eso siempre me he fiado de los resultados) Al personal del estabulario, sobretodo a América Jiménez y a Carme Cleries, por cuidar tan bien de mis ratitas hasta el día del cultivo.

Al Departamento de Neuroquímica: *Roser, Paco, Albert, Emili, Teresa, Pau, Leti, Lupe* (por cierto, que cada día estás más joven!) y muy en especial a *Cristina* por haberle llevado a mi madre noticias mías en su viaje a Cuba. Y cómo no, a los amiguetes *Llorenç* (*cuándo nos casamos, mi amool?*), *Zoila, Iolanda, Merçè, Noe, Cecilia, Analía, Eli, Judith* y *Olga* por las cenas y los bailoteos en los congresos y demás eventos “extraescolares” (aún estoy fagocitando el entrecote de la cena del congreso de Lleida)

Al Departamento de Farmacología y Toxicología empezando por aquellos amiguetes de mi primera etapa: *Carles Justicia, Sergi Gassó, Jordi Sebastià, David Vilchez, Álvaro Cervera, Félix Gil, Bibiana Fríguls, Josep Moreno, Eduardo Romanos, Eduard Bustamante* (*Edu*, mil gracias por haber sobrellevado todos esos dolores de cabeza que te he dado por mi ignorancia en informática), *Sonia Alcázar* (aún he de ver el vídeo de tu boda) y *Carme Casal* (puff, que puedo decir, hemos sido muy buenas compañeras y amigas lo que hizo que el trabajo fuera muy fácil) A los Seniors a los que me aprecio y que me han aceptado plenamente tal y como soy: *Núria, Lluïsa* y *Rosa* por su cariño, cercanía y empatía con mi cubanía (*Rosa*, te agradezco que en tu viaje a Cuba dedicaras unos momentos a mi madre) A *Anna Planas*, por los momentos cercanos y sinceros que hemos tenido y que aprecio. A *Coral*, a quien le debo parte de mi nivel de catalán; me ha hecho sentir cómoda hablando en una lengua que no era la mía (no obstante, le agradezco su esfuerzo para hablarme en castellano sabiendo que le era menos cómodo) A *Valerie*, de quien valoro su filosofía de orden y responsabilidad a la hora de trabajar y que me ha ayudado siempre que lo he necesitado. A *Tomás*, una de las mejores y últimas adquisiciones de la familia FIT porque sin apenas conocerme me ha brindado su ayuda y apoyo como gran persona y profesional que es (¡Qué grande eres, Papá Noel!)

Quiero sobretodo agradecer a la alegría de la huerta, al **“Pharmacology Team 007”**: Aroa, Eugenia, Noelia, Jero, Silvia, Cristina, Laura, Fernando, Manel, Ester, Almudena (bueno, en realidad, somos más de 7) y a nuestra invitada especial Sue Mian Then, por todos nuestros domingos palomiteros, por las birras en el Michael Collins, por nuestra navidad juntos, por nuestras cenas, barbacoas y bailes, por nuestras tardes de cultura, por nuestros cafés y chocolates, por nuestros mediodías en el comedor del Clínico; y porque a pesar de mi mala leche siempre habéis estado ahí para aguantarme. Ey chicos, que ya hemos parido la tesis!! Sólo falta bautizarla con mucha, mucha, mucha birra y fiesta.

Sue, really a shame you must go back to Malaysia. I would like you were here to celebrate together my PhD degree. I enjoyed being your tourist guide in Barcelona as well as ours suppers, Nip/Tuck sessions at my place, New Year's Eve celebration at your place, our interesting conversations (even my English teacher believes that a Third level student cannot have the resources to serious conversations. Should I invite him for a coffee and make him change his mind?) and your wise advises. Thank you so much for everything. Hope we'll see again, but next time better on London, La Havana or Kuala Lumpur. Break a leg!!! (It's my lucky message to your thesis)

Merecen mención especial los integrantes de mi grupo **“Neurobiologia Cel-lular”**, por la paciencia, amistad, compañerismo y tolerancia que me han demostrado durante todos estos años. A los que están y a los que han estado: Sonia Barrón, Carme Casal, Sonia Alcázar, Eva Olmedo, Ana P. Pérez, Rubén Llinàs, Mar Borregan, Olga Collazo, Manel García, Aroa Ejarque, Josep Saura, Pep Tusell.

A Jou, por su humildad como persona, siempre dispuesto a dar un consejo en lo personal y profesional. A Pep, por ser tan sincero y buscarle el doble sentido a las cosas como a mí me gusta (a ver si algún día sigo tu consejo, me dulcifico y hay boda. Que sepas que si lo consigo serás uno de mis padrinos y tendrás que ponerte **“guapo superplus”** y pisar una iglesia!) A Aroa, ¿me guardas un secreto? Ya me esforcé para que la lectura de mi tesis fuera después de que volvieras del país de los gringos. ¿Cómo iba a dejar que te perdieras este momento histórico?, zagalaaaa!!! He trabajado muy a gusto contigo y seguiremos en contacto amigueta..... y a ver cuando llega esa boda!!!

Y por último y no por ello menos importantes, a mis dos directores de tesis: Dra. Carme Solà y Dr. Joan Serratosa, quienes me descubrieron el mundo de las células gliales y a quienes dejo exhaustos y con los ordenadores contaminados por el virus letal **Kamilitis**.

A **Carme**, con quien he aprendido muchas cosas durante mis años de tesis. A pesar de nuestras diferentes maneras de ser (yo huracán y ella la calma) hemos trabajado codo con codo compartiendo buenos y duros momentos. No ha sido un camino fácil pero el resultado ha merecido la pena. Espero que su próxima becaria/o no sea tan torbellino como lo he sido yo. Le agradezco la meticulosidad y rigurosidad que me ha inculcado a la hora de hacer ciencia (En el futuro trataré de seguir su consejo haciendo el esquema antes de pasar a la acción) Hemos estado tan compenetradas en este último año que nos

pusimos de acuerdo para accidentarnos (por cierto, no dejes a tu próxima becaria/o ir a esquiar ni jugar básquet)

A **Joan**, por ser una de las mejores personas que he conocido. Te he de agradecer algo y ya no sólo por mí, también por mi madre, gracias por tu visita a Cuba y por aquella tarde en que le hiciste saber que no debía preocuparse por mí, que yo estaba bien y salía adelante. La verdad es que más que un jefe, siento que ha sido un padre para mí. Sin su apoyo, su respeto, su afecto y su fe en mí no hubiera podido acabar esta tesis y llegar a este momento. También quiero extender este agradecimiento a Margarita, su mujer, por su apoyo en los duros y difíciles momentos que atravesé después de mi accidente. En cuanto a lo profesional he aprendido a su lado la responsabilidad, el rigor y la honestidad a la hora de hacer las cosas, lo cual me ha sido también muy útil en lo personal. ¡Lo que nunca se hubiera imaginado es que tendría que enseñar a su becaria a subir y bajar escaleras con muletas: Hasta eso aprendí de ti!

Mami, gracias por contener las lágrimas aquel domingo 24 de octubre de 1999 y no impedirme caminar por los senderos de la superación. ¡Cuánto te he abrazado en mi corazón durante estos años para no claudicar ante los momentos difíciles! Nunca dudes que todo lo que he hecho ha estado marcado por la fuerza de tu amor incondicional y te puedes sentir orgullosa de mí.

ABREVIACIONES

ABREVIACIONES

A β : péptido β -amiloide

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

Apaf-1: factor 1 activador de proteasas de apoptosis (*Apoptosis protease activating factor 1*)

APP: proteína precursora del péptido β -amiloide

Bcl-2: proteína de linfoma 2 de células B (*B-cell lymphoma-2 protein*)

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived Neurotrophic Factor*)

BHE: barrera hematoencefálica

bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor*)

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

C/EBPs: proteínas de unión a secuencias CCAAT y potenciadoras (*CCAAT/Enhancer Binding Proteins*)

CNTF: factor neurotrófico ciliar (*Ciliary Neurotrophic Factor*)

COX-2: ciclooxigenasa-2

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (*cyclic AMP response element (CRE)-Binding protein*)

DIV: días *in vitro*

EAAT: transportador de aminoácidos excitatorios

eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial

GABA: ácido γ -aminobutírico

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*)

gcd-10: gen de muerte de células granulares-10 (*granule cell death-10*)

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía (*Glial-derived Neurotrophic Factor*)

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GLAST: Transportador de glutamato y aspartato

GLT-1: Transportador de glutamato de tipo 1

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GSH: glutation reducido

- HSP-32: proteína de estrés térmico-32 (*Heat Shock Protein 32*)
- ICAM: molécula de adhesión intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- IFN: interferón
- IGF-1: factor 1 de crecimiento similar a la insulina (*Insulin-like Growth Factor 1*)
- IL: interleucina
- iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible
- KA: ácido caínico
- LIF: factor inflamatorio de leucocitos
- LPS: lipopolisacárido
- MAPK: proteín quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- MBP: proteína básica de la mielina
- MCP-1: proteína 1 quimiotáctica de monocitos (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*)
- M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos (*Macrophage Colony Stimulating Factor*)
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
- mrf-1: factor 1 de respuesta microglial (*microglia response factor 1*)
- NCAM: molécula de adhesión celular de tipo neural (*Neural Cell Adhesion Molecule*)
- NFκB: factor nuclear *kappa* B
- NGF: factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*)
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NO: óxido nítrico
- NT-3: neurotrofina 3
- PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*)
- PAF: factor activador de plaquetas (*Platelet Activating Factor*)
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor*)
- PPAR-γ: receptor γ de peroxisomas activado por proliferación (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*)
- RANTES: *regulated on activation normal T cell-expressed and secreted*
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SNC: sistema nervioso central
- SOD: superóxido dismutasa

Abreviaciones

STATs: transductor de señales y activador de la transcripción (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

TGF: factor de crecimiento transformante (*Transforming Growth Factor*)

TNF: factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

VCAM: molécula de adhesión celular vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VIP: péptido intestinal vasoactivo (*Vasoactive Intestinal Peptide*)

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- Las células gliales en el sistema nervioso central	3
1.1.1- Tipos mayoritarios de células gliales	6
1.1.1.1- Astrogliá	6
1.1.1.2- Oligodendroglía	9
1.1.1.3- Microglía	11
1.1.2- Función de las células gliales	14
1.1.2.1- Soporte trófico de las neuronas	14
1.1.2.2- Modulación de los niveles de glutamato extracelular	17
1.1.2.3- Mantenimiento de la homeostasis iónica.....	19
1.1.2.4. Las células gliales y la barrera hematoencefálica	21
1.1.2.5- Protección frente al estrés oxidativo.....	22
1.1.3- Activación de las células gliales.....	23
1.1.3.1- Producción de citocinas y otros factores inmunoreguladores	25
1.1.3.2- Producción de NO	29
1.1.3.3- Factores de transcripción	30
1.1.3.4- Proliferación	37
1.1.3.5- Fagocitosis.....	38
1.2- Comunicación bidireccional entre las neuronas y las células gliales.....	40
1.2.1- Interacciones neurona-glía en condiciones fisiológicas	40
1.2.2- Interacciones neurona-glía en patologías del SNC.....	46
1.2.2.1- Papel neuroprotector.....	47
1.2.2.2- Papel neurotóxico	49
1.3- Muerte neuronal	51
2- OBJETIVOS	59
3- MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1- Cultivos primarios de células de cerebelo.....	63
3.1.1- Cultivo de neuronas granulares	66
3.1.2- Cultivo mixto de neuronas granulares y de células gliales	66
3.1.3- Cultivo primario mixto de células gliales.....	67
3.1.4- Identificación de los tipos celulares presentes en los cultivos	68
3.2- Tratamientos de los cultivos.....	69
3.2.1- Tratamiento con glutamato.....	69
3.2.2- Tratamiento con LPS.....	70
3.2.3- Tratamiento de privación de potasio.....	71
3.2.4- Tratamiento con estaurosporina	71
3.3- Determinación de la viabilidad celular.....	72
3.4- Evaluación de la activación glial.....	73

3.4.1- Producción de NO	73
3.4.1.1- Determinación de nitrito liberado al medio de cultivo	73
3.4.1.2- Expresión de la iNOS	74
3.4.2- Determinación de la activación de factores de transcripción: NFκB y C/EBPs	74
3.4.2.1- Translocación nuclear de NFκB	74
3.4.2.2- Activación de C/EBPs	75
3.4.3- Producción de TNF-α.....	75
3.4.4- Determinación del índice de proliferación de las células gliales	76
3.4.5- Determinación de la actividad de fagocítica microglial	78
3.5- Evaluación del tipo de muerte celular	79
3.5.1- Evaluación de la morfología nuclear: tinción de Hoechst.....	79
3.5.2- Determinación de la caspasa-3 activada.....	80
3.6- Inmunocitoquímica	81
3.6.1- Inmunofluorescencia	81
3.6.2- Inmunoperoxidasa y tinción con lectina.....	84
3.6.3- Contratinción con hematoxilina	86
3.7- Captura y análisis de imágenes	87
3.8- Tratamiento estadístico de los resultados.....	87
4- RESULTADOS.....	89
4.1- Primer trabajo: Glial activation modulates glutamate neurotoxicity in cerebellar granule cell cultures	91
4.2- Segundo trabajo: Excitotoxic and apoptotic neuronal death induce different patterns of glial activation <i>in vitro</i>	105
4.3- Tercer trabajo: Expresión de C/EBPs en las células gliales activadas.....	119
5- DISCUSIÓN GENERAL	135
6- CONCLUSIONES.....	143
7- BIBLIOGRAFÍA GENERAL	147