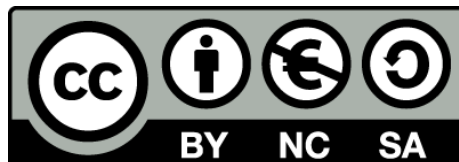


Efecte de l'activació del canal K_{ATP} al perfil d'expressió microglial durant la neurodegeneració a l'hipocamp de la rata

Margot Martinez Moreno



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Tesi Doctoral

**EFFECTE DE L'ACTIVACIÓ DEL CANAL K_{ATP} AL PERFIL D'EXPRESSIÓ
MICROGLIAL DURANT LA NEURODEGENERACIÓ A L'HIPOCAMP DE LA
RAT**

Margot Martinez Moreno

Barcelona, Març de 2013

Tesi Doctoral

**EFFECTE DE L'ACTIVACIÓ DEL CANAL K_{ATP} AL PERFIL D'EXPRESSIÓ
MICROGLIAL DURANT LA NEURODEGENERACIÓ A L'HIPOCAMP DE LA
RAT**

Programa de Doctorat en Biomedicina

Treball realitzat per Margot Martinez Moreno a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Facultat de Medicina (IDIBAPS) de la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Manuel José Rodríguez per optar al títol de Doctora en Biomedicina.

Barcelona, Març de 2013

L'autora:

El director:

Margot Martinez Moreno

Manuel J. Rodríguez Allué

“Aprender es descubrir lo que ya sabemos.
Enseñar es recordar a otros que lo saben tan bien como nosotros.
Todos somos aprendices, hacedores, maestros.”

Stephen Edwin King

“No podemos dejar de crear belleza.”
Lestat, a El ladrón de cuerpos
Anne Rice

"Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro."
Santiago Ramón y Cajal

Para mi Pepe...

AGRAÏMENTS

Durant aquests anys hi ha hagut molta gent que ha estat recolzant-me en aquesta experiència, de totes les maneres en què es pot estar en la vida d'una persona, totes mereixen tenir una petita part de reconeixement. Si m'he deixat algú prego em perdonin, segur que no marxaran del meu pensament.

En primer lloc voldria agrair el meu director de tesi, el Dr. Manuel Rodríguez. Manolo, amb la paciència que has tingut, sobre tot en aquests últims moments, i tots els esforços que has dedicat, mereixes estar en un pedestal. Gràcies, de tot cor, per totes les ensenyances.

A la Dra. Nicole Mahy, moltíssimes gràcies per acollir-me al vostre grup i donar-me la oportunitat d'aprendre amb vosaltres.

A la Dra. Anna Maria Solanas, per la oportunitat de fer el projecte de màster al seu laboratori, i a tots els companys de microbiologia.

Als membres de la Comissió de Seguiment, els doctors Artur Llobet, Albert Martínez i Alba Colell, per tots els consells i la ajuda prestada, que ha ajudat molt a definir el camí de la tesi.

Al Dr. Xavier Gasull i al seu equip, per la inestimable ajuda en els experiments de mesura de calci intracel·lular.

A Amèrica Giménez i Pep Marimón, i a la resta de personal, per tota la ajuda prestada a l'estabulari.

També voldria agrair al Dr. Carreras, al Dr. Climent i a la Dra. Cussó per permetre'm realitzar la tesi a la Unitat.

La Núria i a la Cris de la secretaria del Departament, per fer-nos més fàcils les gestions.

A la resta de personal de la Unitat de Bioquímica: Mario i Rosario, gràcies per les estones passades i l'ajuda prestada. Als Dr. Jou Saura, per la ajuda sempre rebuda. Al Dr. Jose Vidal, gran mentor en biologia molecular i genètica, per tota la ajuda en els experiments, pels consells i memorables converses. A la Dra. Margarita Martín, pels ànims que sempre m'ha donat i les converses i dinars al menjador.

Als que eren a la Unitat però que s'han desplaçat. Dami, espero que tu vida siga el rumbo que te mereces, nunca olvidaré tu risa. A Feliu, per fer-me sentir valenta. A la Montse, moltes gràcies per ensenyar-me, has estat una gran font d'inspiració, cada cop que vegi una rata recordaré qui em va ensenyar. Al Xavi, gràcies per tota la ajuda prestada, espero que hagi trobat el teu lloc. A la Neus, quantes converses i secrets

confiats, espero comptar amb la teva amistat sempre, sigues feliç en aquesta nova etapa. Ana Béeeee!!! Que te voy a contar a tí, los momentos que hemos pasado tan divertidos, sé feliz y sigue tu camino, sea cual sea! A Toni, por toda la ayuda prestada en muchos momentos, esas situaciones en prácticas y fuera del lab también. To Anna, for your friendship beyond our time on the lab. I als “Neurotecs”! Pilar, sigues tant alegre com sempre, eres el sol de neuroquímica. A Andrea, gracias por ayudarme con las células, siempre serán mejores las chilenas! A la Noe, m’ho he passat molt bé amb tu, no canviïs mai! Al Dr. Marco Pugliese, gracias por tu gran ayuda. I al meu mentor del calci, tant dins com fora del lab, el Joan, gràcies de tot cor.

A la gent que encara segueix pel lab: Carmen, me has dado tu ayuda y apoyo tanto a nivel científico como a nivel personal, espero que nos podamos ver “más allá de los cerebros”. Erola, gràcies pels ànims finals, tant de bó hagués pogut coincidir més amb tu. Marta, per la teva franquesa i personalitat. I el Francesco, por esas conversas bizarras en la hora de comer. Finalment, a “los chicos”. Alan, mai oblidaré les converses a la llum de la lluna banyades amb caldo de Burdeus. Ivan, propietario intelectual de la portada de ésta tesis, tu sabes hacer que cualquier chica se sienta especial. Y Chiwi, no sabría ni por dónde empezar... por la ayuda prestada en todo tipo de situaciones y por el equipo Chiwi-Fru! A tots tres, moltes gràcies per tota la ajuda tècnica/gràfica/psicològica (esos pitis contando marujeos...). Gràcies a tots també pels moments fora del laboratori.

També volia agrair a la gent qui, tot i que no ha viscut directament la feina al laboratori, m’ha recolzat d’una manera o altra.

A la meva família: mama, por confiar que siempre hago lo correcto, te quiero. Rebecca y Dolma, mis hermanas, por escuchar mis quejas y alegrías. A la Dra. Montserrat Ros i la seva família, per ser com una segona família per a mi, us ho dec gairebé tot a vosaltres. Y a los que no están, por enseñarme a luchar siempre por mis sueños...

A les nenes de biologia, per passar amb mi tants bons moments, han estat la gasolina per a tirar endavant. Després de tants anys, tot i que hem crescut i seguim els nostres camins, sembla que res ha canviat. Alba, Elena, Judit, Maria, Marta, gràcies.

A la gent de bioquímica, la que potser m’ha entès millor a la meua vida: Roser, David, Joan, Tanit, heu estat sempre prop meu, hem viscut moltes coses, *E. coli* forever! Y a Gabriel, por éste reencuentro de último momento y por tu apoyo, ha sido vital. A l’Anna

i el Lluís, desapareguts pels països baixos, m'he sentit sempre súper acollida, us trobo a faltar. A Dani, Óscar y Glòria, por hacerme reír.

Y a la “colla” de Girona, que potser no han entès sempre les meves decisions, però que sempre estan allà per a les celebracions. La família Silvestre-Cruz, con el pequeño Marc. La família Silvestre-Castillo, con la pequeña Dana. A Pedro y Mikel, a Juancri. Gracias por esos momentos, tranquilos, ya estoy de “másteres y esas cosas”. I a la Irene, tants anys i encara tan properes...

A Fru i Puto, per l'amor incondicional i per la companyia, escriure sense vosaltres no hagués estat el mateix.

Finalment, a la persona qui més m'ha recolzat. Pepe, cariño, te amo, gracias por estar a mi lado en todos los momentos, sobre todo los duros.

PUBLICACIONS I FINANÇAMENT

El treball que aquí es presenta està basat en les següents publicacions internacionals:

1.- Rodríguez MJ, Martínez-Moreno M, Ortega FJ, Mahy N. "Targeting microglial KATP channels to treat neurodegenerative diseases: a mitochondrial issue" Oxid Med Cell Long (Sotmès).

2.- Espinosa-Parrilla JF, Martínez-Moreno M, Gasull X, Mahy N, Rodríguez MJ "VGCC channels modulate microglial activity in vitro" (2012) Cell Mol Neurosci (Sotmès).

3.- Martínez-Moreno M, Vidal-Taboada JM, Ortega FJ, Batlle M, Mahy N, Rodríguez MJ. "Diazoxide-mediated KATP channel opening modulates the pro-inflammatory activity of reactive microglia" (2012) J Neurochem (En preparació).

I ha estat finançat pels següents projectes de recerca:

SAF2008-01902. (Ministerio de Ciencia e Innovación)

RD10-1-0072 (Generalitat de Catalunya)

IPT-010000-2010-35 (Ministerio de Ciencia e Innovación)

2009SGR1380 (Generalitat de Catalunya)

ABREVIACIONS

- 6-OHDA: 6-hidroxidopamina
- $[Ca^{2+}]$: Concentració de calci intracel·lular
- AA/BA: Acrilamida/Bis-acrilamida
- ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- ActB: Actina B
- APS: Persulfat d'Amoni
- B2m: Beta-2-microglobulina
- BAPTA: àcid-1,2-bis(o-aminofenoxi)età-N,N,N',N'-tetraacètic
- BCP: 1-Bromo-3-CloroPropà
- BDNF: Factor neurotròfic derivat del cervell
- BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina
- BSA: Seroalbúmina Bovina
- CCDV: Canals de Calci Depenents de Voltatge
- Ccl5: Chemokine (C-C motif) ligand 5
- CSF: Factor estimulant de la colònia
- Cy3: Cianina 3
- cDNA: DNA còpia
- C_T : Temps de cicle
- CXCL9: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
- CXCR3: Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
- DAB: Di-amino benzidina
- DCX: Doblecortina

- DG: Gir dentat de l'hipocamp
- DMSO: Dimetil sulfòxid
- DNA: Àcid desoxiribonucleic
- dNTP: Desoxiribonucleòtid trifosfat
- DPX: Resina sintètica a base de Distrè, Plasticisè i Xilè
- Dzx: Diazoxida
- ELISA: Assaig per Immunoabsorció Lligat a Enzims
- FBS: Sèrum Fetal Boví
- FC: Fold change
- FGF: Factor de creixement dels fibroblasts
- FITC: Fluoresceïna Isotiocianat
- GAPD: Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
- GFAP: Proteïna àcida fibrilar glial
- Gusb: Beta-glucuronidasa
- HBSS: Solució salina balancejada de Hanks
- HGF: Factor de creixement dels hepatòcits
- HK: Gen normalitzador ó *Housekeeper*
- Hprt1: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
- HRP: Peroxidasa de Rave
- IB4: Isolectina B4
- IFN γ : Interferó- γ
- Ig: Immunoglobulina
- IGF: Factor de creixement insulínic

- IL-1 β : Interleukina-1 β
- HERG: *Human ether a go-go-related gene*
- KCC: Tancadors del canal de potassi
- KCO: Obridors del canal de potassi
- Kdr: Canal de potassi rectificador retardat
- Kir: Canal de potassi rectificador per entrada
- KW: Kruskal-Wallis
- LDP: Llet desnatada en pols
- LPS: Lipopolisacàdid
- LSD: *Least Significant Difference* ó Contrast de Fisher (Anàlisi de la variança)
- MDP: Desviació mitjana de producte
- MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- MS: Esclerosi múltiple
- Nefh: Cadena pesada del neurofilament
- NeuN: Nucli Neuronal
- NGS: Sèrum Normal de Cabra
- NGF: Factor de creixement neural
- Nif: Nifedipina
- Nim: Nimodipina
- NMDA: Àcid N-metil-D-aspàrtic
- NO: Òxid Nítric
- NPS: Sèrum Normal de Porc
- NSAID: Fàrmac antiinflamatori no esteroïdal

- NT: Neurotrofina
- OB: Bulb olfactori
- O/N: Durant tota la nit
- PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
- PAMPS: Patrons moleculars associats a patògens
- PBS: Tampó Fosfat Salí
- PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa
- PFA: Paraformaldèhid
- PGK: Fosfoglicerat kinasa
- PKC: Proteïna kinasa C
- Pp1a: Proteïna fosfatasa-1a
- PSA-NCAM: *Polysialic Acid – Neural Cell Adhesion Molecule*
- PVDF: Polifluorur de vinilidè
- RAGE: Receptor per la glicació avançada de productes
- RANTES: *Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Expressed*
- RIPA: RadioImmunoPrecipitation Assay
- RMS: Via Rostromigratòria.
- RNA: Àcid ribonucleic
- ROS: Espècies reactives d'oxigen
- Rpl13a: Proteïna ribosomal-13a
- rpm: Revolucions per minut
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

- RT-PCT: Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa
- S100 β : Proteïna S100
- SDS: Dodecilsulfat sòdic
- SEM: Desviació estàndard de la mitja
- SGZ: Zona Subgranular
- S/N: Sobrenedant
- SNAT: Transportador d'aminoàcids neutre associat a sodi
- Sp8: Factor de transcripció Proteïna específica 8
- SUR: Receptor de sulfonilurees
- SVZ: Subventricular
- TA: Temperatura ambient
- Taq: *Thermus aquaticus*
- TBS: Salí Tamponat amb Tris
- TBI: Dany cerebral traumàtic
- TBP: Proteïna d'unió a TATA
- TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
- Tfrc: Proteïna del receptor de transferrina 1
- TGF: Factor de creixement transformant
- TLR: *Toll-like receptors*
- TMB: Tetrametilbenzidina
- tMCAO: Oclusió temporal de l'artèria cerebral mitja
- TNF α : Factor de necrosis tumoral α
- VEGF: Factor de creixement vascular endotelial

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	25
1.1. DANY AL SNC I NEURODEGENERACIÓ	25
1.1.1. Mecanismes moleculars del dany agut al sistema nerviós central i dels processos neurodegeneratius	25
1.2. L'EXCITOTOXICITAT	26
1.2.1. La sinapsi glutamatèrgica	26
1.2.2. Els receptors de glutamat	27
1.2.3. Mecanismes d'excitotoxicitat	28
1.2.4. L'excitotoxicitat als processos neurodegeneratius	31
1.3. MICRÒGLIA I NEUROINFLAMACIÓ	32
1.3.1. La micròglia en el cervell sa	32
1.3.2. La resposta microglial al dany	36
1.3.3. Microgliosi, citotoxicitat i neuroinflamació	42
1.4. MICRÒGLIA I NEUROGÈNESI	45
1.4.1. La neurogènesi al cervell adult	45
1.4.2. La neurogènesi associada a la lesió del Sistema Nerviós Central	49
1.5. EL CANAL K_{ATP}	51
1.5.1. Canals iònics a la micròglia	51
1.5.2. Estructura del canal K_{ATP}	51
1.5.3. Rellevància funcional del canal K_{ATP} a la cèl·lula	53
1.5.4. Els canals K_{ATP} al cervell	56
1.5.5. Els canals de calci dependents de voltatge de tipus L	57
2. ANTECEDENTS, HIPÒTESIS I OBJECTIUS DE TREBALL	63
2.1. ANTECEDENTS	63
2.2. HIPÒTESI	64
2.3. OBJECTIUS	64
3. MATERIALS I MÈTODES	65
3.1. MATERIALS	67
3.1.1. Cèl·lules	67
3.1.2. Animals	67
3.1.3. Reactius	67
3.1.4. Fàrmacs específics	68
3.1.5. Lots	68
3.1.6. Anticossos	69
3.1.7. Oligonucleòtids	70
3.1.8. Altres compostos	70
3.1.9. Instrumentació	70
3.2. MÈTODES	72
3.2.1. Manteniment de la línia cel·lular BV-2	72
3.2.2. Manipulació farmacològica de les cèl·lules BV-2	73
3.2.3. Test de viabilitat per Trypan blue	76
3.2.4. Valoració de la concentració de nitrits en el medi	76

3.2.5. Valoració de la concentració de TNF α en el medi	77
3.2.6. Valoració de la concentració de CXCL9 i Ccl5 en el medi	78
3.2.7. Extracció de mRNA i proteïnes de les cèl·lules BV-2	79
3.2.8. Determinació de la concentració de proteïnes pel Mètode de Bradford	81
3.2.9. Array de PCR de la resposta inflamatòria modulada per Dzx	81
3.2.10. Reacció en cadena de la polimerasa per transcripció reversa (RT-PCR) i PCR de les subunitats α_{1C} i α_{1D} del CCDV	83
3.2.11. <i>Western-blot</i> de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV2	85
3.2.12. Marcatge Immunocitoquímic de les cèl·lules BV2	87
3.2.13. Assaig de fagocitosis a les cèl·lules BV-2	88
3.2.14. Mesura del calci citosòlic lliure i estimulació dels CCDV	89
3.2.15. Anestèsia dels animals	91
3.2.16. Lesió estereotàxica	91
3.2.17. Administració oral de Dzx a les rates	92
3.2.18. Test de glucèmia a les rates	94
3.2.19. Obtenció de mostres cerebrals per histologia	95
3.2.20. Tincions histològiques i immunohistoquímica	96
3.2.21. Preparació dels extractes de hipocamp de rata	106
3.2.22. Determinació de la concentració de proteïnes hipocampals	110
3.2.23. Anàlisi d'expressió diferencial per PCR en temps real dels extractes de RNA	111
3.2.24. Quantificació dels paràmetres histològics	114
3.2.25. Comptatge cel·lular	115
3.2.26. Microscòpia confocal i estudis de colocalització	115
3.2.26. Anàlisi densitomètrica dels <i>Western Blot</i>	116
3.2.27. Anàlisi de dades de la PCR en temps real	116
3.2.28. Anàlisi estadístiques	117

4. RESULTATS **119**

4.1. LA DZX DISMINUEIX L'ACTIVITAT PRO-INFLAMATÒRIA DE LES CÈL·LULES BV2 EN CULTIU **121**

4.1.1. Expressió del canal K _{ATP} per les cèl·lules microglials BV2 en cultiu	121
4.1.2. La Dzx no modifica la viabilitat cel·lular	123
4.1.3. La Dzx disminueix l'activitat pro-inflamatòria de les cèl·lules BV2	124
4.1.4. La Dzx disminueix l'expressió de molècules pro-inflamatòries a les cèl·lules BV2 activades	126
4.1.5. La Dzx disminueix la secreció de les citocines cxcl9 i ccl5 a les cèl·lules BV2 activades	131
4.1.6. La Dzx no modifica la capacitat fagocítica de les cèl·lules BV2	131

4.2. LA DZX REDUEIX LA LESIÓ EXCITOTÒXICA A L'HIPOCAMP DE LA RATA **133**

4.2.1. La micròglia reactiva expressa el canal K _{ATP} a l'hipocamp lesionat	134
4.2.2. La Dzx limita la lesió excitotòxica hipocampal	136
4.2.3. La Dzx redueix l'àrea de reacció microglial però no la reacció astrogial	137
4.2.4. La Dzx a la concentració utilitzada no modifica la glucèmia de la rata	140

4.3. LA DZX ALENTEIX LA PROGRESSIÓ DE LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL **141**

4.3.1. La Dzx alenteix de la lesió hipocamp induïda per NMDA	142
--	-----

4.3.2. La Dzx disminueix la reacció glial associada amb la lesió excitotòxica hipocampal	146
4.3.3. Efecte de la Dzx sobre els canvis de concentració de mRNA de NF-H, GFAP i S100 β induïts per NMDA a l'hipocamp de la rata	146
4.3.4. La lesió excitotòxica augmenta l'expressió de Kir6.1 i SUR2 a 5 dies post-lesió	148
4.3.5. La lesió excitotòxica no modifica l'expressió <i>in vivo</i> de cxcl9, ccl5 i CXCR3 a llarg termini	149
4.4. LA DZX POTENCIA LA NEUROGÈNESI ASSOCIADA A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL.	151
4.4.1. La lesió excitotòxica hipocampal augmenta el nombre de cèl·lules PSA-NCAM positives i de calretinina positives	153
4.4.2. La Dzx promou la proliferació de noves cèl·lules neuronals i limita la generació de noves cèl·lules glials	154
4.4.3. La Dzx promou la migració de cèl·lules Sp8/GFAP positives	157
4.5. LA MICRÒGLIA EXPRESSA EL CANAL DE CALCI DEPENDENT DE VOLTATGE DE TIPUS L	161
4.5.1. Les cèl·lules BV2 expressen el CCDV tipus L	162
4.5.2. Fàrmacs específics del CCDV tipus L modifiquen l'increment de calci intracel·lular induït per KCl a les cèl·lules BV-2	164
4.5.3. El bloqueig del CCDV tipus L disminueix la resposta pro-inflamatòria però no modifica la capacitat fagocítica de cèl·lules BV-2	166
4.5.4. La microglia reactiva expressa el CCDV tipus L a l'hipocamp lesionat amb NMDA	170
5. DISCUSSIÓ	172
5.1. LA REACCIÓ MICROGLIAL A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL	175
5.2. EL CANAL K_{ATP} COM A MODULADOR DE L'ACTIVITAT MICROGLIAL	177
5.3. EFECTE DE LA DZX SOBRE LA NEUROGÈNESI ASSOCIADA A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL	180
5.4. EL CANAL DE CALCI DEPENDENT DE VOLTATGE A LA MICRÒGLIA	183
5.5. UN POSSIBLE ACOBLAMENT DE L'ACTIVITAT DELS CANALS K_{ATP} I CCDV TIPUS L A LA MICRÒGLIA	186
6. CONCLUSIONS	191
7. BIBLIOGRAFIA	194
7.1. ARTICLES	197
7.2. LLIBRES	236
7.3. TESIS	237
7.4. RECURSOS WEB	237
7.5. APORTACIONS A CONGRESSOS	237

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1.1. DANY AL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I NEURODEGENERACIÓ

Les malalties neurològiques i psiquiàtriques tenen un gran impacte en la nostra societat. La recerca bàsica en neurociències actualment es troba dirigida a estudiar les causes i els mecanismes pels quals cursen aquestes patologies per tal de millorar-ne els tractaments i prevenir-ne la incidència. Les malalties neurodegeneratives són aquelles que tenen una component crònica, com la malaltia d'Alzheimer (AD), la de Parkinson (PD), la de Huntington (HD), l'Esclerosi Múltiple (MS) i l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ALS). Hi ha processos patològics que poden induir un procés neurodegeneratiu i estan desencadenats per una lesió inicial amb una component aguda, com l'ictus cerebral ó el traumatisme cerebral (Vidal-Taboada *et al.*, 2011).

1.1.1. Mecanismes moleculars del dany agut al sistema nerviós central i dels processos neurodegeneratius

El dany agut al sistema nerviós central (SNC) es caracteritza per una mort neuronal massiva i immediata i un dany tissular marcat per una necrosi local incontrolada. Aquest dany primerenc es pot expandir pel teixit durant setmanes per mecanismes independents, com la sobre-estimulació de receptors de glutamat (excitotoxicitat), privació energètica, acidosi, generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), desequilibri iònic i una resposta inflamatòria potent (Ortega *et al.*, 2011).

Les causes processos neurodegeneratius són multi-factorials, amb causes genètiques, ambientals i altres factors endògens. Patològicament, aquests desordres tenen la mateixa característica: la pèrdua d'una subpoblació de neurones per raons heterogènies però que tenen característiques similars, com la agregació i el plegament anormal de certes proteïnes, l'estrès oxidatiu i la formació de ROS, fallida de l'homeòstasi iònica, disfunció mitocondrial, etc. (Jellinger, 2003; Soto, 2003).

Una de les característiques que comparteixen tots els processos patològics del sistema nerviós és l'excitotoxicitat.

1.2. L'EXCITOTOXICITAT

L'excitotoxicitat es refereix a la mort neuronal provocada per l'activació sostinguda de receptors d'aminoàcids, com el glutamat (Glu) i l'aspartat (Asp) (Wikinski and Acosta, 1995), que tenen funció activadora, però no de l'àcid γ -aminobutíric (GABA), la glicina (Gly) i la taurina (Tau), els quals tenen una funció inhibidora. El terme va ser donat per Olney el 1978, qui va corroborar els experiments de Lucas el 1957, que descrivien com el glutamat pot actuar com una neurotoxina (Lucas and Newhouse, 1957; Olney and de Gubareff, 1978).

1.2.1. La sinapsi glutamatèrgica

El Glu és neurotransmissor excitador principal del sistema nerviós central. És un aminoàcid no essencial que no travessa la barrera hematoencefàlica (Hawkins *et al.*, 1995). A la sinapsi glutamatèrgica una neurona presinàptica allibera el Glu a l'espai sinàptic on activa els receptors de glutamat i és recaptat pels astròcits mitjançant transportadors específics (EAATs). A l'astròcit el Glu és transformat a glutamina (Gln), que acaba el seu cicle tornant a la neurona presinàptica a través dels transportadors d'aminoàcids neutres associats a sodi (SNATs) (Figura 1.1).

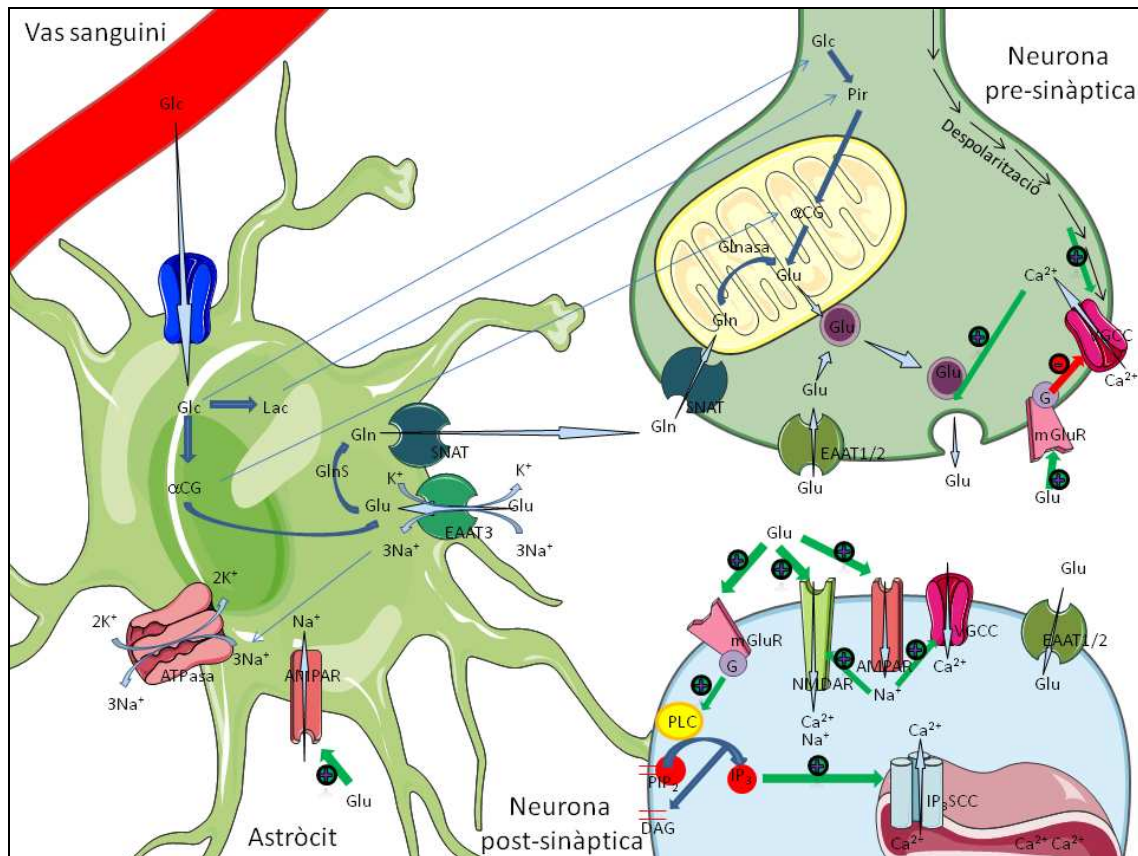


Figura 1.1: Esquema general de la sinapsi glutamatèrgica. L'arribada d'un potencial d'acció a la neurona pre-sinàptica a mode de despolarització de membrana provoca l'obertura dels CCDV i l'alliberament del Glu a l'espai sinàptic. Aquest Glu interacciona amb els receptors de la neurona post-sinàptica (i dels astròcits) promovent la producció de segons missatgers mitjançant l'entrada de Ca^{2+} i provocant un potencial de membrana post-sinàptic. Els astròcits són els principals mediadors de la eliminació del Glu de l'espai sinàptic mitjançant el reciclatge a Gln. α CG: α -cetoglutarat. Glnasa: Glutaminasa. GlnS: Glutamina sintasa. Glu: Glucosa. IP₃SCC: Canal de calci sensible a IP₃. Lac: Lactat. Pir. Piruvat. PIP₂: Fosfatidil inositol bifosfat. PLC: Fosfolipasa C. VGCC: Canals de calci dependents de voltatge. (Adaptat de Rodríguez, 2000).

1.2.2. Els receptors de glutamat

El glutamat exerceix les seves accions a través de varies classes de receptors que poden ser diferenciats no només molecularment sinó també en funció de les seves característiques farmacològiques i electrofisiològiques (Michaelis, 1998).

De forma general, els receptors de glutamat es caracteritzen en dos tipus (Ozawa *et al.*, 1998):

- Receptors ionotròpics: formen un canal iònic activat per lligand. La seva activació porta a un increment per a la permeabilitat de la membrana cel·lular a Na^+ i Ca^{2+} . Fonamentalment, i segons a les seves propietats farmacològiques, es poden dividir en

tres classes: Receptors del tipus àcid alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiònic (AMPA), receptors tipus Kainat i receptors tipus N-metil-D-aspartat (NMDA). La seva activació, ja sigui pel glutamat o pels seus agonistes que els donen el nom, porten finalment a un augment de calci intracel·lular, mediat pels receptors NMDA i pels canals de calci dependents de voltatge (Figura 1.1).

- Receptors metabotròpics: activen proteïnes G que elsacoblen a sistemes de segons missatgers amb efectes funcionals diversos. Per exemple, el mGluR1 indueix l'activació de la proteïna G_q que provoca l'hidròlisi del fosfatidil inositol per part de la fosfolipasa C i promou la alliberament d' IP_3 , el qual activa el canal de calci sensible a IP_3 de la membrana del reticle endoplasmàtic, provocant l'augment intracel·lular de calci (Figura 1.1).

1.2.3. Mecanismes d'excitotoxicitat

Com ja hem dit l'excitotoxicitat és un dels mecanismes que contribueixen a la mort neuronal després dels processos d'isquèmia, els traumatismes i les malalties neurodegeneratives (Sattler and Tymianski, 2000; Arundine and Tymianski 2003, 2004). L'alliberació de glutamat a l'espai sinàptic incrementa la permeabilitat al calci de la neurona postsinàptica, principalment a través dels receptors NMDA (i, indirectament, pels receptors metabotròpics), i la glia, la qual cosa porta a un augment transitori a la concentració intracel·lular de calci en ambdós tipus cel·lulars (Obrenovitch *et al.*, 2000). En conseqüència, l'estimulació excessiva dels receptors de glutamat pot portar a una mort neuronal provocada per la desregulació del calci intracel·lular (Lau and Tymianski, 2010).

D'altra banda, l'entrada de calci i de sodi pels receptors ionotròpics fa que hi hagi un desequilibri en els gradients transmembrana de Na^+ , Cl^- i K^+ , portant a un edema cel·lular que pot provocar la necrosi (Ortega *et al.*, 2011).

Els mecanismes pels quals el calci exerceix una acció tòxica són variats. Un d'ells és la formació ROS. Una de les fonts d'aquests ROS és la cascada del metabolisme dels fosfolípids controlada per l'àcid araquidònic. Aquesta molècula és un segon missatger produït a partir de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) dependent de calci. La PLA_2 també pot generar eicosanoids, els quals causen neurotoxicitat i peroxidació de fosfolípids de membrana, que causen porus a la membrana cel·lular (Farooqui and Horrocks, 2006). Una altra font de radicals lliures és l'activació de la calmodulina, la qual s'activa per

calci (Tymianski and Tator, 1996), regula l'activitat de l'enzim òxid nítric sintasa (NOS) i promou la formació de òxid nítric (NO). El NO per si sol no és perjudicial, però si es combina amb radicals lliures pot portar a la formació de molècules més perjudicials, les espècies reactives de nitrògen (RNS). Per exemple, la combinació del NO amb el radical superòxid produeix peroxinitrit, una espècie molt reactiva que oxida grups sulfidril, lípids i àcids nucleics (Sattler and Tymianski, 2000).

L'entrada massiva de calci també porta a una alteració del metabolisme energètic cel·lular: l'augment de calci al citoplasma de la cèl·lula engega una sèrie de mecanismes de tamponament i d'extrusió d'aquest ió (Tymianski and Tator, 1996; Verkhratsky and Toescu, 1998). Aquests mecanismes impliquen una despesa d'energia molt gran, que fa que la neurona sigui incapaç de mantenir el gradient de Na^+ i K^+ i, per tant, el seu potencial de membrana (Greene and Greenamyre, 1996). La disminució del potencial de membrana té efectes en la sensibilitat del receptor NMDA, ja que promou l'alliberament de l'ió Mg^{2+} que l'inhibeix i disminueix el llindar d'activació per glutamat a concentracions fisiològiques, agreujant encara més l'excitotoxicitat.

El calci té la capacitat d'activar enzims que destrueixen els components estructurals cel·lulars, com les proteases i les nucleases. Una entrada massiva de calci activa una família de proteases dependents de calci, les calpaïnes (CP), que degraden les proteïnes del citoesquelet (Tymianski and Tator, 1996). El calci també activa endonucleases (EN) que degraden el DNA (Nicholls *et al.*, 2003; Verkhratsky, 2007).

L'excitotoxicitat, a més, provoca acidosi de diferents maneres. Una d'elles és modificant el metabolisme energètic al mitocondri, el qual canvia d'un metabolisme aerobi a un d'anaerobi per a l'obtenció ràpida d'ATP, amb l'alliberament de lactat i dos protons. Aquesta baixada de pH provoca acidosi tant a nivell cel·lular com a nivell del teixit. Altres mecanismes contribueixen a aquest alliberament de protons, com l'hidròlisi de fosfolípids i les bombes de restauració del gradient de calci, que intercanvien protons per ions calci. La manera per la qual la baixada de pH produeix dany neuronal ve mediada per la degradació del DNA i l'augment de la producció de ROS (Tymianski and Tator, 1996). D'altra banda, l'acidosi sembla tenir un efecte neuroprotector, ja que la baixada de pH provoca un bloqueig dels receptors NMDA i, en conseqüència, una reducció de l'entrada de calci a la cèl·lula (Rodríguez, 2000).

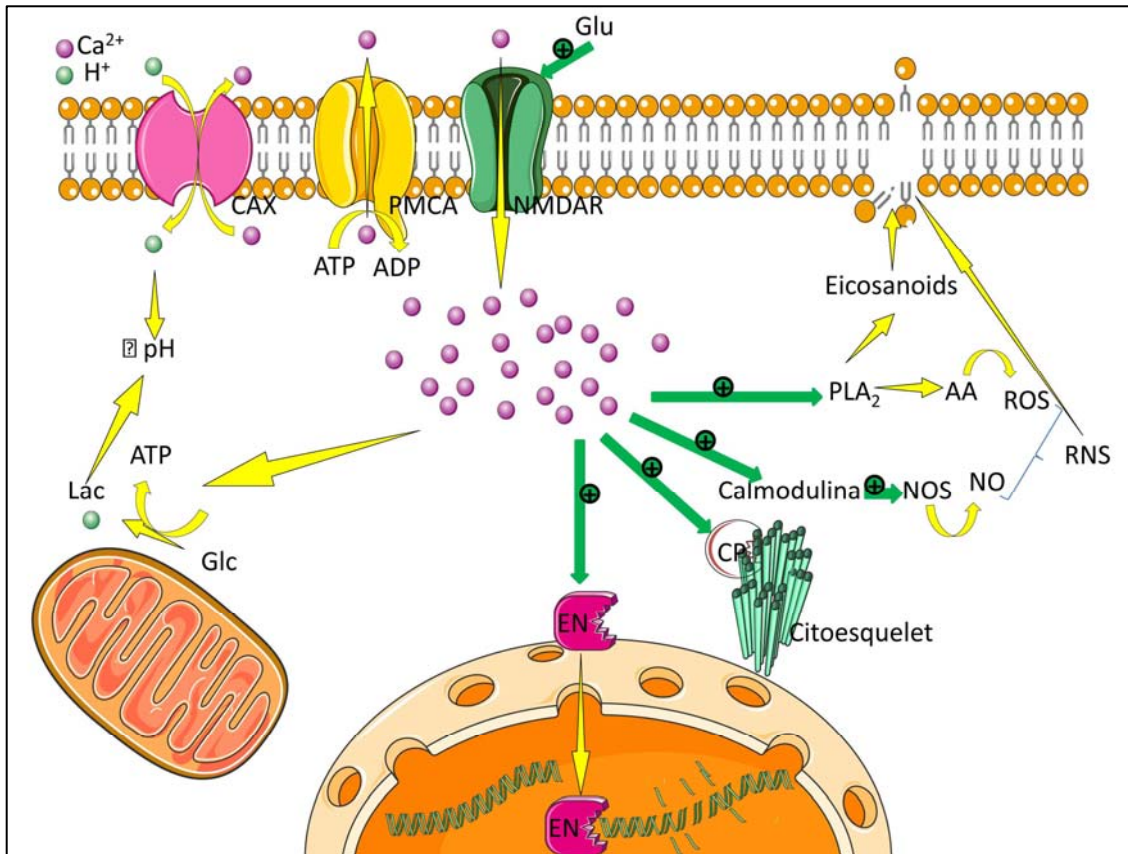


Figura 1.2: Esquema simplificat dels efectes de l'excitotoxicitat mediada pel calci. El calci que entra pels receptors NMDA activa una sèrie d'enzims els quals acaben generant ROS i RNS, eicosanoids; activa proteases i endonucleases que degraden els components cel·lulars. Aquest augment de calci activa les bombes de calci, les quals consumeixen molta energia. Per tal d'enfrontar aquesta despesa d'energia, el mitocondri canvia a un metabolisme anaeròbic, generant lactat i protons els quals, juntament amb els protons adquirits per l'intercanviador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, produeixen acidosis cel·lular. AA: Àcid araquidònic. CAX: Intercanviador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. CP: Calpaïna. EN: Endonucleases. Glc: Glucosa. Glu: Glutamat. Lac: Lactat. NMDAR: Receptor de NMDA. NO: Òxid nítric. NOS: Òxid nítric sintasa. PLA₂: Fosfolipasa A₂. PMCA: Bomba calci-ATPasa. RNS: Espècies reactives de nitrogen. ROS: Espècies reactives d'oxigen.

Com a conseqüència de la baixada de pH i de l'entrada massiva de calci es formen cristalls de hidroxiapatita dins les cèl·lules. S'ha plantejat l'hipòtesi que aquesta calcificació és una resposta a la excitotoxicitat, ja que disminuint els ions calci lliures del citoplasma sense despesa d'energia s'inhibeixen els efectes perjudicials d'aquest (Ramonet *et al.*, 2006). A llarg termini, la excitotoxicitat provoca una calcificació tissular (Rodríguez *et al.*, 2001). Aquesta característica la comparteixen gran part de les malalties neurodegeneratives (Ramonet *et al.*, 2002).

Contra aquests efectes tòxics el SNC presenta uns mecanismes de regulació que controlen els nivells extracel·lulars de Glu, bé sigui promovent la recaptació, o bé impedit la secreció, mitjançant l'alliberació de neurotransmissors inhibidors, com el

GABA, i neuromoduladors com la taurina i l'adenosina (Sapolsky, 2001), mecanisme, per altra banda, dependent d'energia (Ramonet *et al.*, 2004b).

1.2.4. L'excitotoxicitat als processos neurodegeneratius

L'excitotoxicitat per glutamat està lligada tant a lesions agudes del SNC, com ara la isquèmia ó un dany traumàtic, com a les malalties neurodegeneratives cròniques, per la sobreexcitació glutamatèrgica de les neurones (Ortega *et al.*, 2011). També pot estar donada per una disfunció de les sinapsis glutamatèrgiques a nivell de neurona pre i postsinàptica, per exemple per una pèrdua de selectivitat dels receptors ionotòpics, i fins i tot a nivell astrogial, per deficiències en el recaptament de glutamat (Obrenovitch *et al.*, 2000; Liévens *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009).

La contribució de l'excitotoxicitat a les malalties neurodegeneratives pot ser reproduïda al laboratori per una microinjecció d'agonistes de glutamat al SNC de rosegadors: els receptors ionotòpics tenen una alta afinitat per als seus agonistes, AMPA, NMDA o kainat. Per tant, una dosi no saturable d'aquests pot començar un procés excitotòxic a partir d'una lesió aguda que esdevé crònica, i reproduïx alguns dels processos observats a les malalties neurodegeneratives (Bernal *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Petegnief *et al.*, 2004; Ramonet *et al.*, 2004a). En un model de lesió excitotòxica amb AMPA al sèptum mig del cervell de la rata, el grup ha mostrat que hi ha un increment al llarg del temps de la lesió i la mort neuronal, enlloc d'incrementar amb la dosi inicial de toxina (Rodríguez *et al.*, 2004). Això mostra que els mecanismes que indueixen a una mort neuronal aguda i a una crònica són diferents, però que la primera porta a la segona. Hi ha dos mecanismes principals que determinen si una lesió es troba en la seva fase crònica: la primera és la inflamació mediada principalment per les cèl·lules microgials, i la segona és la remodelació i reparació tissulars, que inclouen processos de neurogènesi (Ortega *et al.*, 2011).

1.3. MICRÒGLIA I NEUROINFLAMACIÓ

1.3.1. La micròglia en el cervell sa

Quadre 1: Història del descobriment de la micròglia

Al segle XIX, es va descriure que en el cervell danyat de pacients d'esclerosi múltiple (MS) la glia tenia una morfologia diferent al cervell control: el soma cel·lular s'engruixia i els nombre de processos disminuïa i es tornaven més curts (Frommann, 1878). Per tant semblava evident que la glia es transformava en la MS. Més tard, altres científics com ara Alzheimer, Nissl i Merzbacher (Alzheimer, 1910) van descriure aquestes cèl·lules com una cèl·lula modificada en patologies neurodegeneratives, sense saber molt bé les seves funcions.

El primer que va descriure la micròglia com un tipus glial diferent a astròcits i oligodendròcits va ser Pío del Río-Hortega l'any 1932, usant un mètode de tinció de plata carbonatada en el cervell de mamífers joves (del Río Hortega, 1932). Per això, durant la primera meitat del segle XX aquestes cèl·lules es van anomenar cèl·lules d'Hortega, fins que Gless va començar a fer servir el terme micròglia per anomenar-les (Glees, 1955).

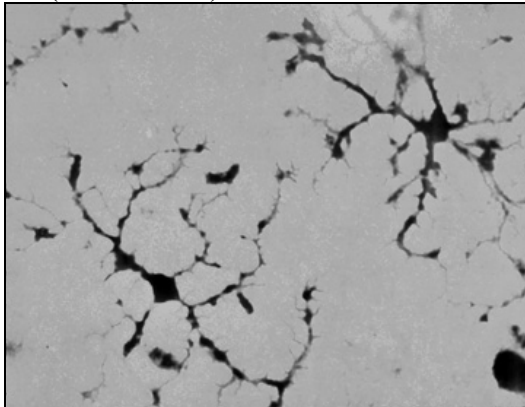


Figura 1.3: Cèl·lules de micròglia amb la tinció de plata realitzada per Hortega. De: Del Río-Hortega, 1932.

L'origen exacte de la micròglia es troba encara sota debat. Nombrosos estudis suggereixen que podria derivar de precursors cel·lulars mesodèrmics d'un possible llinatge hematopoètic, que envairia el cervell durant el desenvolupament embrionari i allà es reproduïx (Cuadros and Navascués, 1998). Altres evidències mostren que hi ha una reserva de progenitors microglicals al moll de l'os que, quan la micròglia es troba senescent, s'allibera al torrent sanguini i entra al cervell a substituir-la (Hinze and Stolzing, 2011; Prinz *et al.*, 2011). S'ha descrit, però, que als primers dies post nats hi ha un gran increment de cèl·lules microglicals al cervell, que podria ser deguda, també, a reclutaments tardans de micròglia circulant provinent del sac vitel·lí (Alliot *et al.*, 1999).

La densitat i la morfologia de la micròglia al cervell sa és específica de la regió, essent més abundant a la matèria grisa que a la matèria blanca (Lawson *et al.*, 1990). Aquesta variabilitat regional suggereix que hi ha heterogeneïtat microglial depenent de la zona del cervell, tot i que encara no es coneix la natura molecular de aquestes diferències (Polazzi and Monti, 2010), es creu que la organització estructural del cervell, la proximitat a vasos i diferent ambient bioquímic poden donar diferents característiques regionals a la micròglia (Ransohoff and Perry, 2009). Per exemple, en un estudi recent de Van Weering van trobar que, en una lesió excitotòxica hipocampal, la sensibilitat neuronal en front a la mort depenia en la heterogeneïtat zonal de la micròglia, essent més vulnerable a la zona de la CA1 que a la zona de la CA3 (Van Weering *et al.*, 2011). A més, la morfologia pot variar depenent de la zona cerebral: a la substància grisa, la micròglia té un soma arrodonit i amb molts processos, mentre que a la substància blanca té un soma més ovalat i amb menys processos (Savchenko *et al.*, 2000), cosa que indica que l'activitat neuronal condiciona l'activitat microglial i, per tant, l'activació microglial serà diferent depenent de la zona cerebral (McKay *et al.*, 2007). Aquesta heterogeneïtat morfològica sembla correlacionar amb diferències en l'expressió de molècules que es pensava eren comunes a tota la micròglia i que s'han fet servir com a marcadors específics. Aquest és el cas dels grups de diferenciació 11b (CD11b), CD40, CD45, CD80 ó CD86; factors neurotròfics com el factor de creixement transformant β 1 (TGF- β 1) i citocines i quimiocines com ara els Ccl2, CXCR3 i CCR9 (Meeuwsen *et al.*, 2005; Olah *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2011).

Fa més d'una dècada, Georg Kreutzberg va crear el terme “sensor de patologia microglial” (Kreutzberg, 1996) per definir la funció principal de la micròglia en el teixit cerebral sa, on la micròglia fa de sensor del per avaluar l'estat del teixit (Raivich, 2005; Graeber and Streit, 2010). En aquestes condicions, la micròglia és l'encarregada de fagocitar les neurones apoptòtiques i el debris cel·lular (Neumann *et al.*, 2009).

A més, durant el desenvolupament post natal elimina l'excés de sinapsis que el cervell madur no podria mantenir (Tremblay *et al.*, 2011) i promou la sinaptogènesi mitjançant la producció local de factors neurotròfics (Elkabes *et al.*, 1996; Aarum *et al.*, 2003; Walton *et al.*, 2006; Bessis *et al.*, 2007).

La micròglia ramificada contacta amb les sinapsis neuronals actives i els astròcits (Wake *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2010; Fontainhas *et al.*, 2011), fet que suggereix que hi ha una interacció cèl·lula-cèl·lula entre la micròglia, la neurona i l'astròcit, i que pot respondre a l'estatus funcional de les sinapsis. (Schafer *et al.*, 2012). (Perea and

Araque, 2005; Araque, 2008; Perea *et al.*, 2009). La micròglia expressa una gran varietat de receptors de membrana, com els receptors de immunoglobulines Fc γ , l'antigen comú dels leucòcits (LCA), les glicoproteïnes de classe I com HLA-DR, DP i DQ, les de classe II com HLA-ABC, els *Toll-Like Receptors* (TLRs), el Complex Major d'Histocompatibilitat (MHC) i els receptors del complement com integrines β 2 (CD11a, b i c) (Kim and De Vellis, 2005; Block *et al.*, 2007). Segons l'estímul, la micròglia actua diferentment. Per exemple, hi ha autors que suggereixen que la micròglia s'activa diferencialment segons si l'estímul és una infecció o neuroinflamació (Sugama *et al.*, 2009). Però hi ha altres autors, com Schwartz, que proposen que hi ha diferents subpoblacions microgials, amb diferents fenotips, que reaccionen diferentment sota el mateix estímul (Schwartz *et al.*, 2006). Aquesta darrera hipòtesi explicaria perquè un mateix estímul provoca una resposta microglial tròfica o citotòxica.

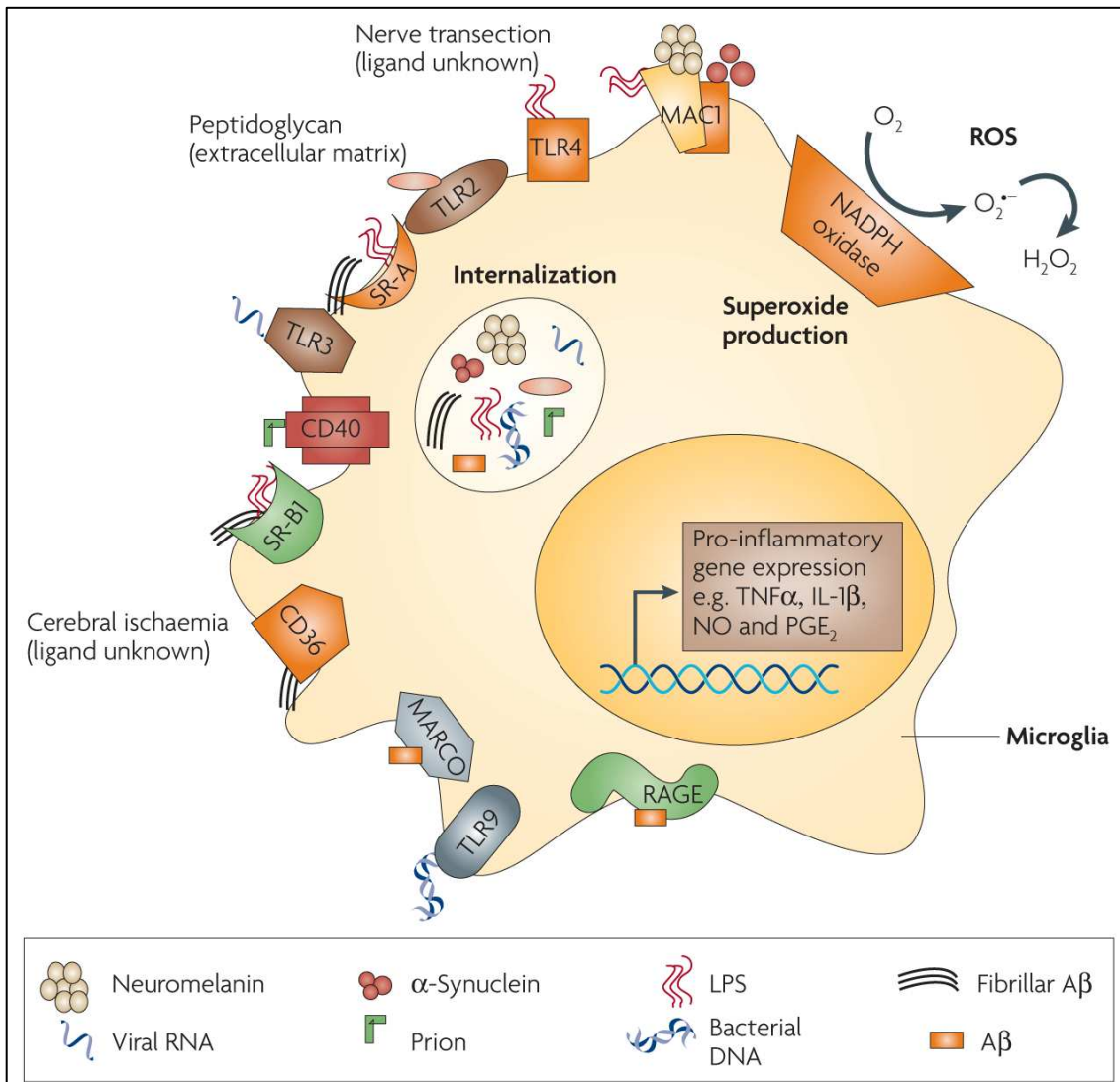


Figura 1.4: Els PRRs microglials identifiquen lligands neurotòxics i proinflamatoris. La microglia monitoritza l'ambient cerebral amb receptors de reconeixement de patrons (PRRs). Els PRRs són els responsables tant de moltes funcions fagocítiques com de la identificació de patògens, la producció de superòxid extracel·lular, l'alliberaments de compostos proinflamatoris i la retirada i la destrucció d'estímuls tòxics mitjançant la internalització i fagocitosis. La neurotoxicitat mediada per microglia ocorre a través dels PRRs quan els patrons moleculars associats a patògens (PAMPS) promouen una resposta immune excessiva, o quan l'estímul (toxines ambientals, proteïnes endògenes i dany neuronal) és mal interpretat a patògens, la NADPH oxidasa s'activa i es produeixen citocines proinflamatòries. La llista de lligands neurotròfics i proinflamatoris és extensa, i la investigació actual es troba centrada en la identificació d'aquells receptors implicats en la resposta microglial deletèria (sobre activació i inflamació) respecte les funcions de manteniment beneficioses (internalització). Donat que una sola senyal pot ser reconeguda per diversos PRRs, l'efecte acumulatiu de diverses combinacions de receptors definiria com respon la microglia a les neurotoxines i si l'activació és deletèria o beneficiosa. Aβ, β-amiloide; H₂O₂, peròxid d'hidrogen; IL-1β, interleukina 1β; LPS, lipopolisacàrid; MAC1, complex d'antígens de macròfag; MARCO, receptor de macròfag amn domini col·lagenós (receptor *escombriaire*); NO, òxid nítric; O₂⁻, superòxid; PGE₂, prostaglandina E₂; RAGE, receptor per la glicosilació avançada dels productes finals; ROS, espècies reactives d'oxigen; SR-A, receptor *escombriaire* tipus A; TLR2, receptor tipus *toll* 2; TNFα, factor de necrosis tumoral α. De: Block *et al.*, 2007.

1.3.2. La resposta microglial al dany

La resposta microglial davant una lesió o un estímul infeccios va ser descrita primerament com un procés estereotipat i gradual (Kreutzberg, 1996), però aquesta visió ha canviat en els darrers anys i ja no es considera la micròglia com un tipus cel·lular que es troba esperant a un estímul, sinó que és un sensor del microambient del SNC i un efector versàtil al SNC sa i patològic (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007).

La resposta microglial als estímuls pot ser de dos tipus: aguda, a la qual la micròglia en ser estimulada fagocita restes cel·lulars per recuperar després la seva activitat inicial; i crònica, la qual indueix un procés de reacció permanent, on la cèl·lula no torna mai al seu estat inicial (Figura 1.5). Aquesta activació microglial perllongada pot portar a una degeneració cel·lular que, en últim termini pot portar a la mort microglial (Liu and Hong, 2003).

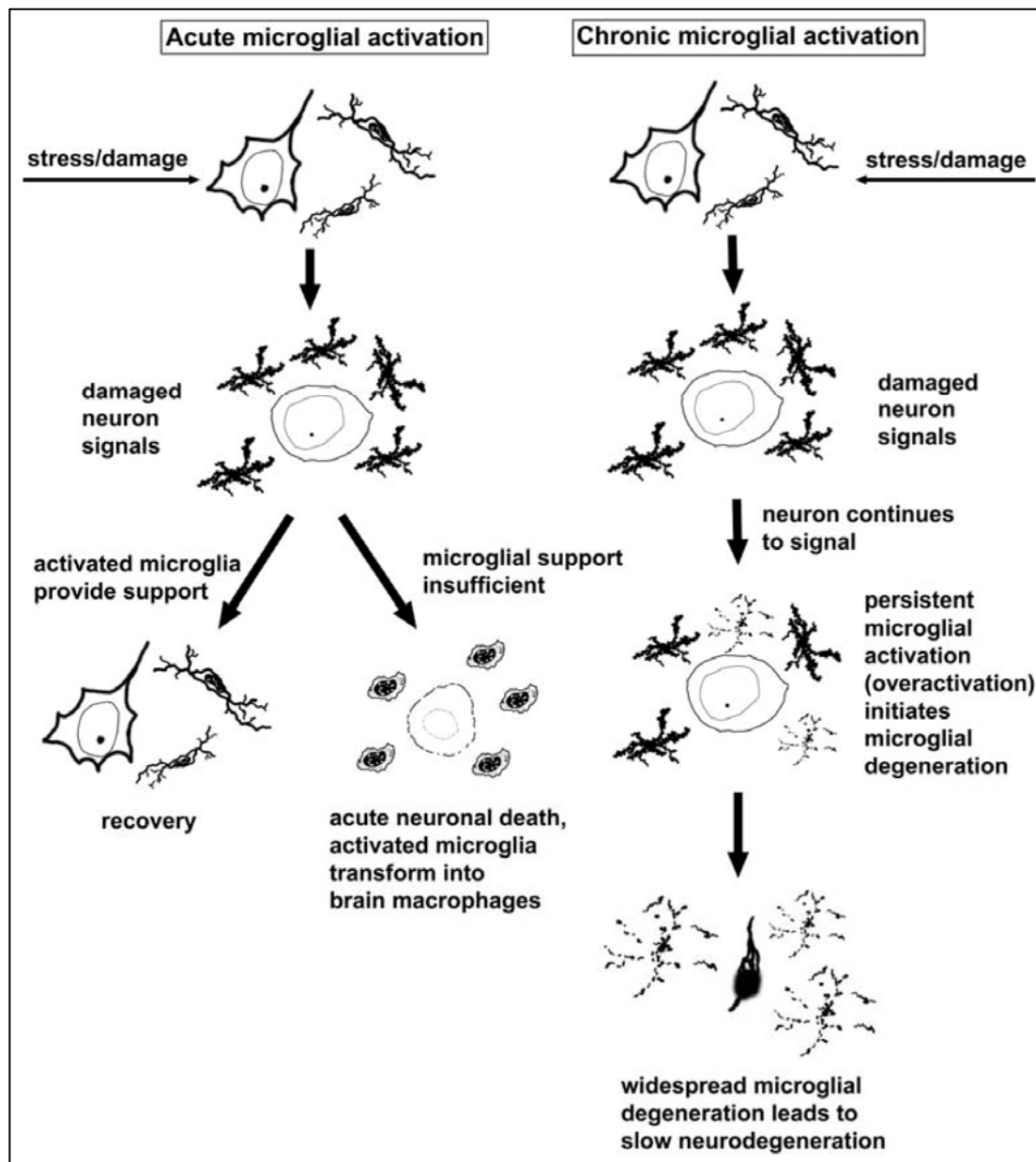


Figura 1.5: Visió actualitzada de la plasticitat funcional de la micròglia incloent les interaccions micròglia-neurona durant l'activació aguda i crònica. L'estímul inicial per a l'activació microglial són els senyals emesos per neurones danyades o estressades que diuen a les cèl·lules quiescents que es divideixin, incrementin la producció de citocines i factors de creixement, i canviïn la expressió antigènica de superfície. Aquest increment en la activitat microglial, reflectit en hipertròfia cel·lular, representa una neuroinflamació aguda que està dissenyada per portar a una recuperació neuronal. Si és un èxit, l'excés de cèl·lules microglials és eliminat mitjançant mort cel·lular programada. Si no és un èxit, la mort neuronal aguda promou la formació de la micròglia a un fenotip macròfag, que neteja el debris cel·lular. Una neuroinflamació crònica ocorre quan les neurones danyades continuen enviant senyals activadors que resulten en una activació microglial persistent. Aquesta sobre activació perllongada fa que part de la micròglia es torni senescent i tingui canvis degeneratius i eventualment porti a una degeneració microglial. Un cop un nombre crític de micròglia arriba a aquest estat, les neurones han perdut el suport microglial i segueixen un procés de neurodegeneració lenta, que es reflecteix morfològicament amb inclusions anormals (cossos de Lewis) i/o degeneració neurofibril·lar. De: Graeber and Streit, 2010.

A les cèl·lules microglials convergeixen múltiples senyals per a mantenir o alterar el seu estat, o per orquestrar el repertori específic d'accions de la micròglia reactiva (Hanisch and Kettenmann, 2007). Podem distingir entre dos tipus de senyals, anomenats senyals *on* i senyals *off*. Els senyals *on* indueixen una resposta de la micròglia, mentre que els senyals *off* mantenen la micròglia en un estat vigilant. La manca d'aquests senyals *off* també pot ser considerada com una senyal *on* (Biber *et al.*, 2007). No tots els senyals *on* activen la micròglia de manera que es torni citotòxica. Per exemple, la IL-10 és considerada una senyal *on* però inhibeix l'activació citotòxica microglial.

La natura bioquímica dels senyals *on* és molt diversa (Liu and Hong, 2003). Moltes són molècules alliberades pel teixit danyat, que fan que fins i tot les lesions més petites condueixin a una activació microglial ràpida (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Per exemple, la laminina i la neuromelanina són alliberades per les neurones o la proteïna S100 β pels astròcits després d'una lesió neuronal i activen una reacció microglial (Adami *et al.*, 2001). També, la micròglia, mitjançant múltiples receptors, detecta canvis en la concentració de neurotransmissors de forma que quan aquests estan per sobre dels nivells crítics poden indicar una funció neuronal alterada o excessiva que la micròglia pren com un signe de lesió (Haynes *et al.*, 2006). Aquests estímuls activen la capacitat fagocítica de la micròglia. Les neurones danyades que executen l'apoptosi, aquestes presenten a la membrana altes quantitats de fosfatidilserina que és reconeguda per la micròglia i desencadena el procés de fagocitosis (Zitvogel *et al.*, 2010). Certes lectines i integrines també promouen la fagocitosis (Witting *et al.*, 2000).

Hi ha casos en que la capacitat fagocítica de la micròglia es considera perjudicial, com ara a les malalties neurodegeneratives on la micròglia fagocita neurones que encara no estaven mortes ni morint (Nimmerjahn *et al.*, 2005). De fet, hi ha estudis que mostren que inhibint la activitat fagocítica de la micròglia s'inhibeix la mort neuronal en co-cultius primaris micròglia-neurona (Neher *et al.*, 2011). Però en general els autors associen la fagocitosis com una capacitat neuroprotectora, ja que cèl·lules microglials amb fenotip neuroprotector mantenen la capacitat fagocítica (Michelucci *et al.*, 2009).

La micròglia posseeix receptors AMPA i metabotròpics de glutamat, que permeten una comunicació neurona-micròglia en estats normals i de patologia (Noda *et al.*, 2000). L'activació dels receptors AMPA té un efecte final cel·lular en la producció de TNF α , molècula que activa altres cèl·lules microglials i astròcits, potenciant la capacitat citotòxica cel·lular (Hagino *et al.*, 2004). Una altra conseqüència de l'activació dels receptors AMPA és la quimiotaxis cap a llocs on hi ha molta concentració de glutamat,

per exemple, on hi ha una mort neuronal (Liu *et al.*, 2009). També s'ha demostrat *in vitro* que l'activació dels receptors AMPA per Glu pot activar cascades intracel·lulars que promouen l'alliberament de ATP (Liu *et al.*, 2006). Per una banda, l'activació dels mGlu de tipus II porta a un fenotip microglial neurotòxic (Taylor *et al.*, 2002), mentre que l'activació dels mGlu de tipus III porta a un fenotip més neuroprotector (Pocock and Kettenmann, 2007). Això demostra que el glutamat regula l'activació microglial (Liang *et al.*, 2010).

La micròglia és particularment sensible als canvis en el seu microambient i ràpidament s'activa en resposta a una infecció o lesió, estira els seus processos cap al focus, i seguidament es torna una cèl·lula mòbil que té capacitat migratòria (Davalos *et al.*, 2005; Ohsawa *et al.*, 2010), i usualment va acompanyada amb proliferació microglial (Hailer *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 2002). La heterogeneïtat zonal que hem descrit anteriorment i els diferents estadis i estímuls d'activació fan que hi hagi múltiples morfologies microglials. La

Figura 1. mostra que la micròglia quan està en un estat de repòs de vigilància i rep una senyal d'activació, es torna en una micròglia alertada que, amb els senyals adequats, pot transformar-se en una micròglia activada amb una orientació defensiva, que torna fàcilment a l'estat inicial (fenotip 1). L'aparició de senyals activadores, ó la desaparició de senyals calmants, i depenent de l'origen, la durada i la intensitat dels estímuls, poden portar a la micròglia a fenotips més citotòxics o de reparació (fenotips 2) i a fenotips més citotòxics però neurotòxics i que poden acabar també en mort microglial ó expansió per migració a altres teixits sans (fenotips 3). Aquestes cèl·lules microglials, un cop han complert la seva missió poden tornar a un estat post activat on poden haver canviat la manera en respondre a futurs estímuls (Hanisch and Kettenmann, 2007). Tots aquests estats de la micròglia tenen un fenotip diferenciat, per tant, observant el fenotip microglial es pot arribar a conèixer l'estat d'activació (Beynon and Walker 2012).

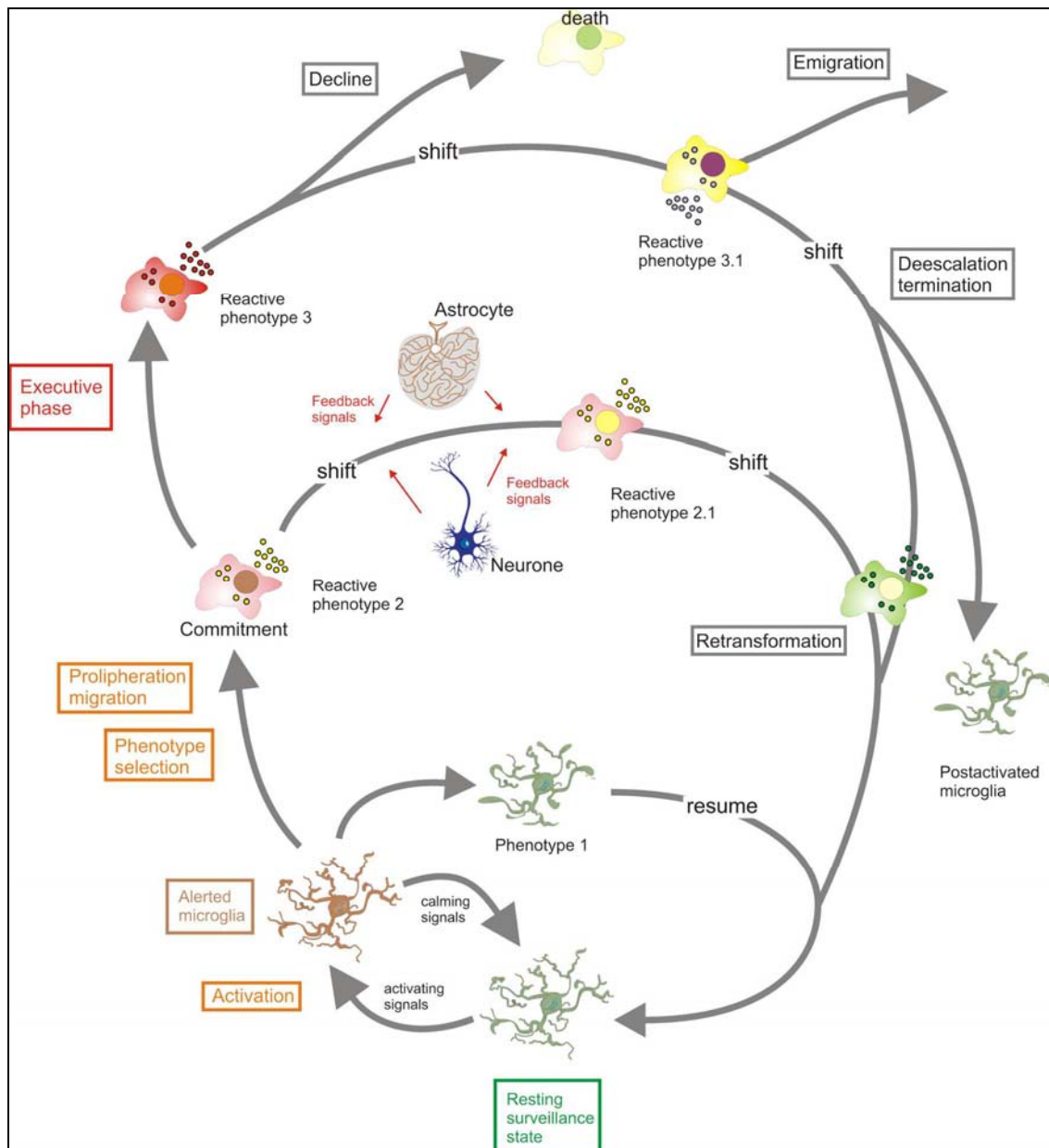


Figura 1.6: Estats de l'activitat microglial pels que passa en un procés d'activació microglial. La microglia en repòs es troba constantment escanejant el seu ambient, per tal de trobar senyals exògens o endògens que indiquen un trencament de la seva homeòstasis. L'aparició de senyals activadores ó la pèrdua de senyals inhibidores constitutives fan que la microglia passi de manera transitòria als estats d'alerta i d'activació. Les cèl·lules es comprometen a diferents fenotips reactius depenent de l'estímul i del context d'aquest. Les respostes inicials es poden intercanviar per altres influències. No només les cèl·lules immunes residents del SNC, sinó que les cèl·lules immune invasores poden exercir influències moduladores. Els fenotips reactius inicials amb orientació defensiva poden convertir-se a fenotips orientats a la reparació. Les cèl·lules poden tornar a un estat de repòs o quedar-se en un estat "experimentat". La microglia experimentada pot, però, tenir respostes diferents davant el mateix estímul. De: Kettenmann *et al.*, 2011.

Hi ha citocines que tenen un rol dual, com és el cas del TNF- α , que pot actuar com una citoquina proinflamatòria com una antiinflamatòria, depenent de la seva concentració en el espai extracel·lular i del receptor que activi. Actua a través dels receptors TNFR1 i TNFR2, activant funcions microgials con la resposta inflamatòria, la proliferació i la producció de ROS (MacEwan, 2002).

Altres citocines també regulen la proliferació microglial *in vitro*, com la IL-1 β (Ganter *et al.*, 1992), la IL-4 (Suzumura *et al.*, 1994), el IFN- γ (Fischer *et al.*, 1993; Xiao *et al.*, 1996) i, sobre tot, els CSF (factors estimulants de la colònia): M-CSF (CSF de macròfag) i GM-CSF (CSF de macròfag granulòcit) (Suzumura *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994; Zhang and Fedoroff, 1998).

La micròglia també allibera quimiocines, molècules involucrades en processos inflamatoris on la seva funció principal és la de quimioattractants i activadors de certs tipus cel·lulars, com els limfòcits T, B i les cèl·lules dendrítiques, als llocs d'inflamació (Rossi and Zlotnik, 2000). Les quimiocines es poden trobar al SNC durant el desenvolupament i durant una patologia, principalment amb la funció de mediar la infiltració de leucòcits en resposta a malalties del SNC (De Groot and Woodroffe, 2001). Estan relacionades amb malalties que cursen amb neuroinflamació, com MS, demència associada a HIV, isquèmia, TBI i tumors (Limatola *et al.*, 2005). D'altra banda, també tenen funcions tròfiques i neuroprotectores al SNC. Per exemple, la fractalkina ó CX₃CL1 és una quimioquina el receptor de la qual és expressat tant per neurones com per micròglia, i media la comunicació micròglia-neurona, unió que suprimeix la capacitat citotòxica de la micròglia (Mizuno *et al.*, 2003; Cardona *et al.*, 2006).

La micròglia reactiva també secreta òxid nítric, produït per l'acció de la iNOS (òxid nítric sintasa induïble). Aquesta es pot induir sota efecte de quimiocines ó de LPS. Des de fa dècades s'ha relacionat un excés de NO amb la mort neuronal (Chao *et al.*, 1992) i dels oligodendròcits (Merrill *et al.*, 1993), i que el NO es troba implicat en moltes malalties neurodegeneratives, com AD, PD, MS i isquèmies (Brosnan *et al.*, 1994).

1.3.3. Microgliosi, citotoxicitat i neuroinflamació

Una activació perllongada de la microglia porta a un procés anomenat microgliosi reactiva, que pot esdevenir crònica (Figura 1.7).

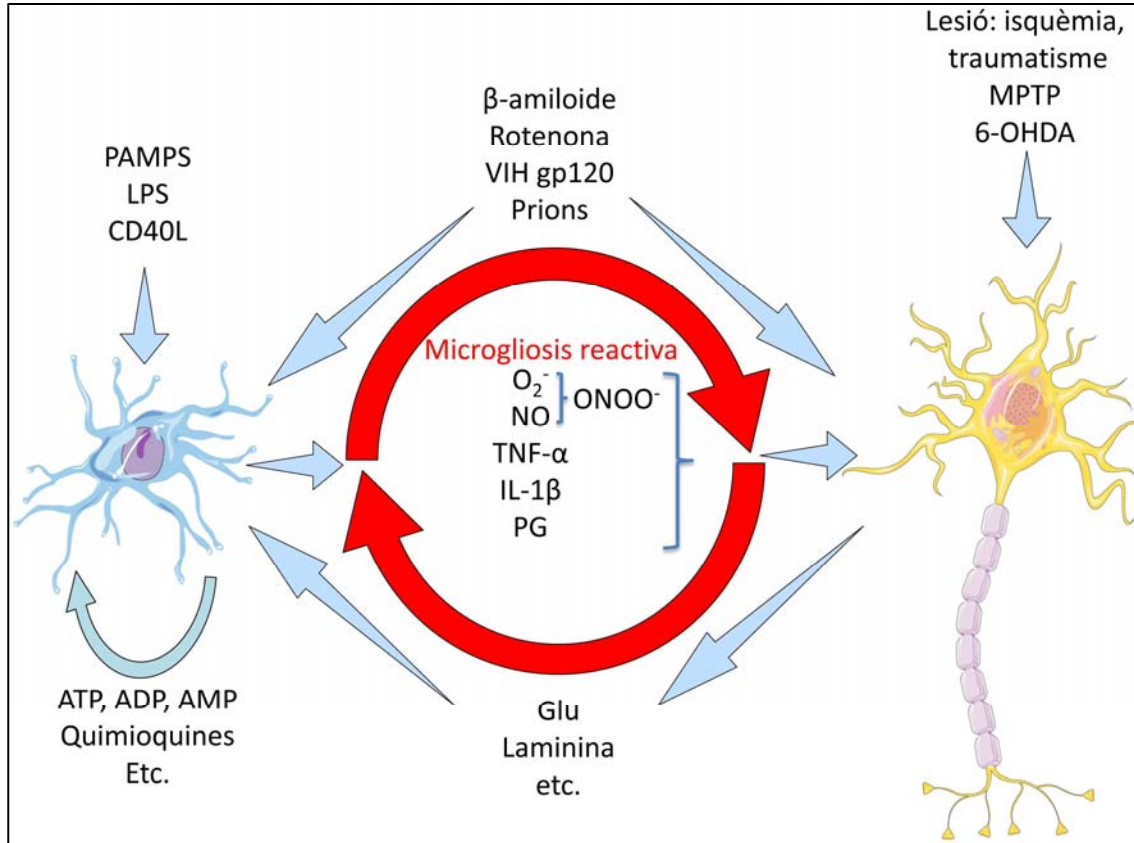


Figura 1.7: Microgliosi reactiva. L'activació perllongada de les cèl·lules microgials per parts de les molècules senyalitzadores fan que la microglia secreti citocines i factors proinflamatoris que, a la seva vegada, mata més neurones, que generen a la seva vegada més molècules que activen la microglia. Interleuquina 1 β , IL-1 β ; Lligand del grup de diferenciació 40, CD40L; Glutamat, Glu; 6-Hidroxidopamina, 6-OHDA; Lipopolisacàrid, LPS; 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPTP; Òxid nítric, NO; O_2^- , superòxid; Patrons moleculars associats a patògens, PAMPS; Proteïna de superfície 120 del VIH, VIH gp120; Prostaglandines, PG; Factor de necrosi tumoral α , TNF- α . Adaptat de Block et al., 2007.

Aquesta microgliosi reactiva ve acompanyada amb la neuroinflamació, que participa en els processos crònics de les malalties neurodegeneratives (Ortega *et al.*, 2011).

Les accions beneficioses i perjudicials de la microglia reactiva s'han descrit en moltes malalties neurodegeneratives, incloent la AD (González-Scarano and Baltuch, 1999). La microglia genera citocines i molècules proinflamatòries (fenotip M1) i presenta activitat fagocítica i allibera molècules neuroprotectores com la fractalkina (fenotip M2) (Mizuno, 2012). Hi ha un patró temporal en el fenotip microglial durant una lesió: primerament la microglia té un fenotip neuroprotector amb l'objectiu de preservar la

integritat de les neurones sanes, mentre que quan es va cronificant la malaltia es produeix una sobreactivació microglial que contribueix a la neuropatologia (Streit and Xue, 2009). Aquest fet junt amb la presència de més molècules citotòxiques que neurotròfiques que impedeixen la regeneració axonal propicien hi ha una progressió de la malaltia que fa que el fenotip neurotòxic adquireixi predominança en aquesta microglia reactiva (Schnell *et al.*, 1999). En casos de sobreexposició descontrolada als estímuls (Block *et al.*, 2007), o quan la funció microglial es troba desregulada, com en el cas del cervell senescent (Streit *et al.*, 2004; Streit, 2006), la microglia pot tornar-se en un fenotip netament neurotòxic, que causa una neuroinflamació. Múltiples evidències suggereixen que la microglia és el principal productor de citocines durant la neuroinflamació, i que la sobreproducció de citocines proinflamatòries contribueix a les malalties neurodegeneratives. De fet, gràcies a aquestes la microglia té un rol important en la iniciació i la progressió de les malalties neurodegeneratives (Kim and de Vellis, 2005).

La neuroinflamació és comú a totes les malalties neurodegeneratives cròniques i ve mediada principalment per la microglia. El paper de la microglia a la lesió primerenca és un intent de restauració del teixit. Amb el temps aquesta microglia reactiva canvia el seu fenotip a un més neuroinflamatori causant una microgliosi citotòxica. Després d'una lesió al SNC, la microglia s'activa canviant la seva morfologia i regulant la expressió de molècules de membrana i la producció de citocines. A més, hi ha reclutament, proliferació i activació de precursors microglials que venen de la sang i també infiltració de leucòcits, macròfags i limfòcits. Les cèl·lules T que s'infilten influeixen les respostes pro i antiinflamatòries de la microglia, afectant, doncs, les seves propietats de cèl·lula presentadors d'antigen (APC) i la capacitat fagocítica (Vidal-Taboada *et al.*, 2011).

La microglia no és la única cèl·lula resident del cervell que causa neuroinflamació: els astròcits i les cèl·lules endotelials estan també involucrades amb la secreció de citocines, quimiocines i factors tròfics o neurotòxics (Ortega *et al.*, 2011).

L'astrogliosi és una reacció cel·lular dels astròcits en resposta a varis tipus de patologies al SNC, amb característiques estructurals, com un eixamplament del soma i augment de prolongacions (Pekny and Nilsson, 2005). L'astròcit reactiu secreta diferents factors tròfics, citoquines i quimioquines i transmissors com el glutamat (Zhang *et al.*, 2010) que generen senyals locals per a comunicar-se amb les neurones. Aquestes senyals influeixen en la integritat del teixit durant la neurodegeneració (Allaman *et al.*, 2011).

Els astròcits a més influeixen sobre la activitat microglial, ja sigui sota una infecció (Ovanesov *et al.*, 2008) com en patologies com la MS (Tanuma *et al.*, 2006), fent que participin en el manteniment d'una la microgliosi reactiva crònica mitjançant la secreció de TNF α (Kuno *et al.*, 2005; Suzumura *et al.*, 2006). Depenent de la seva concentració el TNF α pot induir una activació tant citotòxica com neuroprotectora. Per tant, el paper de les funcions tròfiques, neuroprotectores, inflammatòries i citotòxiques de la microglia i els astròcits en la lesió aguda o crònica al SNC condiciona de forma important l'evolució de les malalties neurodegeneratives.

La resposta microglial davant una lesió no és només neurotòxica. S'ha demostrat nombrosos efectes neuroprotectors de la microglia, tant *in vivo* (El Khoury *et al.*, 1998; Boillée *et al.*, 2006; Turrin and Rivest, 2006; Rogers *et al.*, 2011; Bohacek *et al.*, 2012) com *in vitro* (Jiang *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012). De fet, s'ha demostrat que la ablació selectiva de la microglia durant una malaltia neurodegenerativa (Gowing *et al.*, 2006; Lalancette-Hébert *et al.*, 2007) ó una lesió excitotòxica (Kohl *et al.*, 2003; Marín-Teva *et al.*, 2004; Heppner *et al.*, 2005; Markovic *et al.*, 2005; Vinet *et al.*, 2012) no fa sinó empitjorar i accelerar la progressió de la mateixa.

A més, la microglia secreta factors neurotròfics o factors de supervivència neuronals davant una lesió (Nakajima and Kohsaka, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Kraft and Harry, 2011) i que poden potenciar la neurogènesi (Aarum *et al.*, 2003). Els factors neurotròfics que s'han trobat a medis condicionats microglials han estat el factor de creixement neural (NGF) (Heese *et al.*, 1997), la neurotrofina (NT) 3 (Elkabes *et al.*, 1996), el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) (Miwa *et al.*, 1997; Elkabes *et al.*, 1998), el factor de creixement dels fibroblasts bàsic (bFGF) (Shimojo *et al.*, 1991; Presta *et al.*, 1995; Polikov *et al.*, 2009; Niidome *et al.*, 2009), el factor de creixement dels hepatòcits (HGF) (Di Renzo *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1995; Badie *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Lalive *et al.*, 2005) i el plasminogen (Nakajima *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2012). També s'ha trobat augment de aquests factors neurotròfics *in vivo*. Per exemple, en el model d'isquèmia de tMCAO hi ha un augment de TGF- β , IGF-1, el TNF- α i el BDNF que són secretats per microglia (Lehrmann *et al.*, 1998; Lalancette-Hébert *et al.*, 2007; Madinier *et al.*, 2009). La microglia també secreta citocines i quimiocines neuroprotectores, com és el cas de la fractalkina ó CX₃CL1, que és capaç de protegir les neurones davant un estímul excitotòxic (Limatola *et al.*, 2005).

1.4. MICRÒGLIA I NEUROGÈNESI

La neurogènesi és el procés mitjançant el qual es generen neurones a partir de cèl·lules mare neuronals (NSC) i cèl·lules progenitores. Es duu a terme majoritàriament durant el desenvolupament embrionari i persisteix fins a la adolescència (Cheung *et al.*, 2007; Fietz *et al.*, 2010). Però també s'ha descrit que persisteix a la edat adulta desde uns nínxols concrets (Anderson and Waxman, 1985; Lois and Alvarez-Buylla, 1993).

Les NSCs tenen tres propietats: la d'auto-renovació, la de multipotencialitat: aquests progenitors es poden diferenciar en neurones i en glia (Lois and Alvarez-Buylla, 1993), i la de quiescència, poden mantenir-se fora de cicle esperant una senyal.

Es creu que la natura d'aquestes cèl·lules mare és glial, per tant se les anomena “glia radial” (Garcia *et al.*, 2004; Spassky *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2010).

1.4.1. La neurogènesi al cervell adult

La neurogènesi persisteix a la edat adulta a partir de les cèl·lules mare neuronals i les cèl·lules progenitores que resideixen a la zona subgranular (SGZ) del gir dentat (DG) de l'hipocamp i la zona subventricular (SVZ), a la paret dels ventricles laterals (McKay, 1997; Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Als rosegadors, aquestes cèl·lules donen lloc a neurones funcionalment madures de les capes del DG i a cèl·lules del bulb olfatori, després de varis passos de desenvolupament i presentant diferents fenotips (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; van Praag *et al.*, 2002; Carleton *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2007).

La neurogènesi a l'hipocamp adult en condicions normals es deu a la incorporació de noves neurones als circuits implicats en la memòria i l'aprenentatge, funció bàsica de l'hipocamp (Brüel-Jungferman *et al.*, 2007). L'hipocamp forma part del sistema límbic del cervell, i té un rol important en la consolidació de la memòria a curt termini a memòria a llarg termini, així com participar de l'orientació espacial.

Concretament, la neurogènesi es realitza a la zona subgranular (SGZ) del gir dentat (DG), una capa fins de cèl·lules que resideix entre la capa granular i l'hilus (Figura 1.8).

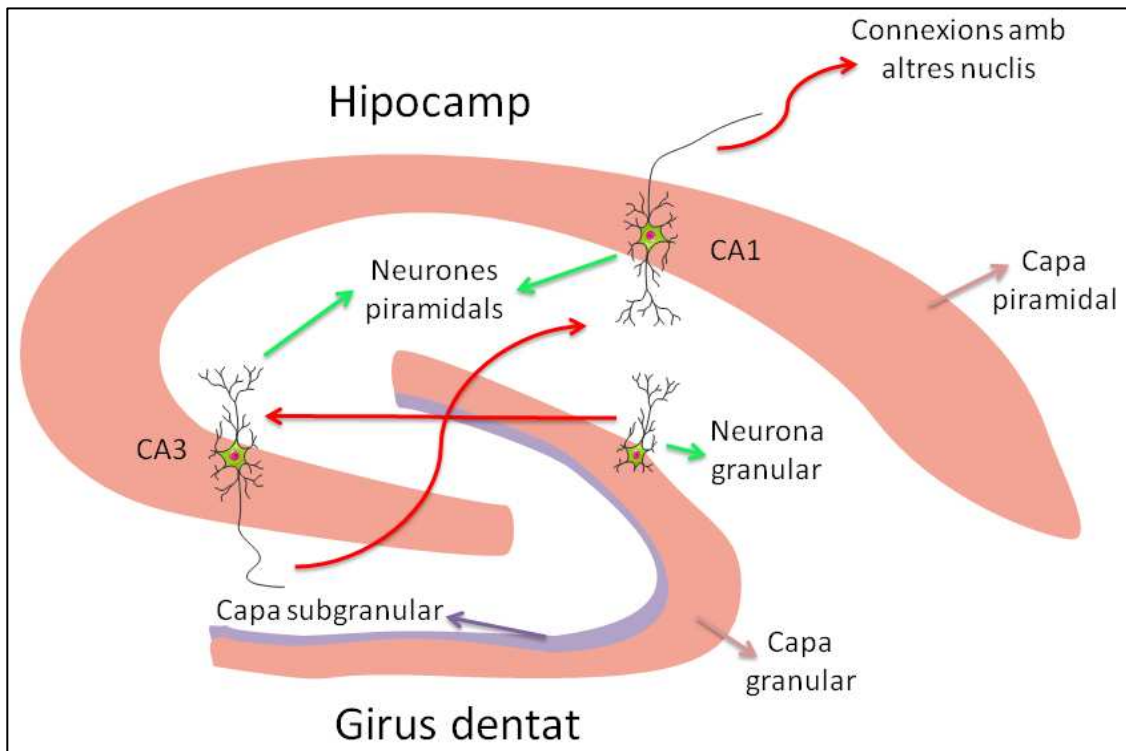


Figura 1.8: Esquema de la formació hipocampal d'un rosegador, amb les seves capes principals. Les fletxes vermelles assenyalen les connexions neuronals entre capes.

A l'hipocamp, aquests progenitors són plàstics, proliferen en resposta a certs senyals del microambient encara per aclarir i migren fins al seu destí per a diferenciar-se a neurones i glia (Kempermann *et al.*, 2004; Rando, 2006; Ehninger and Kempermann, 2008; Jessberger *et al.*, 2008). En allà, aquestes noves neurones envien connexions a la regió més proximal de la capa piramidal CA3 i o bé s'integren al circuit o bé degeneren (Gould *et al.*, 1997; Lledo *et al.*, 2006).

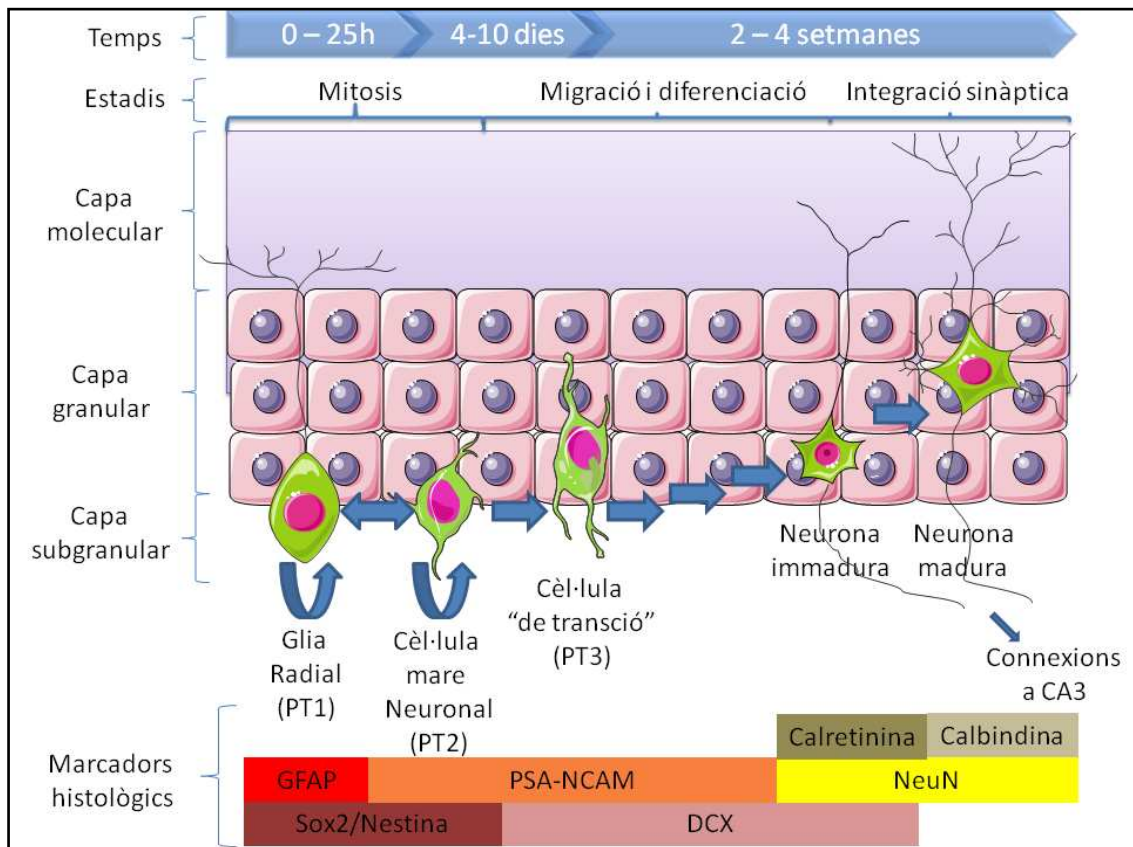


Figura 1.9: Esquema de la neurogènesi a l'hipocamp adult a rosegadors, on es mostra el temps en què una neurona es forma, els estadis, els tipus cel·lulars i els marcadors histològics per a diferenciar els estadis. PT1-3: Precursor tipus 1 a 3.

Els precursors neuronals es troben a la capa subgranular, i tots ells tenen una naturalesa glial (expressen marcadors astrocítics com GFAP, Sox2 i nestina) (Goldman, 2003; Alvarez-Buylla *et al.*, 2008). N'hi ha de tres tipus, que es diferencien per la combinació de marcadors, per la morfologia i per l'estat cel·lular. El precursor tipus 1 (PT1) comparteix les característiques de la glia radial, però mostra marcadors de llinatge neuronal, com la molècula d'adhesió cel·lular neural amb àcid polisiàlic (PSA-NCAM) i amb la regulació adequada pot convertir-se en un neuroblast (cèl·lula PT2). Les cèl·lules PT2 poden transformar-se en un PT3, ó neuroblast de transició, que es troba en procés de diferenciació i no pot tornar a desdiferenciar-se. Expressa també doblecortina (DCX) un altre marcador del llinatge neural (Ehninger and Kempermann, 2008). Aquesta cèl·lula va madurant, migrant i diferenciant-se al llarg del temps fins a convertir-se en neurones immadures, que ja tenen la capacitat de formar connexions amb les neurones de la capa CA3 (Eriksson *et al.*, 1998), i generen espines dendrítiques (Zhao *et al.*, 2006). Les neurones immadures expressen alguns marcadors de neurona madura, com ara la proteïna NeuN, però poden ser discriminades de les funcionalment

madures per la manca d'expressió de calretinina. Aquestes cèl·lules finalment maduren fins a neurones i poden ser reconegudes amb el marcador calbindina. Però fins a que no passen un parell de mesos d'ençà que són neurones madures, no comencen a rebre estímuls (Tozuka *et al.*, 2005; Toni *et al.*, 2007).

A banda de l'importància del bagatge genètic cel·lular que determinarà el procés de neurogènesi (Kempermann *et al.*, 1997b), la generació i la supervivència d'aquestes noves neurones a l'hipocamp es deu en part a factors estimulants, com un ambient enriquit (Kempermann *et al.*, 1997a), aprenentatge (Gould *et al.*, 1999; Leuner *et al.*, 2006) i exercici físic (Van Praag *et al.* 1999). Des del punt de vista molecular, els neuroblasts reben diferents estímuls sinàptics per a la diferenciació i la maduració. Sembla ser que el principal estímulo sinàptic que reben és GABAèrgic (Tozuka *et al.*, 2005).

Les cèl·lules endotelials i els astròcits també regulen la neurogènesi amb la producció de molècules com els factors de creixement derivat del cervell, l'insulínic, el fibroblàstic i l'ependimal (BDNF, IGF, FGF i EGF, respectivament) (Doetsch, 2003). Els nínxols neurogènics estan altament vascularitzats, de manera que es pensa que part de la regulació neurogènica hipocampal pot venir dels vasos sanguinis, amb regulació perifèrica (Palmer *et al.*, 2000). Un dels factors que estimulen la neurogènesi és el factor de creixement vascular endotelial (VEGF) (Jin *et al.*, 2002; Schänzer *et al.*, 2004).

Finalment, la neurogènesi també ve regulada pels estímuls sensorials i pels neurotransmissors, tant clàssics, com per acetilcolina, glutamat, etc. com altres, com el NO (Kempermann, 2002).

La neurogènesi es veu reduïda amb l'edat i l'envelliment (Kuhn *et al.*, 1996), segurament degut a canvis hormonals, com l'augment en corticosteroides (Cameron and Gould, 1994; Cameron and McKay, 1999; Boku *et al.*, 2010). Altres hormones augmenten la capacitat neurogènica, com els estrògens (Kareva *et al.*, 2012). L'estrès físic i fisiològic també redueixen la neurogènesi, segurament també degut a canvis hormonals (Cameron and Gould, 1994).

1.4.2. La neurogènesi associada a la lesió del Sistema Nerviós Central

Hi ha evidències que la neurogènesi és estimulada després de lesions cerebrals com ara l'isquèmia (Kokaia and Lindvall, 2003; Liu *et al.*, 2007), l'atac d'apoplexia (Ekdahl *et al.*, 2003), l'ablació cortical (Magavi *et al.*, 2000) i diferents tipus de lesió cerebral traumàtica (TBI) (Xiong *et al.*, 2010). També s'ha proposat que pot haver-hi infiltració de cèl·lules mare perifèriques en models de isquèmia a partir dels vasos sanguinis (Zhang *et al.*, 2004). A més, alguns autors suggereixen que aquestes noves cèl·lules tenen la capacitat de migrar a les zones del cervell lesionades i diferenciar-se al tipus cel·lular corresponent (Magavi *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Arvidsson *et al.*, 2002). També s'ha trobat neurogènesi en malalties del CNS, com a la malaltia d'Alzheimer (AD) (Jin *et al.*, 2004), la Corea de Huntington (HD) o la malaltia de Parkinson (PD) (Curtis *et al.*, 2003).

S'ha proposat que la funció de la neurogènesi en aquestes condicions és la de suplir les funcions de les neurones que han mort (Parent, 2003). Tot i el potencial neurogènic, el nombre de cèl·lules que han migrat es diferencien i s'integren al circuit és molt baix, i d'aquestes les que sobreviuen és encara més baix (Arvidsson *et al.*, 2002; Parent *et al.*; 2002). Per tant, a la zona lesionada hi ha unes condicions de manca de senyals tròfics, d'excés de senyals inhibidores o un excés de molècules neurotòxiques que impedeixen la supervivència de les noves neurones (Romero-Grimaldi *et al.* 2006). A més, la presència de la anomenada cicatriu glial també és un element inhibidor del procés de regeneració (Fawcett and Asher, 1999).

1.4.1. La reacció microglial i la neurogènesi

Estudis recents donen a la micròglia un paper important en la neurogènesi induïda per una lesió, tot i que la seva funció és dual: mentre que hi ha factors que alliberen la micròglia que poden estimular la neurogènesi, sobretot en la fase aguda de la malaltia, almenys en els primers estadis, la neuroinflamació sempre acaba creant un ambient que és negatiu per a la supervivència de les noves neurones (Block *et al.*, 2007; Das and Basu, 2008; Ekdahl *et al.*, 2009). Múltiples estudis apunten que la micròglia és capaç de secretar factors neurotròfics que potencien la migració i la diferenciació de les cèl·lules mare neuronals *in vitro* (Aarum *et al.*, 2003; Battista *et al.*, 2006; Ekdahl, 2012). A més, estudis *in vitro* mostren que la neurogènesi varia segons si la micròglia està activada en condicions proinflamàtores o no (Butovsky *et al.*, 2006; Olah *et al.*, 2009). Per tant,

s'ha proposat que modulant l'activitat microglial es pot modular el procés de neurogènesi (Kim and de Vellis, 2005).

D'altra banda, estudis recents en ratolins mostren que les pròpies NPC poden modificar la activitat microglial, a més de la seva reproducció i la capacitat fagocítica, a través de la secreció de factors tròfics, jugant un paper en la integritat del teixit (Mosher *et al.*, 2012).

Quadre 2: Mecanismes per a estudiar la neurogènesi *in vivo*

Introducció d'anàlegs de nucleòtids

A la introducció d'anàlegs de nucleòtids durant la divisió cel·lular (fase S del cicle cel·lular) les cèl·lules que estiguin proliferant durant la injecció d'aquests anàlegs quedaran marcades. N'hi ha de dos tipus: la timidina tritiada, que requereix detecció per autoradiografia (Altman and Das, 1965; Rogers, 1973) i la 5-bromo-2'-deoxiuridina ó BrdU, que es pot detectar per immunohistoquímica (Del Rio and Soriano, 1989).

Marcatge genètic per retrovirus

Al marcatge genètic per retrovirus el virus entra al nucli durant la fase M del cicle cel·lular i s'integra, integrant també un gen *reporter* com la proteïna GFP, que marca fluorescentment totes les cèl·lules que han proliferat en una finestra de temps (Price and Thurlow, 1988).

Expressió de marcadors específics

Les neurones en desenvolupament expressen diferents marcadors segons l'estadi de maduració (Figura 1.). Per tant, estudis d'immunohistoquímica amb els marcadors histològics adequats i un marcador del llinatge cel·lular (per exemple, per diferenciar neurones i glia) ens permet estudiar la neurogènesi *in vivo*.

1.5. EL CANAL K_{ATP}

1.5.1. Canals iònics a la micròglia

La micròglia no activada en cultiu presenta un potencial de membrana de -50 mV (Kettenmann *et al.*, 1990; Nörenberg *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1998). Quan aquestes cèl·lules s'activen amb LPS el potencial de membrana varia fins a -70 mV, segurament per la presència de canals iònics rectificadors per entrada (Chung *et al.*, 1999).

Estudis fets en rodanxes de cervell mostren que la micròglia no activada té un potencial de membrana molt baix, de -20 mV a rates joves (Boucsein *et al.*, 2000) i de -52 i -29 mV a rates adultes (Boucsein *et al.*, 2003). On s'ha trobat una veritable activitat de membrana és durant el desenvolupament post natal, quan hi ha la invasió microglial. La micròglia presenta una morfologia ameboide mentre migra, i aquesta presenta corrents de membrana de K^+ (Brockhaus *et al.*, 1993). Les cèl·lules microglijals no activades no presenten corrents de K^+ *in vivo*, però si quan hi ha una activació microglial deguda a l'axotomia del nervi facial (Boucsein *et al.*, 2000). Per tant la micròglia presenta corrents iònics a través de canals de membrana (Färber and Kettenmann, 2005), els quals permeten respondre a una velocitat elevada a pertorbacions en el microambient, normalment augmentant l'entrada de calci, per a respondre intracel·lularment amb una modificació enzimàtica (Walz and Bekar, 2001). També, l'activació *in vitro* amb LPS de cèl·lules microglijals porta a increments de la concentració de calci intracel·lular ($[Ca^{2+}]_i$), la qual contribueix en part a la secreció de citocines proinflamatòries i NO. Per tant, aquesta elevació de la $[Ca^{2+}]_i$ pot jugar un rol central en la regulació d'algunes funcions de la micròglia activada (Hoffmann *et al.*, 2003).

1.5.2. Estructura del canal K_{ATP}

El canal de potassi dependent de ATP (K_{ATP}) és un canal que acobla el potencial de membrana al metabolisme cel·lular, tal i com s'ha demostrat en molts tipus cel·lulars, com les cèl·lules β -pancreàtiques regulant la secreció d'insulina; la regulació del to muscular dels vasos sanguinis, i la regulació de la excitabilitat a neurones i a múscul esquelètic (Suzuki *et al.*, 2001; Rodrigo and Standen, 2005). La inhibició del canal K_{ATP} per part de l'ATP i l'activació per part de nucleòtids difosfat són els que permeten que l'estat metabòlic de la cèl·lula controli el potencial de membrana i la excitabilitat

cel·lular. A més, hi ha estudis que suggereixen que l'activació del canal K_{ATP} com a resultat d'un estrès metabòlic, com la isquèmia i la hipòxia, protegeixen el múscul, el cor i, fins i tot, el cervell (Aziz *et al.*, 2011).

El canal K_{ATP} és un canal format per dos subunitats diferenciades: el canal de potassi Kir, format per quatre subunitats de la subfamília Kir6.x (Kir6.1 i Kir6.2), i quatre subunitats reguladores, receptors de sulfonilurees (SUR1, SUR2A i SUR2B) que pertanyen a la superfamília de proteïnes d'unió a ATP, cadascuna unida a cada subunitat Kir. El canal es troba actiu quan hi ha subunitats SUR unides a subunitats Kir (Babenko *et al.*, 1998). L'estructura final del canal K_{ATP} consta d'un hetero-octàmer format d'un homotetràmer de quatre subunitats Kir embolcallades de quatre subunitats Kir.

L'assemblatge d'una subunitat formadora de porus amb una subunitat reguladora particular genera canals amb diferents propietats electroquímiques, sensitivitat a nucleòtids i propietats farmacològiques (Mikhailov *et al.*, 2000).

La subunitat SUR presenta uns dominis d'unió a nucleòtids (NBD) els quals, a banda de ser els llocs d'unió d'aquests són els que permeten l'assemblatge amb la subunitat Kir (Figura 1.0A).

La subunitat SUR està formada per un complex de cinc dominis transmembrana i dos complexos de sis dominis transmembrana cadascun, i els *loops* o llaços intracel·lulars que uneixen aquests complexos són els que contenen els NBD. Però també hi ha llaços que uneixen els dominis transmembrana dins de cada complex, i és a certs dominis concrets on es poden unir fàrmacs específics ó sulfonilurees (Mikhailov *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2003). La subunitat Kir està composta per dos dominis transmembrana lligats entre si per un llaç extracel·lular (P loop), amb els segments carboxi i amino-terminals a l'interior de la cèl·lula (Shi *et al.*, 2005). Es creu que té una unió física amb la subunitat SUR, entre l'extrem C-terminal de SUR i el N-terminal de Kir, formant un enllaç peptídic (Mikhailov *et al.*, 2005)(Figura 1.10B).

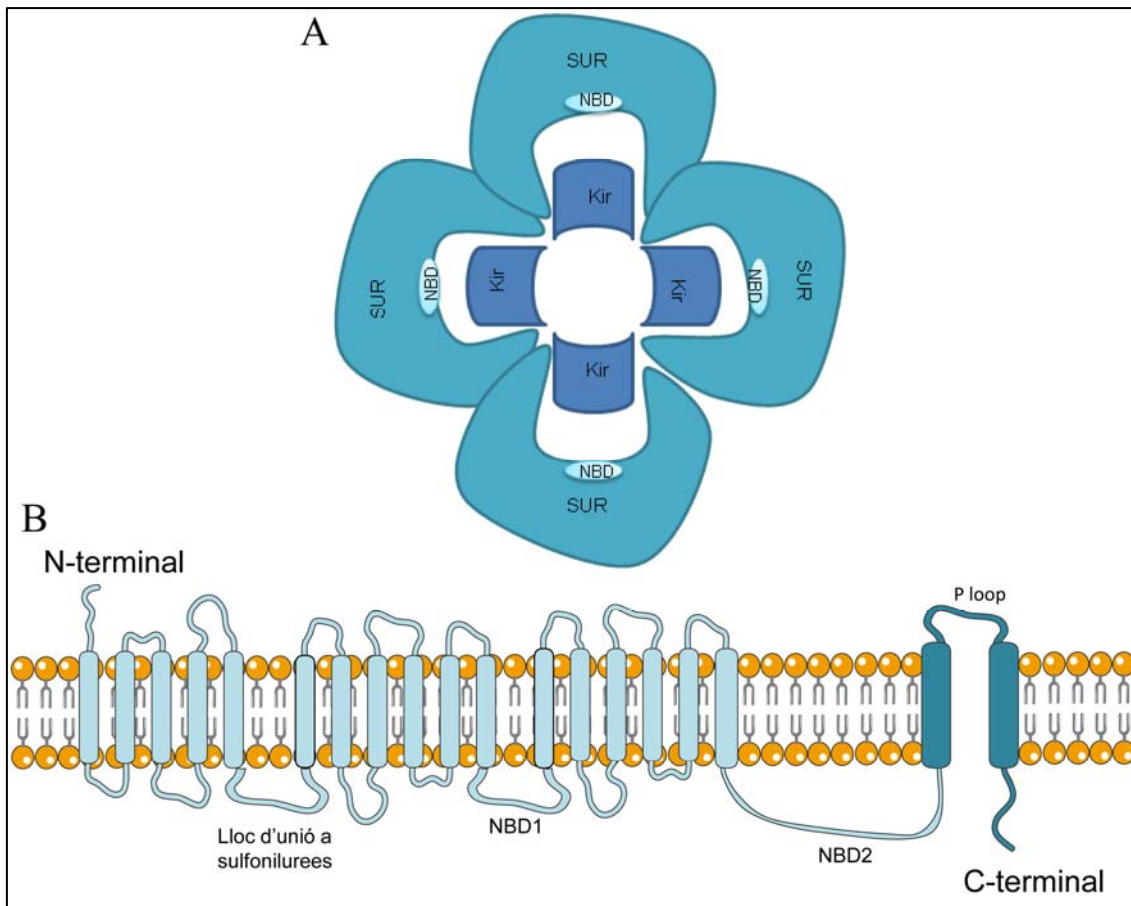


Figura 1.10: Interaccions entre les subunitats Kir i SUR del canal K_{ATP} . (A) Esquema de l'assemblatge del canal K_{ATP} vist des de dalt. Les quatre subunitats Kir es troben embotellades de les quatre subunitats SUR. En la interfase, es troben els NBD. (B) Estructura i esquema de la unió entre la subunitat SUR (blau clar) i la subunitat Kir (blau fosc), i dels llocs d'unió a sulfonilurees i nucleòtids. NBD: dominis d'unió a nucleòtids.

1.5.3. Rellevància funcional del canal K_{ATP} a la cèl·lula

Els principals reguladors de l'activitat del canal K_{ATP} són l'ATP i l'ADP. L'ATP, en absència de ió Mg^{2+} , redueix l'obertura del porus, mentre que l'ADP, en presència de Mg^{2+} , estimula l'obertura del canal. La figura 1.14 ens mostra el mecanisme: L'ATP, en unió amb la subunitat Kir, pot canviar la conformació del canal de manera que el porus es fa més petit i es tanca. També pot mantenir-se unit a la subunitat SUR en forma de MgATP, de manera que la seva hidròlisis provoca la obertura del porus, i la unió de MgADP manté aquesta conformació oberta (Nichols, 2006; Craig *et al.*, 2008).

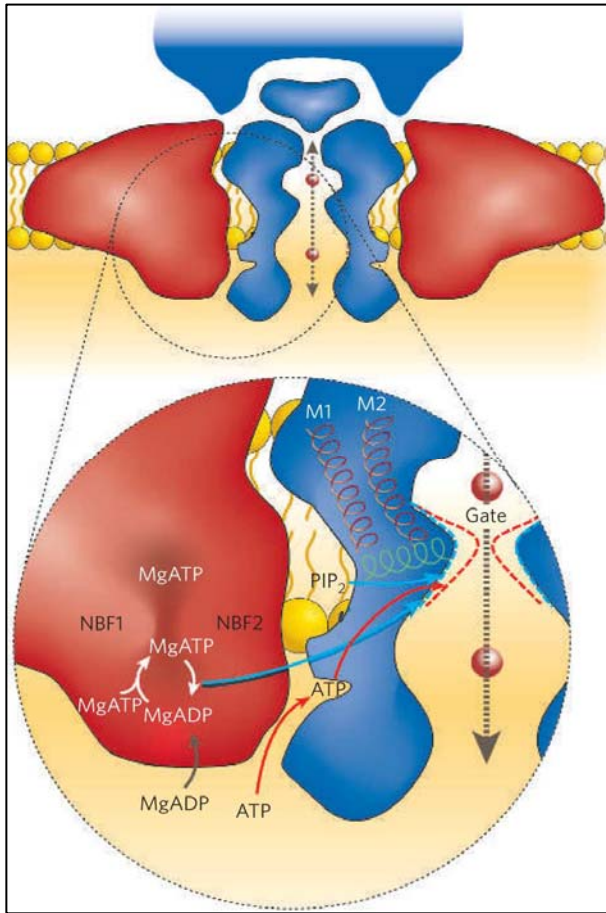


Figura 1.11: Regulació nucleotídica de l'activitat del canal K_{ATP} . El pont controlat metabòlicament es troba al final citoplasmàtic de la cavitat interna. La interacció del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP_2) proporciona energia per obrir els canals, i la unió de l'ATP proporciona la energia per tancar els canals regulats per lligand, segurament per la unió física amb la hèlix "corredissa" (hèlix verda). El MgATP s'uneix a cadascun dels llocs d'unió a ATP (ABSs) que es formen a l'espai que hi ha entremig dels llocs d'unió a nucleòtids NBF1 i NBF2 a cada subunitat SUR. L'hidròlisi d'ATP al segon lloc resulta en un estat conformacional "activat", que es transforma en una "empenta" de l'ATP que inhibeix a la subunitat Kir6.2. L'estat "activat" persisteix fins la dissociació del MgADP, i pot ser mantinguda per la nova unió de MgADP. De: Nichols, 2006.

També es regula l'activitat del canal per fosforil·lacions sobretot mediades per les proteïnes quinasa A (PKA) i C (PKC). Les fosforil·lacions de certs aminoàcids canvia la conformació de la subunitat Kir, i té una importància especial en la musculatura vascular per a la vasoconstricció (Light, 1996; Niki *et al.*, 1997; Quayle *et al.*, 1997).

L'exemple més estudiat de la funció del canal K_{ATP} (Kir6.2/SUR1) es troba a les cèl·lules β -pancreàtiques i el seu paper al mecanisme de secreció d'insulina. quan augmenta la concentració sèrica de glucosa, hi ha una augment de la seva captació i oxidació a les cèl·lules B i per tant hi ha un augment en la concentració d'ATP intracel·lular. Aquest ATP s'uneix a la subunitat reguladora del canal, fent que aquest es tanqui i es despolaritzi la membrana plasmàtica. Aquesta despolarització obre els canals de calci depenents de voltatge (CCDV) i provoca, per senyalització per calci, la secreció d'insulina (Figura 1.12).

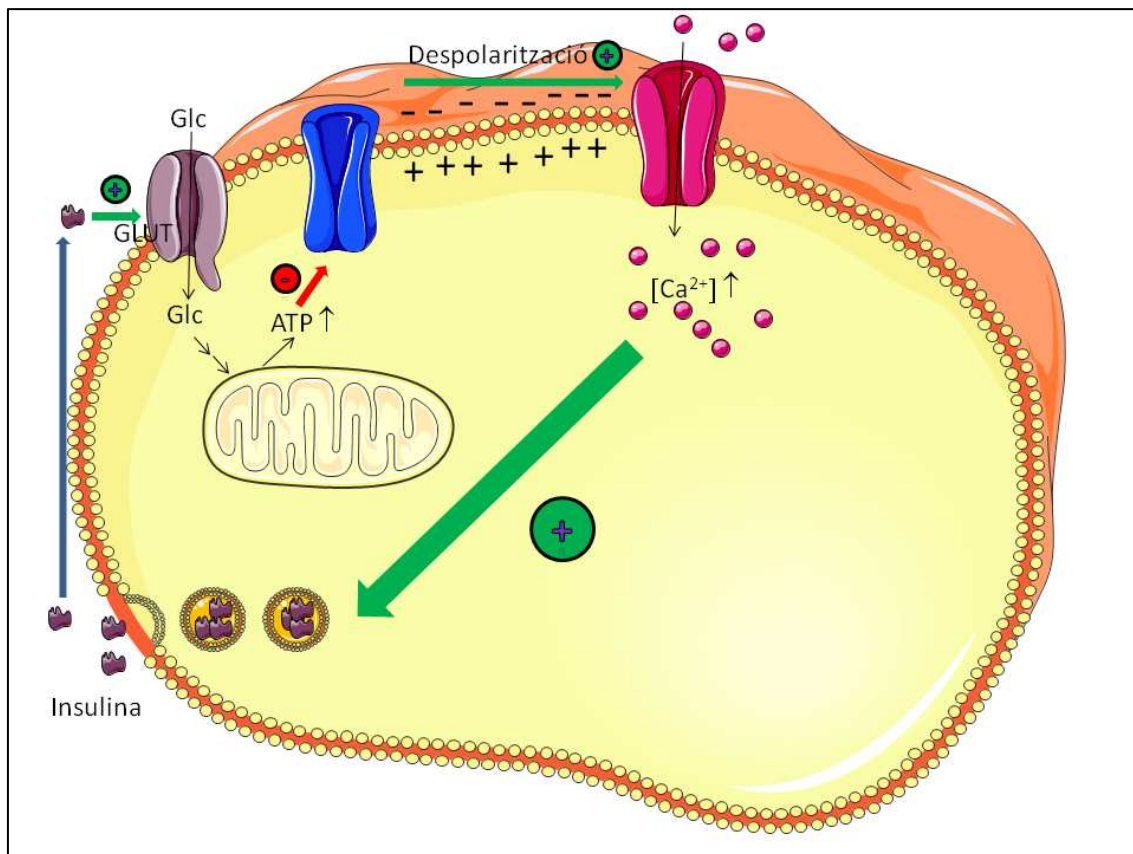


Figura 1.12: Esquema de la producció d'insulina a la cèl·lula β -pancreàtica.

Un altre exemple del mecanisme d'acció directe del canal K_{ATP} és al cas de la vasodilatació coronària de les cèl·lules del múscul llis: la vasodilatació i la vasoconstricció lliga la disponibilitat de glucosa i la despesa d'oxigen amb la correcta arribada del flux sanguini al cor. La vasoconstricció resultant de la obertura del CCDV tipus L ve determinada pel tancament del canal K_{ATP} , que despolaritza la membrana, a causa de la gran activitat metabòlica que augmenta els nivells de ATP dins la cèl·lula (Dick and Tune, 2010).

Es coneix una gran quantitat de fàrmacs que interaccionen amb el canal K_{ATP} i modifiquen la seva activitat. En funció de la seva acció sobre el canal aquests fàrmacs s'anomenen KCO (obridors de canal de potassi) i KCC (tancadors del canal de potassi). Entre alguns dels KCO trobem els derivats de dioxides, com la diazoxida, el pinacidil, iptakalim, cromakalim, nitropirazol, penzopirà, derivats de la benzamida i altres compostos sintètics, com el P1075, entre altres (Buchheit and Fozard, 1999; Lawson, 2000).

Entre els KCC trobem les sulfonilurees com la glibenclamida ó la glipizida, ó altres compostos com la iodoglibenclamida, azido-iodoglibenclamida ó tolbutamida.

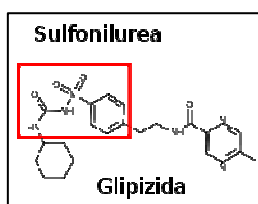


Figura 1.13: Estructura molecular de la glipizida. En el requadre en vermell hi ha representat el nucli de la sulfonilurea. De: Wikipedia, the free encyclopedia.

Tant els KCC com els KCO tenen llocs d'unió als dominis transmembrana de la subunitat SUR, i també als dominis d'unió a nucleòtids, NBD1 i 2 (Figura 1.10).

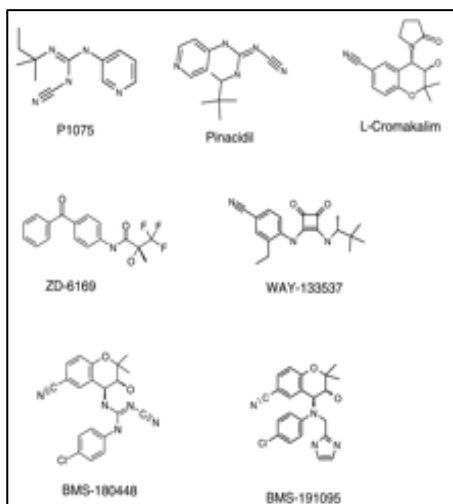


Figura 1.14: Alguns KCO. De: (Shieh *et al.*, 2000)

1.5.4. Els canals K_{ATP} al cervell

Al cervell, s'ha trobat expressió de canals K_{ATP} a neurones a diverses regions, incloent la *substantia nigra*, el neocòrtex, l'hipocamp i l'hipotàlam, i tenen un paper essencial en el control de l'homeòstasi de la glucosa (Miki *et al.*, 2001). En aquestes neurones, en un estat de privació energètica (com és el cas de l'hipoglicèmia però també de l'isquèmia) una depleció d'ATP provoca l'obertura del canal K_{ATP} , que a la seva vegada hiperpolaritza la membrana inhibint així la secreció de neurotransmissors i neurohormones disminuint l'activitat neuronal. Si aquesta situació s'agreuja i la privació energètica perdura en el temps o es fa més dràstica es produirà una mort neuronal per manca d'activitat elèctrica (Yamada *et al.*, 2001; Yamada and Inagaki, 2005). En aquests casos, una administració de glibenclamida quan la lesió encara és

aguda promou una millora funcional neuronal, a més que redueix la resposta inflamatòria associada (Wali *et al.*, 2012; Ortega, *et al.*, 2012a, Simard *et al.*, 2012). En canvi, altres estudis suggereixen que una administració de diazoxida a llarg termini podria ser beneficiosa per a la supervivència neuronal (Jiang *et al.*, 2004).

Les cèl·lules epitelials que formen els vasos sanguinis que formen el sistema circulatori del cervell també s'ha demostrat que tenen el canal K_{ATP} , i es creu que està implicat en els processos de resposta cerebrovascular durant situacions tant fisiològiques com patològiques (Rosenblum, 2003).

El nostre laboratori ha descrit l'expressió del canal K_{ATP} a micròglia (Ramonet *et al.*, 2004a; Ortega *et al.* 2012a), qui controla l'alliberament de mediadors pro-inflamatoris (Virgili *et al.*, 2011). En un model de neurodegeneració a la rata i a mostres *post-mòrtem* de malalts de AD, el nostre grup de recerca també ha demostrat que la micròglia reactiva expressa els components SUR del canal K_{ATP} , i que aquesta micròglia reactiva incrementa la seva expressió dels components del canal K_{ATP} Kir6.1, kir6.2, SUR1 i SUR2B després de lesions cerebrals (Virgili *et al.*, 2011, Ortega *et al.*, 2012b). A més, hi ha estudis amb cèl·lules BV-2 que mostren que aquest cultiu de micròglia expressa Kir6.1 i SUR2, i que la aplicació de KCOs (com la diazoxida) inhibeix la secreció de paràmetres proinflamatoris (Zhou *et al.*, 2008).

S'han descrit canals K_{ATP} similars a la mitocondria (mito K_{ATP}), localitzats a la membrana mitocondrial interna, on juguen un paper clau al manteniment de l'homeòstasis mitocondrial i el gradient implicat en la cadena respiratòria (Ardehali and O'Rourke, 2005). Estudis recents mostren que les unitats formadores del porus pot ser diferent, fet que explicaria per què no tots els fàrmacs afecten de la mateixa manera els dos canals. Sembla ser que la micròglia podria expressar també aquest mito K_{ATP} (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.5.5. Els canals de calci dependents de voltatge de tipus L

Estudis electrofisiològics suggereixen que la micròglia expressa canals de calci dependents per voltatge (CCDP), els quals permeten l'entrada de Ca^{2+} (Colton *et al.*, 1994; Silei *et al.*, 1999; Hegg *et al.*, 2000).

L'estructura molecular d'aquest canal està composta per cinc polipèptids diferents: la subunitat α_1 , de 175 kDa, amb quatre dominis homòlegs que formen el porus

(transmembrana) i que conté llocs d'unió a antagonistes d'alta afinitat i llocs de fosforilació; la subunitat α_2 , de 143 kDa, exposat fora la cèl·lula, que no conté cap mena de lloc d'unió; i tres subunitats de baix pes molecular, la subunitat β (54 kDa) intracel·lular, la subunitat γ (30 kDa) i la subunitat δ (27 kDa), aquestes dues últimes amb dominis transmembrana (Figura 1.).

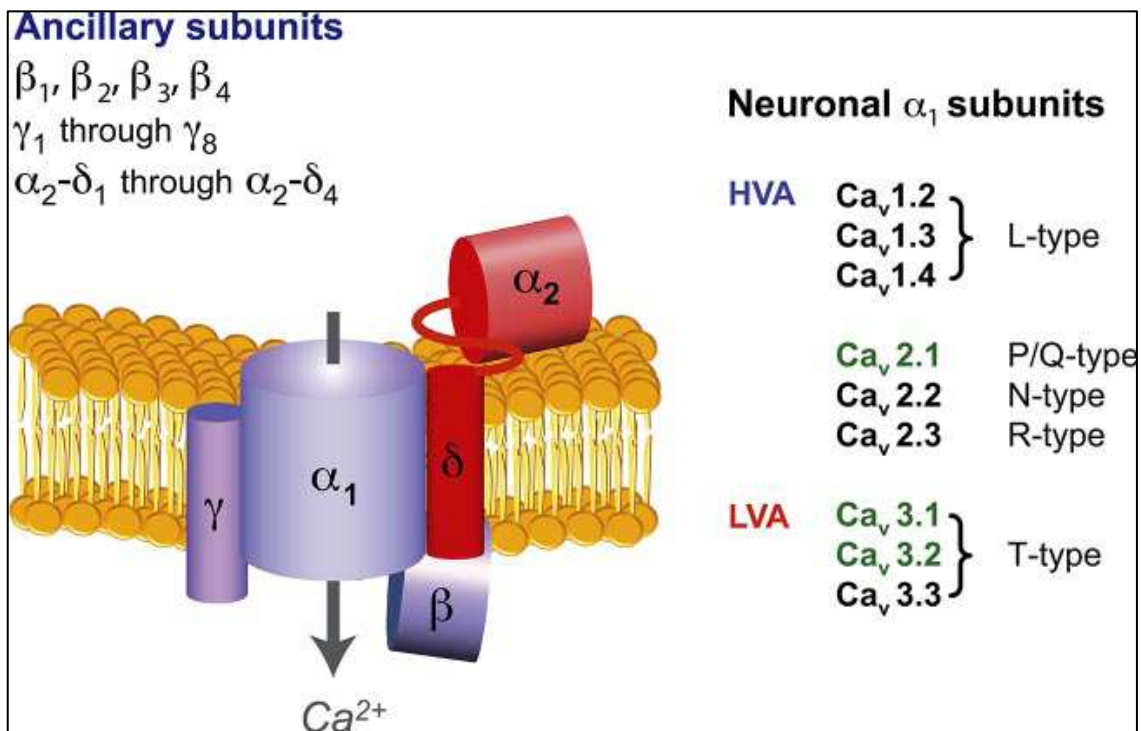


Figura 1.15: Estructura molecular dels CCDV, i classificació de les subunitats formadores del porus. De: Khosravani and Zamponi, 2006.

La subunitat α_1 , subunitat formadora del porus i sensor de voltatge (Catterall *et al.*, 2005) forma part de la família Ca_v , i les diferents isoformes es relacionen amb les diferents propietats elèctriques del canal (Khosravani and Zamponi, 2006): la família Ca_v1 pertany al tipus L, essent $Ca_v1.2$ la subunitat α_{1C} (nom del gen CACNA1C), $Ca_v1.3$ la subunitat α_{1D} (nom del gen CACNA1D) i $Ca_v1.4$ la subunitat α_{1F} (nom del gen CACNA1F). La diferència que tenen és d'expressió, essent α_{1C} i α_{1D} presents a cervell (neurones) i α_{1F} present a múscul esquelètic.

El CCDV tipus L regula diversos processos com la secreció de neurohormones i neurotransmissors, expressió gènica, estabilitat del mRNA, eficàcia sinàptica, i l'activitat d'altres canals iònics (Bean, 1989; Bading *et al.*, 1993; Ashcroft *et al.*, 1994).

El CCDV tipus L té un paper a la supervivència neuronal i al dany axonal induït per isquèmia, per això és considerat com una diana per a teràpies dissenyades per a interferir amb processos neuropatològics. Per tant, el bloqueig dels CCDV tipus L amb dihidropiridines ó nimodipina redueix el dany neuronal i millora la variació de comportament que ve acompanyat amb l'excitotoxicitat, el TBI i la isquèmia (Bielenberg *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1999; Mattsson *et al.*, 1999; Bernal *et al.*, 2009). Tot i així, els tractaments amb antagonistes de calci amb models d'hipòxia i d'isquèmia només han tingut una efectivitat del 50% (Horn *et al.*, 2001), i aquests mateixos inhibidors del CCDV presenten resultats contradictoris en nombrosos estudis de excitotoxicitat mediada per calci (Frandsen *et al.*, 1993; Rami and Krieglstein, 1994; Berg *et al.*, 1995; Small *et al.*, 1997; Fryer *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2001; Petegnief *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2009).

Hi ha estudis electrofisiològics que indiquen que la micròglia expressa un CCDV que media la entrada de calci (Colton *et al.*, 1994; Silei *et al.*, 1999; Hegg *et al.*, 2000).

ANTECEDENTS, HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2. ANTECEDENTS, HIPÒTESIS I OBJECTIUS DE TREBALL

2.1. ANTECEDENTS

Durant la última dècada s'ha intentat reduir la activitat microglial, sense atenuar-la del tot, potenciant els elements beneficiosos com la fagocitosi i la neuroprotecció i evitant els perniciosos, com la neurotoxicitat i la neuroinflamació (Tan *et al.*, 2012). Així, una supressió o disminució de l'alliberament dels productes neuro tòxics per part de la micròglia la conduiria a una funció neuroprotectora d'aquest tipus cel·lular (Skaper, 2011).

Per això, molts fàrmacs s'estan testant, sobretot antagonistes de proteïnes de membrana que activen la micròglia (Liu and Hong, 2003), fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdeus ó NSAIDs (Polazzi and Monti 2010), medicines herbals (Liu *et al.*, 2008), antibiòtics (Hayakawa *et al.*, 2008) i anàlegs de neurotransmissors (Kawanokuchi *et al.*, 2008).

El nostre grup de recerca ha demostrat que la micròglia reactiva de rata i la humana expressa els canals K_{ATP} *in vivo*, després d'un dany excitotòxic, i que aquest canal es troba relacionat amb l'enzim glucoquinasa (Ramonet *et al.*, 2004b). L'administració intrahipocampal de diazoxida, un activador del canal K_{ATP} , en un model de neurodegeneració a rata limita la activitat microglial i disminueix significativament la pèrdua neuronal associada a la lesió (Rodríguez *et al.*, 2007), mentre que la administració oral de diazoxida atenua la progressió del procés neurodegeneratiu en un model murí de esclerosi múltiple (Virgili *et al.*, 2011). Aquests resultats indiquen que, a diferència dels NSAIDs, la diazoxida disminueix la capacitat de resposta microglial inhibint de forma simultània múltiples factors proinflamatoris, allunyant l'activitat microglial de l'umbral neuro tòxic, amb molt pocs efectes secundaris.

D'altra banda, en un model de dany cerebral produït per radiació, amb el subsegüent procés d'inflamació crònica, s'ha descrit una disfunció del procés de neurogènesis que es reverteix amb la administració de NSAIDs (Monje *et al.*, 2003). Sembla ser que aquesta inhibició del procés de neurogènesis vindria donada per la alliberament de les interleucines 1 i 6 (Kempermann and Neumann, 2003) per les quals el fenotip microglial seria determinant en el procés de neurogènesis.

2.2. HIPÒTESI

La lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata adulta desencadena un procés neurodegeneratiu caracteritzat per una pèrdua neuronal progressiva, una neuroinflamació crònica i la potenciació del procés de neurogènesi. En aquestes circumstàncies, l'activació del canal K_{ATP} microglial mitjançant un fàrmac específic, la diazoxida, hauria d'implicar una disminució de l'activitat inflamatòria microglial, la qual cosa comportaria i un alentiment del procés neurodegeneratiu hipocampal i una potenciació de la neurogènesi associada. El mecanisme d'acció del canal K_{ATP} microglial podria implicar l'activitat d'uns canals de calci dependents de voltatge (CCDV) no descrits.

Per tant, en aquest treball es proposa estudiar *in vitro* l'expressió microglial dels canals K_{ATP} i CCDV de tipus L. Com a aproximació farmacològica, també s'estudiarà si l'obertura del canal K_{ATP} amb diazoxida modifica l'activitat pro-inflamatòria microglial, frena la progressió de la lesió excitotòxica hipocampal i potencia la neurogènesi associada.

2.3. OBJECTIUS

Per tot això aquest treball planteja els següents objectius:

1. Caracteritzar *in vitro* els efectes de l'obertura del canal K_{ATP} amb diazoxida en l'activitat pro-inflamatòria i fagocítica de la línia cel·lular microglial BV2.
2. Determinar *in vivo* la dosi òptima de diazoxida que, administrada oralment, redueix la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata amb NMDA.
3. Investigar *in vivo* com la diazoxida modifica en el temps la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata adulta, i la neuroinflamació que porta associada.
4. Investigar *in vivo* com la diazoxida incideix en els processos de neurogènesi associada a la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata.
5. Determinar *in vitro* i *in vivo* l'expressió microglial del CCDV i estudiar el seu possible paper en el control de l'activitat pro-inflamatòria a la línia cel·lular microglial BV2.

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIALS

3.1.1. Cèl·lules

En el present estudi s'ha utilitzat la línia cel·lular murina BV-2. Aquesta línia cel·lular, immortalitzada mitjançant la transfecció de un retrovirus recombinant v-raf/v-myc, ha estat subministrada a la Banca Biologica e Cell Factori (Interlab Cell Line Collection, ICLC, Gènova, Itàlia).

3.1.2. Animals

Es va treballar amb rates (*Rattus norvegicus*, sp) mascles de la soca Wistar, amb un pes a l'inici dels experiments comprès entre 200 i 225 grams, mantenint-se engabiades sota un cicle controlat de dia-nit de 12 hores i amb lliure accés a menjar i aigua. Els animals foren facilitats per l'estabulari de les Facultats de Medicina i de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i manipulats a les seves instal·lacions segons les normatives aprovades per la Generalitat de Catalunya (Decret 214/1997, DOGC nº 2450) i la legislació europea (86/609/EEC) sobre la manipulació d'animals d'experimentació. Es va minimitzar al màxim el nombre d'animals usats, així com el seu sofriment, i tots els procediments realitzats van ser aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona sota la supervisió de la Generalitat de Catalunya.

3.1.3. Reactius

- Totes les sals per a fer tampons i tots els dissolvents van ser subministrats per Merck (Whitehouse Station, NJ, US), Scharlau (Barcelona, Spain) i Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US)
- El PFA al 37%, la poly-L-Lysine, la poly-D-Lysine, el reactiu ABTS *Enzymatic Assay of Peroxidase*, la acrilamida al 30%, l'APS, el TEMED, la solució Trypan blue al 0,4%,

el *RIPA buffer*, el reactiu TRI Reagent® RNA Isolation Reagent, i el BCP van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).

- El medi RPMI-1640 enriquit amb glutamina, FBS i penicil·lina - estreptomina van ser subministrats per Gibco (Gran Island, NY, US.).

- Les pastilles *Complete Protease Inhibitor Cocktail* van ser adquirides a Roche (Suïssa)

3.1.4. Fàrmacs específics

- El NMDA, la Dzx (Dzx), la nifedipina (Nif), la nimodipina (Nim), el BAY k8644, el LPS, l' IFN γ i el BrdU van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).

- El pentobarbital sòdic va ser proporcionat per Vétoquinol (Lure Cedex, France).

3.1.5. Lots

- Els lots *RT² First Strand Kit*, el *RT² profiler PCR array PAMM-011* (Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors) del *SABiosciences's RT² qPCR Master Mix* i l'array *Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors RT² profiler PCR Array* van ser subministrats per SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, US).

- El lot *cDNA AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit*® era de Stratagene (CA, US).

- Els lots *Nuclospin*® *RNA/Protein kit*, *PCR Core kit*® i *RNeasy Mini kit* eren de Qiagen (Studio City, CA, US).

- Les membranes de nitrocel·lulosa, les de PVDF i el lot per a revelar les immunodeteccions sobre membrana *System ECL-Plus* van ser subministrats per Amersham Pharmacia Biotech (San Francisco, CA, US).

- El *Murine TNF α ELISA Development Kit* va ser subministrat per PeproTech (London, UK).

- El *Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA Development Kit* i *Mouse Ccl5/RANTES DuoSet ELISA Development Kit* van ser subministrats per R&D Systems (Minneapolis, NM, USA).

- El *TMB Substrate Reagent Set* va ser subministrat per BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

- El *Bicinchonic Acid Kit for Protein Determination* era de Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).
- El lot *First Strand cDNA Synthesis kit* era de Fermentas (St. Leon-Rot, Germany).
- El lot *SensiFASTTM SYBR Lo-ROX Kit* va ser adquirit a Bioline (London, UK)

3.1.6. Anticossos

- L'anticòs anti-NeuN era un anticòs monoclonal de ratolí contra la proteïna d'unió a DNA específica de neurones i va ser subministrat per Chemicon-Millipore (Billerica, MA, US).
- L'anticòs anti-GFAP era un anticòs monoclonal de ratolí contra la GFAP i va ser subministrat per Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).
- L'anticòs anti-BrdU era un anticòs monoclonal de rata contra la 2-Bromo-deoxi-Uridina (BrdU) va ser subministrat per AbdSerotec (Kidlington, OX, UK).
- L'anticòs anti-Sp8 era un anticòs policlonal de conill contra el factor de transcripció Sp8 dels neuroblasts de la SVZ. L'anticòs anti-PSA-NCAM era un anticòs policlonal de ratolí contra la molècula d'adhesió que intervé en la neurogènesis. Ambdós van ser subministrats per Chemicon-Millipore (Billerica, MA, US).
- L'anticòs anti-calretinina era un anticòs policlonal de conill contra la proteïna d'unió de calci, calretinina, específica d'una població neuronal. Va ser subministrat per Swant (Switzerland).
- Els anticossos policlonals anti- α_{1C} , anti-Kir's i anti-SUR's de conill eren de Alomone Labs (Jerusalem, Israel).
- L'anticòs α -tubulina-FITC i el Hoechst 33258 van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).
- Els anticossos secundaris anti-conill IgG de cabra conjugat a Alexa-fluor 488 i anti-ratolí IgG de cabra conjugat a Alexa-fluor 555 eren de Invitrogen (Carlsbad, CA, US).
- El NGS, el NPS, la BSA, la peroxidasa conjugada a estravidina, a Cy3 o a FITC, i la resta d'anticossos secundaris i productes per a la sèrie de les reaccions de les immunohistoquímiques van ser subministrades per Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).

3.1.7. Oligonucleòtids

- Els encebadors per a α_{1C} , α_{1D} , iNOS-II i 18S van ser subministrats sota disseny per TIB Molbiol (Berlin, Germany).
- Els encebadors per als experiments de PCR en temps real van ser subministrats per RealTimePrimers.com (PA, USA).

3.1.8. Altres compostos

- La isolectina B₄ de *Bandeiraea simplifolia* conjugada amb biotina i el violeta de Cresil eren de Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, US).
- Les FluoSpheres Carboxylate-modified microspheres van ser subministrades per Invitrogen (Carlsbad, CA, US).
- El fura-2 acetoxymethyl ester era de Calbiochem (San Diego, CA, US).

3.1.9. Instrumentació

- Autoclau AUTESTER –G (Anorsa, Barcelona, Espanya)
- Incubador Heraeus B 5061 EK (Firstenberg Machinery Company, Inc, Richmond, CA, US)
- Centrifuga Megafuge 1,0 Heraeus Seratech (Heraeus, Buckinghamshire, England)
- Bany termostatat Precistern S-140 (Anorsa, Barcelona, Espanya)
- Puntetes de pipeta de varis volums i pipetes de Cultiu estèrils (Rubilabor, Barcelona, Espanya)
- Raspadors de cèl·lules esterilitzats, plaques d'ELISA base plana i flascons de cultiu T150, T75 i T25 cc, estèrils (Nunc, Roskilde, Denmark)
- Pipetes automàtiques (Gilson, Middleton, WI, USA)
- *Pipeta multicanal (Biohit, Helsinki, Finland)*
- *Shandon Sequenza Slide Rack* de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
- Lector de plaques ELISA Tecan Sunrise (Tecan, Männedorf, Switzerland)

- Càmera amb un dispositiu de càrregues acoblades (ó charge-coupled device, CCD) model CH250 de Photometrics (Tucson, AZ,US)
- Ordinador Macintosh 840AV; Apple, Inc. (Cupertino, CA, US)
- Termociclador MJ Mini™ Thermal Cycler PTC-1148 (Bio-rad, Madrid, Espanya)
- Espectrofotòmetre NanoDrop N1000 de Thermo (Wilmington, DE, US)
- Bioanalyzer 2100 de Agilent (Santa Clara, CA, US)
- Termociclador *real-time* PCR: Applied Biosystems Stem One Plus® Real Time PCR Systems de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, US)
- Plaques de 96 pous per a *real-time* PCR: *Squirted PCR plate* (VWR, Barcelona, Spain)
- *Optical Adhesive Covers PCR compatible* de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, US)
- Transil·luminador MacroVue™ UV-25 (Hoefer, Holliston, MA, US)
- Sistema de Adquisició d'imatges Alphadigidoc Pro (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA)
- Sistema de Adquisició d'imatges Carl Zeiss (Göttingen, Germany)
- Aparell revel·lador films Curix 60 (Agfa, México D.F. Mexico)
- Instrument estereotàxic (David Kopf, Carnegie Medicine, Sweden)
- Xeringa Hamilton de 5 µL (Bonaduz, GR, Switzerland)
- Bomba d'infusió (CMA/100; Carnegie Medicine, Sweden)
- Agulla d'alimentació: Stainless Steel Straight Feeding Needle, 16 Gauge, 76.2 mm (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)
- Aparell de mesura de glucosa: Glucocard™ G+ meter (Menarini Diagnostics, Badalona, Spain)
- Tires reactives mesura glucosa: Glucocard™ G sensor (Menarini Diagnostics, Badalona, Spain).
- Criòstat model Shandon-Cryotome FSE de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
- Portaobjectes normals i silanitzats (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA, US)
- Cobreobjectes rectangulars i rodons (diàmetres 10 mm i 25 mm) (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA, US)

- Microscopi confocal Leica TCS SL laser scanning (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany)
- Microscopi òptic Zeiss Axiolab (Göttingen, Germany).
- Microscopi de fluorescència Zeiss Axio Observer (Göttingen, Germany).
- Microscopi invertit d'epifluorescència Diaphot-300 (Nikon, Tokyo, Japan)

Es va utilitzar aigua MilliQ per a fer totes les solucions, les quals es conservaren a 4 °C excepte en els casos en què el protocol ho exigia.

3.2. MÈTODES

3.2.1. Manteniment de la línia cel·lular BV-2

Les cèl·lules BV-2 han estat cultivades en medi RPMI enriquit amb FBS inactivat al 5% (v/v), 100 U/mL de penicil·lina i 100 mg/mL d'estreptomicina, en un incubador a 37 °C y 5% CO₂. Les plaques i els flascons de cultius van ser subministrats per Nunc (Roskilde, Denmark).

Quan el número de cèl·lules ocupava tota la superfície del recipient on es trobaven sembrades fou necessari realitzar una dilució en una nova placa amb medi fresc:

1. Es rascaven les parets del flascó de T-75 cc amb un raspador per a separar les cèl·lules en monocapa.
2. Es prenen 1'5 mL de la solució que contenia les cèl·lules en suspensió i es diluïa en 13'5 mL de medi de cultiu a (37 °C) en un nou flascó T-75 cc a dilució 1:10,
3. S'introduïa el flascó en l'incubador a 37 °C, 5% CO₂ fins a la nova confluència o fins a la realització d'experiments.

Un cop obtingut el cultiu microglial i previ a la realització dels experiments, una part de les cèl·lules es van congelar en N₂ líquid i s'han mantingut a la Unitat de Criopreservació de l'Hospital Clínic de Barcelona. D'aquesta manera se n'han descongelat de noves quan ha sigut necessari per a realitzar experiments. Totes les

manipulacions amb les cèl·lules s'han realitzat dins una campana de flux laminat i en condicions i materials estèrils.

1. Es resuspenien les cèl·lules amb ajuda d'un raspador
2. Es traspassaven a un tub i es centrifugaven a 1000 rpm (300 g) durant 10 minuts.
3. Es descartava el sobrenedant.
4. Es resuspenien en 1 mL de medi de cultiu.

Medi de cultiu: 500 mL medi RPMI 1X d'invitrogen

10 mL Fetal Bovine Serum-GIBCO inactivat (30 min, 56°C)

1 mL Antibiòtic: Penicillin-Streptomycin

5. Es calculava la seva concentració mitjançant la cambra de Neubauer.
6. Es centrifugaven a 1000 rpm durant 10 minuts.
7. Es descartava el sobrenedant.
8. El sediment es resuspenia en 900 μ L de FBS inactivat i es transferia el contingut en un criovial rotulat.
9. Se li afegien 100 μ L de DMSO.
10. Les cèl·lules s'emmagatzemaven a -80 °C durant 48 h.
11. Finalment, les cèl·lules es conservaven en N₂ líquid a l'Àrea de Criopreservació.

3.2.2. Manipulació farmacològica de les cèl·lules BV-2

Per a realitzar els experiments amb les cèl·lules és necessari treballar sempre amb la mateixa concentració de cèl·lules per unitat de volum. Al nostre cas, eren 50000 cèl·lules/mL. Per a calcular el nombre de cèl·lules utilitzàvem la cambra de comptatge de Neubauer i un microscopi òptic.

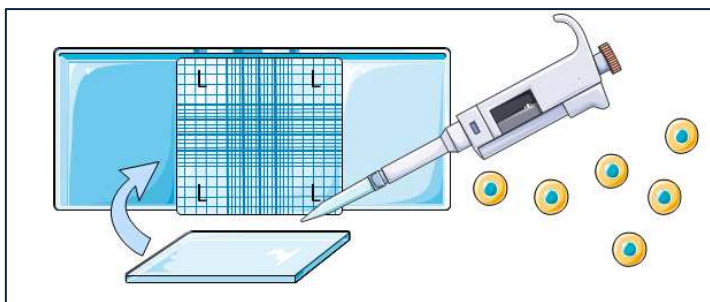


Figura 3.4: Esquema de la utilització d'una cambra de Neubauer. Basat en Strober (2001).

El mètode és col·locar, sobre la cambra de Neubauer (Figura 3.1) un cobreobjectes i injectar en l'espai entre el cobreobjectes i la cambra 10 µL de la suspensió cel·lular. Seguidament es posava sobre el microscopi òptic i es comptava el nombre de cèl·lules sobre les quatre àrees exteriors (L, imatge). Observant un total de x cèl·lules entre les quatre àrees, la concentració a la suspensió cel·lular serà :

$$\text{Concentració a la suspensió (cèl·lules/mL)} = 10000 \cdot (x/4)$$

Abans de les activacions, les cèl·lules es sub-cultivaven en plaques de 24 pouets ó en flascons de 75 ó 150 cc, a una densitat de 5×10^4 cèl·lules/mL durant 24 hores. Els pouets s'agrupaven en grups, segons si s'havien d'activar o no o de tractar o no. Generalment, es dividien en quatre grups diferents: a) Un grup sense manipular, anomenat control; b) Un grup on les cèl·lules no foren activades però si incubades amb el fàrmac específic (Nif 10 µM, Nim 25 µM, Bay k8644 10 µM ó Dzx 1 µM), 48 hores després de la sembra, anomenat control tractat; c) un grup anomenat activat, on les cèl·lules BV2 van ser activades 24 hores després de la sembra, amb una barreja de LPS i IFN γ a una concentració de 0,1 µg/mL i 0,5 ng/mL, respectivament, tal i com està descrit per Saura (Saura *et al.*, 2003), i d) el grup anomenat activat tractat, on les cèl·lules eren activades i posteriorment tractades. 48 hores després de l'activació, es raspaven les cèl·lules, es recollia el medi de cultiu, es precipitaven les cèl·lules durant 10 minuts a 1000 rpm (ó 300 g). Les cèl·lules es separaven i es processaven per a posteriors estudis bioquímics i el medi de cultiu es congelava fins a la seva utilització. Per a experiments de immunocitoquímica, es seguia el mateix protocol amb la única diferència que les cèl·lules es sembraven sobre cobreobjectes rodons de 10 mm, prèviament tractats amb poli-D-Lisina (10% en aigua destil·lada estèril, 10 minuts) sobre plaques de 24 pouets.

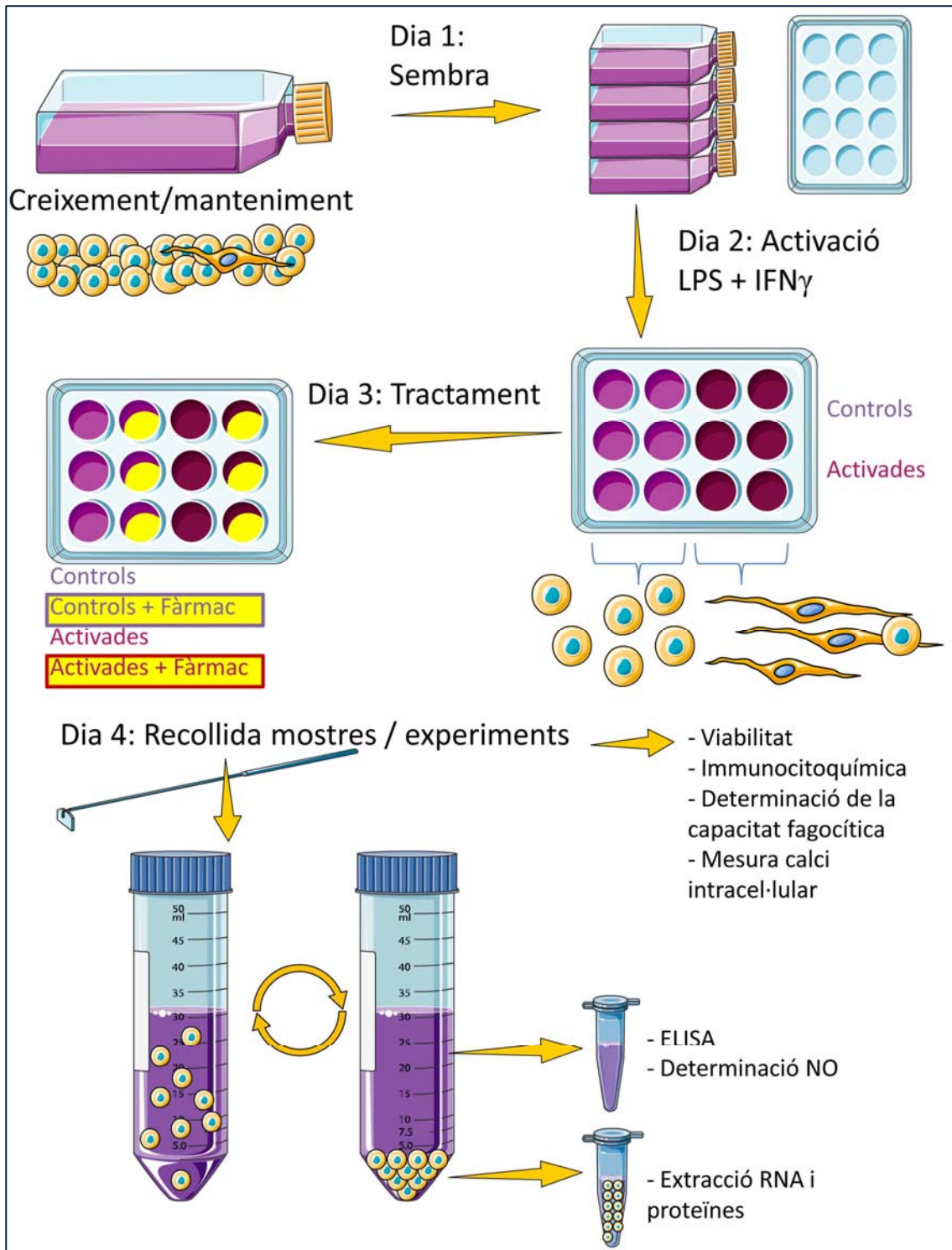


Figura 5: Esquema de la manipulació amb la línia cel·lular BV-2

3.2.3. Test de viabilitat per Trypan blue

El colorant Trypan blue té la capacitat de marcar les cèl·lules mortes o que estan morint, ja que les cèl·lules viables no l'incorporen. El protocol que es va seguir va ser el de Strober (2001):

1. Raspar les cèl·lules amb un raspador per a crear una suspensió cel·lular.
2. Afegir a un tub Eppendorf: 0,3 mL de HBSS
0,5 mL de la solució Trypan blue al 0,4%
0,2 mL de la suspensió cel·lular
3. Després de barrejar amb la pipeta amb cura, incubar durant 10 minuts a TA.
4. Pipetejar 10 μ L i transferir-los a la cambra de Neubauer. Comptar el nombre de cèl·lules tenyides de blau respecte el nombre de cèl·lules totals.

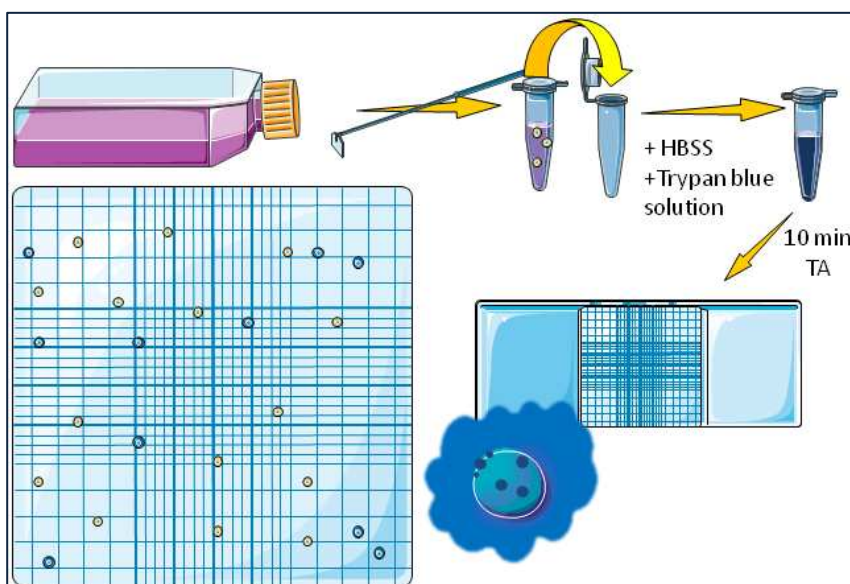


Figura 6: Esquema de protocol de Trypan Blue.

3.2.4. Valoració de la concentració de nitrats en el medi

Els medis es van extreure de les plaques de cultiu, i es van precipitar les cèl·lules amb una centrifugació de 1000 rpm (300 g) durant 10 minuts. Seguidament es va separar el medi i es va congelar a -20 °C fins a la seva utilització. Cada cop que es necessitava es descongelava en gel.

Vam mesurar la concentració de NO produïda per les cèl·lules mitjançant la mesura de la concentració de l'ió nitrit (NO_2^-), en un assaig basat en la reacció de dissociació descrita originalment per Griess (Griess, 1879):

1. En una placa d'ELISA de 96 pous s'introduïen 50 μ L de l'estàndard o de la mostra.
2. S'afegien 25 μ L de la solució de Griess A (sulfanilamida 1% i àcid fosfòric 5%) i s'incubava durant 5 min.
3. S'afegien 25 μ L de la solució de Griess B (0,1% N-1-naphtylenediamine dihydrochloride) i s'incubava durant 10 min.
4. Es llegeix la absorbància a 540 nm en un lector de plaques.

3.2.5. Valoració de la concentració de TNF α en el medi

El TNF α es va valorar amb un lot subministrat per Peprotech (*Murine TNF α ELISA Development Kit*), de la manera que segueix:

Preparació de la placa

1. Diluir l'anticòs de captura (anti-m TNF α de cabra purificat + 2,5 mg D-manitol) en PBS 10 mM en una concentració de 1 μ g/mL i administrar 100 μ L de la solució a cada pou de la placa d'ELISA. Segellar la placa i incubar O/N a temperatura ambient.
2. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 300 μ L per pou.
1. Afegir a cada pou 300 μ L de tampó de bloqueig: BSA a l'1% en PBS, 1 h a temperatura ambient.
2. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 300 μ L per pou.

Protocol d' ELISA

1. Construir un patró estàndard (mTNF α recombinant) des de la concentració 0 ng/mL a 2 ng/mL en solució diluent (Tween20 al 0,05% i BSA al 0,1% en PBS 10 mM).
2. Administrar 100 μ L de l'estàndard o de la mostra a cada pou per triplicat i incubar 2 h a temperatura ambient.
3. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 300 μ L per pou

4. Diluir l'anticòs de detecció (anti-m TNF α de cabra biotinitat + 2,5 mg D-manitol) en solució diluent (0,25 μ g/mL) i administrar-ne 100 μ L per pou. Incubar 2 h a temperatura ambient.
5. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 300 μ L per pou
6. Diluir l'avidina HRP conjugada 1:2000 en solució diluent i administrar-ne 100 μ L per pou. Incubar 30 min a temperatura ambient.
7. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 300 μ L per pou
8. Revelar amb la solució ABTS (100 μ L per pou) i llegir en un lector de plaques a 405 nm

3.2.6. Valoració de la concentració de CXCL9 i Ccl5 en el medi

Les quimioquines CXCL9 i Ccl5 es van valorar amb els respectius lots subministrats per R&D Systems (*Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA Development Kit* i *Mouse Ccl5/RANTES DuoSet ELISA Development Kit*) seguint les instruccions del fabricant:

Preparació de la placa

3. Diluir els anticossos de captura (anti-ratolí MIG de cabra ó anti-ratolí RANTES de rata) en solució diluent (PBS 10 mM, pH=7,2-7,4, 1% BSA) a una concentració 200 ng/mL i 2 μ g/mL, respectivament, i administrar 100 μ L de la solució a cada pou de la placa d'ELISA. Segellar la placa i incubar O/N a temperatura ambient
4. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 400 μ L per pou
3. Per a realitzar el bloqueig de les unions inespecífiques, afegir a cada pou 300 μ L de solució diluent, 1 h a temperatura ambient
4. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 400 μ L per pou

Protocol d' ELISA

9. Construir un patró estàndard (MIG ó RANTES de ratolí recombinant) des de la concentració 0 ng/mL a 1 ng/mL ó 2ng/mL, respectivament, en solució diluent

10. Administrar 100 μL de l'estàndard o de la mostra a cada pou per triplicat i incubar 2 h a temperatura ambient.
11. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 400 μL per pou
12. Diluir l'anticòs de detecció (anti-ratolí MIG de cabra ó anti-ratolí RANTES de rata biotinitats) en solució diluent (200 ng/mL i 400 ng/mL, respectivament) i administrar-ne 100 μL per pou. Incubar 2 h a temperatura ambient.
13. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 400 μL per pou
14. Diluir l'avidina HRP conjugada 1:200 en solució diluent i administrar-ne 100 μL per pou. Incubar 20 min a temperatura ambient
15. Aspirar els pous i rentar 4 cops la placa amb tampó de rentat: Tween20 al 0,05% en PBS, 400 μL per pou
16. Afegir 100 μL per pou de la solució TMB (barreja 1:1 de la solució A, H_2O_2 , i de la solució B, TMB) i revelar durant 20 minuts
17. Aturar el revelat amb una solució 2 N de H_2SO_4 , 50 μL /pou
18. Llegir en un lector de plaques a 450 nm

3.2.7. Extracció de mRNA i proteïnes de les cèl·lules BV-2

A banda del medi de cultiu, també es va fer una extracció del RNA total i de les proteïnes de les cèl·lules BV-2, per tal de realitzar experiments de RT-PCR i array de PCR i experiments de *Western Blot*, respectivament. En aquest cas, es varen fer quatre grups: un de control, on les cèl·lules no foren activades. Un segon de control tractat, on les cèl·lules no foren activades però si tractades amb Dzx a una concentració 10 μM . Un de tercer on les cèl·lules foren activades amb LPS+IFN γ . I un quart on les cèl·lules foren activades i tractades amb la Dzx. Aquests experiments es feien sobre flascons de 150cc i per duplicat, ja que a les cèl·lules activades hi ha una disminució dràstica del nombre de cèl·lules.

Extracció de mRNA i proteïnes

1. Amb un raspador es separen les cèl·lules adherides de la paret del flascó T-75 ó T-150 cc i es compten les cèl·lules

2. Les cèl·lules es sedimenten a 300 g ó 1000 rpm durant 10 min
3. Es guarda el sobrenedant (S/N) i es resuspèn el sediment en 1 mL de PBS estèril fred
4. Separar en dos tubs *eppendorf*: 2/3 per a RNA ($1 \cdot 10^6$ cèl·lules) i 1/3 per a proteïnes

Aïllament del RNA total

Per l'aïllament del RNA total s'ha utilitzat el lot *Nucelospin® RNA/Protein*. Es continua a partir del pas 4 de l'apartat anterior:

5. Les cèl·lules es sedimenten a 300 g ó 1000 rpm durant 10 min.
6. Es resuspèn en 350 µL de la solució RP1 i 3.5 µL de β-mercaptoetanol i s'agita vigorosament.
7. El lisat es centrifuga a 11000 g durant 1 min.
8. El lisat se fa passar 5 vegades a través d'una xeringa de 9 mm.
9. S'afegeixen 350 µL d'etanol (70%) al lisat, barrejant-lo amb la pipeta.
10. Per a cada una de les preparacions, es pren una columna *NucleoSpin® RNA Protein* i s'introdueix en un tub de centrifugació de 2 mL. El lisat es carrega i es centrifuga a 11000 g durant 30 segons. Es descarta el sobrenedant amb el tub col·lector.
11. La columna s'introdueix en un nou tub col·lector.
12. S'afegeixen 350 µL de MDB (Membrane Desalting Solution) i es centrifuga a 11000 g durant 1 min. Es descarta el sobrenedant amb el tub col·lector.
13. La columna s'introdueix en un nou tub col·lector.
14. Es prepara la mescla *rDNase reaction* en un tub de microcentrifuga estèril, afegint 10 µL de rDNase I reconstituïda a 90 µL de *rDNase reaction*
15. S'aplica 95 µL de *rDNase reaction* directament al centre de la membrana de sílica de la columna. S'incuba a temperatura ambient durant 15 min.
16. S'afegeixen 200 µL de la solució de rentat RA2 a la columna *NucleoSpin® RNA/Protein column* i es centrifuga a 11000 g durant 30 segons. Es descarta el sobrenedant amb el tub col·lector.
17. La columna s'introdueix en un nou tub col·lector.
18. S'afegeixen 200 µL de la solució de rentat RA3 a la columna *NucleoSpin® RNA/Protein column* i es centrifuga a 11000 g durant 30 segons.

19. Es descarta el sobrenedant amb el tub col·lector.
20. Es torna a fer el rentat amb 250 µL de la solució RA3 a la columna.
21. Es centrifuga el tub sol a 11000 g durant 2 min.
22. S'elueix el RNA en un tub *ependorf* estèril i *RNAasa free*, aplicant sobre el filtre 60 µL d'H₂O (RNase-free) centrifugant 1min.
23. Es mesura la concentració de RNA al NanoDrop N1000 i la qualitat d'aquest al Bioanalyzer.

Aïllament de les proteïnes totals

Es continua a partir del punt 4 de l'apartat anterior a l'anterior:

5. Centrifugar a 1100 rpm durant 5 minuts
6. Descartar el S/N i resuspendre les cèl·lules en cocktail RIPA a 4 °C (fins a 10⁷ cèl·lules 1mL, per a menys 300-400 µL)
7. Incubar 15 minuts en inversió ó orbital a 4 °C
8. Centrifugar a 14000 rpm durant 15 minuts a 4 °C
9. Recollir el S/N, que és on estan les proteïnes.

3.2.8. Determinació de la concentració de proteïnes pel Mètode de Bradford

1. Realitzar una mostra patró a partir de concentracions conegudes de BSA en PBS
2. 0,01 M: 0,04 - 0,2 - 0,04 - 0,8 - 1,2 - 1,6 - 2 mg/mL
3. Preparar per triplicat dilucions de la mostra problema a estudiar
4. Afegir el reactiu de Bradford en una proporció de 40:1 respecte la mostra
5. Medir l'absorbància en l'espectrofotòmetre a 595 nm
6. A partir de les concentracions conegudes de BSA calcular la concentració de la mostra problema

3.2.9. Array de PCR de la resposta inflamatòria modulada per Dzx

Per a realitzar aquest experiment es va utilitzar les mostres de RNA extretes a l'apartat anterior. Per recomanacions del fabricant del *PCR Array*, 1 µg de mRNA de cada mostra es va convertir a cDNA usant el lot *RT² First Strand Kit*. La expressió quantitativa del mRNA de 84 citoquines i els seus receptors es va fer amb l'array *Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors RT² profiler PCR Array*. Les PCRs es van dur a

terme usant el lot *RT² profiler PCR array PAMM-011* (Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors) del lot *SABiosciences's RT² qPCR Master Mix* (SuperArray Bioscience Corporation). El protocol que es va utilitzar es detalla a continuació.

RT-PCT

Les reaccions de retrotranscripció es van dur a terme usant el lot *RT² First Strand Kit*:

1. Preparació de la barreja d'eliminació de DNA genòmic (GE):
 - 1 µg de RNA
 - 2 µL del reactiu GE
 - H₂O lliure de RNAases fins a 10 µL
2. Incubació de la reacció a 42 °C Durant 5 minuts.
3. Refredar en gel durant, almenys, un minut
4. Afegir els següents components per a la reacció de la retrotranscripció:
 - 4 µL del tampó *5X RT buffer*
 - 1 µL de la barreja *Primer and External Control Mix*
 - 2 µL de la barreja *RT Enzyme Mix*
 - 3 µL de H₂O lliure de RNAases
5. Incubar durant 5 minuts a 42 °C i immediatament aturar la reacció a 95 °C
6. Afegir-hi 91 µL de H₂O lliure de RNAases
7. Posar les mostres en gel abans de realitzar l'array de PCR ó la PCR en temps real ó guardar-les a -20 °C

Array de PCR

La barreja de reacció es va realitzar amb el *RT² qPCR Master Mix*, mentre per la placa de 96 pous on hi ha els 84 gens i els *housekeeping* vam utilitzar el lot *RT² profiler PCR array PAMM-011*, El protocol que vam seguir es detalla a continuació:

1. Barrejar en un tub falcon els següents reactius:
 - 1350 µL de la barreja *2X SDABiosciences RT² qPCR Master Mix*
 - 102 µL del cDNA diluït de l'apartat anterior
 - 1248 µL H₂O lliure de RNAases
2. Afegir 25 µL de la barreja a cada pou de la placa *PCR Array* de 96 pous
3. Treure les bombolles, segellar la placa i centrifugar 1 minut a 1000 g

Condicions de la PCR: *Holding Stage*: 95 °C 10 min. 1 cicle

Cycling Stage: 95 °C 15 seg. + 60 °C 1 min. 40 cicles

Les reaccions de les PCR en temps real es van dur a terme amb el termociclador Stem One Plus® Real Time PCR Systems de Applied Biosystems.

3.2.10. Reacció en cadena de la polimerasa per transcripció reversa (RT-PCR) i PCR de les subunitats α_{1C} i α_{1D} del CCDV

El nostre objectiu va ser el de determinar si hi ha expressió de les subunitats del CCDV tipus L a la línia cel·lular murina BV-2. Les mostres que vam utilitzar van ser el mRNA purificat de les mostres control i mostres activades de l'apartat anterior. Per tal de determinar-ho vam realitzar una retrotranscripció seguida d'una amplificació d'aquests gens. Per realitzar la conversió de RNA a cDNA s'ha utilitzat el lot: *cDNA AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit*®, i per fer la PCR s'ha utilitzat el lot *Taq PCR Core kit*® .

Retrotranscripció

Les reaccions de retrotranscripció es van dur a terme usant encebadors aleatoris seguint el protocol del lot *AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit*:

1. Preparació de la reacció en un tub de microcentrífuga:

1 µg de RNA

3 µL de encebadors aleatoris

H₂O lliure de RNAases fins a 15,7 µL

1. Incubació de la reacció a 65 °C Durant 5 minuts.
2. Deixar refredar 10 minuts a temperatura ambient
3. Afegir els següents components per ordre:

2 µL del tampó 10X *Affinity Script RT buffer*

0,8 µL dels dNTPs (cadascun d'ells a 25 mM)

0,5 µL del *RNase Block RibonucleaseInhibitor*

1 µL del *Affinity Script Multiple Temperature RT*

4. Incubar durant 10 minuts a 25 °C
5. Incubar a 55 °C durant 60 minuts

6. Incubar a 72 °C durant 15 minuts
7. Posar les mostres en gel abans de realitzar la PCR ó guardar-les a -20 °C.

PCR

Les reaccions de PCR es van dur a terme usant el protocol del lot *Taq PCR Core kit* i en les condicions donades per Toba (Toba *et al.*, 2005). Es van utilitzar 2 µL del producte de RT, que corresponen a 0,1 µg de cDNA total.

Les seqüències dels encebadors per a α_{1C} , α_{1D} i de la seqüència del mRNA no codificant, que s'utilitzava com a control, van ser:

Gen	Accession number	Tamany	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Cacna1c	NM_009781	223 pb	CCAGAGAAGAAGTGGG TTA	AGCAAGCAATGACAGGAA A
Cacna1d	AK018426	226 pb	GCATCATCTTCCTGGAT CAC	CCTTGCTGAATCTGGGTCT A
Nos2	NM_010927 .3	497 pb	CCCTTCCGAAGTTTCTG GCAGCAGC	GGCTGTCAGAGCCTCGTG GCTTTGG
18S	NR_003278. 1	488 pb	TCAAGAACGAAAGTCCG GAGG	GGACATCTAAGGGCATCA CA

Taula 3.1: Seqüències dels encebadors que es van utilitzar per als experiments de PCR. De: Toba *et al.*, 2005.

Aquestes seqüències es van extreure de l'article de Toba (Toba *et al.*, 2005). La seqüència del mRNA 18S no codificant va ser usada com a control.

1. Es fa la següent barreja per reacció:

Barreja	Volum (µL)
<i>10X Buffer</i>	2,5
<i>dNTP Mix</i>	0,5
<i>Taq DNA polimerase</i>	0,125
<i>Free RNase Water</i>	16,875
<i>Reverse Primer</i>	1,5
<i>Forward Primer</i>	1,5
<i>Template cDNA</i>	2
Volum final	25

Taula 3.2: Barreja de la reacció per a la PCR

2. Es fa la reacció amb les següents condicions del termociclador:

Passos	Temps	Temperatura (°C)
Desnaturalització i activació	15'	95
Desnaturalització	30''	95
“Annealing”	30''	55
Extensió	45''	72
Número de cicles	X40	
Extensió final	5'	72

Taula 3.3: Condicions de la PCR.

3. Els productes de PCR resultants han estat sotmesos a una electroforesis en un gel d'agarosa al 1,5% amb 3 µL de bromur d'etidi (10 µL/pou). Les bandes han estat visualitzades utilitzant el transiluminador i fotografiades amb el sistema d'adquisició d'imatges Alphadigidoc Pro.

3.2.11. Western-blot de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV2

A continuació es va realitzar un experiment de *Western Blot* per tal de determinar la quantitat de proteïna de la subunitat α_{1C} del CCDV que hi ha a les cèl·lules BV-2, tant activades com no.

Separació electroforètica de proteïnes en un gel SDS-PAGE

1. Construir el gel al percentatge adequat d'acrilamida pel pes molecular de la proteïna que separem segons la següent taula:

	5%	7'5 %	10 %	12 %	15 %	Gel de Stacking (3%)
AA/BA (30%) (mL)	1,67	2,5	3,33	4,0	5,0	0,5
Lower-tris (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-
Upper-tris (mL)	-	-	-	-	-	1,23
APS (10%) (µL)	70	70	70	70	70	30
H ₂ O (mL)	5,75	4,92	4,09	3,42	2,42	3,21
TEMED (µL)	10	10	10	10	10	10

Taula 3.4: Composició dels gels d'acrilamida segons el pes de la proteïna.

Al cas de la subunitat α_{1C} la concentració va ser del 10%.

2. Carregar 30 µg de proteïna per pou de cada mostra
3. Fer córrer el gel, 20 min a 80 V i la resta a 100 V en un tampó compost de:
 - Glicina 1,92 M
 - Tris 0,25 M
 - 0,1% de SDS

Transferència electroforètica del gel a una membrana de PVDF

1. Activar la membrana de PVDF en metanol durant 1 - 2 minuts.
2. Construir un sandvitx seguint el següent esquema (prèviament s'han de remullar tots els components en tampó de transferència durant uns minuts):

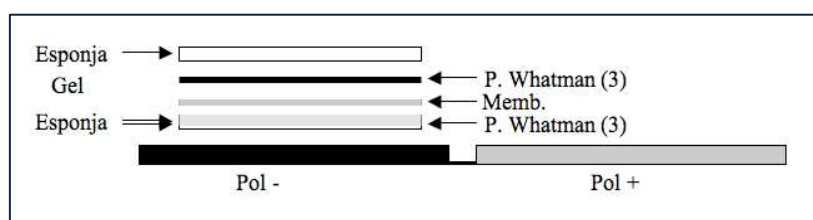


Figura 3.7:
Esquema del muntatge del "sandvitx".

3. Realitzar la transferència a 4 °C i 100 V durant 1 h en el tampó de transferència:
 - Tris 0,12 M
 - Glicina 0,027 M
 - 20 % de metanol

Immunodetecció de la subunitat α_{1C} sobre membrana

1. Rentar la membrana dues vegades en TBS-Tween (TBS-T), 10 minuts cada una:
 - Tris 100 mM
 - NaCl 1,4 M
 - 1% de Tween 20
 - pH 7,4
2. Bloquejar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient en TBS-T amb 5% de LDP i 1% de BSA
3. Afegir l'anticòs primari anti- α_{1C} de conill 1:200 en TBS-T amb 5% de LDP i 1% de BSA , O/N a 4 °C
4. Rentar la membrana tres vegades en TBS-T, 5 min cada una
5. Incubar amb l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a peroxidasa 1:2500 en TBS-T amb 5% de LDP i 1% de BSA , 1 hora a T^a ambient

6. Rentar la membrana tres vegades en TBS-T, 5 min cada una
7. Realitzar l'últim rentat amb TBS sense Tween 20, 5 min
8. Revelar: usem el lot *Amersham ECL Plus Western Blotting*. Barregem 1mL de la Solució A (solució ECL PLUS contenint també Tris) i 200 µL de la solució B (solució stock Acridan amb dioxà i etanol). Submergim la membrana uns 2 min en aquesta solució. Posem en contacte la membrana amb un film fotogràfic a les fosques. Revelem el film fotogràfic amb l'aparell Curix 60,

3.2.12. Marcatge Immunocitoquímic de les cèl·lules BV2

Preparació de la mostra

Per als assaigs de immunocitoquímica, les cèl·lules BV2 es van fer créixer sobre cobreobjectes rodons tractats amb poli-D-Lisina, en plaques de 24 pouets, a una concentració de 50000 cèl·lules/mL. El medi va ser canviat el dia de l'activació per un medi LPS + IFN γ .

Immunocitoquímica de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV-2

Per a la immunocitoquímica es va seguir el següent protocol:

1. Retirada del medi i rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
2. Fixació amb metanol (-20 °C) durant 8 minuts.
3. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
4. Bloqueig (5% BSA, 5% NPS, PBS 10 mM) durant 30 minuts.
5. Incubació amb l'anticòs anti- α_{1C} de conill (1 :1000 en solució diluent, 1% BSA, 1% NPS, en PBS 10 mM), 1 h a TA ó O/N a 4 °C.
6. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
7. Detecció amb l'anticòs anti-conill de cabra Alexa-Fluor A488 (1:500 en solució diluent, 1% BSA, 1% NPS, en PBS 10 mM), 1 h a TA ó O/N a 4 °C.
8. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
9. Per la visualització del nucli cel·lular, incubació amb Hoescht33258 (2,5 µg/mL en solució diluent, 1% BSA, 1% NPS, en PBS 10 mM) màxim 5 minuts.
10. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
11. Muntar amb pro-long sobre portaobjectes de vidre i mantenir a -20 °C.

Les imatges van ser adquirides usant un microscopi Zeiss Axio Observer Fluorescence Microscope (Göttingen, Germany).

3.2.13. Assaig de fagocitosis a les cèl·lules BV-2

El protocol s'ha extret de l'article del 2003 de Saura. Per a l'assaig es va realitzar una incubació amb fluoroesferes i seguidament una immunocitoquímica, com segueix:

1. Incubació les fluorosferes (FluoSpheres) al 0,01% al medi on són les cèl·lules durant 10 minuts i durant 30 minuts.
2. Retirada del medi i rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
3. Fixació amb metanol (-20 °C) durant 8 minuts.
4. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
5. Bloqueig (5% BSA, 5% NPS, PBS 10 mM) durant 30 minuts.
6. Incubació amb l'anticòs α -tubulina-FITC (1 :1000 en solució diluent, 1% BSA, 1% NPS, en PBS 10 mM), 1 h a TA o O/N a 4 °C.
7. Rentat amb 1 mL de PBS 10 mM (4 °C).
8. Per la visualització del nucli cel·lular, incubació amb Hoescht33258 (2,5 μ g/mL en solució diluent, 1% BSA, 1% NPS, en PBS 10 mM) màxim 5 minuts.
9. Rentat amb 1mL de PBS 10 mM (4 °C).
10. Muntar amb *pro-long* sobre portaobjectes de vidre i mantenir a -20 °C.

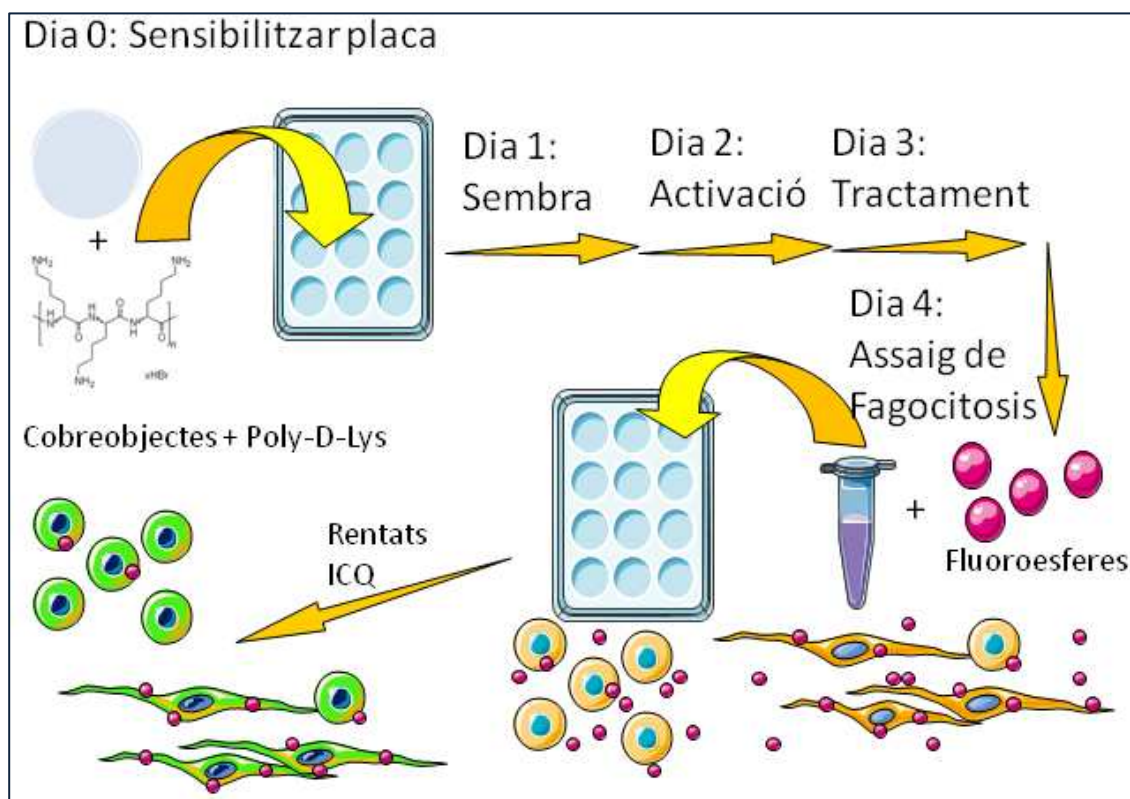


Figura 3.8: Esquema de l'assaig de fagocitosi.

Les imatges van ser adquirides usant un microscopi Zeiss Axio Observer Fluorescence Microscope (Göttingen, Germany). La quantificació es va dur a terme amb el programa ImageJ 1,39u, mitjançant el comptatge de les cèl·lules que contenien, almenys, una fluoresfera.

3.2.14. Mesura del calci citosòlic lliure i estimulació dels CCDV

La concentració intracel·lular de calci ($[Ca^{2+}]_i$) es va mesurar com s'ha descrit prèviament (Bataller *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2004).

Les cèl·lules BV2 es van sembrar sobre cobreobjectes rodons de vidre de 25 mm, prèviament netejats amb NO pur en agitació suau, O/N (per evitar les interaccions dels greixos que podrien haver al vidre), i mantinguts en etanol 100%, amb revestiment amb Poli-D-Lisina, flambejats prèviament, a raó de $5 \cdot 10^4$ cèl·lules/mL. Es va seguir el procediment habitual de activació al cap de les 24 hores, però no es va obtenir cap grup tractat a les 24 hores després de l'activació. 48 hores després de l'activació, es va fer un

primer rentat amb medi d'incubació ó medi fisiològic (130 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2,7 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂ i 10 mM glucosa, pH 7,4 amb NaOH). Les cèl·lules es van carregar amb 4µM de fura-2/acetoximetil éster, incubant-les durant 30 minuts a 37°C en medi d'incubació, amb agitació suau. Passats els 30 minuts, es va tornar a fer un rentat amb medi d'incubació.

Les cèl·lules carregades amb fura-2 es van col·locar en una cambra de flux oberta, termostatada a 37 °C, muntada sota un microscopi d'epifluorescència Diaphot-300, Les imatges de fluorescència es van obtenir amb una càmera i es van digitalitzar, emmagatzemar i analitzar amb un ordinador Macintosh 840AV.

Després d'un període d'estabilització de 10 minuts, havent comprovat a més que no hi ha heterogeneïtat en la fluorescència, es triava un camp i seleccionaven les cèl·lules que es volien estudiar, de manera que el programa les pogués diferenciar individualment. També es triava un punt de referència per a obtenir el co-registre de les imatges a 340 i 380nm. Es van prendre imatges cada 4 segons durant un total d'uns 12 minuts, amb longituds d'ona de 340 i 380 nm per excitar el Ca²⁺ lliure unit a fura-2. La longitud d'ona d'emissió era de 510 nm (vermell) i les concentracions de calci es van calcular a cada cèl·lula amb els quocients de fluorescència de 340 i 380 nm.

Dels primers 10 minuts per estabilitzar les cèl·lules, els 2 darrers serveixen per a calcular la [Ca²⁺]_i basal.

Després dels primers vuit minuts d'excitació per estabilitzar el senyal es va procedir al registre per a calcular la [Ca²⁺]_i basal durant els dos minuts següents.

La obertura dels CCDV s'indueïa mitjançant despolarització de membrana amb l'addició de KCl 80 mM, segons Bataller (2001). La composició d'aquest medi d'activació fou: 52,7 mM NaCl, 10 mM HEPES, 80 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂ i 10 mM glucosa, pH 7,4 amb NaOH La concentració de NaCl era més baixa per mantenir constant l'osmolaritat,. L'addició de KCl no va fer variar la viabilitat cel·lular tal i com es va testar testat amb l'assaig de *Trypan blue*.

El bloqueig farmacològic dels CCDV va ser amb l'addició de Nifedipina 10 µM, tant en medi d'incubació com en medi d'activació, i l'obertura d'aquest canal va ser amb Bay k8644 a una concentració a la cubeta de 10 µM. Les cèl·lules es consideraven que eren responedores a la addició de KCl quan la fluorescència augmentava més d'un 20% respecte al basal. Cada condició es va assajar amb entre 3 i 7 cultius independents.

3.2.15. Anestèsia dels animals

Per a la cirurgia, les rates es van anestesiari amb equitesina, una barreja d'hidrat de cloral i de pentobarbital, segons el següent protocol:

a) hidrat de cloral	2,12 g
propilenglicol	21,4 mL
b) pentobarbital sòdic	485 mg
etanol	5,75 mL
c) MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,06 g
aigua destil·lada	21,8 mL

Barrejar (a+b)+c i guardar a 4 °C, protegint de la llum

L'administració es realitzava intra-peritonealment amb una dosi de 0,12 unitats per gram de rata.

Per al seu sacrifici es van utilitzar dues tècniques diferents en funció de si la mostra era destinada a realitzar una anàlisi histològica o l'estudi molecular d'expressió gènica per les PCR a temps real i quantificació de proteïnes per *Western-blot*. Així, en el primer cas s'usà equitesina abans de sotmetre els animals a perfusió transcardíaca i en els altres dos, un cristal·litzador amb l'atmosfera saturada de *forane* per anestesiari les rates abans de la seva decapitació.

3.2.16. Lesió estereotàxica

Es feien dos tipus d'injeccions per tal d'obtenir dos tipus de grups: els grups Sham, és a dir, grups que rebien una injecció de PBS 50 mM; i grups NMDA, és a dir, grups que rebien una injecció de la toxina NMDA 40 mM en PBS 50 mM.

Es va utilitzar un aparell estereotàxic (David Kopf, Carnegie Medicine) per accedir a les coordenades hipocàmpals (desde bregma: -3.3 rostral a bregma, -2,2 lateral a bregma, -2,9 ventral des de la duramadre) segons la referència de l'Atlas de Paxinos i Watson 1986 (Paxinos & Watson 1986).

Un cop comprovada l'anestèsia, la rata es va col·locar a l'aparell d'estereotàxia, amb la barra d'incisius a -3.3 mm d'altura i se'n comprovà la seva fixació. Amb un bisturí se li va practicar una incisió *antero-posterior* per arribar al crani i poder visualitzar els punts

bregma i *lambda*, els quals corresponen a la intersecció de les sutures fronto-parietals i occipito-parietals respectivament. Després de comprovar que la posició de l'animal era la correcta i després de calcular es coordenades d'injecció, es va trepanar el crani amb un torn de dentista. Segons les coordenades s'introduí l'agulla i s'injectà un volum de 0,5 μ L després d'esperar 5 minuts per tal que el teixit es recuperés. Un cop finalitzada la injecció s'esperaren 5 minuts més per permetre la difusió del volum, es va extreure l'agulla i es practicaren 3-4 punts de sutura a la ferida. La rata es retornava a una gàbia sota un focus de llum fins a la seva recuperació moment en el qual se li proporcionava aigua.

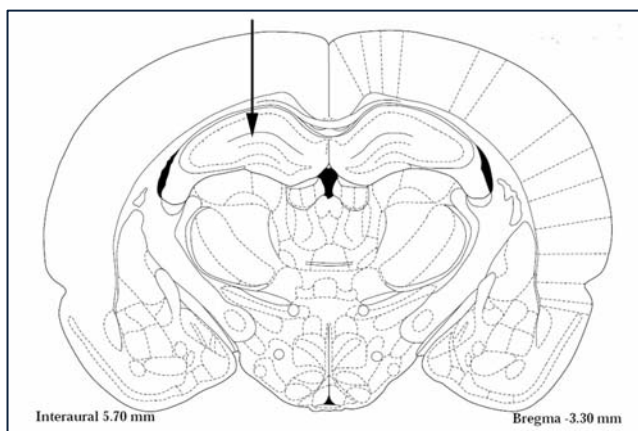


Figura 3.9: Imatge del cervell de la rata a les coordenades d'injecció. La fletxa assenya el lloc d'injecció en la lesió estereotàxica hipocampal. De: Paxinos and Watson, 1986.

3.2.17. Administració oral de Dzx a les rates

Per tal de veure si la obertura del canal K_{ATP} modula la activitat microglial *in vivo* i té algun efecte a la lesió, vam administrar les rates amb Dzx. La Dzx és un derivat de la dioxida i, com ja hem dit, un agonista del canal K_{ATP} . Com s'ha descrit en nombrosos estudis de producció d'insulina (Kishore *et al.*, 2011), la Dzx té capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica, ja que és molt homofòbica. Per això, la vam poder administrar de manera oral. Primer vam fer una dosi-resposta a 15 dies post-lesió per a saber la dosi òptima de Dzx que limitava la lesió hipocampal. L'administració oral de Dzx es va fer amb una xeringa d'alimentació de 76.2 mm.

Es va treballar amb set grups diferents. Dos d'ells eren grups Sham: un d'ells rebia la solució de Dzx màxima (10 mg/Kg/dia) i l'altre la solució de vehicle on es troba dissolta la Dzx. El vehicle era una solució 1:1 (v/v) de DMSO:aigua de l'aixeta, donada la seva hidrofobicitat. Els cinc grups restants eren grups NMDA: un d'ells rebia la

administració del vehicle i els quatre restants una administració oral diària de Dzx a diferents concentracions: 10, 1, 0,1 i 0,05 mg/Kg/dia.

Les administracions es van realitzar diàriament durant 8 dies (dels dies 8 al 15 post-lesió). Els cervells obtinguts per perfusió transcardíaca s'empraven per a la obtenció de talls seriats per a realitzar tincions, histoquímiques i immunohistoquímiques.

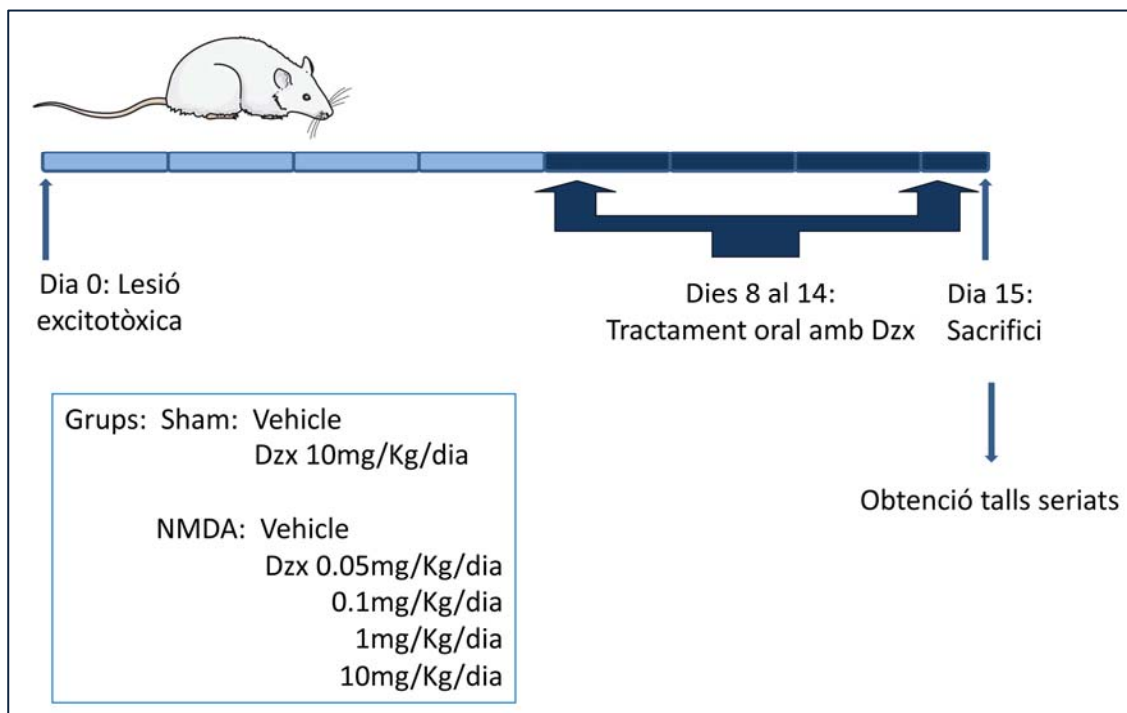


Figura 3.10: Esquema del procediment de lesió+tractaments que es fa servir per l'estudi de dosi-resposta de les rates.

Un cop trobada la dosi òptima, es va fer un estudi de *time-course* per tal de veure l'efecte de la Dzx a diferents temps, per tal de estudiar l'efecte en la neurogènesi. Aquest cop es van fer servir 10 grups diferents: dos grups (un Sham i un NMDA, que es sacrificaven a 5 dies post-lesió); quatre grups més (Sham, Sham tractat, NMDA, NMDA tractat) que es sacrificaven 15 dies post-lesió; i quatre grups més (Sham, Sham tractat, NMDA, NMDA tractat) que es sacrificaven 38 dies post-lesió. Als grups que es sacrificaven al dia 15 post-lesió es feia servir el mateix procediment que al punt anterior. El grups que es sacrificaven a 38 dies post-lesió rebien el tractament durant 30 dies (del 8 al 38). Tots els grups estaven duplicats, un grup per a la obtenció de talls per a histologia i un altre grup per a obtenir els hipocamps.

Totes les rates de l'estudi de la neurogènesis destinades a histologia van rebre una injecció intraperitoneal (IP) de BrdU (50 mg/Kg en PBS 50 mM) entre els dies 5 i 8 post-lesió, exceptuant les rates que es sacrificaven al cinquè dia post-lesió.

Els cervells obtinguts per perfusió transcardíaca s'empraven per a la obtenció de talls seriats per a realitzar tincions, histoquímiques, immunohistoquímiques i doble immunohistoquímiques. També es va obtenir el teixit fresc, del qual es congelava l'hipocamp per a la extracció de proteïnes i àcids nucleics.

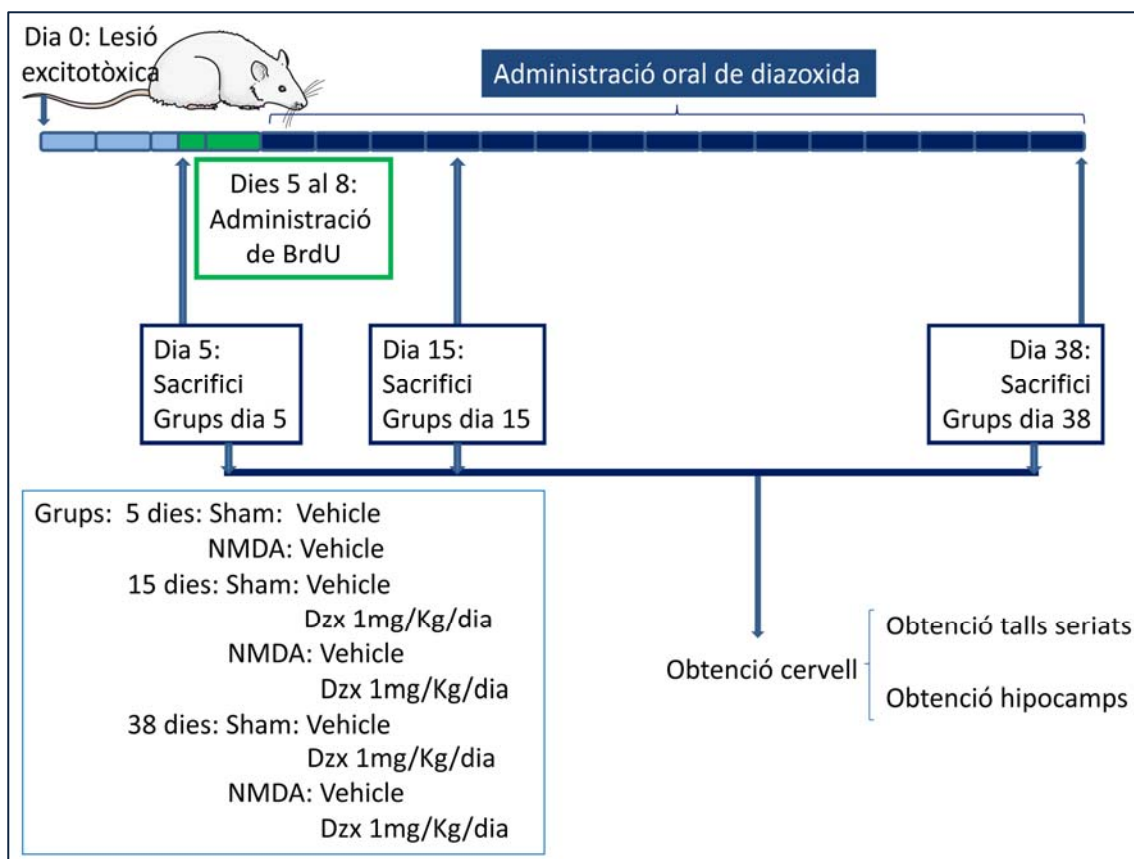


Figura 3.11: Esquema del procediment que es fa servir per l'estudi de *time-course* de les rates.

3.2.18. Test de glucèmia a les rates

La Dzx, quan es pren per administració oral, és un fàrmac que es fa servir per a combatre la hipoglucèmia. Se sap que a altes dosis en humans provoca hiperglucèmia. Per tal de descartar canvis en la glucosa en sang derivats del tractament amb la dosi 1 mg/Kg/dia de Dzx, es va monitoritzar la concentració de glucosa en sang d'algunes de les rates administrades, entre els dies 8 i 14 post-lesió, un cop cada dos dies, una hora després de l'administració de la Dzx. Les rates seleccionades van ser dues sense

administració de cap mena, quatre a les quals se'ls administrava el vehicle, dos de NMDA i dos de Sham, i quatre més a les quals se'ls administrava la Dzx, dues Sham i dues NMDA. Per a la obtenció de la sang es va fer una punció a la vena safena de la rata segons el protocol de Hem *et. al.* (1998). La mesura de la glucosa es va fer amb un aparell automàtic Glucocard, amb les seves tires reactives, que mesuren els nivells totals de β -D-Glucosa en sang, a una concentració de mg/dL.

3.2.19. Obtenció de mostres cerebrals per histologia

Després d'anestesiari l'animal i fixar-lo en una graella se li realitzava una incisió des del final de l'apòfisi xifoide fins a mig abdomen. Seccionant la part més lateral de les costelles, s'obria la caixa toràctica de manera que quedés prou espai per accedir al cor. Ràpidament es seccionava el diafragma i s'accedia a la cavitat cardiopulmonar. Inmediatament s'introduïa la cànula al ventricle esquerre de l'animal per iniciar la perfusió amb PBS 0,01M (pH, 7,4). Al moment, es seccionava la vena cava al seu accés a l'aurícula dreta per obtenir una sortida d'evacuació del sistema. El flux de pas del PBS era aproximadament de 2 mL per minut i permetia en uns 20 minuts el rentat complet de sang del sistema circulatori de l'animal. Després s'obria el pas a la solució fixadora de paraformaldehid (PFA) al 4% (p/v) en PBS 0,01M, que corria amb el mateix flux i durant el mateix temps. Per evitar una fixació innecessària de tot l'animal, pocs minuts després d'iniciar el pas de la solució fixadora es tallava el flux per l'artèria aorta descendent i així s'anul·lava el circuit inferior.

Finalment, s'extreïa el cervell i es post-fixava en la mateixa solució fixadora durant 2 hores a 4 °C i es crioprotegia en una solució de sacarosa al 15% durant 3 dies a la mateixa temperatura (canviant la solució cada 24 hores). Finalitzada la crioprotecció es congelava en neu carbònica i es guardava a -50 °C fins al seu ús.

Les solucions que es van utilitzar van ser:

PBS	0,01 M
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,26 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g

Aigua destil·lada 0,1 L

Ajustar el pH a 7,4

Solució fixadora: solució de PFA al 4% p/v en PBS 0,01 M.

Solució de crioprotecció: solució de sacarosa al 15% p/v en PB 0,01 M i d'azida sòdica al 0,01% p/v.

Totes les solucions es preparaven el dia abans del seu ús, es filtraven i es guardaven a 4 °C.

Amb un criòstat es van obtenir talls coronals seriatos dels cervells congelats per a poder fer estudis histològics. Les seccions obtingudes eren de 14 µm i es mantenia la temperatura de la càmera del criòstat a -16 °C i l'espècimen a -20 °C per tal que es mantingués el cervell amb una adequada textura pel seu tall i recol·lecció. Els talls realitzats es recollien en portaobjectes tractats amb poli-L-Lisina (10% w/v en aigua destil·lada) per a l'estudi de dosi-resposta i amb portaobjectes silanitzats per a l'estudi de la neurogènesi. Es van obtenir talls a l'alçada de l'hipocamp.

3.2.20. Tincions histològiques i immunohistoquímica

Per tal de determinar la extensió de la lesió, la gliosi i la preservació de les capes neuronals, es van fer estudis de histoquímica i tincions. Per tal de determinar la natura de les noves cèl·lules proliferants a l'estudi de neurogènesi, es van fer immunohistoquímiques i dobles immunohistoquímiques amb diferents marcadors. A més, es va realitzar dobles immunohistoquímiques per tal de localitzar i identificar a l'hipocamp els canals K_{ATP} i CCDV.

Totes les immunohistoquímiques es van realitzar en un sistema de racs i cassettes (*Shandon Sequenza Slide Rack*) subministrats per Thermo Scientific.

A continuació es facilita un llistat dels protocols detallats per a totes les tincions histològiques, histoquímiques i immunohistoquímiques que es van realitzar.

Tinció de Nissl

1. Bany en etanol 95°, 2 min

2. Bany en etanol 100°, 2 min
3. Bany en xilol, 5 min
4. Bany en etanol 100°, 2 min
5. Bany en etanol 95°, 2 min
6. Tinció amb solució filtrada de Violeta de Cresil (1% p/v en H₂O, pH3,5), 10 min
7. Bany en etanol 95°, 2 min
8. Bany en etanol 100 °, 2 min
9. Bany en xilol, un mínim de 10 min
10. Muntar en DPX

Tinció histoquímica de la Isolectina B₄

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb IB₄ 1:25 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a TA
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb ExtrAvidina conjugada amb HRP 1:250 en PBS 0,01 M (pH 7,4), 1 h a 37 °C ó 2 h a TA i a les fosques
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2x5 min
9. Rentar en una solució Tris-HCl 50 mM, 5 min
10. Revelar en una solució Tris-HCl 50 mM que conté DAB al 0,03% (p/v) i H₂O₂ al 0,006% v/v, 10-15 min
11. Rentar en PBS, 10 min
12. Deshidratar
13. Muntar en DPX

Localització immunohistoquímica de la proteïna NeuN

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA

4. Incubar amb la solució de l'anticòs monoclonal anti-NeuN de ratolí 1:150 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a TA
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari *Anti-mouse IgG Conjugat a biotina* 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb ExtrAvidina conjugada HRP 1:250 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Rentar en una solució Tris-HCl 50 mM, 5 min
12. Revelar en una solució Tris-HCl 50 mM que conté DAB al 0,03% (p/v) i H₂O₂ al 0,006% v/v, 10-15 min
13. Rentar en PBS, 10 min
14. Deshidratar
15. Muntar en DPX

Localització immunohistoquímica de la proteïna GFAP

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució de l'anticòs primari anti-GFAP de ratolí 1:400 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a TA
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari anti- IgG de ratolí conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb ExtrAvidina conjugada HRP 1:250 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Rentar en una solució Tris-HCl 50 mM, 5 min

12. Revelar en una solució Tris-HCl 50 mM que conté DAB al 0,03% (p/v) i H₂O₂ al 0,006% v/v, 10-15 min
13. Rentar en PBS, 10 min
14. Deshidratar
15. Muntar en DPX

Localització immunohistoquímica del BrdU

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Banyar en una solució HCl 2 M a 37-40 °C, 1 h
4. Banyar en una solució d'acid bòric 0,1 M, pH 8,5 a TA, 10 min
5. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
6. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
7. Incubar amb la solució de l'anticòs primari monoclonal anti-BrdU de rata 1:100 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
8. Continuar la incubació, 1 h a TA
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
10. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari anti-rat IgG de ratolí conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
11. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
12. Incubar amb ExtrAvidina conjugada HRP 1:250 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
13. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
14. Rentar en una solució Tris-HCl 50 mM, 5 min
15. Revelar en una solució Tris-HCl 50 mM que conté DAB al 0,03% (p/v) i H₂O₂ al 0,006% v/v, 10-15 min
16. Rentar en PBS, 10 min
17. Deshidratar
18. Muntar en DPX

Localització immunohistoquímica de calretinina

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min

3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució de l'anticòs primari policlonal anti-Calretinina de ratolí 1:2000 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb ExtrAvidina conjugada HRP 1:250 en *Solució diluent*, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Rentar en una solució Tris-HCl 50 mM, 5 min
12. Revelar en una solució Tris-HCl 50 mM que conté DAB al 0,03% (p/v) i H₂O₂ al 0,006% v/v, 10-15 min
13. Rentar en PBS, 10 min
14. Deshidratar
15. Muntar en DPX

Localització immunofluorescència de PSA-NCAM

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució de l'anticòs primari policlonal anti-PSA-NCAM de ratolí 1:200 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari *Alexa-fluor 455* anti-ratolí de cabra 1:200 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica BrdU-NeuN

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Banyar en una solució HCl 2 M a 37-40 °C, 1 h
4. Banyar en una solució d'acid bòric 0,1 M, pH 8,5 a TA, 10 min
5. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
6. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
7. Incubar amb la solució dels anticossos monoclonal anti-BrdU de rata 1:200 i monoclonal mouse anti-NeuN 1:200 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
8. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
10. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a BrdU, anti-rata IgG de ratolí conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
11. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
12. Incubar amb la solució de fluorescència per al BrdU: extravidina-FITC 1:250 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
13. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
14. Incubar amb la solució de fluorescència per al marcador cel·lular específic: *Alexa fluor-555*- anti-ratolí de rata 1:100 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
15. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
16. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
17. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica BrdU-GFAP

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Banyar en una solució HCl 2 M a 37-40 °C, 1 h
4. Banyar en una solució d'acid bòric 0,1 M, pH 8,5 a temperatura ambient, 10 min
5. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min

6. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
7. Incubar amb la solució dels anticossos monoclonal anti-BrdU de rata 1:200 i monoclonal anti-GFAP de ratolí 1:400 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
8. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
10. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a BrdU, anti-rata IgG de ratolí conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
11. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
12. Incubar amb la solució de fluorescència per al BrdU: extravidina-FITC 1:250 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
13. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
14. Incubar amb la solució de fluorescència per al marcador cel·lular específic: *Alexa fluor-555*- anti-ratolí de rata 1:100 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
15. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
16. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
17. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica BrdU-IB₄

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Banyar en una solució HCl 2 M a 37-40 °C, 1 h
4. Banyar en una solució d'acid bòric 0,1 M, pH 8,5 a temperatura ambient, 10 min
5. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
6. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
7. Incubar amb la solució de l'anticòs monoclonal anti-BrdU de rata 1:200 i de l'extracte IB₄ biotinitat 1:25 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
8. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min

10. Incubar amb la solució de fluorescència per a IB₄: extravidina-cy3 1:250 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
11. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
12. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a BrdU, anti-rata IgG de ratolí conjugat a biotina 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
13. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
14. Incubar amb la solució de fluorescència per al BrdU, *extravidin*-FITC 1:250 en PBS 0,01 M, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
15. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
16. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
17. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica de Sp8-NeuN

1. Atemptar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució de l'anticòs primari policlonal anti-Sp8 de conill 1:1000 i monoclonal anti-NeuN de ratolí 1:200 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) durant 48 hores a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari *Alexa-fluor 488* anti-conill de mico 1:100 i *Alexa fluor-555* anti-ratolí de cabra 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica de Sp8-GFAP

1. Atemptar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA

4. Incubar amb la solució de l'anticòs primari policlonal anti-Sp8 de conill 1:1000 i monoclonal anti-GFAP de ratolí 1:400 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) durant 48 hores a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari *Alexa-fluor 488* anti-conill de mico 1:100 i *Alexa fluor-555* anti-ratolí de cabra 1:100 en solució diluent, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3 x 5 min
9. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
10. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
11. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica α_{1C} -IB4

1. Atemptar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució dels anticossos monoclonal anti- α_{1C} de conill 1:200 i de l'extracte IB₄ biotinitat 1:25 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a α_{1C} , *Alexa-Fluor A488* anti-conill de cabra 1:300 en solució diluent, i l'anticòs secundari per a IB₄, *extravidin-Cy3* conjugat 1:500 en solució diluent, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
10. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica α_{1C} -GFAP

1. Atemptar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA

4. Incubar amb la solució dels anticossos monoclonal anti- α_{1C} de conill 1:200 i de l'anticòs anti-GFAP de ratolí 1:750 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a α_{1C} , *Alexa-Fluor A488* anti-conill de cabra 1:300 en solució diluent, i l'anticòs secundari per a GFAP, *Alexa-fluor 555 conjugated* anti-ratolí de cabra, 1:500 en solució diluent, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
10. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica Kir6.2-IB4

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min
3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució dels anticossos anti-Kir6.2 policlonal de conill 1:200 i de l'extracte IB₄ biotinitat 1:25 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a Kir6.2, *Alexa-Fluor A488* anti-conill de cabra 1:300 en solució diluent, i l'anticòs secundari per a IB₄, *extravidin-Cy3* conjugat 1:500 en solució diluent, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
10. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

Doble localització immunohistoquímica SUR1-IB4

1. Atemperar les seccions, 10-20 min
2. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 10 min

3. Bloquejar les unions no específiques amb una solució de PBS 0,01 M -0,5% Tritó x-100 amb 5% de NGS i 5% de BSA, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
4. Incubar amb la solució dels anticossos anti-SUR1 policlonal de conill 1:100 i de l'extracte IB₄ biotinitat 1:25 en solució diluent (solució de PBS 0,01 M-0,5% Tritóx100, 1% NGS, 1% BSA) O/N a 4 °C
5. Continuar la incubació, 1 h a temperatura ambient
6. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 3x5 min
7. Incubar amb la solució de l'anticòs secundari per a α_{1C} , Alexa-Fluor A488 anti-conill de cabra 1:300 en solució diluent, i l'anticòs secundari per a IB₄, *extravidin-Cy3* conjugat 1:500 en solució diluent, a les fosques, 1 h a 37 °C ó 2 h a TA
8. Incubar amb Hoescht33258 1:50 en solució diluent, durant 5 minuts a TA
9. Rentar en PBS 0,01 M (pH 7,4), 2 x 5 min
10. Muntar en *ProLong antifade* i segellar amb esmalt

3.2.21. Preparació dels extractes de hipocamp de rata

Després de ser anestesiades, les rates van ser sacrificades per decapitació. L'extracció del cervell es feia en fresc i les mostres disseccionades es sotmetien immediatament a ultracongelació amb nitrogen líquid. Dels hipocamps obtinguts de les rates per a l'experiment de *time-course*, es va realitzar una extracció del RNA i de les proteïnes, per tal de poder realitzar experiments de PCR en temps real i *Western Blot*, respectivament.

Homogeneïtzació del teixit

Per a la homogeneïtzació dels hipocamps per a la extracció del RNA i les proteïnes es va realitzar el següent protocol:

1. Disgregar el teixit (de 50 a 60 mg de teixit), usant un morter i una mà de morter en nitrogen líquid.
2. Afegir 1mL del reactiu TriReagent i moldre fins que quedi una pols fina en nitrogen líquid.
3. Transferir la barreja a un tub Falcon de 50 mL estèril, i deixar que s'evapori el nitrogen líquid. Descongelar la barreja a TA.

4. Homogeneitzar el llisat amb una xeringa i una agulla de 20 G de diàmetre, unes 10 vegades o fins que s'aconsegueixi un llisat homogeni. Transvasar-lo a un tub *ependorf*. En aquest pas, les mostres es poden mantenir a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant mesos.

Separació de les fases

1. En cas que no estigués descongelat, deixar la barreja a TA fins a la completa descongelació.
2. Afegir $100\text{ }\mu\text{L}$ de BCP i barrejar amb el vòrtex durant uns 15 segons. Deixar a TA durant uns 2-3 minuts.
3. Centrifugar a $12000\times G$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15 minuts fins a la obtenció de dues fases (aquosa amb el RNA, i la orgànica + la interfase amb el DNA i les proteïnes).
4. Separar les dues fases: amb una pipeta recuperar la fase aquosa (superior, i transparent) i transvasar-la a un nou tub *ependorf* estèril. La fase orgànica (inferior, vermella) i la interfase es poden quedar al mateix tub. Totes les mostres es poden mantenir a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant mesos.

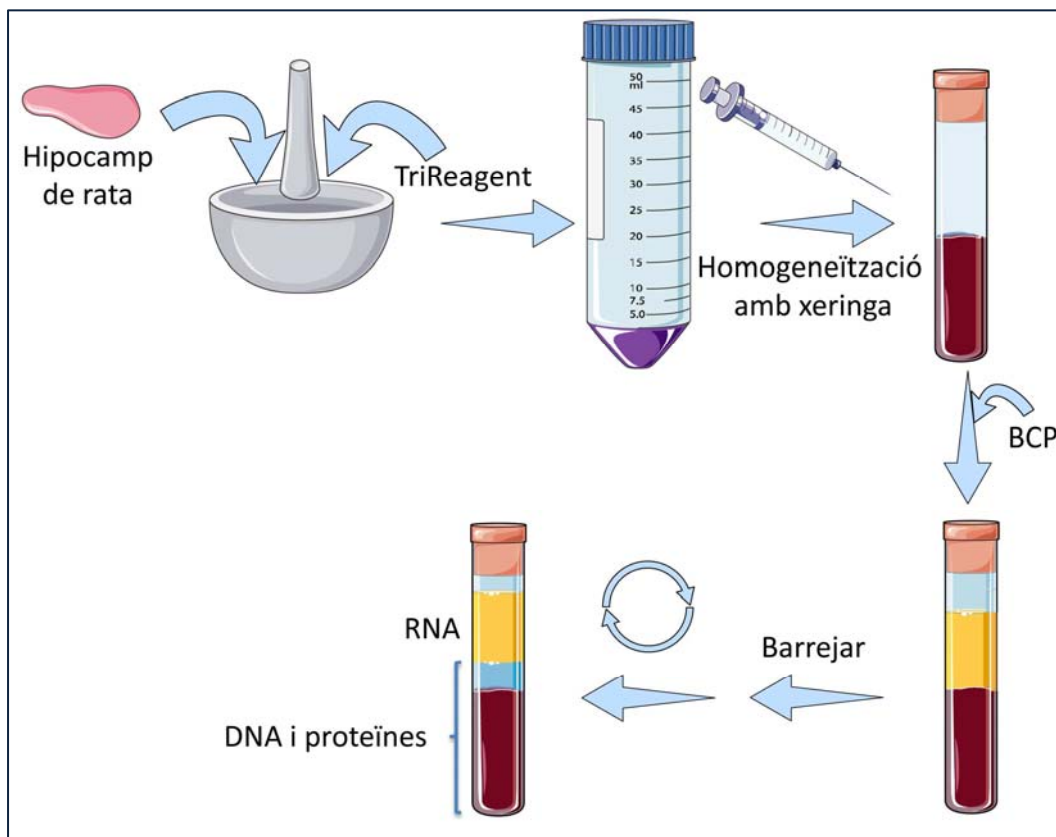


Figura 3.12: Esquema de la separació de fases basat en el reactiu Tri-Reagent.

Extracció del RNA total de l'hipocamp de la rata

L'extracció del RNA total es va dur a terme utilitzant el lot *RNeasy Mini Kit* de Qiagen.

El protocol que es va fer servir es detalla a continuació:

1. Afegir 1,5 volums d'Etanol 100% (uns 675 μL) al tub *ependorf* on hi ha la fase aquosa, i barrejar varis cops per inversió. Es podrà observar un precipitat blanc, corresponent a restes de DNA i de RNA llargs.
2. Transvasar el contingut a una columna *RNAeasy spin column*, 800 μL com a màxim, i col·locar-ho sobre un tub col·lector. Centrifugar a 8000 x g durant 15 segons i descartar el sobrenedant. Repetir en el cas de que encara hi hagués mostra.
3. Afegir 350 μL del tampó RWT, centrifugar a 8000 x g durant 15 segons i descartar el sobrenedant.
4. Es prepara la mescla *rDNase reaction* en un tub de microcentrifuga estèril, afegint 8 μL de rDNase I reconstituïda a 72 μL de *rDNase reaction*.
5. S'aplica 80 μL de *rDNase reaction* directament al centre de la membrana de sílica de la columna. S'incuba a temperatura ambient durant 15 min.
6. Afegir 350 μL del tampó RWT, centrifugar a 8000 x g durant 15 segons i descartar el sobrenedant.
7. Afegir 500 μL del tampó RPE, centrifugar a 8000 x g durant 15 segons i descartar el sobrenedant.
8. Afegir 500 μL del tampó RPE, centrifugar a 8000 x g durant 2 minuts i descartar el sobrenedant.
9. Centrifugar el tub buit a 8000 x g durant 1 minut i descartar el sobrenedant.
10. Posar la columna en un nou tub *ependorf RNAase free* i afegir 50 μL d'aigua estèril *RNAase free*.
11. Centrifugar a 8000 x g durant 1 minut i recuperar l'eluit (RNA). El RNA es pot guardar a -80 °C durant mesos. Manipular en gel.
12. Per al control de qualitat i la quantificació, preparar dues alíquotes de 1,5 μL cadascuna, una per al NanoDrop i l'altra per al Bioanalyzer (Agilent).

Totes les determinacions de la concentració i qualitat de RNA es van dur a terme a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

Extracció de proteïnes de l'hipocamp de la rata

Partim de les fases orgànica i interfase que teníem fa dos punts, preparades en *TriReagent*. El protocol que es fa servir és el que es detalla a continuació:

1. Afegir a les fases 0,7 mL d'Etanol 100% i barrejar vigorosament amb el *vòrtex*.
2. Afegir 0,2 mL de BCP i barrejar vigorosament amb el *vòrtex*.
3. Centrifugar a 12000 x g durant 5 minuts.
4. Obtindrem tres fases: una superior aquosa, una interfase que conté proteïnes i una fase orgànica (amb etanol) que conté les proteïnes. Retirar amb cura la fase aquosa.
5. Afegir a les fases 0,7 mL d'Etanol 100% i barrejar vigorosament amb el *vòrtex*.
6. Centrifugar a 12000 x g durant 5 minuts.
7. Obtindrem dues fases: una orgànica que conté l'etanol, i una inferior amb textura de pasta, que conté les proteïnes. Retirar amb cura la fase orgànica i passar la proteica a un nou tub eppendorf i deixar evaporar les restes de l'etanol durant 30 minuts.
8. Afegir 0,1 mL de un tampó inhibidor de proteases, compostat per un tampó Tris-HCl 4% SDS amb una pastilla amb un còctel inhibidor de proteases.
9. Incubar a 50 °C durant 5 minuts.
10. Homogeneïtzar mecànicament amb un *polytron* en gel, fins que quedi totalment homogeni.
11. Afegir 0,4 mL més de tampó inhibidor de proteases, i barrejar bé amb el *vòrtex*.
12. Mantenir a 4 °C durant no més de 24 hores, o a -20 °C o -80 °C durant períodes més llargs.

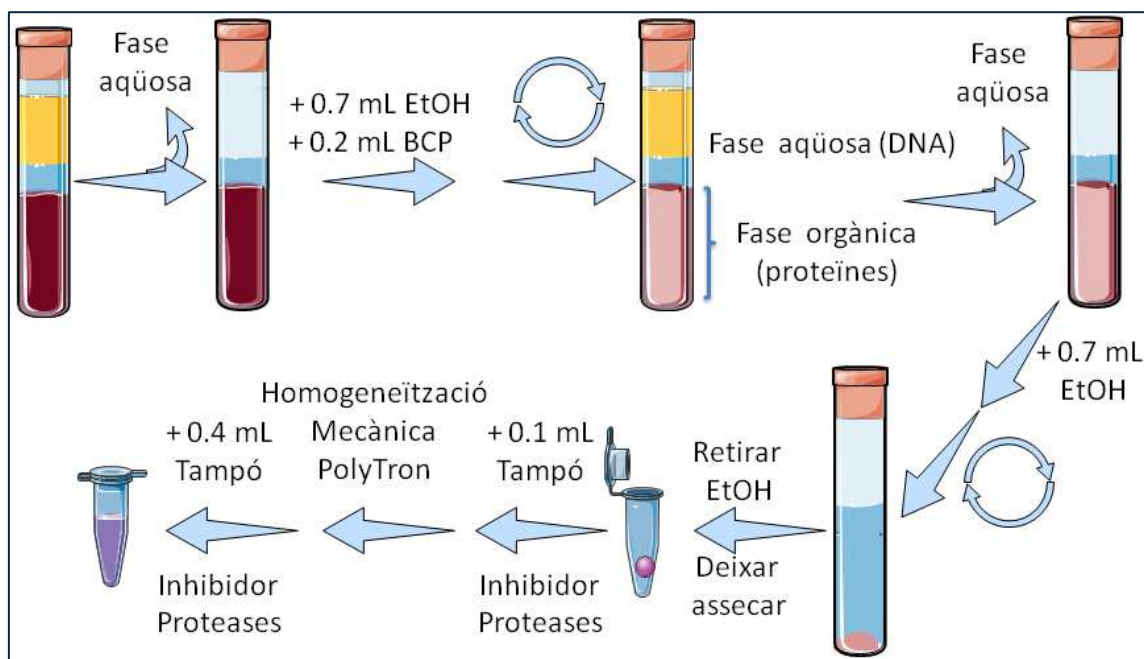


Figura 3.13: Esquema de la separació de proteïnes basat en la extracció amb BCP/etanol/aigua

3.2.22. Determinació de la concentració de proteïnes hipocampals

Donat que el SDS que es troba present en el tampó on es troben dissoltes les proteïnes pot interferir en la reacció de Bradford, la determinació de la concentració proteica es fa en BCA (àcid biquinonínic). El porta Cu^{2+} , que es redueix en presència del ambient alcali de les proteïnes. Aquest Cu^+ resultant es combina amb BCA donant un producte porpre, que es pot quantificar mitjançant un assaig colorimètric. Aquest assaig es va fer amb el lot *Bicinchonic Acid Kit for Protein Determination* tal i com segueix:

1. Preparar estàndards de diferent concentració de BSA en el tampó d'inhibidors de proteases on es troben dissoltes les proteïnes (de 0 a 1 mg/ mL).
2. Afegir, a una placa d'ELISA, 25 μL de cada estàndard, i 25 μL de cada mostra, diluïda convenientment.
3. Afegir, a cada pou, 0,2 mL de la barreja de A i B (5 mL del reactiu A + 0,1 mL del reactiu B).
4. Incubar un mínim de 2 hores a TA ó 30 minuts a 37°C, cobert amb *parafilm*.
5. Mesurar l'absorbància a 562 nm amb un lector de plaques.
6. Inferir les concentracions de les proteïnes a partir de la recta patró resultant.

3.2.23. Anàlisi d'expressió diferencial per PCR en temps real dels extractes de RNA

Les reaccions de retrotranscripció es van dur a terme amb un lot òptim per a les posteriors PCR en temps real. Abans de realitzar les reaccions de retrotranscripció s'ha de tenir en compte la concentració desitjada de RNA a cada pouet de la PCR en temps real. Tenint en compte que el volum del producte de la RT-PCR no ha de superar en 1/10 el volum de la barreja de la PCR en temps real, que és de 20 µL, com a màxim ha de ser de 2 µL. Suposant que es retrotranscriu tot el RNA a cDNA, i que necessitem 50 ng per cada reacció de PCR en temps real, en aquests 2 µL hi ha d'haver els 50 ng necessaris per a la reacció. Si el volum final de la RT-PCR és de 20 µL, en aquests hi haurem d'haver carregat 500 ng (0,5 µg) de RNA. En tots els casos es van carregar aquestes concentracions de RNA.

RT-PCR

Les reaccions de retrotranscripció es van dur a terme usant encebadors aleatoris seguint el protocol del lot *First Strand cDNA Synthesis kit*:

1. Preparació de la reacció en un tub de microcentrífuga:
 - 0,5 µg de RNA
 - 1 µL de encebadors aleatoris
 - H₂O lliure de RNAases fins a 12 µL
2. Incubació de la reacció a 65 °C durant 5 minuts.
3. Posar els tubs en gel, centrifugar i tornar a posar en gel.
4. Afegir els següents components per ordre:
 - 4 µL del tampó *5X Reaction Buffer*
 - 1 µL del *RiboLockTM RNase Inhibitor*
 - 2 µL de les barreges de dNTPs
 - 1 µL de la *RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase*
5. Barrejar i centrifugar.
6. Incubar durant 5 minuts a 25 °C
7. Incubar a 42 °C durant 60 minuts
8. Incubar a 70 °C durant 5 minuts
9. Posar les mostres en gel abans de realitzar la PCR en temps real ó guardar-les a -20 °C.

La concentració final de cDNA és de 25 ng/ μ L.

PCR en temps real

L'objectiu d'aquests experiments va ser determinar en el model *in vivo* si es compleixen tots els canvis, a nivell transcripcional i d'expressió, que s'han vist al model de cèl·lules BV-2. Tots els experiments de *real-time* PCR es van dur a terme amb el lot de Bioline: *SensiFASTTM SYBR Lo-ROX Kit*.

Determinació dels gens control adients per al model d'excitotoxicitat a l'hipocamp de la rata

El que vam fer primer va ser triar els gens control adequats per al nostre model d'excitotoxicitat. L'objectiu és trobar un gen control l'expressió del qual no es modifiqui ni en la lesió ni en el tractament. Per això vam utilitzar el lot *Rat Housekeeping Gene Primer Set*, que contenia els encebadors per a 10 gens, a priori no regulats: Actb, B2m, Gapd, Gusb, Hpvt1, Pkg, Ppia, Rpl13a, Tbp i Tfr. A continuació es mostra la informació detallada del producte:

Gen	Accession number	Tamany	Tm	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Actb	NM_031144	272 pb	58°C	CACACTGTGCCCATCTATGA	CCGATAGTGATGACCTGACC
B2m	NM_012512	196 pb	58°C	TGCTACGTGTCTCAGTTCCA	GCTCCTTCAGAGTGACGTGT
Gapd	NM_017008	207 pb	58°C	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
Gusb	NM_017015	205 pb	58°C	GTGGGGATAATGACTTGCAG	GGAACCCCTGGTAGAACAGT
Hpvt1	NM_012583	152 pb	58°C	GACTTTGCTTTCCTTGGTCA	AGTCAAGGGCATATCCAACA
Pkg	NM_053291	253 pb	58°C	TAAAGTCAGCCATGTGAGCA	ATGAATCCCAGTGCAGTAAA
Ppia	NM_017101	295 pb	58°C	CTGGTGGCAAGTCCATCTAC	CCCAGCAAGTCAAAGAAATTA
Rpl13a	NM_173340	242 pb	58°C	GTGAGGGCATCAACATTCT	CATCCGCTTTTCTTGTCAT
Tbp	NM_001004198	166 pb	58°C	CGATAACCCAGAAAAGTCGAA	AGATGGGAATTCCAGGAGTC
Tfr	M58040	242 pb	58°C	CATCTCCATCTGACCCTCAC	GTCTTTGGCTTCTGGTCTCA

Taula 3.5: Seqüències dels gens control.

Les condicions de reacció d'aquests encebadors fou:

Concentració dels encebadors: 100 nM

Concentració de MgCl₂: 4 mM

Condicions de la PCR: *Holding Stage*: 95 °C 2 min. 1 cicle

Cycling Stage: 95 °C 15 seg. + 60 °C 1 min. 45 cicles

Melt Curve Stage: 95 °C 15 seg. + 60 °C 1 min. 1 cicle +

pujar fins a 95 °C cada 0,3 °C

La T_m és de 60 °C enlloc de 58 °C com aconsella la casa comercial ja que són les condicions òptimes de la polimerasa.

La barreja de la reacció segons el lot és:

Barreja	Volum (µL)
<i>SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step mix (2x)</i>	10
<i>Free RNase Water</i>	6
<i>Template cDNA (25 ng/µL)</i>	2
<i>Primers (1 µM)</i>	2
Volum final	20

Taula 3.6: Barreja de reacció per a la PCR en temps real.

La barreja del lot *SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step mix (2x)* conté la concentració idònia de MgCl₂ (6.8mM, per tal que quedi 4mM de volum final), conté els dNTPs necessaris, conté els inhibidors de RNases, conté la polimerasa i, finalment, el seu tampó.

Com a mostres vam agafar totes les mostres de les que teníem RNA provenen dels hipocamps de les rates, creant 7 grups: Sham, Sham + Dzx, NMDA 5 dies, NMDA 15 dies, NMDA 15 dies + Dzx, NMDA 38 dies i NMDA 38 dies + Dzx.

Un cop fetes les comparatives de les corbes i les C_T es va triar com a HK la GAPD, ja que era l'únic HK el qual no variava la seva expressió amb la lesió (Sham vs NMDA), ni amb el temps (NMDA 5 dies vs 15 dies vs 38 dies), ni amb el tractament (NMDA vs NMDA + Dzx).

PCR en temps real dels gens d'interès

Es van fer un seguit de reaccions de PCR en temps real amb diferents gens. Per començar, es van dur a terme reaccions de PCR dels marcadors neuronals i gials GFAP, S100β i Nefh. Seguidament analitzar l'expressió de les subunitats del canal K_{ATP}: Kir6.1, Kir6.2, SUR1 i SUR2. Finalment vam analitzar l'expressió de les quimioquines: Ccl5 i Cxcl9 i el receptor d'aquesta última CXCR3. A la taula 3.7 continuació es mostra la combinació de primers que es va fer servir en cada cas:

Gen	Número d'accèssió	Tamany (pb)	Tm (°C)	Seqüència endavant (5'-3')	Seqüència reversa (3'-5')
Ccl5	NM_031116	104	58	CCAGAGAAGAAGTGGGTTCA	AGCAAGCAATGACAGGAAAG
Cxcl9	NM_145672	212	58	GCATCATCTTCC TGGATCAC	CCTTGCTGAATCTGGGTCTA
CXCR3	NM_053415	244	58	CTTCCTGCTGGCCTGTATAA	TAGCTGCAGTACACGCAGAG
Nefh	NM_012607	216	58	CTGCAGTCAGAGGAGTGGTT	GGCCATGTCTACCTGATGAC
S100b	NM_013191	239	58	GGGAGCTTCTCTGTCTACCC	CTGCTCTTTGATTTCTCTCA
Gfap	NM_017009	175	58	CATGAGGAGGAAGTTCGAGA	CAAACCTGGACCGATACCAC
Kenj8	NM_008428	246	58	CACAAGAACATCCGAGAGCA	CGTGAATGACCTGACATTGG
Kenj11	NM_010602	166	58	CCACCCATTCTCTGTCTGTC	CCAGGATTTGAACCAATCAG
Abcc8	NM_011510	218	58	TGAACACAGCTATCCCCATT	CTCTGCACTGGACAGGAACT
Abcc9	NM_011511	184	58	CCAACATCGCTTTTTGGAC	AACACACTGCCATCCTTCAT

Taula 3.7: Seqüències dels gens ccl5, cxcl9 , cxcr3, Nefh, S100 β , GFAP, Kir6.1, Kir 6.2, SUR1 i SUR2.

Les condicions de reacció d'aquests tres grups de primers foren les mateixes que les condicions de reacció dels gens control, detallades al punt anterior. Donada la baixa expressió dels gens, en tots els casos es carregaven 50 ng per reacció.

Les reaccions de les PCR en temps real es van dur a terme amb el termociclador Step One Plus® Real Time PCR Systems de Applied Biosystems.

3.2.24. Quantificació dels paràmetres histològics

La mida de l'àrea hipocampal i de les diferents capes hipocampals estudiades es van mesurar a partir de les tincions de Nissl usant un sistema d'anàlisi d'imatges assistit per ordinador (Image-Pro Plus, Media Cybernetics Inc., MD, USA). Així, a partir d'una fotografia, i referenciant-ne l'escala, vam mesurar l'àrea hipocampal total i l'àrea de les capes piramidal de CA1, piramidal de CA2-CA3 i granular del DG. Les reaccions astroglials i microglials es van quantificar amb el mateix sistema a partir de les immunohistoquímiques de GFAP i IB4 respectivament. En tots els casos es va mesurar l'àrea de l'hipocamp contralateral a fi de corregir els efectes dels procediments histològics en la seva mida i corregir la variabilitat individual.

La quantificació de l'àrea de tinció Sp8 es va quantificar amb mètodes fluorimètrics a partir de les immunohistoquímiques amb fluorescència. Es van realitzar fotografies a x5 augments de tot l'hipocamp que es van ensamblar amb el sistema d'anàlisi d'imatges assistit per ordinador Photoshop® (Adobe Systems Incorporated). El sistema d'anàlisi d'imatges ImageJ 1,39u es va fer servir per quantificar a cada hipocamp la intensitat de

la tinció amb la mesura de la intensitat dels píxels de color verd, que van donar una mesura indirecta de la quantitat de cèl·lules Sp8 positives.

3.2.25. Comptatge cel·lular

Es va realitzar comptatge de cèl·lules tenyides per immunohistoquímica de BrdU i calretinina a diferents capes hipocampals (CA1, CA2/3, el gir dentat, la zona subgranular i el parènquima) El recompte es va realitzar al microscòpic òptic a 100 augments amb una reixeta a l'ocular (1,25 x 1,25 mm). Es va comptar el nombre de cèl·lules positives o nuclis tenyits un mínim de tres vegades en cada secció, prenent com a valor la mitjana de les tres.

El recompte de les cèl·lules proliferants es va fer a partir de les dobles immunohistoquímiques amb BrdU i neuN, BrdU i GFAP i BrdU i IB4. Es van prendre fotografies dels hipocamps de cada canal al microscopi invertit d'epifluorescència, a x5 augments, que posteriorment es van ensamblar amb el programa Photoshop®. Finalment, amb el programa ImageJ 1,39u es fusionaven dels dos canals i es comptaven totes les cèl·lules doble-positives.

3.2.26. Microscòpia confocal i estudis de colocalització

Els estudis de microscopia confocal es van realitzar al microscopi confocal Leica TCS SL a la Unitat de Microscopia dels Serveis Científicotècnics del Campus Casanova de la Universitat de Barcelona.

Les mostres que s'analitzaven a microscòpia confocal eren aquelles dobles immunohistoquímiques tenyides amb anticossos secundaris units a una molècula fluorescent: Alexa 488 i FITC per al verd i Alexa555 per al vermell. Per a cada tall de 14 micròmetres de gruix, es van obtenir 10 imatges confocals de cada canal (verd amb el làser de Heli-Neó, a 543nm, i vermell amb el làser d'Argó, a 488nm) a 40 augments en un microscopi confocal Leica TCS SL (resolució Z=586nm). Les imatges es van obtenir per separat i es va fer una posterior projecció Z de l'apilament amb el programa ImageJ 1,39u. L'estudi de colocalització dels píxels fluorescents es va realitzar amb imatges simples confocals, amb el programa FluoColoc® (ExploraNova), executant la distribució espacial dels valors normals MDP amb la taula de referència o LUT

adequada, segons Jalkolski (Jalkolski *et. al*, 2005); i la obtenció d'un mapa de punts ó la gràfica dels valors d'una variable sobre una altra.

3.2.26. Anàlisi densitomètrica dels *Western Blot*

Per a quantificar els *Western Blot*, els films resultants del revelat van ser escanejats. La imatge resultant s'obria amb el programa ImageJ, i es quantificava la intensitat de les bandes en valors de densitat òptica de l'àrea dibuixada de cada banda. Es feia el mateix amb les bandes de actina, que servien com a control de càrrega, per a normalitzar el valor de les bandes. El valor dels *Sham* s'agafaven com a referència i els resultats de les diferents situacions es calculaven com a percentatges d'aquest *Sham*.

3.2.27. Anàlisi de dades de la PCR en temps real

Els resultats de les PCR en temps real (incloses les del array de PCR) es van obrir amb el mateix programa del termociclador: *StepOne Software v2.1*. El primer que comprovem és la corba de dissociació, per assegurar-nos de que totes les mostres presenten un perfil idoni. Si és el cas, obrim el gràfic de amplificació, representat com a ΔRn vs Cycle (increment de la senyal fluorescent a cada punt de temps). Tenim la opció de modificar el llindar, per tal de que caigui a la part lineal de la corba a cada mostra: d'aquesta manera obtenim els C_T (temps de cicle), que ens dóna una idea de a quin cicle apareix expressió del gen triat, de tal manera que com més petit és el C_T més expressió hi ha d'aquest gen. El programa ens permet exportar aquests valors en un full *excel*.

Les diferències de concentració es van analitzar pel mètode comparatiu o mètode de $\Delta\Delta C_T$ (Bookout *et al*. 2006). Aquest mètode s'utilitza quan s'investiguen diferències en la expressió gènica entre diferents grups de mostres, com per exemple, en el nostre cas, entre animals lesionats i no lesionats, i vehicle/control ó tractats. Els resultats que ens dóna l'aparell són els C_T . Amb aquests C_T es fan els següents càlculs:

La diferència entre els C_T dels gens i del FC dels gens control ens dóna un valor, anomenat ΔC_T , que és l'increment natural de la expressió del gen. Aquest resultat es normalitza realitzant la operació: $2^{\Delta C_T}$, obtenint el $\Delta\Delta C_T$. Els resultats són representats com a "relació de canvi" (FC ó *Fold Change*), que són quantes vegades més està expressat un gen en, per exemple, una rata lesionada respecte, per exemple, una rata

control/vehicle. S'obté el FC de les mostres que volem comparar fent el quocient entre els $\Delta\Delta C_T$ de, per exemple, les mostres NMDA i les mostres *Sham*. Els tests estadístics que es realitzen per a veure si hi ha diferències significatives entre grups són els test de Student i el test LSD Posthoc, mitjançant una ANOVA unidireccional (One-Way ANOVA).

La casa comercial SABIOSCIENCES, però, posa a la disposició, a la seva pàgina web (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>), d'un recurs on insertant els nostres valors de C_T ens dona els valors de $\Delta\Delta C_T$, fa el test estadístic de t-Student per aquests resultats, donant-nos el p-valor, i també ens dona, per a la seva representació, els valors de FC i els de canvi en la regulació (*fold regulation*).

3.2.28. Anàlisi estadístiques

Per a cada paràmetre es van calcular els índexs de Skewness i Kurtosis per comprovar la distribució normal de les dades. La homogeneïtat de la variança es va testar amb els tests de Cochran, Bartlett, Hartley i Levene. Quan les dades presentaven una distribució normal s'aplicaven proves estadístiques paramètriques, la ANOVA unidireccional (One-Way ANOVA) seguida del test de Fisher o LSD. Quan les dades no s'ajustaven a una distribució normal, s'analitzaven amb la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis seguida del test U de Mann-Whitney. En tots els casos, els resultats es consideraven estadísticament significatius amb una $p < 0,05$, Tots els valors es presenten com a la mitjana \pm l'error estàndart de la mitjana (SEM). Excepte quan s'expliqui el contrari, totes les anàlisi estadístiques es van realitzar amb el programa STATGRAPHICS (STSC Inc., Rockville, MD, USA).

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. LA DZX DISMINUEIX L'ACTIVITAT PRO-INFLAMATÒRIA DE LES CÈL·LULES BV2 EN CULTIU

L'objectiu d'aquest bloc ha estat caracteritzar *in vitro* els efectes de l'obertura del canal K_{ATP} amb Dzx en l'activitat pro-inflamatòria i fagocítica de la línia cel·lular microglial BV2. Els grups emprats van ser quatre:

- a) Cèl·lules no activades (Grup control).
- b) Cèl·lules no activades post-tractades amb una dosi 1 μ M de Dzx durant 24 hores (Grup control + Dzx).
- c) Cèl·lules activades amb una dosi 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores (Grup LI).
- d) Cèl·lules activades amb una dosi 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores i post-tractades amb una dosi 1 μ M de Dzx durant 24 hores (Grup LI + Dzx).

Es van realitzar 6 experiments independents per grup (N = 6). Per tal de determinar els efectes de la activació i la Dzx sobre les cèl·lules, vam realitzar experiments de immunocitoquímica i determinació de la viabilitat cel·lular. Per tal de determinar l'efecte de la Dzx sobre la activitat proinflamatori de la micròglia vam realitzar experiments de ELISA i determinació de nitrits, i l' array de PCR *Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors RT² profiler PCR Array*. Finalment, vam estudiar si la Dzx modificava la capacitat fagocítica de la micròglia. La estadística que es va fer servir va ser la ANOVA unidireccional (One-Way ANOVA) seguida del test de Fisher o LSD.

4.1.1. Expressió del canal K_{ATP} per les cèl·lules microglials BV2 en cultiu

Experiments previs del grup van demostrar que les cèl·lules BV2 en cultiu expressen les subunitats SUR1, Kir6.1 i Kir6.2, del canal K_{ATP} i que aquesta expressió es veu augmentada amb una activació de les cèl·lules amb LPS+IFN γ (Ortega *et al.*, 2012a)(Figura 4.1). La dosi de Dzx utilitzada es va testar prèviament al grup amb uns

estudis de dosi resposta que ens van facilitar la dosi òptima de Dzx (dosi 1 μ M) que reduïa la secreció de NO de les cèl·lules BV2 *in vitro* (Figura 4.2).

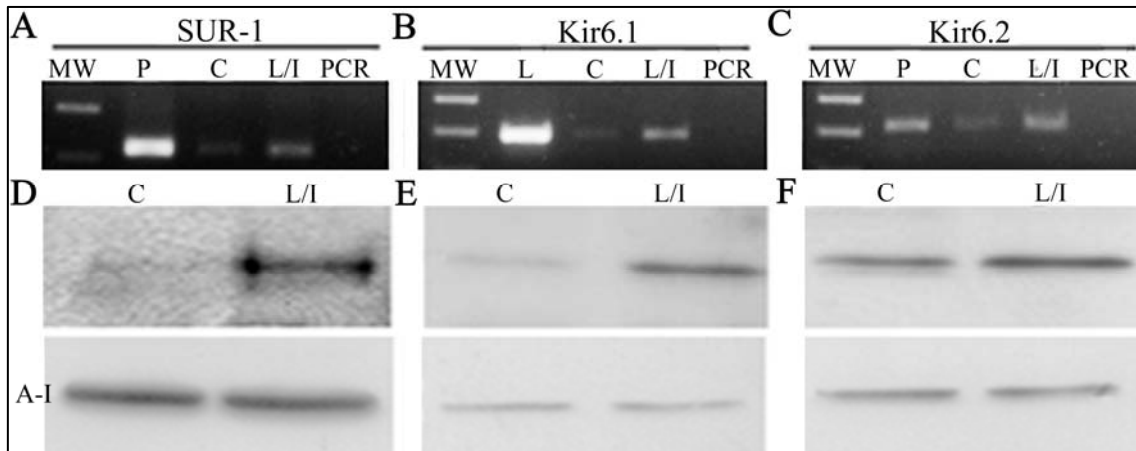


Figura 4.1: Expressió a les cèl·lules microgials BV2 dels components del canal K_{ATP} 48 h després de l'activació amb LPS i $IFN\gamma$. (A) – (C): productes de RT-PCR de les diferents subunitats (SUR1, Kir6.1 i Kir6.2) del canal K_{ATP} expressats a cèl·lules control (C) i cèl·lules activades amb LPS i $IFN\gamma$ (L/I). Com a controls positius s'han utilitzat RNAs de pàncreas (P) i pulmó (L) i, com a control negatiu de PCR, RNA de cèl·lules HEK293 (PCR). (D)-(F): Immunoblots de les diferents subunitats (SUR1, Kir6.1 i Kir6.2) del canal K_{ATP} expressats a cèl·lules control (C) i cèl·lules activades amb LPS i $IFN\gamma$ (L/I). Tot seguit es va realitzar l'immunoblot de actina-1 (A-I) com a control de proteïna carregada. Adaptat de Ortega *et al.* 2011a).

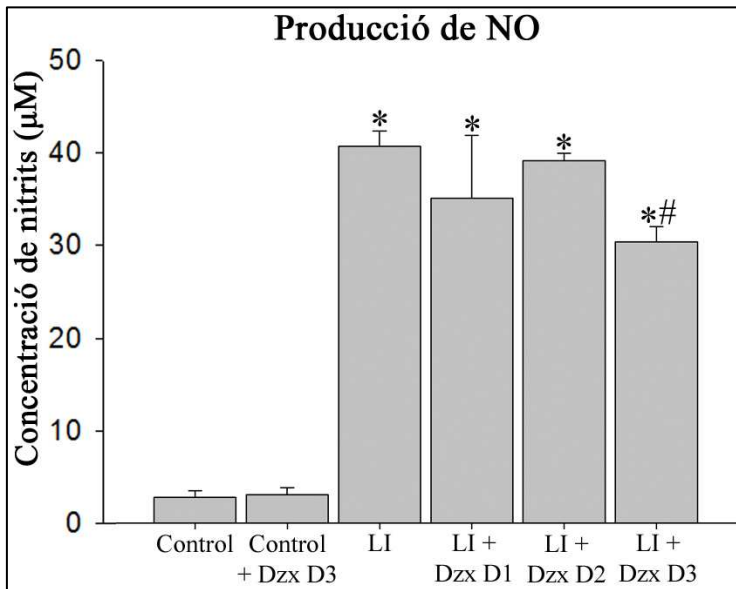


Figura 4.2: Mesura de la concentració de nitrats de les cèl·lules BV-2 activades amb LPS+ $IFN\gamma$ i en presència de diferents dosis de Dzx. Dzx: Cèl·lules tractades amb Dzx. LI: Cèl·lules tractades amb LPS i $IFN\gamma$. D1: Dosi 10 nm de Dzx. D2: dosi 100 nM de Dzx. D3: Dosi 1 μ M de Dzx. (* $p < 0,05$ respecte les cèl·lules control. # $p < 0,05$ respecte les cèl·lules control. $n = 6$ /grup. LSD Post-hoc).

4.1.2. La Dzx no modifica la viabilitat cel·lular

L'activació amb LPS+IFN γ canvia la morfologia de les cèl·lules. Com podem observar a la figura 4.3, la micròglia BV2 en cultiu té una forma arrodonida (A), mentre que la activada presenta uns processos llargs (B). A més, es pot apreciar que hi ha menys cèl·lules. La Dzx no semblava modificar la morfologia i nombre cel·lular en cap dels casos.

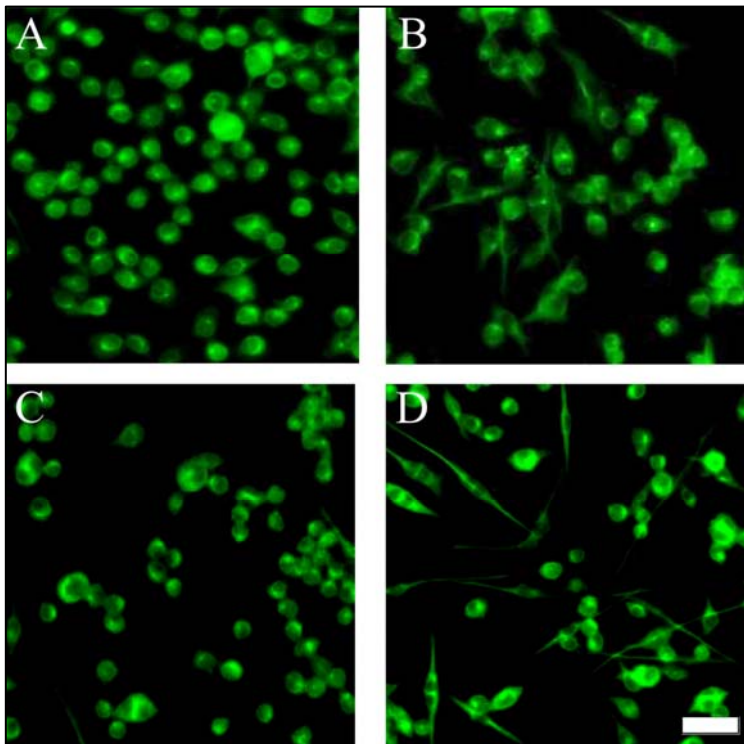


Figura 4.3: Immunocitoquímica amb actina de les cèl·lules microglials sense activar (A), sense activar tractades amb Dzx (C), activades amb LPS i IFN γ (B) i cèl·lules activades tractades amb Dzx (D). Barra de l'escala 20 micres.

Quan vam quantificar aquests paràmetres (Figura 4.4) vam observar que als un cultius de cèl·lules BV2 sense activar, la viabilitat és del $97,3 \pm 1,0\%$ respecte a les cèl·lules sembrades i que, en aquestes condicions, la Dzx a la concentració $1 \mu\text{M}$ no modificava aquest percentatge ($97,6 \pm 1,8\%$). L'activació amb LPS+IFN γ disminuïa la viabilitat cel·lular a un $78,3 \pm 6,7\%$ ($p=0,0001$), mentre que la Dzx augmentava la viabilitat fins al $88,3 \pm 6,2\%$ respecte el grup PLS+IFN γ ($p=0,0114$) tot i que no arriba a assolir el nivell dels control ($p=0,0236$).

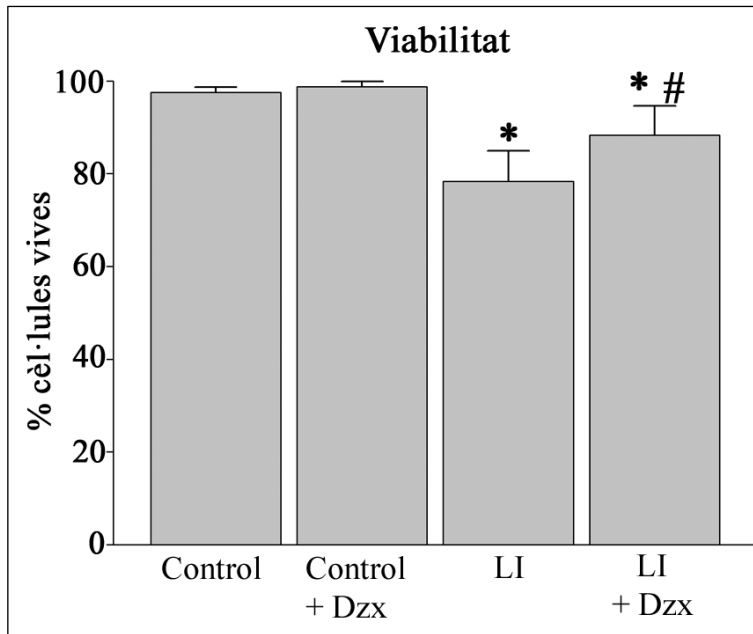


Figura 4.4: Mesura de la viabilitat de les cèl·lules BV-2 en activació i amb un tractament amb Dzx, en % respecte dels cèl·lules totals. Dzx: Cèl·lules tractades amb Dzx. LI: Cèl·lules tractades amb LPS i IFN (* $p < 0,05$ respecte les cèl·lules control. # $p < 0,05$ respecte les cèl·lules activades amb LPS i IFN. $n = 6/\text{grup}$. LSD Post-hoc).

4.1.3. La Dzx disminueix l'activitat pro-inflamatòria de les cèl·lules BV2

Els dos paràmetres que vam utilitzar per a decidir la eficàcia anti-inflamatòria van ser la producció de NO, estimat mitjançant la quantificació de nitrts, i la producció de $\text{TNF}\alpha$ mesurada per ELISA.

Les cèl·lules control produeixen una petita quantitat de NO, $1,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ (Figura 4.5), i la Dzx no en modifica els nivells. Les cèl·lules activades amb LPS+ $\text{IFN}\gamma$ produïen $1,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ de NO. Les cèl·lules activades tractades amb Dzx produïen $24,2 \pm 8,1 \mu\text{M}$, resultat diferent al de les cèl·lules activades no tractades ($p=0,0105$), però que no arribava al nivell de les cèl·lules control.

Paral·lelament, la concentració de $\text{TNF}\alpha$ al medi de les cèl·lules BV2 control era de $0,122 \pm 0,217 \text{ ng/mL}$ i la Dzx no modifica aquesta concentració. L'activació amb LPS+ $\text{IFN}\gamma$ augmentava el $\text{TNF}\alpha$ fins a $0,7946 \pm 0,1619 \text{ ng/mL}$ ($p=0,00001$), i la Dzx reduí aquesta concentració a $0,396 \pm 0,035 \text{ ng/mL}$ ($p=0,00001$).

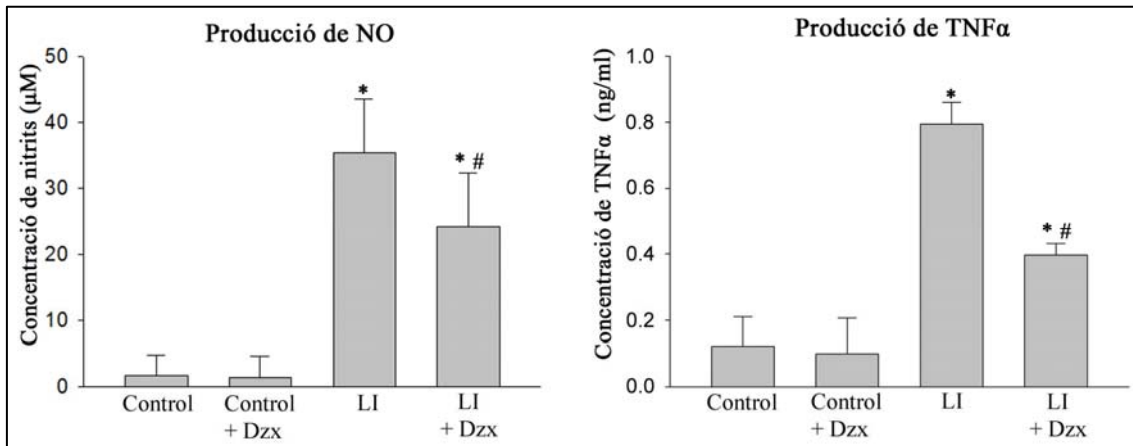


Figura 4.5: Mesura de la concentració de nitrts i de TNFα de les cèl·lules BV-2 activades amb LPS+INFγ i en presència de Dzx. Dzx: Cèl·lules tractades amb Dzx. LI: Cèl·lules tractades amb LPS i INFγ (* p < 0,05 respecte les cèl·lules control. # p < 0,05 respecte les cèl·lules control. n = 6/grup. LSD Post-hoc).

Per tal d'assegurar-nos que la disminució en la producció de nitrts era un reflex de la producció de NO, vam fer una RT-PCR de la expressió de NOS-II, en les nostres condicions de cultiu (Figura 4.6). 24 hores després de l'activació amb LPS i INFγ es detectava una banda del replicó a la alçada de 500 parells de bases (pb), i la Dzx no en modificava aquesta detecció. Però al cap de 12 hores del tractament amb Dzx hi havia una desaparició de la banda de DNA, com també a les 24 hores post-tractament.

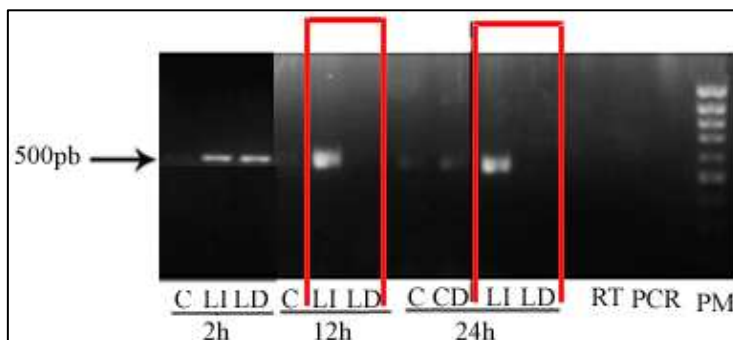


Figura 4.6: RT-PCR de la expressió de l'enzim NOS-II (amplicó de 500 pb de grandària). Les hores fan referència al temps post-tractament amb Dzx. pb: parells de bases. PM: marcador de pes molecular. C: cèl·lules control. CD: cèl·lules control tractades amb Dzx. LI: cèl·lules activades amb LPS i INFγ. LD: cèl·lules activades tractades amb Dzx. Com a control negatiu de retrotranscripció i de PCR es va utilitzar RNA de cèl·lules HEK293 (RT i PCR).

4.1.4. La Dzx disminueix l'expressió de molècules pro-inflamatòries a les cèl·lules BV2 activades

Per estudiar l'efecte que té la Dzx sobre la expressió de les molècules associades amb la inflamació a les cèl·lules BV2 vam realitzar un experiment de array de PCR amb el *Cytokine, Inflammatory Response and Other Immunology Arrays* (veure material i mètodes).

La taula 4.1 mostra l'efecte del tractament amb Dzx i de l'activació amb LPS+IFN γ sobre el nivell de mRNA de les 90 molècules incloses en l'estudi (84 gens de les molècules relacionades amb la resposta inflamatoria i 6 gens normalitzadors ó *housekeeping*). La taula també mostra l'efecte de la Dzx sobre els nivells de mRNA trobats en les cèl·lules activades amb LPS+IFN γ .

Símbol molècula	Respecte les cèl·lules control				Respecte les cèl·lules activades amb LI	
	C + Dzx		LI		LI + Dzx	
	Canvi en la regulació	p-valor	Canvi en la regulació	p-valor	Canvi en la regulació	p-valor
Bcl6	-1,2226	0,538962	2,7197	0,000317	-1,4783	0,010013
C3	-1,2782	0,290747	3,8537	0,000031	-1,3012	0,018266
C3ar1	1,0086	0,99603	1,4368	0,082531	1,1137	0,597871
C4b	-1,4308	0,512286	2,7542	0,000179	-2,394	0,000295
Ccl1	-2,1576	0,474723	-1,4119	0,610182	2,9539	0,143006
Ccl11	-2,4468	0,352692	-2,8373	0,279627	5,2577	0,255839
Ccl12	1,1953	0,192929	12,4643	0,00042	-3,7213	0,001551
Ccl17	1,2225	0,791477	-4,1921	0,085417	5,394	0,116526
Ccl19	1,3187	0,83761	5,3703	0,130375	-1,5769	0,570567
Ccl2	-1,198	0,192426	8,9912	0,000208	-1,4547	0,08711
Ccl20	-1,6458	0,514816	-1,8931	0,245307	2,9778	0,158402
Ccl22	1,6157	0,806854	2,9247	0,405808	1,1989	0,306179
Ccl24	-1,0647	0,602604	-35,7579	0,000034	8,0281	0,001098
Ccl25	1,1162	0,47547	2,2717	0,002823	-1,2324	0,14532
Ccl3	-1,3209	0,009561	16,5489	0,000067	-1,56	0,017606
Ccl4	-1,5023	0,013711	18,423	0,000991	-2,0429	0,017468
Ccl5	-1,166	0,07783	1188,6308	0,000001	-7,0074	0,000004
Ccl7	-1,2089	0,423487	6,7967	0,002377	-1,3185	0,231751
Ccl8	-1,287	0,982141	947,9946	0,000095	-3,8384	0,000562
Ccr1	-1,0329	0,867889	3,09	0,000551	-1,1067	0,459475
Ccr2	-1,0809	0,770222	1,5132	0,207401	1,9659	0,234791
Ccr3	-1,0036	0,747077	2,7807	0,012503	1,4763	0,105989
Ccr4	-1,4552	0,853903	-1,6229	0,503212	2,6681	0,182638
Ccr7	1,0372	0,76931	2,2849	0,020983	-1,9616	0,145328
Cd40	-1,1465	0,456905	6,2205	0,00005	-2,8655	0,000225
Cd40lg	-1,0422	0,7462	-1,8533	0,11174	3,7461	0,174524
Cebpb	-1,1374	0,084517	1,6799	0,001973	-1,2629	0,028735
Crp	1,7783	0,506902	-1,7119	0,244645	3,1018	0,152935

Csfl	-1,2068	0,462226	1,4163	0,015554	-1,6445	0,004098
Cxcl1	1,0372	0,76931	1,5004	0,136729	1,2758	0,460282
Cxcl10	-1,2181	0,308466	200,7471	0,003285	-6,7728	0,007249
Cxcl11	1,5776	0,686776	4,1381	0,284798	-1,3932	0,475197
Cxcl2	-1,9302	0,229769	72,7467	0,015894	-4,5721	0,07849
Cxcl3	1,1031	0,586626	1,2462	0,689832	2,4183	0,297658
Cxcl5	1,8042	0,363331	-2,9497	0,06195	3,0518	0,166734
Cxcl9	1,2911	0,523549	1953,4519	0,000223	-50,4469	0,000249
Cxcr4	-1,0505	0,834735	-3,9888	0,000003	1,3514	0,150134
Fasl	-2,0629	0,512884	-2,093	0,175157	2,3873	0,248871
Flt3l	-1,0455	0,969049	1,1162	0,113509	-1,0908	0,329593
Fos	-1,406	0,005253	2,0683	0,092411	2,3689	0,014635
Hdac4	1,0543	0,673868	1,0635	0,631883	1,0024	0,926784
Ifng	-3,4833	0,244688	-3,6709	0,221107	3,8725	0,156022
Il10	1,1773	0,585631	6,4552	0,000196	1,2325	0,187289
Il10rb	-1,1126	0,308057	-1,0407	0,631092	1,0085	0,957033
Il18	-1,018	0,843545	3,2117	0,000009	-1,3489	0,003415
Il18rap	2,0537	0,033085	2,1246	0,004122	-1,3599	0,287646
Il1a	-1,3259	0,366611	24,455	0,000016	-2,1652	0,000556
Il1b	-1,3162	0,255785	36,4623	0,00012	-1,7656	0,019159
Il1f10	1,5923	0,341025	-1,2173	0,537316	3,1269	0,161308
Il1r1	-1,0221	0,792053	-1,1563	0,220764	1,1699	0,250353
Il1rap	1,1054	0,019524	-1,2396	0,008217	-1,1382	0,278948
Il1rn	-1,2311	0,298018	15,8154	0,000642	-5,0283	0,001432
Il22	-1,1862	0,618313	-4,3615	0,220063	5,8058	0,139768
Il22ra2	-1,9203	0,56189	-1,6586	0,629924	5,5119	0,148138
Il23a	-1,1196	0,702584	4,1805	0,000006	-1,662	0,007719
Il23r	-1,391	0,470929	5,7771	0,085713	-1,3156	0,641129
Il6	1,1546	0,811446	43,5239	0,030937	-2,0393	0,230837
Il6ra	-1,0017	0,938915	-2,0949	0,001389	1,3211	0,024793
Il7	1,2588	0,942299	10,5335	0,000688	-1,337	0,34527
Cxcr1	-1,4453	0,443462	1,3437	0,024929	-1,1698	0,453596
Cxcr2	-1,2807	0,396279	-4,3505	0,000003	-1,8794	0,013007
Il9	-1,2052	0,906206	-3,0001	0,122541	3,6879	0,161602
Itgb2	-1,1302	0,078529	4,4898	0,000011	-1,6775	0,000724
Kngr1	-1,627	0,677408	-1,8843	0,25947	2,8415	0,184738
Lta	-1,074	0,896491	27,0815	0,000237	-3,4732	0,001682
Ltb	-1,0602	0,92493	3,0785	0,000857	-1,4162	0,068693
Ly96	-1,2562	0,07132	2,5318	0,001268	-1,5802	0,010141
Myd88	1,4759	0,022055	1,5966	0,047781	1,0117	0,985169
Nfatc3	-1,0846	0,217277	-1,1146	0,249592	1,2323	0,027392
Nfkb1	1,0267	0,844225	2,4793	0,00011	1,02	0,814432
Nos2	1,0713	0,802861	72,0741	0,000113	-4,7621	0,000387
Nr3c1	-1,0917	0,2206	-1,2156	0,045861	1,0063	0,962936
Ripk2	-1,0465	0,829067	2,5535	0,000319	-1,8226	0,001487
Tirap	1,033	0,520491	1,1613	0,140728	1,1108	0,309101
Tlr1	1,0961	0,53048	1,6859	0,007426	-1,0658	0,523109
Tlr2	-1,2133	0,175227	9,9724	0,000023	-1,2201	0,137342
Tlr3	1,2626	0,040172	5,0959	0,00121	-1,2925	0,141663
Tlr4	1,0063	0,866417	1,1279	0,212086	1,153	0,147416
Tlr5	-1,1626	0,269683	-3,6475	0,000072	1,6881	0,026618
Tlr6	1,0028	0,979224	1,9377	0,019861	-1,1913	0,307211
Tlr7	1,0156	0,757189	1,3547	0,073864	-1,1153	0,385252
Tnf	-1,3796	0,006639	22,9506	0,000037	-2,8457	0,000621
Tnfrsf14	1,1197	0,298762	-1,5992	0,039598	1,3758	0,205019
Tollip	-1,0912	0,121342	1,2723	0,03013	-1,2247	0,061968
Gusb	-1,0154	0,767945	1,9236	0,000039	-1,3531	0,004466
Hprt	-1,0003	0,963354	1,7433	0,000741	1,0175	0,864877

Hsp90ab1	-1,0674	0,357997	-1,3962	0,022389	1,0356	0,823752
Gapdh	-1,0624	0,434979	-1,5279	0,002827	1,0635	0,471571
Actb	1,1518	0,162889	-1,572	0,015048	1,2074	0,193347

Taula 4.1: Molècules relacionades amb la resposta inflamatòria i variació en funció de l'estat d'activació i el tractament amb Dzx a les cèl·lules BV2.

La figura 4.7 mostra els canvis de concentració de mRNA de les diferents molècules estudiades amb activitat pro-inflamatòria després de l'activació amb LPS+IFN γ :

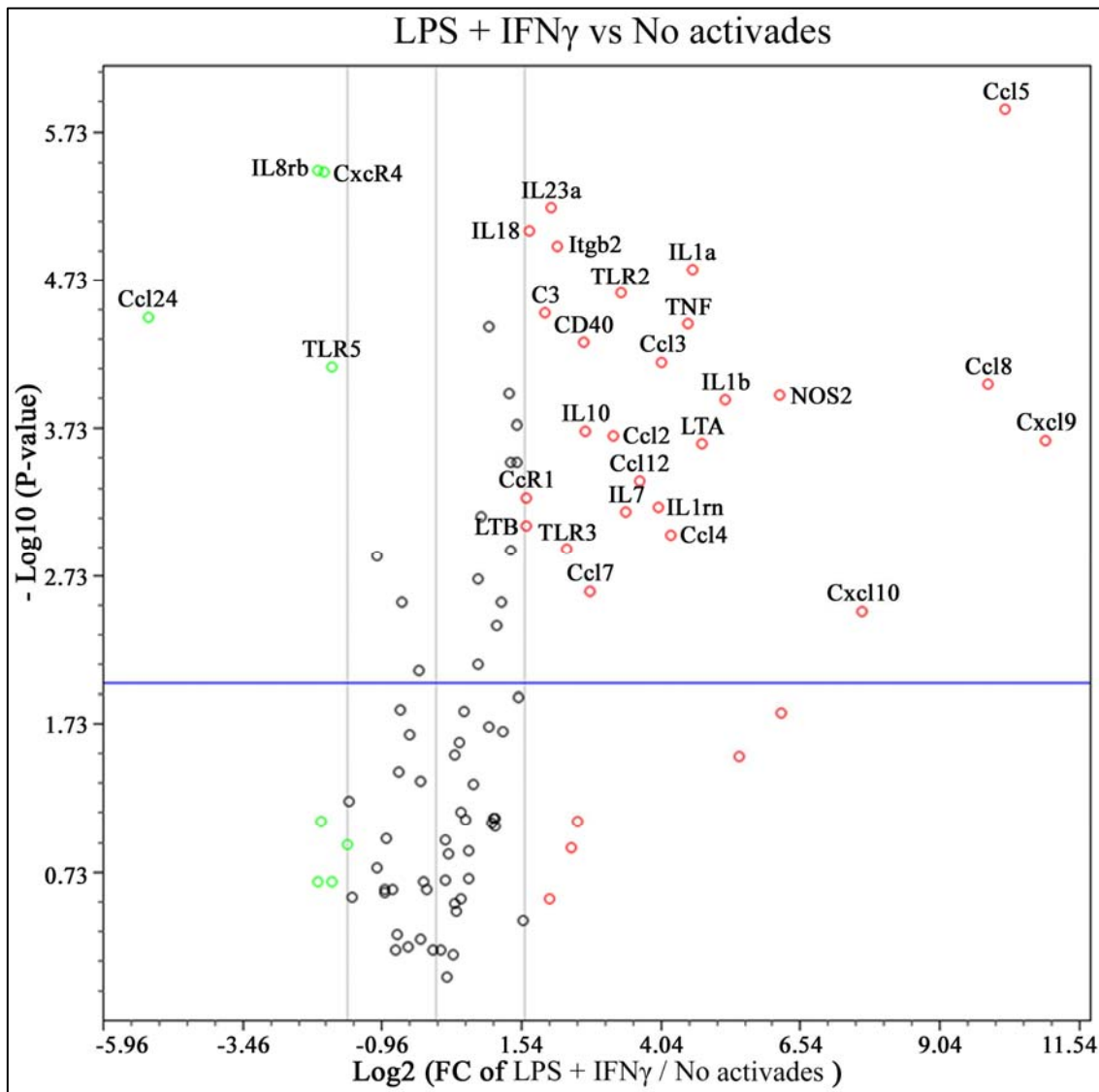


Figura 4.7: *Volcano plot* dels canvis de la quantitat del mRNA de les citocines proinflamàtòries i els seus receptors amb a les cèl·lules BV2 activades amb LPS+IFN γ respecte les cèl·lules control. L'eix d'abscisses mostra el log2 de la relació de canvi (*Fold Change* ó FC, és a dir, quantes vegades canvia l'expressió d'una molècula entre les dues condicions), de manera que els punts que es troben a la línia horitzontal que es troba a 1 mostra que no hi ha canvis, i les que apareixen equidistants a ambdós costats engloben els resultats no significatius. A l'esquerra mostra les molècules que disminueixen (punts verds), i a la dreta les que augmenten (punts vermells). L'eix d'ordenades mostra el $-\log$ del valor p del FC, de manera que com més amunt més diferència. La línia blava horitzontal està a 1 i separa els resultats significatius (part superior) dels no significatius (part inferior) segons el test estadístic. Les quimiocines i receptors que mostren canvis significatius estan nomenats al costat del punt corresponent.

La activació amb LPS i IFN γ de les cèl·lules BV-2 induïa canvis en la concentració del mRNA de varies quimiocines i receptors. Com podem veure a la figura 4.7, les que es

disminuïen la seva quantitat són menys que les que augmentaven la seva quantitat, i només una d'elles disminuïa dràsticament la seva quantitat de mRNA, la citocina ccl24. De les que més augmentaven la seva quantitat de mRNA cal destacar ccl5, ccl8, cxcl9 i cxcl10, a més de l'enzim NOS2, i del gen de TNF i la IL23, així com els *toll like receptors* TLR2 i 3.

El tractament amb Dzx no modifica significativament la quantitat del mRNA de cap gen dels estudiats a les cèl·lules control (Taula 4.1), tot i que si modifica la quantitat de mRNA de varis gens en les cèl·lules activades amb LPS i IFN γ (Taula 4.2):

Tractament	Símbol molècula	Canvi en la regulació	Relació de canvi	95% IC	p-valor	Holm	FDR
LPS+IFNγ/ no activades	Cxcl9	1953,45	1953,45	(243.9, 3662.9)	0,0002	0,0149	0,0009
	Ccl5	1188,63	1188,63	(1025.2, 1351.9)	0	0	0,0001
	Nos2	72,07	72,07	(30.08, 114.06)	0,0001	0,0081	0,0005
	Ccl8	947,99	947,99	(251.9, 1644.0)	0,00001	0,007	0,0005
	Cd40	6,22	6,22	(4.95, 7.49)	0	0,003	0,0003
	C4b	2,75	2,75	(2.25, 3.25)	0,0002	0,0125	0,0008
	Il1a	24,46	24,46	(19.30, 29.62)	0	0,0013	0,0002
Dzx+LPS+IFNγ/ LPS+IFNγ	Cxcl9	-50,45	0,02	(0.01, 0.03)	0,0002	0,0217	0,0074
	Ccl5	-7,01	0,14	(0.12, 0.17)	0	0,0004	0,0004
	Nos2	-4,76	0,21	(0.16, 0.26)	0,0004	0,0329	0,0069
	Ccl8	-3,84	0,26	(0.18, 0.34)	0,0006	0,0466	0,0071
	Cd40	-2,87	0,35	(0.28, 0.42)	0,0002	0,0198	0,01
	C4b	-2,39	0,42	(0.34, 0.49)	0,0003	0,0254	0,0066
	Il1a	-2,17	0,46	(0.37, 0.55)	0,0006	0,0467	0,0082

Taula 4.2: Molècules que augmenten els nivells de mRNA a les cèl·lules BV2 activades amb LPS+ FN γ i que disminueixen la concentració en ser incubades amb Dzx 1 μ M. (IC: interval de confiança ; Holm: Mètode de Holm-Bonferroni; FDR: índex de descoberta falsa (*false discovery rate*)).

Podem apreciar que les molècules la quantitat de mRNA de les quals es veia més disminuït amb la Dzx són aquelles que més augmentaven els nivells de mRNA amb LPS i IFN γ . És a dir: cxcl9, ccl5 i ccl8, a més de l'enzim Nos2 i la IL1a. La Dzx també feia disminuir els nivells de mRNA de Cd40 i C4b. La citocina cxcl9 va presentar els majors canvis d'expressió ja que els seus nivells de mRNA van disminuir 50,45 cops ($p < 0,0005$) respecte a les cèl·lules activades amb LPS i IFN γ . Un altre gen que disminuïa la seva expressió 7 cops ($p < 0,00001$) és el ccl5. El gen Nos2, que correspon a la proteïna NOS-II, responsable de la secreció de NO i per tant responsable en part del dany oxidatiu, també disminuïa la seva expressió 4 cops ($p < 0,0005$) amb el tractament amb Dzx.

4.1.5. La Dzx disminueix la secreció de les citocines cxcl9 i ccl5 a les cèl·lules BV2 activades

Per tal de comprovar que la baixada de concentració de mRNA es traduïa en una disminució de l'alliberament de les citocines, varem quantificar per ELISA la concentració de cxcl9 i ccl5 als medis de cultiu de les cèl·lules BV-2 (Figura 4.19). Les cèl·lules no activades secretaven petites quantitats d'aquestes quimiocines, i el tractament amb Dzx no en modificava els nivells. A les cèl·lules activades amb LPS+INF γ hi havia un increment de 16 vegades en la concentració de cxcl9 ($p = 0,00001$) i de 113 cops en la concentració de ccl5 respecte les cèl·lules control ($p = 0,00001$). La Dzx disminuï en un 30% la secreció de cxcl9 ($p = 0,0206$) i en un 20% ($p = 0,047$) la secreció de ccl5 en les cèl·lules activades, tot i que els nivells continuen molt més alts que a les cèl·lules control ($p = 0,0007$ i $p = 0,00001$, respectivament).

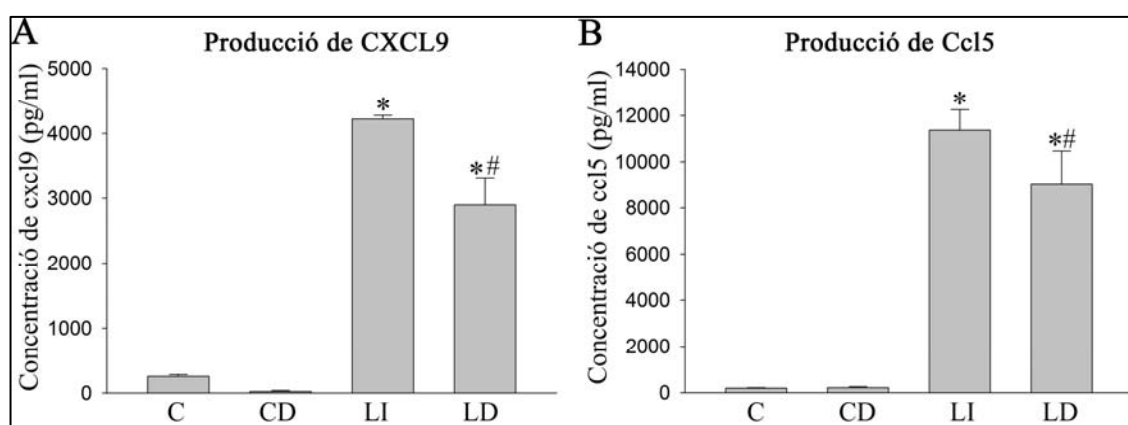


Figura 4.8: Concentració de cxcl9 (A) i ccl5 (B) al medi extracel·lular en diferents condicions de les BV-2. C: Cèl·lules control. CD: Cèl·lules control tractades amb Dzx 1 μ M. LI: Cèl·lules activades amb LPS i INF γ . LD: Cèl·lules activades tractades amb Dzx 1 μ M ($n=3$ cultius diferents, * $p < 0,05$ respecte control, # $p < 0,05$ respecte LI, LSD Post-hoc).

4.1.6. La Dzx no modifica la capacitat fagocítica de les cèl·lules BV2

Amb els temps, les cèl·lules control no incrementaren el nombre d'esferes fagocitades (0,37 esferes/cèl·lula als 10 min en front de 0,56 esferes/cèl·lula als 30 min)(Figura 4.9). Tampoc hi va haver canvis en el percentatge de cèl·lules fagocítiques entre ambdós temps (14,21% als 10 minuts en front de 21,02% als 30 minuts) i la Dzx no va modificar aquests valors.

L'activació amb LPS i IFN γ va augmentar el nombre d'esferes que fagocitades per cèl·lula (1,63 esferes/cèl·lula als 10 minuts, $p = 0,00001$ i 3,25 esferes/cèl·lula als 30 minuts, $p = 0,00001$) i el percentatge de cèl·lules fagocítiques (56,52% de les cèl·lules als 10 minuts, $p = 0,00001$ i 80,13% de les cèl·lules als 30 minuts, $p = 0,00001$).

A més, aquesta capacitat anava augmentant al llarg del temps en les cèl·lules activades amb LPS+IFN γ , essent major el nombre d'esferes fagocitades ($p = 0,001$) i el nombre de cèl·lules amb capacitat fagocítica ($p = 0,001$) als 30 minuts (Figura 4.9).

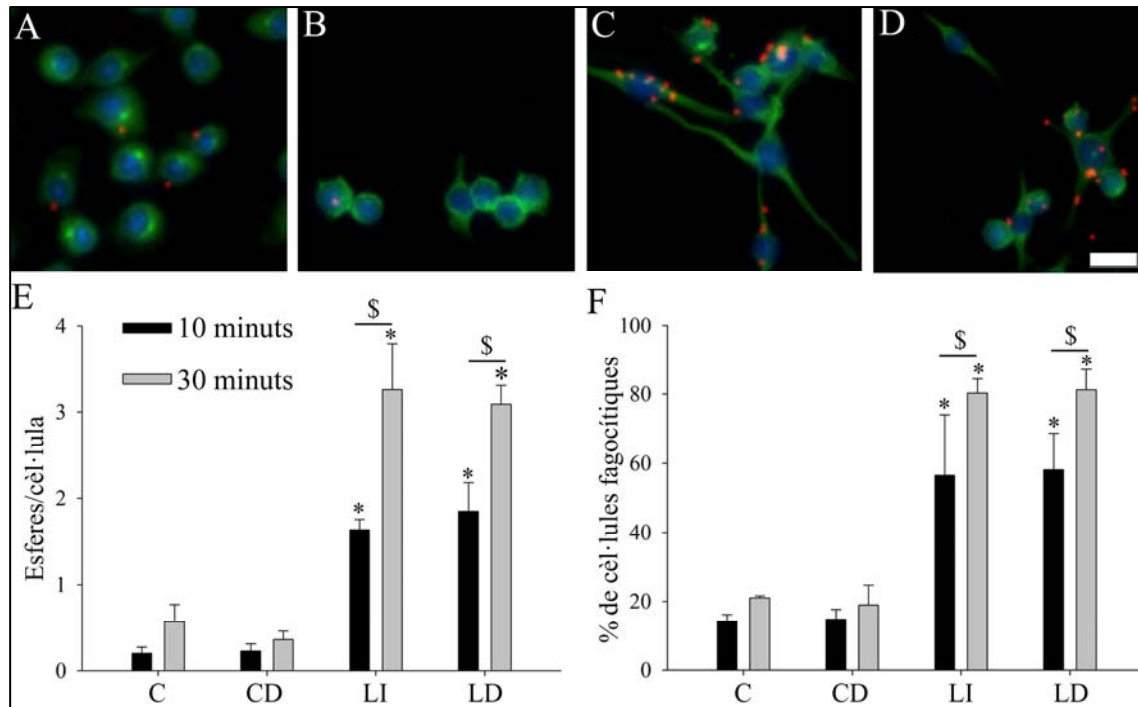


Figura 4.9: Immunocitoquímica de les cèl·lules microglials fagocitantes. (A) Cèl·lules no activades. (B) Cèl·lules activades amb LPS i IFN. (C) Cèl·lules no activades tractades amb Dzx. (D) Cèl·lules activades tractades. Verd: Actina. Vermell: Fluoroesferes. Blau: Nucli. Barra de l'escala 10 micres. (E): Nombre d'esferes per cèl·lula i (F) de % de cèl·lules fagocítiques en diferents condicions. C: cèl·lules control. CD: cèl·lules control tractades amb Dzx. LI: cèl·lules activades amb LPS i IFN γ . LD: cèl·lules activades tractades (* $p < 0,05$ respecte les cèl·lules control. \$ $p < 0,05$ respecte ambdós temps. $n = 4/\text{grup}$. LSD Post-hoc).

La Dzx no va modificar el nombre d'esferes fagocitades per les cèl·lules activades amb LPS+IFN γ (1,85 esferes/cèl·lula als 10 minuts i 3,25 esferes/cèl·lula 30 minuts) ni el percentatge de cèl·lules fagocítiques (56,52% als 10 minuts i el 80,13% 81,24% de les cèl·lules als 30 minuts).

4.2. LA DZX REDUEIX LA LESIÓ EXCITOTÒXICA A L'HIPOCAMP DE LA RATA

L'objectiu d'aquest bloc va estar determinar *in vivo* la dosi òptima de Dzx que, administrada oralment, redueix la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata amb NMDA. Els grups d'animals emprats van ser set:

- a) Rates Sham, injectades amb PBS 50 mM a l'hipocamp a les quals se'ls administrava oralment el vehicle a partir del dia 8 post-lesió (grup Sham)
- b) Rates injectades amb PBS 50 mM a les quals se'ls administrava oralment una dosi de 10 mg/Kg/dia de Dzx a partir del dia 8 post-lesió (grup Sham + D10)
- c) Rates lesionades amb NMDA 40 mM a les quals se'ls administrava oralment el vehicle a partir del dia 8 post-lesió (grup NMDA),
- d) Rates lesionades amb NMDA 40 mM a les quals se'ls administrava oralment amb una dosi de 10 mg/Kg/dia de Dzx a partir del dia 8 post-lesió (grup NMDA + D10),
- e) Rates lesionades amb NMDA 40 mM a les quals se'ls administrava oralment una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx a partir del dia 8 post-lesió (grup NMDA + D1)
- f) Rates lesionades amb NMDA 40 mM a les quals se'ls administrava oralment una dosi de 0,1 mg/Kg/dia de Dzx a partir del dia 8 post-lesió (grup NMDA + D0,1)
- g) Rates lesionades amb NMDA 40 mM a les quals se'ls administrava oralment una dosi de 0,05 mg/Kg/dia de Dzx a partir del dia 8 post-lesió (NMDA + D0,05).

Cada grup constava de 6 a 8 rates (N = 6-8 rates/grup), i es sacrificaven el dia 15 post-lesió. Per tal de determinar si la micròglia a l'hipocamp lesionat presenta expressió del canal K_{ATP} , vam realitzar experiments de doble immunohistoquímica amb les subunitats Kir6.2 i SUR1 del canal K_{ATP} i el marcador microglial IB4, i vam fer un estudi de colocalització on obteníem un mapa de la desviació mitjana de producte (MDP ó *Mean Product Deviation*), que ens mostra en groc els punts que colocalitzen sobre un pla; un mapa de dispersió ó *scatter plot* ens mostra la relació entre les dues variables (marcatge verd i marcatge vermell) i ens mostra les coincidències en groc a la diagonal; i mesuràvem el coeficient de correlació de Pearson, que és un índex que mesura la relació lineal entre dues variables quantitatives, de manera que si és positiu hi ha colocalització entre els dos canals. Els estudis de colocalització els hem fet d'acord al

descriu per Jaskolski (2005). Per tal de determinar l'efecte de la Dzx sobre la lesió excitotòxica hipocampal i trobar-ne una dosi òptima vam realitzar tincions de Nissl per a calcular l'àrea de lesió, immunohistoquímiques de NeuN per a mesurar les capes neuronals, histologies de IB4 per a calcular l'àrea de reacció microglial, i immunohistoquímiques de GFAP per a calcular l'àrea de reacció astrogial. Finalment, vam estudiar si la dosi de Dzx òptima modificava la glucèmia de la rata a nivell perifèric. La estadística que es va fer servir va ser la ANOVA unidireccional seguida del test de Fisher o LSD.

4.2.1. La micròglia reactiva expressa el canal K_{ATP} a l'hipocamp lesionat

Vam fer un estudi confocal de la doble co-localització amb anticossos específics de les subunitats Kir6.2 i SUR1 del canal K_{ATP} amb IB4 a talls histològics de l'hipocamp de la rata obtinguts 15 dies després de la lesió amb 20 nmol NMDA. La figura 4.10 mostra la histoquímica de IB4, marcatge dels mucopolisacàrids específics associats a la cara externa de la membrana cel·lular de la micròglia, i les dues subunitats del canal K_{ATP} , les subunitats Kir6.2 i SUR1. Els experiments de microscòpia confocal i posterior anàlisi de la imatge d'aquestes doble immunohistoquímiques van revelar un marcatge clar de les subunitats Kir6.2 i SUR1 al 100% de la micròglia més ameboide (més reactiva) de la formació hipocampal (Figura 4.10, C i I). Una anàlisi acurada d'un pla (Figura 4.10, D i J) revelà que el coeficient de correlació de Pearson era 0,33 per a SUR1 i 0,27 i per a Kir6., de manera que hi ha correlació positiva entre les dues variables. El mapa de MDP ens mostra en groc els punts que colocalitzen sobre un pla. A més, els mapes de dispersió ens van mostrar alguns d'aquests punts grocs coincidint a la diagonal. Per tant, podem dir que aproximadament totes les cèl·lules IB4 positives i amb morfologia reactiva expressen les subunitats Kir6.2 i SUR1 a l'hipocamp lesionat.

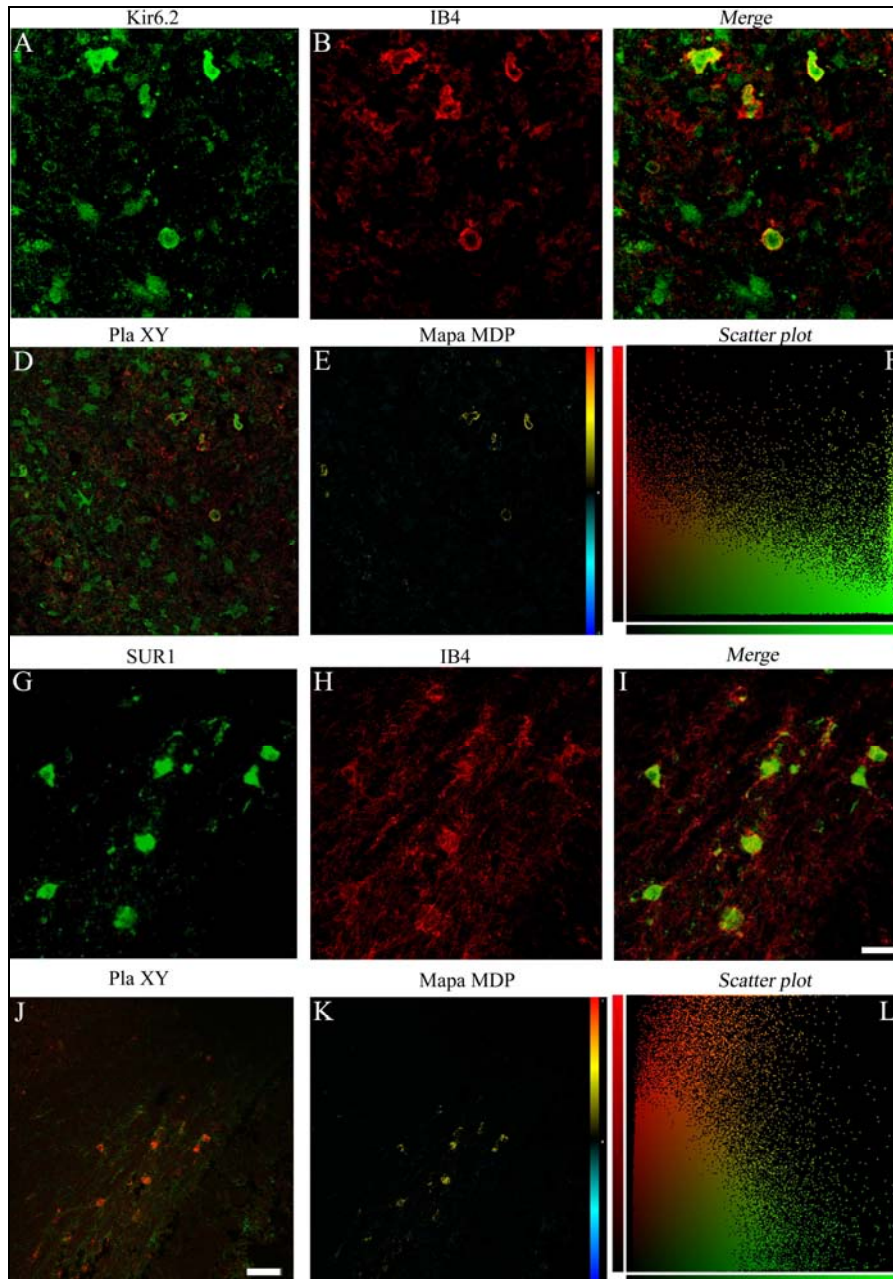


Figura 4.10: Imatges il·lustratives de les dobles immunohistoquímiques i microscopia confocal de les subunitats Kir6.1 (A) – (C) i SUR1 (G) – (I) del canal K_{ATP} (verd) en seccions tenyides amb IB4 (vermell) a l'hipocamp de les rates lesionades amb NMDA . (A) – (C) mostra el marcatge per Kir6.2 i IB4. Al *merge* es veu com algunes cèl·lules presenten marcatge intracel·lular i a la membrana de Kir, rodejat de IB4 que tenyeix els mucopolisacàrids. L'estudi de co-localització sobre un tall està a (D) – (F), (E) és el Mapa MDP de la superposició de dues imatges en un pla confocal XY (D). Al scatter plot (F) hi ha la distribució de punts, amb vermell y verd. El punts grocs denoten co-localització, la qual s'observa malgrat que la tinció de la IB4 és a la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica. (G) – (I) mostra el marcatge per SUR1 i IB4. Al *merge* es veu com algunes cèl·lules presenten marcatge intracel·lular i a la membrana de SUR, envoltat de IB4. L'estudi de co-localització sobre un pla confocal està a (J) – (L), (K) és el Mapa MDP de la superposició de dues imatges en un pla confocal XY (J). Al scatter plot hi ha la distribució de punts, amb vermell y verd. El punts grocs denoten co-localització, la qual s'observa malgrat que la tinció de la IB4 és a la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica. Barres de l'escala: 20 μm per A-C/G-I i 40 μm per D i J.

4.2.2. La Dzx limita la lesió excitotòxica hipocampal

Per a avaluar el dany ocasionat 15 dies després de la injecció de 20 nmol NMDA a l'hipocamp vam realitzar una tinció de Nissl a una alçada de Bregma de -3.3, i es va quantificar l'àrea de lesió (extensió de l'hipocamp des-estructurat) de manera computeritzada. Com podem veure a la figura 4.11A), l'entrada de l'agulla i la subsegüent injecció de vehicle (PBS 50 mM) a les rates Sham feia una petita lesió mecànica en tot el seu recorregut dins el cervell fins arribar a l'hipocamp, el qual presentava una petita desorganització hipocampal en zones molt concretes, de només $0,139\pm 0,060$ mm² de tamany. La Dzx 10 mg/Kg/dia no variava aquesta mínima desorganització hipocampal (Figura 4.11I).

La lesió amb NMDA provocà una gran desorganització hipocampal a totes les capes (Figura 4.11B) que arribà a estendre's a $2,21\pm 0,38$ mm². De totes les dosis de Dzx, només la de 1 mg/Kg/dia provocà una disminució en aquesta àrea de desorganització hipocampal (Figura 4.11C) aquesta àrea era de $1,32\pm 0,26$ mm² ($p = 0,0447$).

Per a avaluar la mort neuronal 15 dies després de la injecció de 20 nmol NMDA a l'hipocamp vam realitzar una immunohistoquímica de NeuN a una alçada de Bregma de -3.3, i es va quantificar l'àrea marcatge de NeuN (per a estimar la mort neuronal) de manera computeritzada, a la capa piramidal i a la capa granular de l'hipocamp. Com podem veure a la figura 4.11E), l'entrada de l'agulla i la subsegüent injecció de vehicle (PBS 50 mM) a les rates Sham no produïa quasi cap mena de mort neuronal a cap de les capes (Figura 4.11E, J i K). La Dzx 10 mg/Kg/dia no variava aquest resultat (Figura 4.11F).

La lesió amb NMDA provocà una disminució de la tinció neuronal que arriba al $61,92\pm 15,11\%$ de tota la tinció a la capa piramidal, i el $70\pm 22,36\%$ a la capa granular, resultats significativament diferents amb els obtinguts a les rates Sham ($p = 0,0008$). Excepte a la capa piramidal, on la dosi de 10 mg/Kg/dia de Dzx també dóna una disminució del % de lesió, a ambdues capes la dosi de 1 mg/kg/dia reduïa el percentatge de pèrdua de tinció neuronal fins a un $36,22\pm 8,01\%$ a la capa piramidal ($p = 0,0413$) i a un $23,15\pm 17,95\%$ a la capa granular ($p = 0,0449$), essent en aquest últim cas una diferència no significativa amb les rates Sham ($p = 0,1732$).

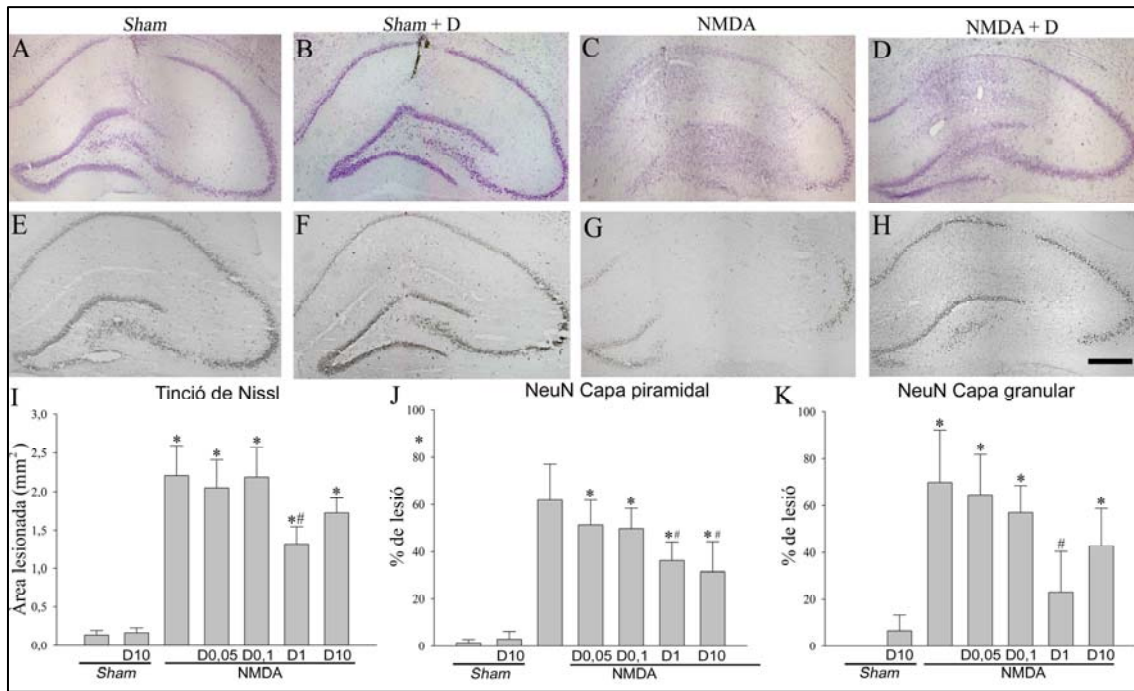


Figura 4.11: Efecte la Dzx a la lesió hipocampal produïda pel NMDA. (A)-(D) mostra les tincions de Nissl i (E)-(H) mostra la immunohistoquímica de NeuN a rates *Sham*, a rates *Sham* tractades amb la concentració òptima de Dzx (*Sham + D*), la de 1 mg/kg/dia, a rates (lesionades amb) NMDA i a rates NMDA tractades. Quantificació del nivell de lesió excitotòxica per quantificació computeritzada de l'àrea de desorganització hipocampal per Nissl (I) i per % de pèrdua neuronal a les capes piramidal (J) i granular (K) de l'hipocamp. D es refereix a Dzx i el nombre al costat a concentració en mg/Kg/dia. Barra de l'escala: 1 mm. (n=6-8 rates/grup, temps post-lesió 15 dies. * $p < 0,05$ respecte les rates *Sham*, # $< 0,05$ respecte les rates NMDA, LSD Post-hoc).

4.2.3. La Dzx redueix l'àrea de reacció microglial però no la reacció astrogliàl

Les àrees de microgliosi i de astrogliosi es van mesurar amb la tinció histoquímica de la IB4 i la immunohistoquímica de la GFAP, respectivament. L'àrea que es va mesurar delimitant les zones hipocampals on les cèl·lules mostraven una morfologia reactiva. En tots els talls analitzats aquestes àrees eren més extenses que l'àrea de lesió mesurada en l'apartat anterior.

La lesió mecànica provocada per la entrada de l'agulla mostrà una reacció microglial mínima limitada al voltant de l'entrada de l'agulla, i que no es troba modificada per la Dzx (Figura 4.12A i B). L'aspecte de la microglia tenyida amb l'IB4 a les rates *sham* era de microglia ramificada o en repòs (Figura 4.12E), i la Dzx no va modificar aquesta morfologia (Figura 4.12F). La injecció de 20 nmols de NMDA va provocar una reacció microglial (Figura 4.12C), mostrant cèl·lules que han proliferat, amb un engruiximent citoplasmàtic, un major nombre de perllongacions i aquestes més curtes (Figura 4.12G).

La Dzx administrada oralment modifica la morfologia de la micròglia reactiva, fent que aquesta sigui menys ameboide, i tingui menys perllongacions i un citoplasma menys gruixut (Figura 4.12H). La lesió amb NMDA va provocar una reacció microglial que va cobrir $5,38 \pm 0,68 \text{ mm}^2$, (Figura 4.12Q). La Dzx va mostrar reducció d'aquesta àrea de reacció microglial a les dosis de 0,1 mg/Kg/dia i de 1 mg/Kg/dia fins a $3,75 \pm 0,38 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0434$).

La lesió mecànica provocada per la entrada de l'agulla mostrà una reacció astrogliàl limitada al voltant de l'entrada de l'agulla, i que la Dzx no va modificar (Figura 4.12I i J). En aquests hipocamps els astròcits reactius per la GFAP mostraven una morfologia no reactiva (figura 4.12 M-N). La injecció de 20 nmols de NMDA va provocar una reacció astrogliàl (Figura 4.12K), mostrant cèl·lules que han proliferat, amb un engruiximent citoplasmàtic, amb un major nombre de prolongacions més curtes (Figura 4.12O) i marcatge més intens per la GFAP. La Dzx administrada oralment modifica la morfologia dels astròcits, fent que aquests disminueixin el seu volum citoplasmàtic, el nombre de processos i presentin menys marcatge per a la tinció de GFAP (Figura 4.12P). La lesió amb NMDA produí una reacció astrogliàl (Figura 4.12K) que va cobrir una àrea de $3,32 \pm 0,49 \text{ mm}^2$ i la Dzx no va modificar aquesta àrea de reacció astrogliàl a cap de les dosis (Figura 4.12L).

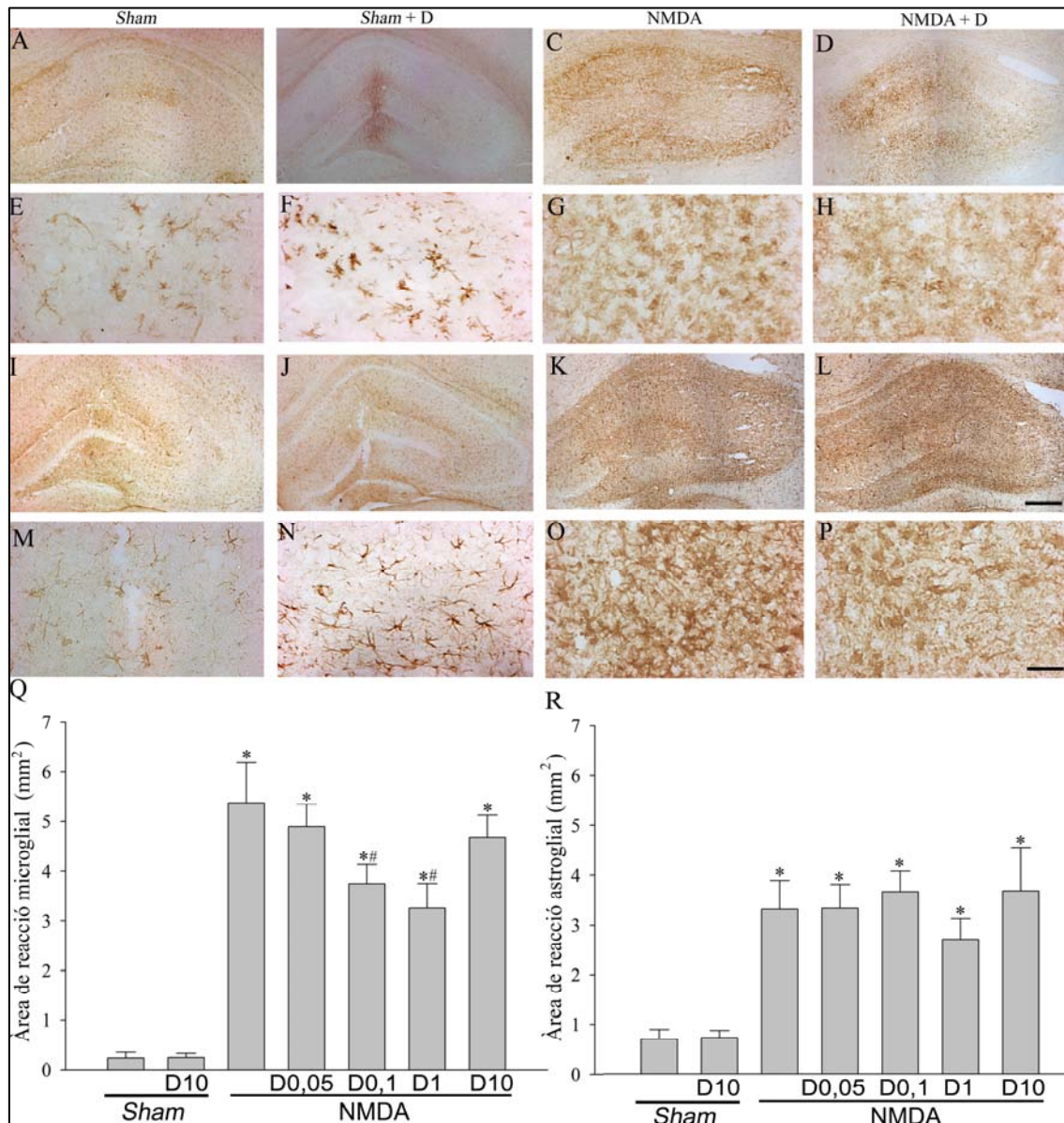


Figura 4.12: Efecte la Dzx a la gliosi reactiva hipocampal produïda pel NMDA. (A)-(H) histoquímica de IB4 i (I)-(P) immunohistoquímica de GFAP a rates *Sham*, a rates *Sham* tractades amb la concentració de Dzx de 1 mg/kg/dia (*Sham +D*), a rates (lesionades amb) NMDA i a rates NMDA tractades amb Dzx a diferents dosis. Les imatges (E)-(H) i (M)-(P) són detalls. Quantificació de les àrees de reacció microglial (Q) i astrogliàl (R). D es refereix a Dzx i el nombre al costat a concentració en mg/Kg/dia. Barra de l'escala: 1 mm per a (A) – (D) i (I) – (L), 100 µm per a (E)-(H) i (M)-(P). (n=6-8 rates/grup, temps post-lesió 15 dies. * p < 0.05 respecte les rates *Sham*, # < 0.05 respecte les rates NMDA, LSD Post-hoc).

4.2.4. La Dzx a la concentració utilitzada no modifica la glucèmia de la rata

Vam mesurar els nivells de glucosa en sang a les rates NMDA+D10 just abans i dues hores després de l'administració de 1 mg/Kg de Dzx. Les mesures es van iniciar el dia de començament del tractament (dia 8 post-lesió), es van acabar el dia anterior al sacrifici de l'animal (dia 14 post-lesió) i es van realitzar cada dos dies. Com vam observar com a aquesta dosi i en aquestes condicions, la Dzx no modifica la glucèmia de les rates estudiades (Figura 4.13).

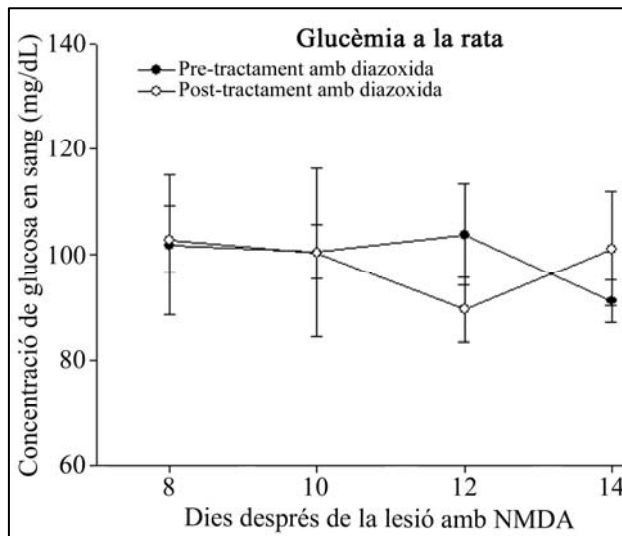


Figura 4.13: Mesura de la concentració de glucosa sanguínia a la rata (n=8, ANOVA unidireccional).

4.3. LA DZX ALENTEIX LA PROGRESSIÓ DE LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL

El nostre objectiu ha estat investigar *in vivo* com la Dzx incideix en la progressió de la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata en el temps. Els grups emprats van ser deu:

- a) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM i sacrificades als 5 dies post-lesió (grup Sham 5 dies).
- b) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM i sacrificades als 5 dies post-lesió (grup NMDA 5 dies)
- c) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup Sham 15 dies),
- d) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup Sham 15 dies + Dzx);
- e) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 15 dies post-lesió (NMDA 15 dies)
- f) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx, i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup NMDA 15 dies + Dzx).
- g) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup Sham 38 dies),
- h) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup Sham 38 dies + Dzx)
- i) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb vehicle, i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup NMDA 38 dies).
- j) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx, i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup NMDA 38 dies + Dzx).

Cada grup constava de 10 rates (N = 10 rates/grup), els quals es dividien aleatòriament a l'hora del sacrifici en dos: 5 rates es feien servir per a histologia i les altres 5 per a bioquímica. La Dzx 1mg/Kg/dia es va administrar oralment del dia 8 post-lesió fins al

dia del sacrifici. El BrdU es va injectar entre els dies 5 i 8 post lesió a una dosi de 50 mg/Kg en PBS 50 mM, tal i com es va descriure prèviament al grup (Batlle, 2009).

Primer vam determinar l'efecte de la Dzx sobre la lesió excitotòxica hipocampal al llarg del temps. L'àrea de lesió es va estimar mitjançant la tinció de Nissl, i es va representar com a percentatge de l'àrea total de l'hipocamp, ja que el volum d'aquest pot variar amb el temps. La pèrdua neuronal es va estimar per mesura d'àrees de pèrdua de tinció i comptatge cel·lular sobre seccions tenyides per immunohistoquímica de NeuN, es va mesurar l'àrea de les capes piramidal (CA1, CA2 i CA3) i DG, i es van representar com a percentatge de pèrdua neuronal respecte l'àrea total neuronal. Les àrees de reacció microglial i astrogial es van calcular mitjançant histoquímica de IB4 i immunohistoquímica de GFAP, respectivament, i es van representar com a percentatge d'àrea de reacció respecte l'àrea total hipocampal.

Per estudiar in vivo els efectes anti-inflamatòris de la Dzx sobre la lesió excitotòxica vam quantificar per qPCR la quantitat de mRNA del neurofilament (NF-H), de la proteïna GFAP i de la proteïna S100 β , per tenir una estimació quantitativa de la lesió. A més vam quantificar els nivells de mRNA de les diferents subunitats del canal K_{ATP} (SUR1 SUR2 Kir 6.1 i Kir 6.2) i de les quimiocines cxcl9 i ccl5. Vam agafar les mostres de les que teníem RNA provinent dels hipocamps de les rates, creant 7 grups: Sham, Sham + Dzx, NMDA 5 dies, NMDA 15 dies, NMDA 15 dies + Dzx, NMDA 38 dies i NMDA 38 dies + Dzx.

La estadística que es va fer servir en la histologia va ser la ANOVA unidireccional seguida del test de Fisher o LSD. La estadística que es va fer servir en les qPCR va ser un test de t-Student.

4.3.1. La Dzx alenteix de la lesió hipocamp induïda per NMDA

Als animals del grup Sham l'àrea de lesió mesurada per tinció de Nissl es restringia a la zona d'entrada de l'agulla, cobrint una àrea del 2,24 \pm 0,95% del total hipocampal, la qual es mantenia durant els 38 dies de l'estudi i no es veia modificada pel tractament amb Dzx (Figura 4.14A). Pel que fa a les rates NMDA, la lesió assolía un 31,65 \pm 4,28% de tota l'àrea hipocampal al cinquè dia (Figura 4.14B), i hi havia una tendència a augmentar fins arribar al 39,34 \pm 5,79% el dia 15 post-lesió, per mantenir-se dia 38 (Figura 4.14C i 4.15A) ($p = 0,0004$). Les rates NMDA 25 dies + Dzx presentaven una

àrea de lesió hipocampal del $24,57 \pm 3,73\%$, que es manté fins a dia 38 post-lesió (Figura 4.14 (D)), resultat que implica una reducció de l'àrea de lesió del $15,97\%$ (Figura 4.15 (A))(p = 0,015).

Els animals Sham van mostrar una pèrdua neuronal mínima associada amb l'agulla, i la Dzx no va modificar aquest efecte (Figura 4.15B i C). A les rates NMDA 5 dies la pèrdua neuronal arribava a un $27,68 \pm 7,25\%$ de la capa piramidal i un $33,17 \pm 9,35\%$ de la capa granular (Figura 4.13F), la lesió augmentava fins una àrea del $60,67 \pm 9,35\%$ del total de la capa piramidal i el $70,61 \pm 12,19\%$ de la granular del DG el dia 15 post-lesió i es mantenia a dia 38 (Figura 4.14G, Figura 4.15B i C). La Dzx disminuï aquesta àrea de pèrdua neuronal fins al $40,07 \pm 6,26\%$ a la capa piramidal i el $32,16 \pm 11,59\%$ a les rates NMDA 15 dies + Dzx (p = 0,0099 vs NMDA a la capa piramidal i p = 0,0450 a la capa granular). A les rates NMDA 38 dies, la lesió arribava al $67,65 \pm 4,36\%$ a la capa piramidal, i al $47,48 \pm 3,23\%$ a les rates NMDA 38 dies + Dzx (Figura 4.13K i O, Figura 4.14B i C) valors d'àrea de encara menors que els presentats per les rates NMDA (p = 0.0430).

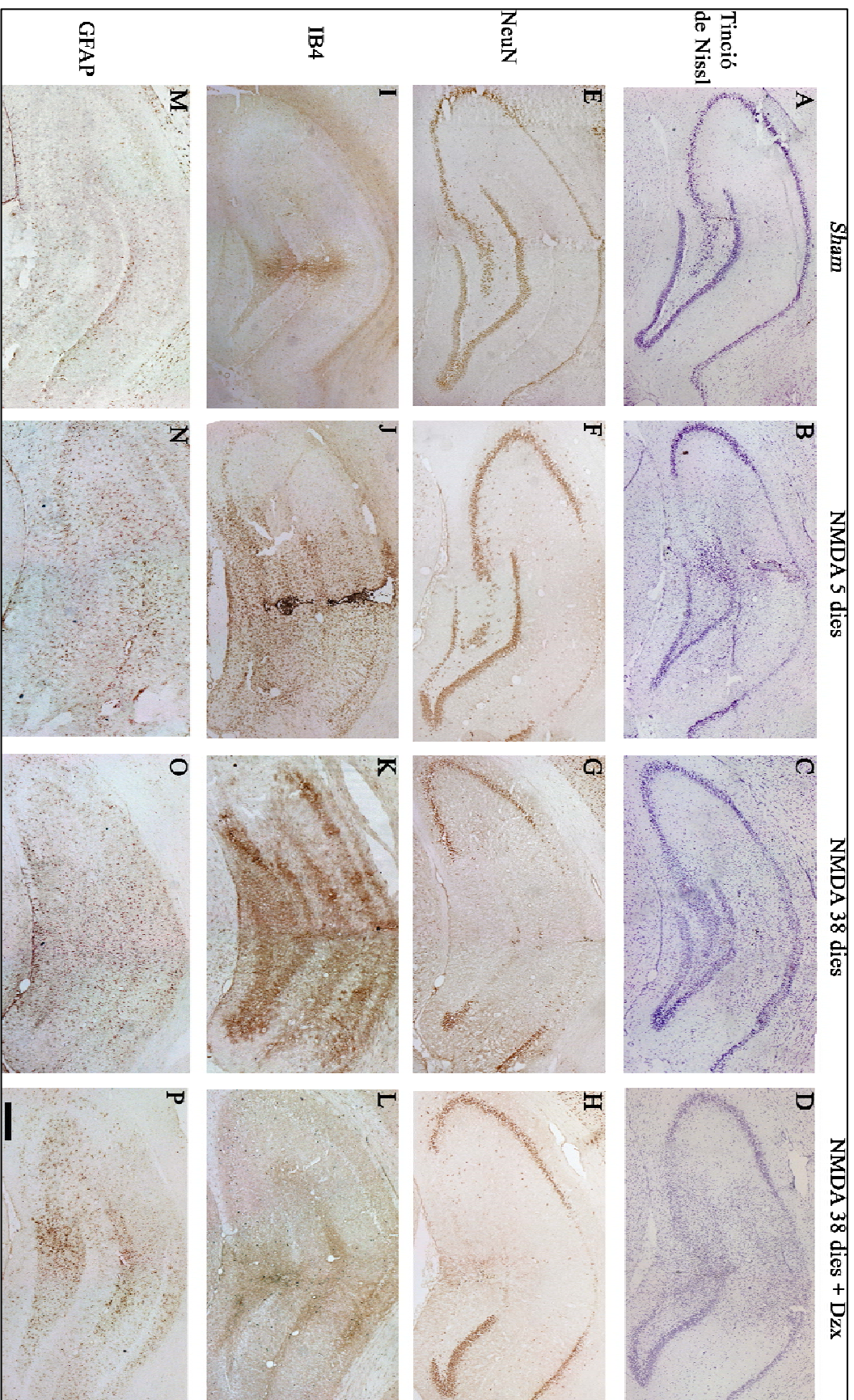


Figura 4.14: Evolució en el temps de la lesió hipocàmpal induïda per NMDA. (A) – (D) Tincions de Nissl. (E) - (H) Immunohistoquímica de NeuN. (I) – (L) Histoquímica de IB4. (M) – (P) Immunohistoquímica de GFAP. Dzcx es refereix al tractament amb Dzcx a la dosi 1 mg/Kg/dia. Barra de l'escala: 1 mm.

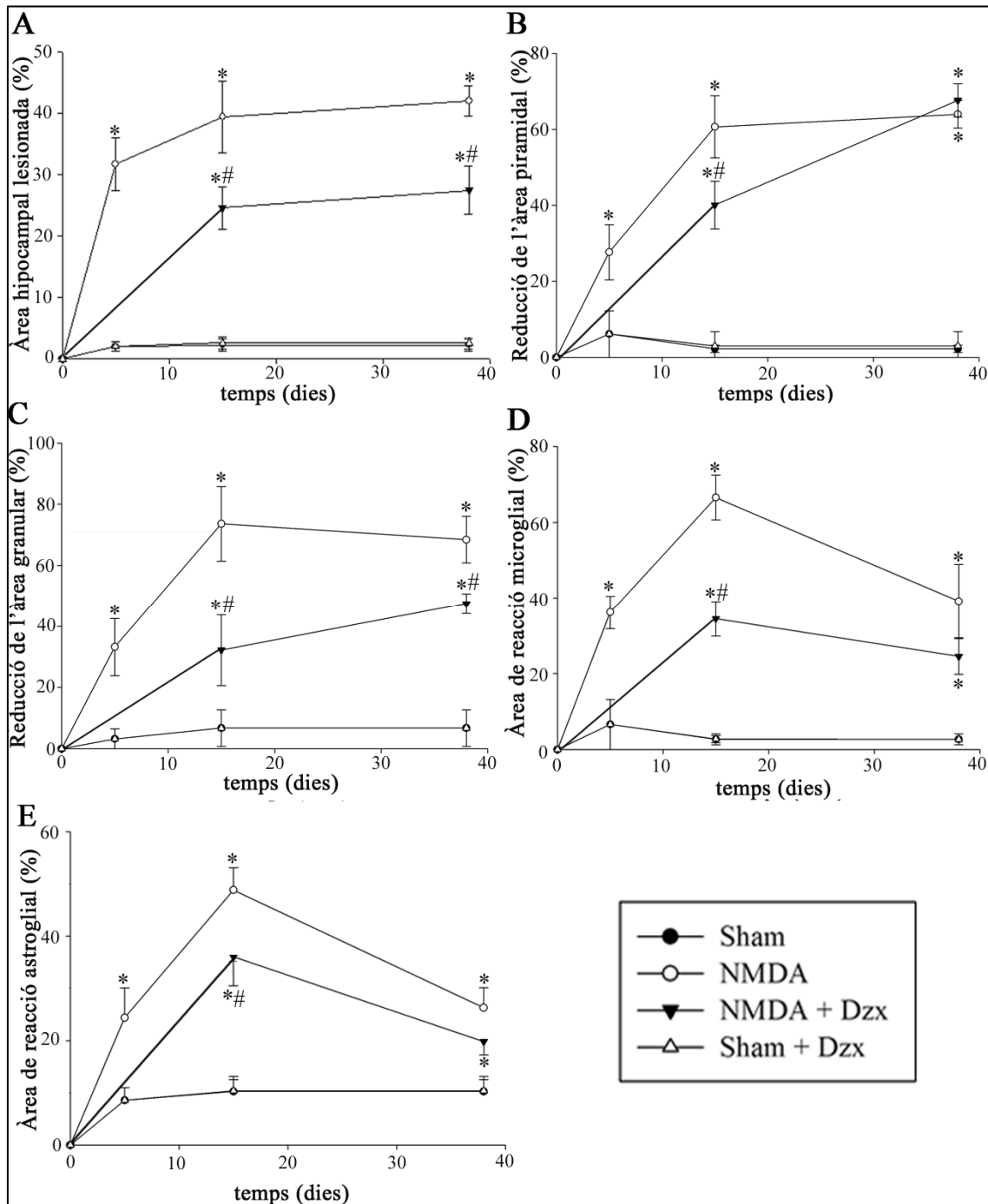


Figura 4.15: Efecte de la Dzx a l'evolució de la lesió induïda per NMDA a l'hipocamp de la rata. (A) El gràfic representa l'àrea de lesió hipocampal mesurada sobre seccions tenyides amb violeta de cresil, (B) la reducció de l'àrea marcada per NeuN es va calcular a la capa piramidal de l'hipocamp (B) i la granular del DG (C) de seccions tenyides per immunohistoquímica de la proteïna NeuN. Quantificació de l'àrea de reacció microglial sobre seccions tenyides amb IB4 (D) i astroglial sobre seccions tenyides amb immunohistoquímica de la GFAP (E). Dzx es refereix al tractament amb Dzx a la dosi 1 mg/Kg/dia. (n=6 Sham, 6 Sham + Dzx, 5 NMDA 5dies, 9 NMDA 15 dies, 5 NMDA 38 dies, 12 NMDA + Dzx 15 dies, 5 NMDA + Dzx 38 dies, * $p < 0.05$ vs Sham, # $p < 0.05$ vs NMDA a cada temps, LSD Post-hoc).

4.3.2. La Dzx disminueix la reacció glial associada amb la lesió excitotòxica hipocampal

Al grup Sham, la tinció d'IB4 va mostrar que aquestes àrees es van restringir a la zona d'entrada de l'agulla, assolint una àrea del $6,59 \pm 6,59\%$ el dia 5 després de la lesió. Aquesta àrea de reacció disminuïa fins al $2,67 \pm 0,95\%$ (Figura 4.14M). La Dzx a una concentració de 1 mg/Kg/dia no va modificar aquestes àrees de reacció ($p = 0,21$) (Figura 4.15D). Pel que fa a les rates NMDA 5 dies, la reacció microglial era major que l'observada a les rates Sham ($p = 0,0005$), cobria un $36,50 \pm 4,33\%$ de l'àrea hipocampal (Figura 4.13J), i va augmentant fins a assolir una àrea del $61,02 \pm 6,95\%$ el dia 15 post-lesió, i disminuï als 38 dies ($p = 0,302$) (Figura 4.14G, Figura 4.15D). La Dzx disminuï l'àrea de reacció microglial induïda per NMDA a 15 dies fins el $32,92 \pm 4,85\%$, de tota l'àrea hipocampal ($p = 0,0032$, Figura 4.14L, Figura 4.15D) i es manté fins a dia 38 post-lesió.

L'estimació de l'àrea de reacció astroglià per immunohistoquímica de GFAP va mostrar que al grup Sham aquesta reacció es restringia a la zona d'entrada de l'agulla, no canviava al llarg de l'estudi i la Dzx no va modificar-la (Figura 4.14D). A les rates NMDA 5 dies, la reacció astroglià cobria un $24,36 \pm 5,69\%$ de tota l'àrea hipocampal (Figura 4.14N), valor que augmentava fins el $48,88 \pm 4,27\%$ el dia 15 post-lesió, per baixar als 38 dies (Figura 4.14K, Figura 4.15E). La Dzx disminuï l'àrea de reacció astroglià fins el $36,04 \pm 5,13\%$ de tota l'àrea hipocampal a les rates NMDA 15 dies + Dzx ($p = 0,0456$, Figura 4.14P, Figura 4.15E) tamany que es va mantenir fins a dia 38 post-lesió (Figura 4.15E).

4.3.3. Efecte de la Dzx sobre els canvis de concentració de mRNA de NF-H, GFAP i S100 β induïts per NMDA a l'hipocamp de la rata

La injecció de NMDA va augmentar 11 vegades la concentració de mRNA del NF-H cinc dies després de la lesió (Taula 4.4) respecte les rates Sham, mentre que a 38 dies aquests nivells van disminuir aproximadament 2,5 vegades ($p = 0,0492$). La Dzx no va modificar els nivells de mRNA del NF-H que presentaven les rates Sham a l'hipocamp 15 dies després de la lesió (Taula 4.3). Per això vam unificar les dades dels grups Sham i Sham+Dzx en un únic grup control. La Dzx disminuïa 2,5 vegades la concentració del mRNA en rates NMDA 15 dies respecte les rates Sham.

	Símbol molècula	Relació de canvi	95% CI	p-valor
Sham + Dzx vs Sham	NF-H	1,555298062	(1,01;2,09)	0,125
	GFAP	0,772815307	(-1,71;0,48)	0,653
	S100 β	0,702537345	(-2,87;0,32)	0,174

Taula 4.3: Comparació de la relació de canvi a la expressió dels gens NF-H, GFAP i S100 β de rates Sham tractades amb Dzx a la dosi de 1 mg/Kg/dia sobre rates Sham. IC: Interval de confiança. p-valor: t-student.

Amb aquesta lesió la concentració de mRNA de la GFAP va augmentar a 54 vegades al les rates NMDA 5 dies mentre que a les rates NMDA 15 dies aquest augment va ser només de 4,5 vegades, respecte les rates Sham ($p = 0,0001$ i $p = 0,002$, respectivament) A les rates NMDA 38 dies no es van detectar canvis significatius en la concentració de mRNA la GFAP induïts per NMDA. La Dzx no va modificar els nivells de mRNA de la GFAP que presentaven les rates Sham 15 dies a l'hipocamp (Taula 4.3). Per això vam unificar les dades dels grups Sham i Sham+Dzx en un únic grup control. La Dzx no tenia cap efecte sobre les rates NMDA + Dzx respecte les rates Sham.

Pel que fa a la expressió de S100 β , hi havia una baixada significativa de concentració del seu mRNA del gen a les rates NMDA 38 dies, una baixada de 2,77 vegades. La Dzx no va modificar els nivells de mRNA de la GFAP, el NF-H i la S100 β que presentaven les rates Sham a l'hipocamp 15 dies després de la lesió (Taula 4.3). Per això vam unificar es dades dels grups Sham i Sham+Dzx en un únic grup control. A les rates NMDA + Dzx, on la baixada era de 14,28 vegades respecte les rates Sham.

Símbol	NMDA vs Sham	Relació de canvi	95% IC	p-valor
NF-H	NMDA 5 dies	11.00191505	(6.03:15.07)	6.0788E-05*
	NMDA 15 dies	0.408900307	(0.029:0.078)	0.0535339
	NMDA 38 dies	0.455777058	(-0.06:0.97)	0.0492227*
	NMDA + Dzx 15 dies	0.392620687	(0.11:0.67)	0.0217481*
	NMDA + Dzx 38 dies	0.436209072	(0.01:0.87)	0.0633243
GFAP	NMDA 5 dies	54.90546018	(-9.34:119.15)	5.7681E-05*
	NMDA 15 dies	4.525553719	(0.76:8.28)	0.0237525*
	NMDA 38 dies	1.960356133	(-0.48:4.40)	0.150865
	NMDA + Dzx 15 dies	1.525011942	(0.49:2.55)	0.328894
	NMDA + Dzx 38 dies	0.232499268	(0.09:0.36)	0.11047
S100β	NMDA 5 dies	1.098334781	(0.66:1.53)	0.441743
	NMDA 15 dies	0.860163999	(0.63:1.08)	0.544036
	NMDA 38 dies	0.367921411	(-0.55:1.28)	0.0286817*
	NMDA + Dzx 15 dies	1.218300217	(0.55:1.88)	0.4689
	NMDA + Dzx 38 dies	0.068013921	(0.01:0.12)	0.00162377*

Taula 4.4: Canvis en la concentració de mRNA dels gens NF-H, GFAP i S100β en hipocamps de rates lesionades amb NMDA 5, 15 i 38 dies post-lesió, i en rates lesionades administrades amb Dzx, i comparats amb les rates Sham. CI: Interval de confiança. p-value: t-student.

4.3.4. La lesió excitotòxica augmenta l'expressió de Kir6.1 i SUR2 a 5 dies post-lesió

Seguidament vam analitzar els canvis en les concentracions de mRNA de les diferents subunitats del canal K_{ATP} induïdes per la lesió hipocampal (Taula 4.5). En comparar amb les rates Sham, la injecció de NMDA va provocar un augment de 2,59 vegades de la concentració de mRNA de la subunitat Kir6.1 ($p = 0.009$) i 2,2 vegades la de SUR2 ($p = 0.007$) a les rates NMDA 5 dies ($p = 0,009$), mentre que aquesta injecció no va canviar els nivells de mRNA de les subunitats Kir6.2 i SUR1. Un augment similar de la concentració de mRNA de la subunitat SUR2 es va observar les rates NMDA 38 dies + Dzx ($p = 0,046$).

Símbol	NMDA vs Sham	Relació de canvi	95% IC	p-valor
Kir6.1	NMDA 5 dies	2,596244133	(1,88:3,31)	0,009*
	NMDA 15 dies	0,477753895	(0,25:0,75)	0,32
	NMDA 38 dies	0,968287049	(0,51:1,43)	0,91
	NMDA + Dzx 15 dies	1,573568605	(0,17:2,97)	0,33
	NMDA + Dzx 38 dies	1,469636551	(1,02:1,91)	0,35
Kir6.2	NMDA 5 dies	1,766475695	(0,83:2,70)	0,19
	NMDA 15 dies	0,733093503	(0,41:1,06)	0,54
	NMDA 38 dies	1,054454873	(0,92:1,19)	0,92
	NMDA + Dzx 15 dies	1,267458921	(0,08:2,45)	0,67
	NMDA + Dzx 38 dies	2,236288092	(1,36:3,10)	0,07
SUR1	NMDA 5 dies	1,189153845	(0,61:1,77)	0,56
	NMDA 15 dies	0,440873667	(0,31:0,57)	0,16
	NMDA 38 dies	0,944611179	(0,85:1,04)	0,99
	NMDA + Dzx 15 dies	1,027521529	(0,44:1,61)	0,84
	NMDA + Dzx 38 dies	1,585339713	(0,31:2,85)	0,29
SUR2	NMDA 5 dies	2,218655918	(1,35:3,09)	0,007*
	NMDA 15 dies	1,484861217	(0,80:2,16)	0,13
	NMDA 38 dies	0,945954768	(0,04:1,84)	0,98
	NMDA + Dzx 15 dies	1,101420898	(0,12:2,08)	0,69
	NMDA + Dzx 38 dies	2,470050791	(0,5:4,43)	0,046*

Taula 4.5: Canvis en la concentració de mRNA dels gens de les diferents subunitats del canal K_{ATP} en hipocamps de rates lesionades amb NMDA 5, 15 i 38 dies post-lesió, i en rates lesionades administrades amb Dzx, i comparats amb les rates Sham. CI: Interval de confiança. p-value: t-student.

4.3.5. La lesió excitotòxica no modifica l'expressió *in vivo* de *cxcl9*, *ccl5* i *CXCR3* a llarg termini

Per analitzar els possibles efectes anti-inflamatoris de la Dzx, vam estudiar les variacions en la concentració de mRNA de les quimiocines *ccl5* i *cxcl9*, i del *CXCR3*, el receptor de la *cxcl9*, a les rates NMDA 5, 15 i 38 dies. Els nivells de mRNA de *cxcl9* detectats estaven molt a prop del límit de detecció de la tècnica i no varem observar cap efecte de la lesió amb NMDA ni del tractament amb Dzx en aquests nivells (taula 4.6) Els nivells de mRNA de *ccl5* i de *CXCR3*, es van trobar per sota dels límits de detecció de la tècnica i no va ser possible detectar-los.

NMDA vs Sham	Relació de canvi	95% IC	p-valor
NMDA 5 dies	0,187	(0,073:0,300)	0,184
NMDA 15 dies	0,224	(0,045:0,402)	0,143
NMDA 38 dies	0,315	(0,132:0,497)	0,144
NMDA+ Dzx 15 dies	0,309	(0,073:0,547)	0,191
NMDA + Dzx 38 dies	0,516	(0,001:1,048)	0,372

Taula 4.6: Canvis en la concentració de mRNA del gen de la quimioquina cxcl9 en hipocamps de rates lesionades amb NMDA 5, 15 i 38 dies post-lesió, i en rates lesionades administrades amb Dzx, i comparats amb les rates Sham. CI: Interval de confiança. p-value: t-student.

4.4. LA DZX POTENCIA LA NEUROGÈNESI ASSOCIADA A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL.

El nostre objectiu d'aquest bloc ha estat investigar com la Dzx incideix en els processos de neurogènesi associada a la lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata. Els grups emprats van ser deu.

- a) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM i sacrificades als 5 dies post-lesió (grup Sham 5 dies).
- b) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM i sacrificades als 5 dies post-lesió (grup NMDA 5 dies)
- c) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup Sham 15 dies),
- d) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup Sham 15 dies + Dzx);
- e) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 15 dies post-lesió (NMDA 15 dies)
- f) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx, i sacrificades als 15 dies post-lesió (grup NMDA 15 dies + Dzx).
- g) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb vehicle i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup Sham 38 dies),
- h) Rates injectades a l'hipocamp amb PBS 50 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup Sham 38 dies + Dzx)
- i) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb vehicle, i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup NMDA 38 dies).
- j) Rates lesionades a l'hipocamp amb NMDA 40 mM, tractades oralment amb una dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx, i sacrificades als 38 dies post-lesió (grup NMDA 38 dies + Dzx).

Cada grup constava de 5 rates (N = 5 rates/grup), excepte els grups a 15 dies, el qual va constar de 10 rates/grup. La Dzx 1mg/Kg/dia es va administrar oralment del dia 8 post-lesió fins al dia del sacrifici. El BrdU es va injectar entre els dies 5 i 8 post lesió a una

dosi de 50 mg/Kg en PBS 50 mM, ja que estudis previs del grup han situat la taxa màxima de proliferació cel·lular provocada per la lesió entre els dies al 8 després de la lesió (Nomura *et al.* 2000; Batlle, 2009).

Vam fer les següents tincions: Tinció immunohistoquímica contra la PSA-NCAM per a marcar els progenitors neuronals en desenvolupament i migració; contra la calretinina per a marcar neurones immadures i dobles immunofluorescències BrdU / NeuN per a marcar noves neurones madures, BrdU / IB4 per a marcar noves cèl·lules microgials i BrdU/ GFAP marcar nous astròcits. També vam estudiar per immunohistoquímica l'expressió del factor de transcripció Sp8, l'expressió del qual és constitutiva del les cèl·lules progenitores i noves neurones del la ZSV i s'ha proposat com a marcador de neurones provinents de la via rostromigratòria al bulb olfactori (Li *et al.*, 2011). Per tal de determinar quin tipus cel·lular presenta expressió de la proteïna Sp8, vam realitzar experiments de doble immunohistoquímica el marcador de Sp8 i el marcador neuronal NeuN ó el marcador astrogial GFAP, i vam fer un estudi de colocalització on obteníem un mapa de la desviació mitjana de producte (MDP ó *Mean Product Deviation*), que ens mostra en groc els punts que colocalitzen sobre un pla; un mapa de dispersió ó *mapa de dispersió de punts* ens mostra la relació entre les dues variables (marcatge verd i marcatge vermell) i ens mostra les coincidències en groc a la diagonal; i mesuràvem el coeficient de correlació de Pearson, que és un índex que mesura la relació lineal entre dues variables quantitatives, de manera que si és positiu hi ha colocalització entre els dos canals. Els estudis de colocalització els hem fet d'acord al descrit per Jaskolski (2005).

La estadística que es va fer servir va ser la ANOVA unidireccional seguida del test LSD.

4.4.1. La lesió excitotòxica hipocampal augmentà el nombre de cèl·lules PSA-NCAM positives i de calretinina positives

Per a estudiar la aparició de cèl·lules PSA-NCAM positives a l'hipocamp, es van emprar els grups de rates Sham 5 dies i NMDA 5 dies, ja que es coneix que és el temps en que apareixen els progenitors neuronals. Vam comptar el nombre de cèl·lules positives per hipocamp. Els hipocamps sense manipular no mostraven expressió de PSA-NCAM en cap cas. Les rates Sham presentaven $28,5 \pm 4,3$ cèl·lules positives (Figura 4.17A i C), que es localitzaven exclusivament a la SGZ del DG. A les rates NMDA aquest nombre augmentava fins a les $457,9 \pm 128,4$ cèl·lules positives (Figura 4.17B i C), resultat clarament diferent al de les rates Sham ($p = 0,0102$), i es localitzaven per tot el DG i part de l'hilus i el tram final de la capa CA3.

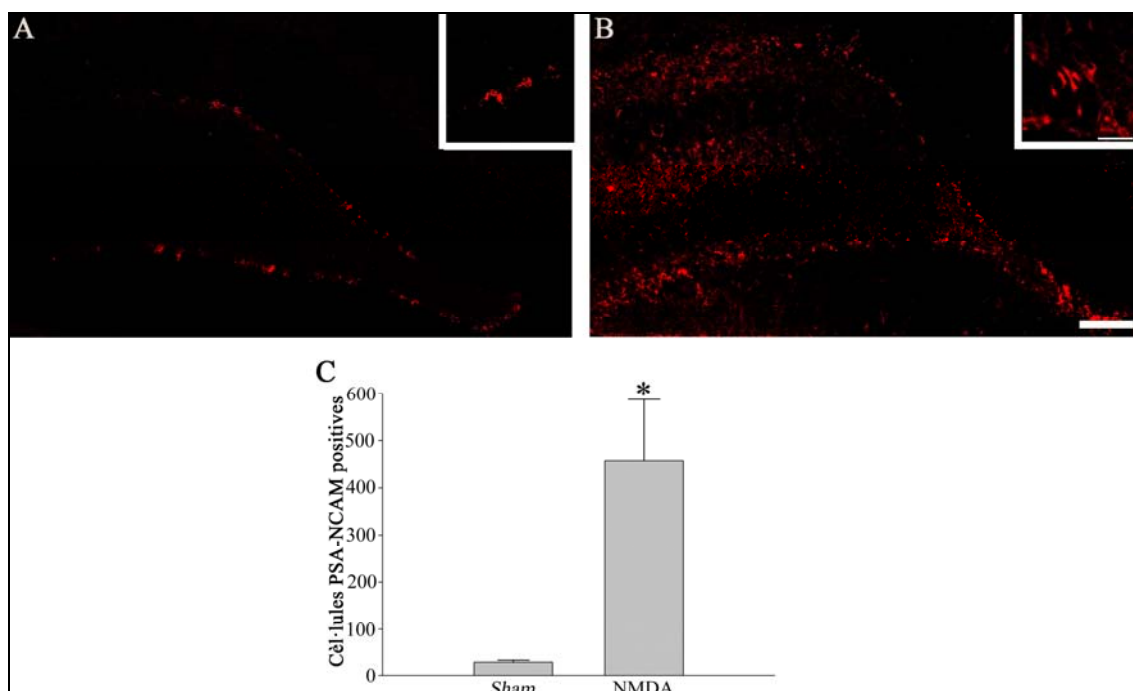


Figura 4.17: Immunofluorescència de PSA-NCAM a l'hipocamp d'una rata *Sham* (A) i 5 dies post-lesió amb NMDA (B) (Barra de l'escala: 1 mm, miniatura 20 μ m). (C) l'histograma mostra la quantificació del nombre de cèl·lules PSA-NCAM positives. ($n = 5$ *Sham*, $n = 5$ NMDA, * $p < 0.05$ vs *Sham*, LSD Post-hoc).

Vam fer una immunohistoquímica de calretinina a les rates del grup 15 dies post-lesió, temps en que les noves cèl·lules ja haurien d'expressar aquest marcador després de la lesió. Els hipocamps sense manipular no mostraven expressió de PSA-NCAM en cap cas. A les rates Sham la immunohistoquímica de calretinina va mostrar interneurons positives disperses per tot l'hipocamp. A les rates NMDA, es va observar un increment

al nombre de cèl·lules calretinina positives al parènquima hipocampal (Figura 4.18C i D, $p = 0,0067$). El tractament oral amb diazoxida no va provocar cap modificació del nombre de cèl·lules calretinina positives comparant amb les rates NMDA.

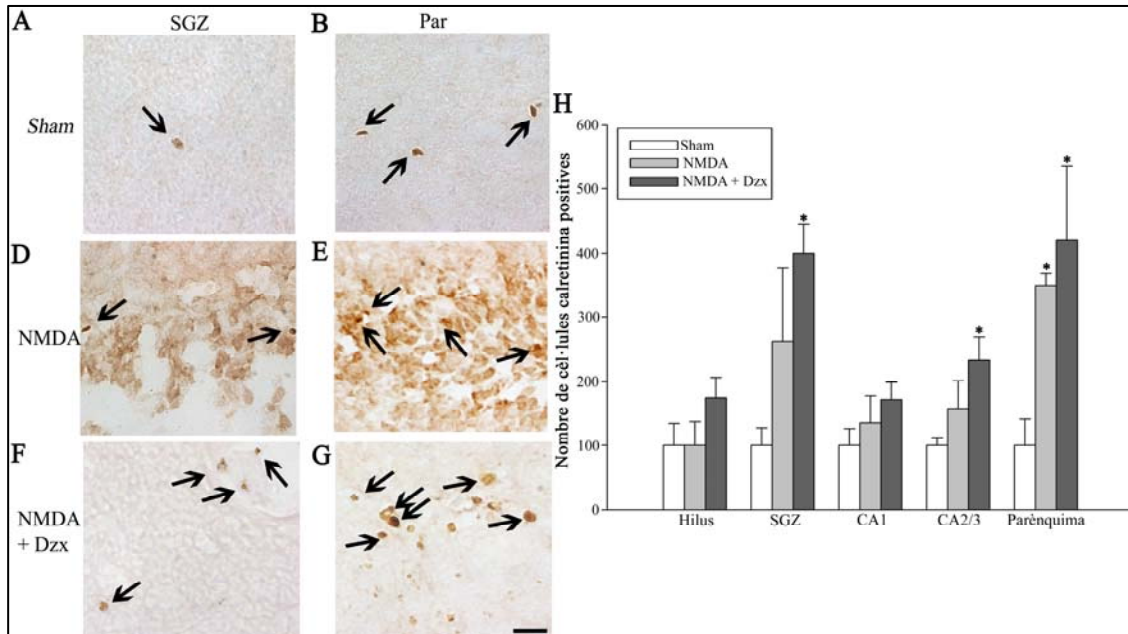


Figura 4.18: Efecte de la Dzx al nombre de cèl·lules calretinina positives a l'hipocamp de la rata 15 dies després de la lesió. Microfotografies il·lustratives de l'immunohistoquímica de calretinina a la SGZ de rates Sham (A) i NMDA-lesionades (B); i al parènquima de rates Sham (C) i NMDA-lesionades (D) 38 dies després de la lesió. (E) mostra el comptatge del nombre de cèl·lules calretinina positives 38 dies després de la lesió a rates Sham, NMDA i NMDA + Dzx, a les diferents capes de l'hipocamp. SGZ: Zona Subgranular. Par: Parènquima. ($n = 6$ rates/grup, * $p < 0.05$ comparat amb Sham, LSD Post-hoc).

4.4.2. La Dzx promou la proliferació de noves cèl·lules neuronals i limita la generació de noves cèl·lules glials

Per estudiar si la administració de diazoxida provocava variacions en el destí de la proliferació cel·lular induïda per la lesió excitotòxica, 38 dies després de la lesió es van realitzar immunohistoquímiques dobles i deteccions, capa per capa, per microscòpia del BrdU amb marcadors cel·lulars específics per a neurones, astròcits i micròglia.

Les rates Sham presentaven una mitjana de 8,24 cèl·lules NeuN i BrdU positives per a tot l'hipocamp, sobre tot a la SGZ, on hi ha la neurogènesi de manera natural, i no sembla tenir relació amb la entrada de l'agulla, ja que no es situaven a les capes danyades, on per exemple a la capa CA1 només hi ha una cèl·lula i no pas en tots els

hipocamps (0,25 cèl·lules/hipocamp, de mitjana) i ja que als hipocamps contralaterals també hi ha neurogènesis a la SGZ (Figura 4.19A-C). Les rates NMDA 38 dies presentaven 23,76 cèl·lules de mitjana a tot l'hipocamp, de les quals la diferència més significativa es troba a les àrees de la capa CA1 (4,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,25 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0103$), les capes CA2 i CA3 (7,25 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 1,5 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0063$), i al parènquima (6,25 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 1,25 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0131$). A la zona subgranular, la Dzx va augmentar el nombre total de cèl·lules positives per NeuN BrdU (10 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte 4 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies, $p = 0,049$), a la capa CA1 (23,66 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte les 4,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies, $p = 0,0003$) i el parènquima (20,33 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte les 6,25 de mitjana a les rates NMDA 38 dies, $p = 0,047$).

Les rates Sham presentaven una mitjana de 3 cèl·lules IB4 i BrdU positives per a tot l'hipocamp, i no es troba relacionat amb la entrada de l'agulla, que com ja hem vist provoca una petita reacció microglial però no en provoca proliferació. Les rates NMDA 38 dies presentaven 43,20 cèl·lules de mitjana a tot l'hipocamp, de les quals la diferència més significativa es troba a les àrees de l'hilus (3,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,5 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0028$), les capes CA2 i CA3 (18,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,15 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0013$), i al parènquima (11,25 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,5 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0078$). La Dzx no augmentava el nombre total de cèl·lules positives per IB4 i BrdU 37,33 cèl·lules de mitjana, ni la distribució a les diferents capes.

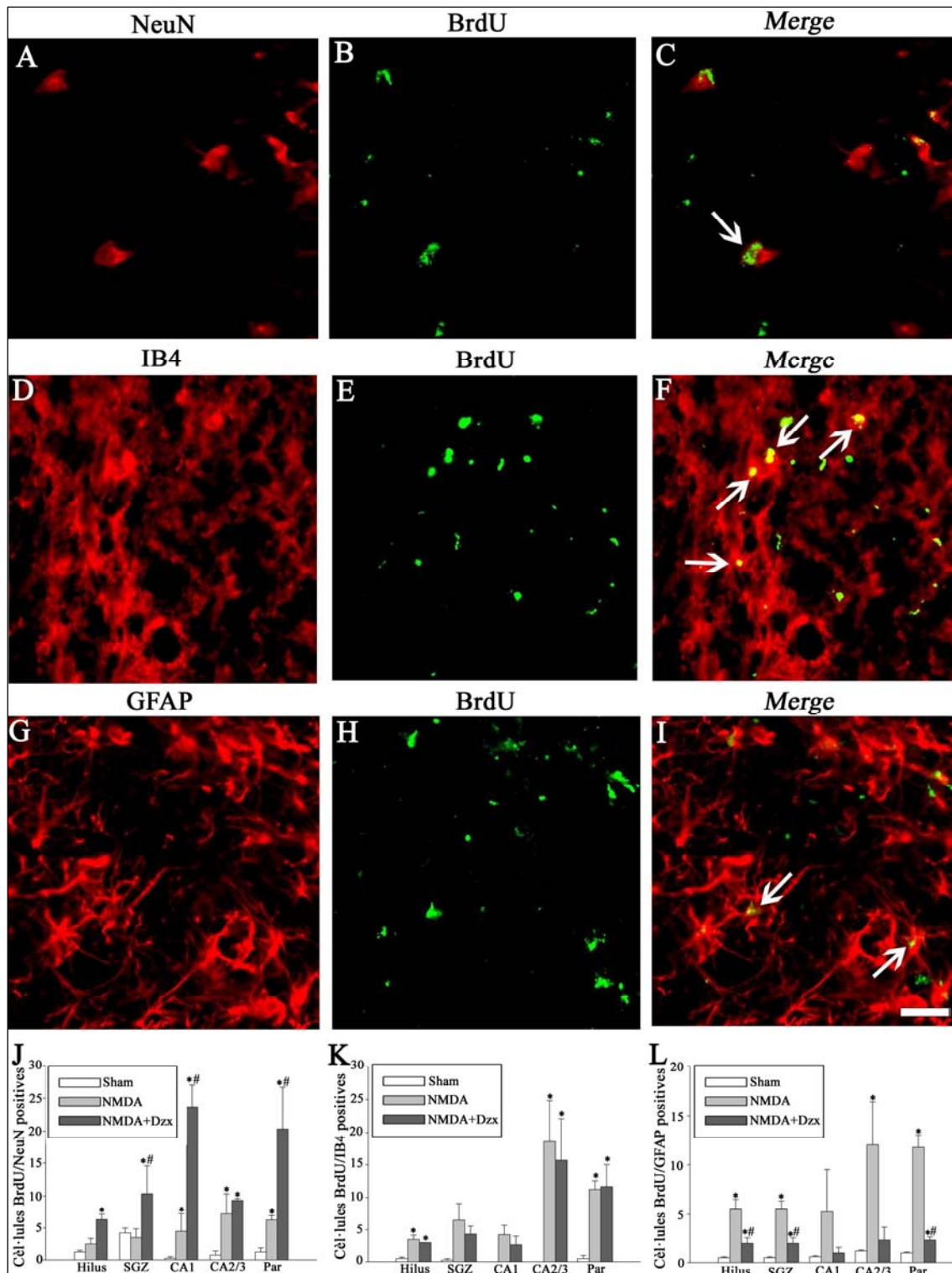


Figura 4.19: Efecte de la Dzx al nombre de cèl·lules proliferants a l'hipocamp de la rata 38 dies després de la lesió. Microfotografies il·lustratives de la doble immunofluorescència de: (A) NeuN, (B) BrdU, (C) solapament BrdU-NeuN; (D) IB4, (E) BrdU, (F) solapament BrdU-IB4; i (G) GFAP, (H) BrdU, (I) solapament BrdU-GFAP. Barra de l'escala 20 μ m. Comptatge de les dobles BrdU-NeuN (J), BrdU-IB4 (K) i BrdU-GFAP (L) cèl·lules positives 38 dies després de la lesió a rates Sham, NMDA i NMDA + Dzx, a les diferents capes de l'hipocamp. SGZ: Zona Subgranular. Par: Parènquima. (n = 6 rates/grup, * p < 0.05 comparat amb Sham, # p < 0.05 comparat amb NMDA, LSD Post-hoc).

Les rates Sham presentaven una mitjana de 5 cèl·lules GFAP i BrdU positives distribuïdes uniformement per a tot l'hipocamp, i no es troba relacionat amb la entrada de l'agulla, que com ja hem vist provoca una petita reacció astrogliàl però no en provoca proliferació. Les rates NMDA 38 dies presentaven 39,37 cèl·lules de mitjana a tot l'hipocamp, essent superior en nombre a les àrees de l'hilus (5,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,5 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0037$), la zona subgranular (5,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,5 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0237$), les capes CA2 i CA3 (12 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,75 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0132$), i al parènquima (11,75 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies enfront de 0,65 cèl·lules de mitjana a les rates Sham 38 dies, $p = 0,0008$). La Dzx disminuïa el nombre total de cèl·lules positives per GFAP i BrdU, fins a 9 cèl·lules de mitjana, disminuint significativament el seu nombre respecte a les NMDA no tractades al hilus (2 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte les 5,5, $p = 0,0457$), la zona subgranular (2 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte les 5,5 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies, $p = 0,0272$) i al parènquima (2,2 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies + Dzx respecte les 11,75 cèl·lules de mitjana a les rates NMDA 38 dies, $p = 0,0019$).

4.4.3. La Dzx promou la migració de cèl·lules Sp8/GFAP positives

Resultats previs del grup mostren que 38 dies després de la lesió amb NMDA hi ha una marcatge de cèl·lules Sp8 a l'hipocamp (Batlle *et al.* 2009). Vam estudiar per doble immunohistoquímica i microscòpia confocal la natura neuronal o glial d'aquestes cèl·lules positives per Sp8 i vam estimar l'efecte de la Dzx en el nombre i localització d'aquestes (Figura 4.20).

Les rates Sham no van mostrar cèl·lules positives per Sp8 a l'hipocamp. Les rates NMDA van mostrar un nombre similar de cèl·lules immunopositives per a Sp8 (Figura 4.20A i C) als 15 dies i als 38 dies post-lesió. La Dzx va incrementar un 200% el nombre de cèl·lules Sp8 positives als 38 dies post-lesió ($p = 0,0341$, Figura 4.20D - E).

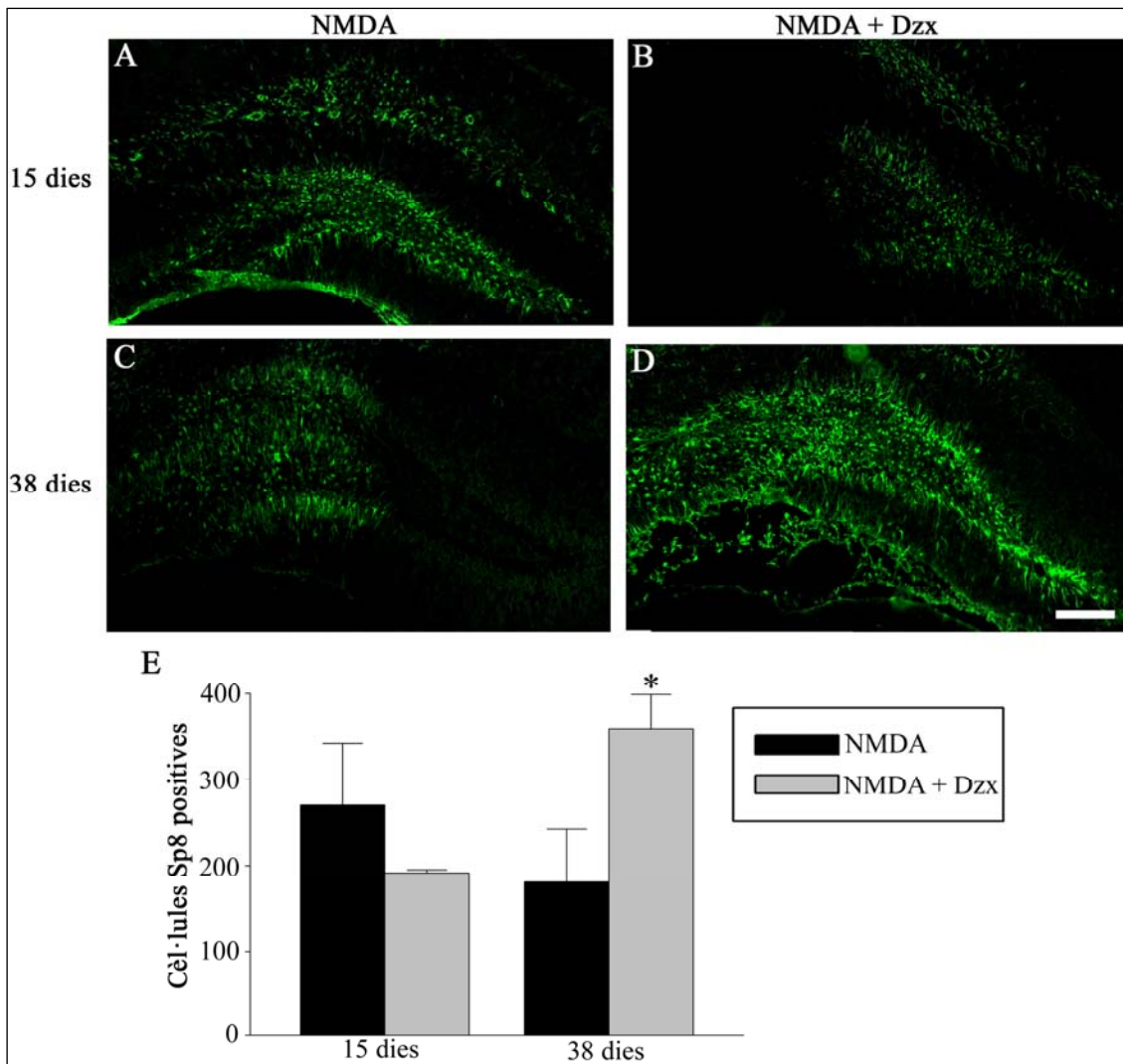


Figura 4.20 Immunodetecció de Sp8 a l'hipocamp de rates NMDA a (A) 15 dies i a (C) 38 dies i rates NMDA+Dzx a (B) 15 dies i a (D) 38 dies. Comptatge de les cèl·lules Sp8 positives a rates NMDA i NMDA + Dzx (n = 6 rates/grup, * p < 0,05 comparat amb *Sham*, LSD Post-hoc).

Per determinar la natura d'aquestes cèl·lules Sp8 vam realitzar dobles immunohistoquímiques i un estudi confocal de co-localització amb Sp8 i neuN o GFAP respectivament.

La doble immunohistoquímica de Sp8 amb NeuN a les rates NMDA a 38 dies post-lesió no va mostrar co-localització del marcatge de Sp8 i NeuN (Figura 4.21A – C). La quantificació a un pla XY a un pla d'una imatge il·lustrativa (Figura 4.21D) va mostrar que no havia píxels que colocalitzessin als dos canals (Figura 4.21E) i el mapa de dispersió de punts mostra una total dispersió en la distribució dels píxels d'ambdós canals amb un coeficient de Pearson és 0,095.

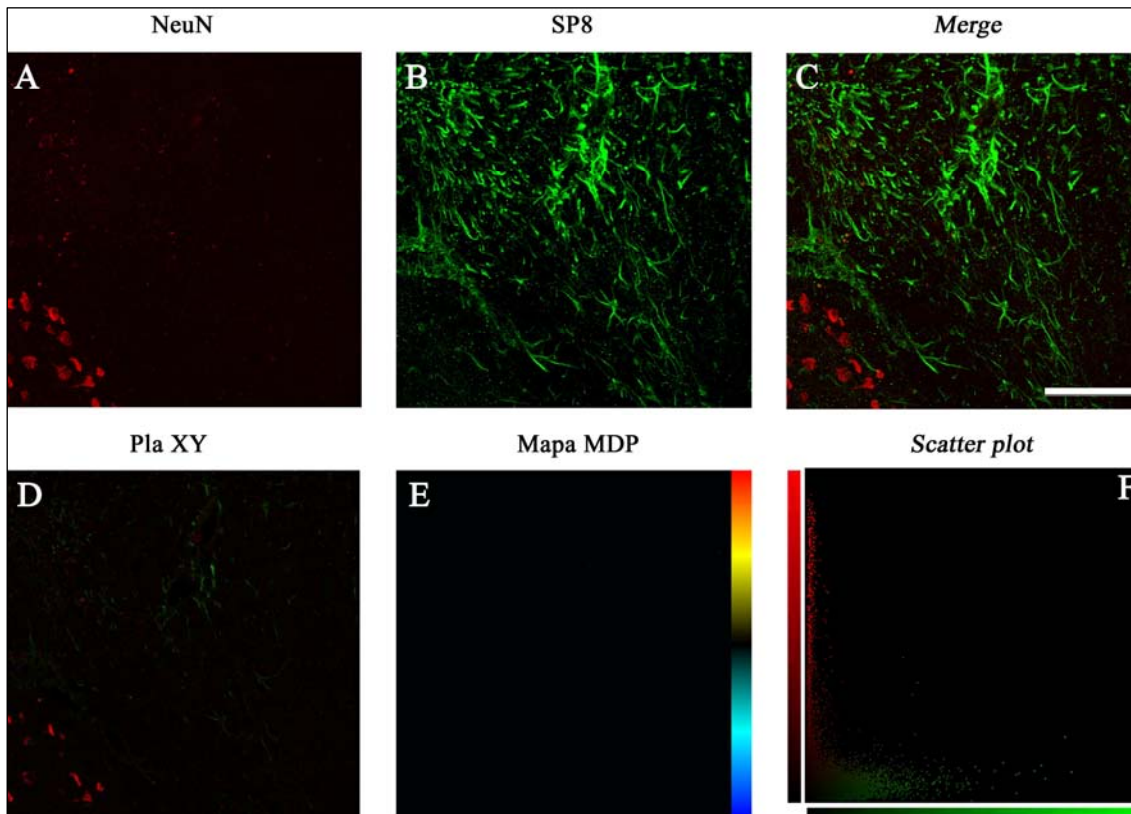


Figura 4.21: Co-Immunodetecció i estudi de co-localització de Sp8 i NeuN a l'hipocamp de rates NMDA 38 dies. Imatges apilades de la immunohistoquímica doble de Sp8 (A) i NeuN (B) a l'hipocamp de rates NMDA 38 dies. La imatge confocal d'un pla XY il·lustratiu (D), el seu mapa MDP (E) que mostra l'absència de co-localització dels canals verd i vermell (punts grocs), i el mapa de dispersió de punts (F) del mateix pla; el qual mostra d'esquerra a dreta de l'eix de les X correspon a l'increment de la intensitat del canal 46/46, mentre que de baix a dalt a l'eix de les Y mostra l'increment d'intensitat del canal vermell. Barra de l'escala 20 μm .

La doble immunofluorescència GFAP i Sp8 a les rates NMDA 38 dies NMDA a 38 dies post-lesió va mostrar co-localització del marcatge de Sp8 i GFAP (Figura 4.22). La quantificació a un pla XY a un pla d'una imatge il·lustrativa (Figura 4.22D) va mostrar l'aparició de píxels de co-localització als dos canals (Figura 4.22E) i el mapa de dispersió de punts mostra l'aparició de punts grocs de co-localització amb un coeficient de Pearson de 0,34.

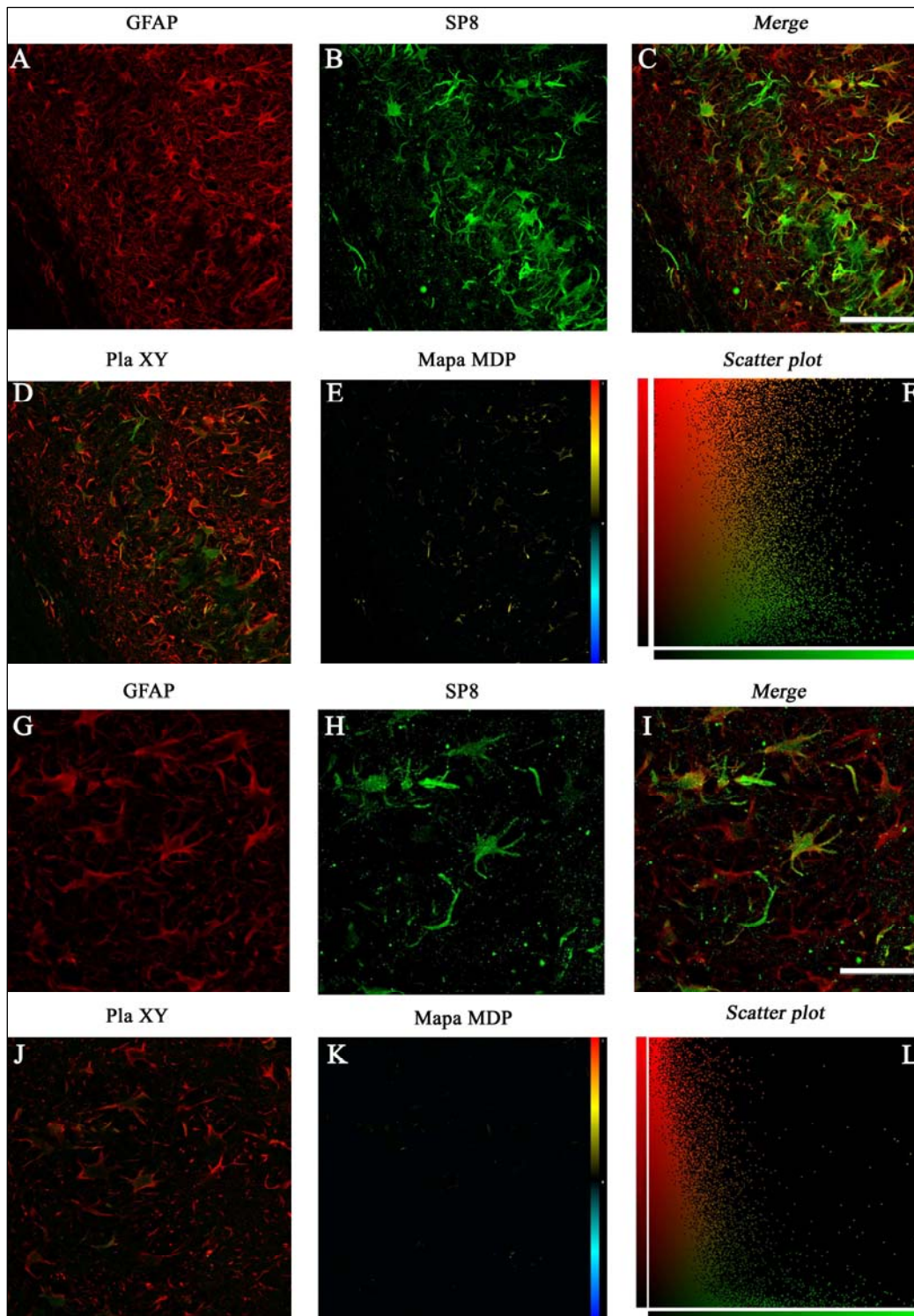


Figura 4.22 Co-Immunodetecció i estudi de co-localització de Sp8 i NeuN a l'hipocamp de rates NMDA 38 dies. Imatges apilades de la immunohistoquímica doble de Sp8 (A i G) i GFAP (B i H) a l'hipocamp de rates NMDA 38 dies. Les imatges confocals d'un pla XY il·lustratiu (D i J), el seu mapa MDP (E i K) que mostra la presència de -colocalització dels canals verd i vermell (punts grocs), i el mapa de dispersió de punts (F i L) del mateix pla; el qual mostra d'esquerra a dreta de l'eix de les X correspon a l'increment de la intensitat del canal 46/46, mentre que de baix a dalt a l'eix de les Y mostra l'increment d'intensitat del canal vermell. Barra de l'escala 20 μm .

4.5. LA MICRÒGLIA EXPRESSA EL CANAL DE CALCI DEPENDENT DE VOLTATGE DE TIPUS L

L'objectiu d'aquest apartat ha estat esbrinar si la micròglia expressa el canal de calci dependent de voltatge (CCDV) tipus L a la línia cel·lular BV-2 i al model de lesió excitotòxica hipocampal A més, vam estudiar *in vitro* la implicació del CCDV tipus L en el control de l'activitat pro-inflamatòria i fagocítica de la línia cel·lular microglial BV2. Els grups emprats van ser sis:

- a) Cèl·lules BV2 en cultiu (Grup control).
- b) Cèl·lules BV2 en cultiu post-tractades amb 10 μ M de Nif durant 24 hores (Grup Control + Dzx)
- c) Cèl·lules activades amb 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores (grup LPS+IFN γ)
- d) Cèl·lules activades amb 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores i post-tractades amb 10 μ M de Nif durant 24 hores (grup LPS+IFN γ + Nif).
- e) Cèl·lules activades amb 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores i post-tractades amb 10 μ M de Bay k8644 durant 24 hores (grup LPS+IFN γ + Bay k8644).
- f) Cèl·lules activades amb 0,1 μ g/mL de LPS i 0,5 ng/mL de IFN γ durant 48 hores i post-tractades amb 25 μ M de Nim durant 24 hores (grup LPS+IFN γ + Bay k8644).

La nifedipina (Nif) és una dihidropiridina que funciona com a inhibidor específic del CCDV tipus L. El Bay k8644 és un compost químic que funciona com a agonista dels CCDV. Per alguns experiments també es va fer un grup de cèl·lules activades i tractades amb nimodipina (Nim) 25 μ M, una dihidropiridina que funciona com a inhibidor específic del CCDV tipus L. Es van realitzar 5 experiments independents per grup (N = 5). Per a saber si les cèl·lules BV-2 expressen el CCDV tipus L vam analitzar la expressió de les subunitats α_{1C} i α_{1D} del CCDV tipus L per RT-PCR del total del RNA extret. Per a estudiar la presència de la proteïna de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV-2 es va realitzar un experiment de *Western Blot* amb extracte de membrana microglial i vam realitzar experiments de immunocitoquímica de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV-2. Els moviments de calci intracel·lular es van estudiar pel mètode de mesura de l'increment de calci lliure intracel·lular $[Ca^{2+}]_i$ per la despolarització amb KCl 80 mM

mitjançant incubació de les cèl·lules amb Fura-2. Per estudiar l'activitat inflamatòria de les cèl·lules BV2 es va quantificar la producció de NO pel mètode de Griess i la secreció de TNF α per ELISA. Finalment, vam estudiar si la Nif modificava la capacitat fagocítica de la micròglia.

Per estudiar l'expressió del CCDV tipus L a la micròglia *in vivo* es van utilitzar 3 rates lesionades amb NMDA 40 mM sacrificades a 15 dies post-lesió. Per tal de determinar si la micròglia a l'hipocamp lesionat presenta expressió del CCDV tipus L, vam realitzar experiments de doble immunohistoquímica amb la subunitat α_{1C} del CCDV i el marcador microglial IB4 ó el marcador astroglial GFAP, i vam fer un estudi de colocalització on obteníem un mapa de la desviació mitjana de producte (MDP ó *Mean Product Deviation*), que ens mostra en groc els punts que colocalitzen sobre un pla; un mapa de dispersió de punts ens mostra la relació entre les dues variables (marcatge verd i marcatge vermell) i ens mostra les coincidències en groc a la diagonal; i mesuràvem el coeficient de correlació de Pearson, que és un índex que mesura la relació lineal entre dues variables quantitatives, de manera que si és positiu hi ha colocalització entre els dos canals. Els estudis de colocalització els hem fet d'acord al descrit per Jaskolski (2005). La estadística que es va fer servir als experiments de mesura de densitometria del *Western-Blot*, la mesura del nombre de cèl·lules que responen a la despolarització amb KCl 80 mM, la mesura de la concentració de nitrits, de TNF α i de la viabilitat cel·lular i la mesura de la capacitat fagocítica de la micròglia va ser la ANOVA unidireccional (One-Way ANOVA) seguida del test LSD. La estadística que es va fer servir per a els estudis de moviment de la $[Ca^{2+}]_i$ va ser la ANOVA unidireccional seguida del test de Mann-Whitney.

4.5.1. Les cèl·lules BV2 expressen el CCDV tipus L

Per a estudiar les funcions del CCDV tipus L a les cèl·lules microglial *in vitro*, primer vam analitzar la de les subunitats α_{1C} i α_{1D} del CCDV tipus L per RT-PCR del total del RNA extret de tres cultius diferents de cèl·lules BV2 control i LI. Vam examinar la expressió del CCDV tipus L. Els productes de PCR per a α_{1C} i α_{1D} trobats a la preparació de mRNA eren comparables a els obtinguts de les preparacions de RNA de tot el cervell usats com a control positiu (Figura 4.23A i B).

La presència de la proteïna de la subunitat α_{1C} a les cèl·lules BV-2 es va estudiar per *Western Blot* amb extracte de membrana microglial aïllat de tres cultius diferents de cèl·lules BV2. Es va observar una senyal positiva a 240 KDa (Figura 4.23C), indicant la presència del CCDV tipus L a la membrana microglial. Comparat amb les cèl·lules control, la quantificació de la densitometria evidencia un increment significatiu del $63 \pm 7\%$ ($n = 5$ cultius diferents, $p = 0,0072$). L'expressió de la proteïna α_{1C} a les cèl·lules LI. La immunofluorescència localitzava α_{1C} a les cèl·lules BV2 i complementava els resultats del *Western Blot* i la PCR (Figura 4.23D – F). Es va localitzar clarament una immunoreactivitat de α_{1C} específica a la membrana plasmàtica i als processos de membrana característics de les cèl·lules LI (Figura 4.23F), mentre que a les cèl·lules control presentaven un marcatge feble similar al fons (Figura 4.23F).

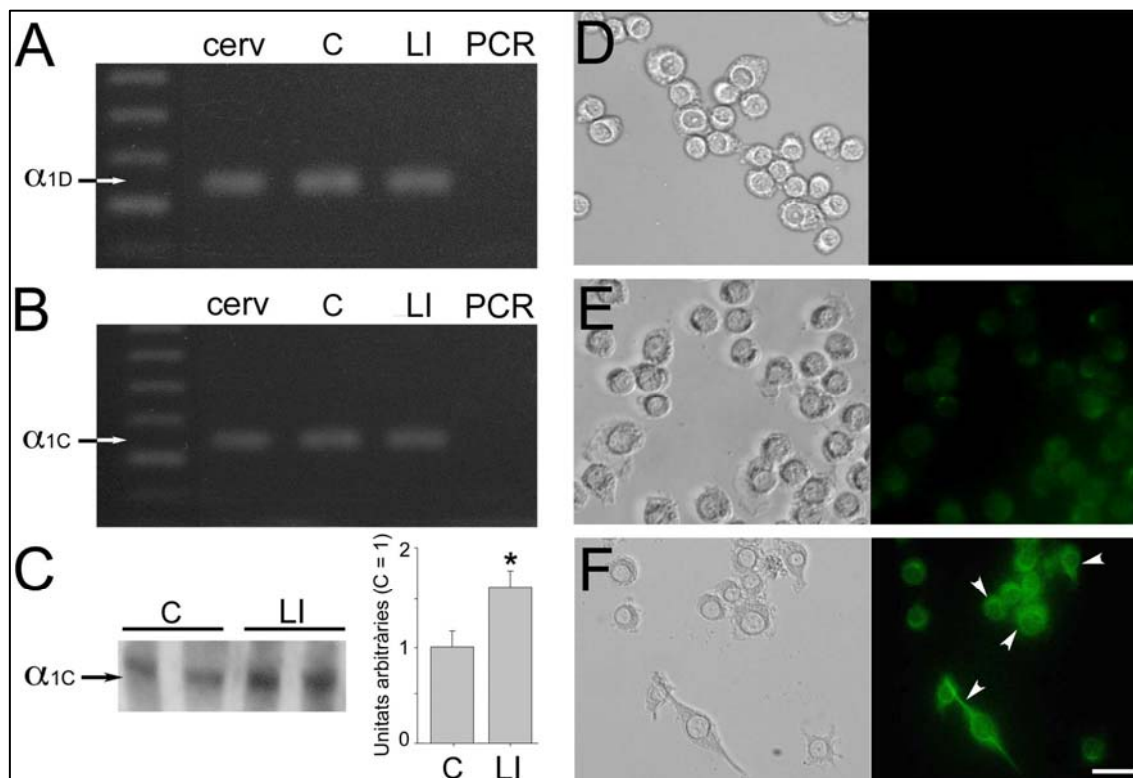


Figura 4.23: Expressió microglial de les subunitats α_{1C} i α_{1D} del CCDV tipus L. Les (A) i (B) mostren les RT PCR de les subunitats de canal. (C) mostra el western blot de la subunitat α_{1C} i la seva quantificació ($n = 4$ experiments/grup, * $p < 0.05$ respecte C, LSD Post-hoc). (D)-(F) mostren les immunocitoquímiques de la subunitats α_{1C} , essent (D) un control negatiu, (E) cèl·lules control i (F) cèl·lules activades amb LPS i IFN γ . C: Cèl·lules control. LI: Cèl·lules activades amb LPS i IFN γ . Cerv: mRNA de cervell de ratolí, utilitzat com a control positiu. PCR: Control negatiu de PCR, utilitzant mRNA de cèl·lules HEK293. Barra de l'escala: 20 μ m.

4.5.2. Fàrmacs específics del CCDV tipus L modifiquen l'increment de calci intracel·lular induït per KCl a les cèl·lules BV-2

L'aplicació de altes concentracions de potassi a un medi de cultiu és un mètode que clàssicament s'ha utilitzat per a despolaritzar les membranes cel·lulars i activar els canals activats per voltatge (Reynolds and Dubyak, 1985).

Per a determinar si hi ha una entrada de calci dependent de CCDV vam carregar les cèl·lules BV-2 amb un fluoròfor, el Fura-2, que reacciona amb el calci citosòlic lliure ($[Ca^{2+}]_i$). Com a inhibidor específic del canal vam utilitzar Nif 10 μ M i com a activador específic el Bay k8644 (Figura 4.24A i B).

A les cèl·lules control, el basal del quocient F_{340}/F_{380} era $0,223 \pm 0,008$ i no es van observar oscil·lacions de calci intracel·lular espontànies en aquestes condicions. La addició de Nif 10 μ M ó de Bay k8644 10 μ M no modificava aquest quocient (Els valors de F_{340}/F_{380} eren $0,203 \pm 0,01$ i $0,236 \pm 0,02$ respectivament; $p = 0,175$) i no es van observar oscil·lacions de calci intracel·lular espontànies en aquestes condicions. La addició de KCl 80 mM al medi va augmentar la $[Ca^{2+}]_i$ a un quocient F_{340}/F_{380} de $0,298 \pm 0,03$ al 42% de les cèl·lules control (45 de 107, de 3 assaigs diferents) (Figura 4.24C i D). En aquestes cèl·lules que responen, la amplitud mitjana de la resposta va incrementar el quocient F_{340}/F_{380} un 28,2% respecte els nivells basals (Figura 4.24E), amb una durada mitja de 180 segons. La tinció amb *Trypan blue* va mostrar que la viabilitat cel·lular no es trobava compromesa per la resposta del calci a altes concentracions de potassi. La Nif 10 μ M va disminuir el quocient F_{340}/F_{380} de fins a uns nivells mitjos de $0,298 \pm 0,03$ al 42% de les cèl·lules control que responien al KCl. La addició de Bay k8644 no va modificar el quocient però si va incrementar el percentatge de cèl·lules que responen fins a un 52,5% ($p = 0,0016$, Figura 4.24C i D). Ambdós fàrmacs van modificar l'increment de la amplitud mitjana de la $[Ca^{2+}]_i$ a les cèl·lules que responien. En presència de Nim, l'increment del quocient F_{340}/F_{380} induït per KCl va incrementar un 23% respecte els nivells basals, mentre que en presència de Bay k8644 el quocient va augmentar un 37% respecte els nivells basals ($p = 0,0136$, Figura 4.24E).

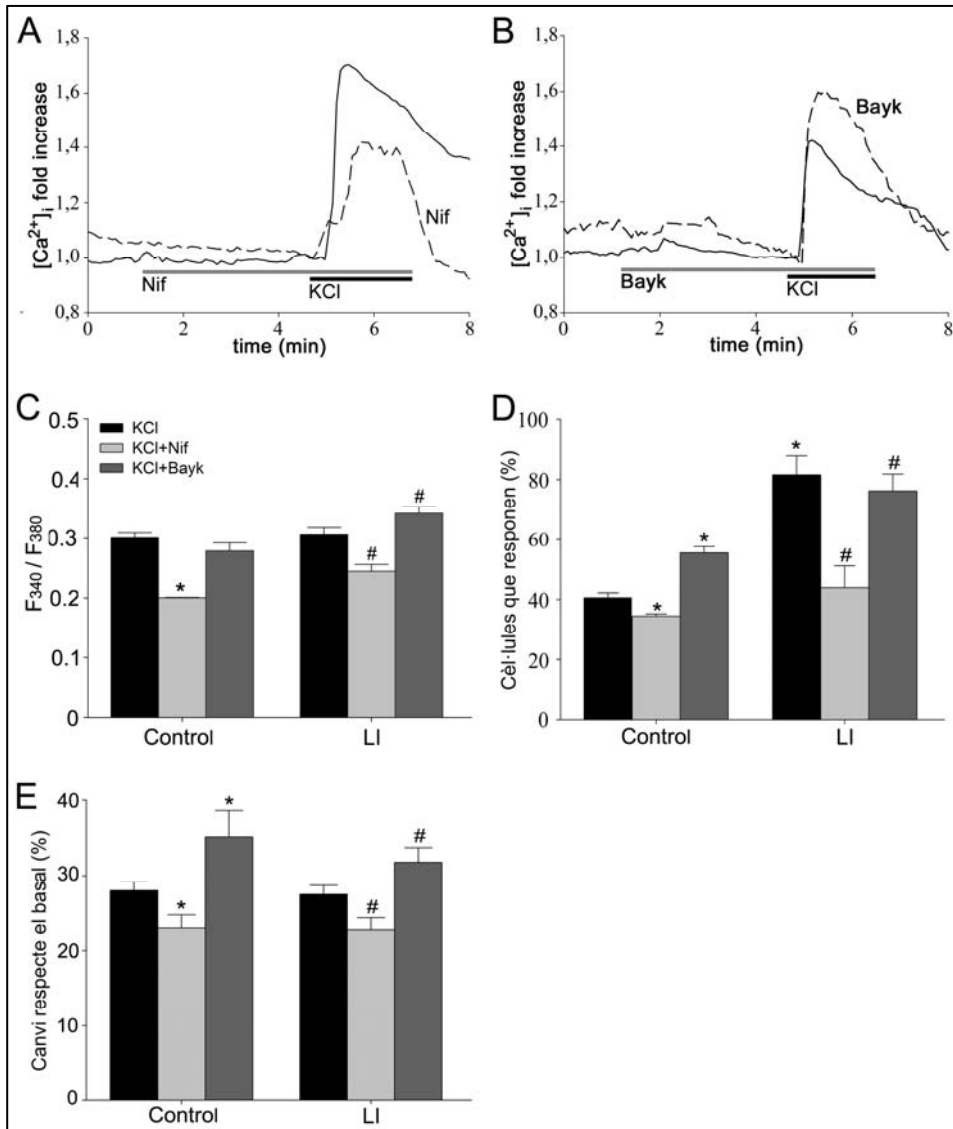


Figura 4.24: Efectes de la modulació farmacològica del CCDV tipus L en la permeabilitat intracel·lular del calci a cèl·lules BV2. (A) – (B): Representació il·lustrativa de la cinètica de la $[Ca^{2+}]_i$ en una sola cèl·lula BV2 activada abans i després de 2 minuts de despolarització amb KCl 80 mM (barra negra). (A): La addició al bany de Nif 10 μ M durant 3 minuts (barra gris) va reduir significativament l'increment de la $[Ca^{2+}]_i$ induïda per KCl 80 mM (línia discontinua vs línia contínua). (B): La addició al bany de Bay k8644 10 μ M durant 3 minuts (BayK, barra gris) va augmentar l'increment de la $[Ca^{2+}]_i$ induïda per KCl 80 mM (línia discontinua vs línia contínua). (C) L'histograma mostra els quocients de fluorescències a 340 i a 380 nm com a una estimació dels canvis en la $[Ca^{2+}]_i$ induïda per la addició de KCl 80 mM a cèl·lules control i LI carregades amb Fura-2. L'efecte sobre el CCDV tipus L en els canvis de la $[Ca^{2+}]_i$ va ser avaluat per l'addició tant de Nif 10 μ M (Nif) com de Bay k8644 10 μ M (Bayk). $n = 154$ cèl·lules al control (70 per a KCl, 46 per a KCl + Nif (les dues de 7 experiments diferents) i 38 per a KCl + Bayk (de 3 experiments diferents)) i $n = 280$ cèl·lules al LI (151 per a KCl, 83 per a KCl + Nif (les dues de 7 experiments diferents) i 46 per a KCl + Bayk (de 3 experiments diferents), * $p < 0.05$ respecte KCl, # $p < 0.05$ respecte Nif, Test de Mann-Whitney). (D): L'histograma mostra el percentatge de cèl·lules que responen a KCl 80 mM a cèl·lules control i LI a les sis condicions ($n = 4 - 8$ experiments/grup, * $p < 0.05$ respecte KCl al control, # $p < 0.05$ respecte KCl a LI, LSD Post-hoc). (E) L'histograma mostra el percentatge dels canvis en la $[Ca^{2+}]_i$ induïda per la addició de KCl 80 mM trobats a les cèl·lules que responen a les sis condicions estudiades (* $p < 0.05$ respecte KCl, # $p < 0.05$ respecte Nif, Test de Mann-Whitney).

A les cèl·lules LI, el basal del quocient F_{340}/F_{380} era $0,221 \pm 0,03$. La addició de Nif $10 \mu\text{M}$ ó de Bay k8644 $10 \mu\text{M}$ no modificava aquest quocient (Els valors de F_{340}/F_{380} eren $0,216 \pm 0,03$ i $0,246 \pm 0,04$ respectivament; $p = 0,535$). La addició de KCl 80 mM al medi va augmentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a un quocient F_{340}/F_{380} de $0,307 \pm 0,03$ al 81% de les cèl·lules LI (165 de 204, de 7 assaigs diferents) (Figura 4.24C i D). En aquestes cèl·lules que responen, la amplitud mitjana de la resposta va incrementar el quocient F_{340}/F_{380} un 27,8% respecte els nivells basals (Figura 4.24E), amb una durada mitja de 180 segons. La Nif $10 \mu\text{M}$ va disminuir la resposta de les cèl·lules KCl de manera significativa (Figura 4.24C i D). Només van respondre el 42% de les cèl·lules (109 de 261, de 7 assaigs diferents) i el quocient F_{340}/F_{380} va caure fins a uns nivells mitjos de $0,25 \pm 0,03$ (Figura 4.24C, $p = 0,00001$), que corresponia a un increment del 27,8% dels nivells basals a les cèl·lules que responien. La Nif també va canviar el temps en què s'arriba a la màxima concentració de calci (temps de pic) de $31,4 \pm 3,34$ a $63,1 \pm 2,29$ segons ($p < 0,05$), mentre que la durada de l'increment de la concentració de calci intracel·lular es manté pràcticament no alterada (Figura 4.24A). La addició de Bay k8644 va incrementar significativament la resposta de les cèl·lules LI al KCl 80 mM (figura 4.24C – E). En presència de Bay k8644, el 78,8% de les cèl·lules van mostrar un major increment en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ degut al KCl amb un quocient F_{340}/F_{380} de $0,351 \pm 0,04$, que corresponia a un increment del 31,3% respecte els nivells basals (64 cèl·lules de 81, de 3 assaigs diferents, $p = 0,032$). El bay k8644 també va incrementar el temps de pic de la resposta en $63,1 \pm 2,29$ segons ($p < 0,05$), mentre que la durada de l'increment de la concentració de calci intracel·lular es manté pràcticament no alterada (Figura 4.24B).

4.5.3. El bloqueig del CCDV tipus L disminueix la resposta pro-inflamatòria però no modifica la capacitat fagocítica de cèl·lules BV-2

Per a investigar el paper del CCDV tipus L en el control de la resposta pro-inflamatòria microglial, les cèl·lules, tant activades com sense activar, es van incubar amb Nif $10 \mu\text{M}$, nimodipina $25 \mu\text{M}$ ó Bay k8644 $10 \mu\text{M}$ 24 hores després de l'activació, i es va determinar la producció de NO i $\text{TNF}\alpha$.

Comparat amb la microglia control, la incubació amb LPS+ $\text{IFN}\gamma$ augmentava en 6 cops la concentració de NO i en 5 cops la concentració de $\text{TNF}\alpha$ (Figura 4.25).

El tractament de la micròglia activada amb Nif 10 μM reduïa les concentracions extracel·lulars de nitrits (40% de reducció, $p = 0,0009$) i de $\text{TNF}\alpha$ (44% de reducció, $p = 0,0261$). El tractament de la micròglia activada amb nimodipina 25 μM reduïa les concentracions extracel·lulars de nitrits (75% de reducció, $p = 0,039$) i de $\text{TNF}\alpha$ (51% de reducció, $p = 0,0003$). El Bay k8644, no afectava a les cèl·lules BV-2, ni en la producció de NO i $\text{TNF}\alpha$ ($p = 0,4926$ per al NO i $p = 0,2200$ per al $\text{TNF}\alpha$), ni variava de forma significativa la viabilitat cel·lular (Figura 4.26). El Bay k8644 no modificava significativament les concentracions extracel·lulars de NO i $\text{TNF}\alpha$ (Figura 4.25).

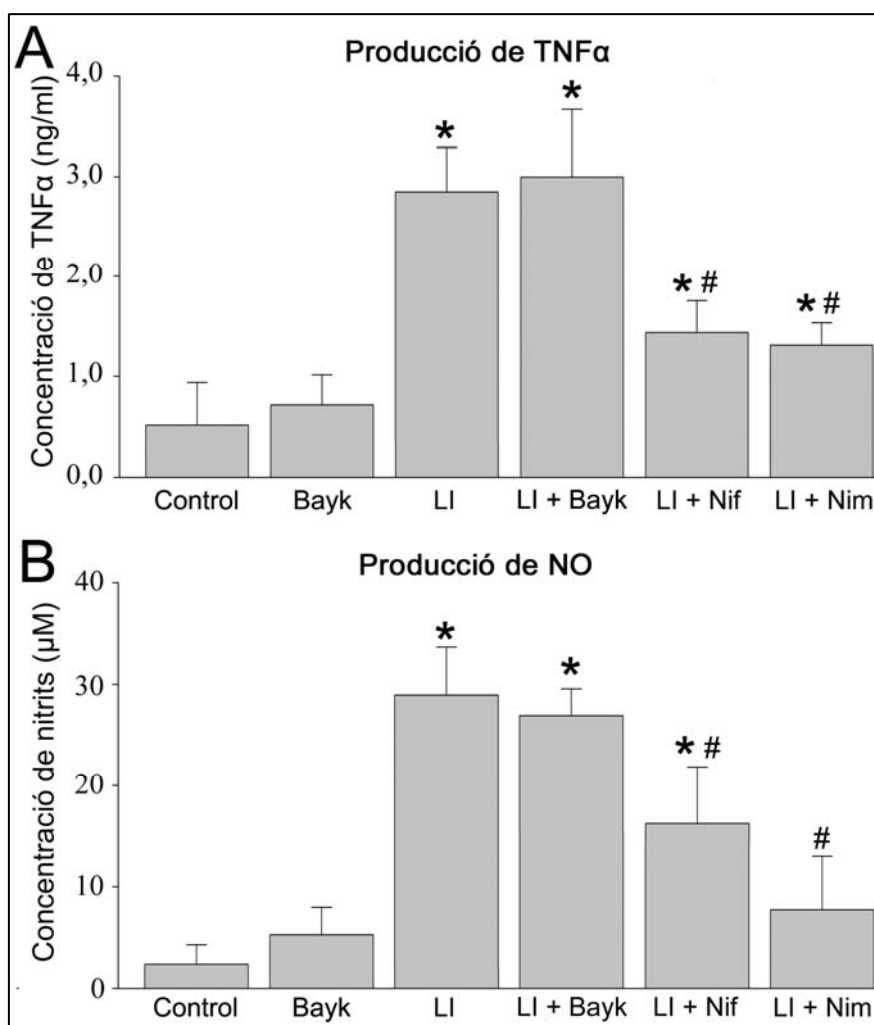


Figura 4.25: Efectes de la modulació farmacològica del CCDV tipus 1 sobre la resposta pro-inflamatòria de la micròglia BV2. Els histogrames mostren l'alliberament de $\text{TNF}\alpha$ (A) i NO (B) de cèl·lules control i LI, mesurats 48 hores després de l'activació, i post-tractades amb Bay k8644 10 μM (Bayk, $n = 3$ cultius diferents), Nif 10 μM (Nif, $n = 7$ cultius diferents) ó Nim 25 μM (Nim, $n = 3$ cultius diferents) durant 24 hores. La producció de NO es va quantificar pel mètode de Griess i l'alliberament de $\text{TNF}\alpha$ es va quantificar per ELISA (* $p < 0,05$ respecte control, # $p < 0,05$ respecte LI, LSD Post-hoc).

Seguidament vam investigar el paper del tipus L sobre el control de la capacitat fagocítica a les cèl·lules BV-2 (Figura 4.26A-I). L'anàlisi es va fer 48 hores després de la activació amb LPS+IFN γ i 30 minuts després de la incubació amb les fluoroesferes. La activació de la micròglia amb LPS+IFN γ incrementava el percentatge de cèl·lules que presentaven fluoroesferes al citoplasma ($p = 0,0001$) a més del nombre de fluoroesferes per cèl·lula ($p = 0.0022$). El tractament amb Nif 10 μ M no tenia efecte sobre aquesta capacitat fagocítica (Figura 4.26J – K).

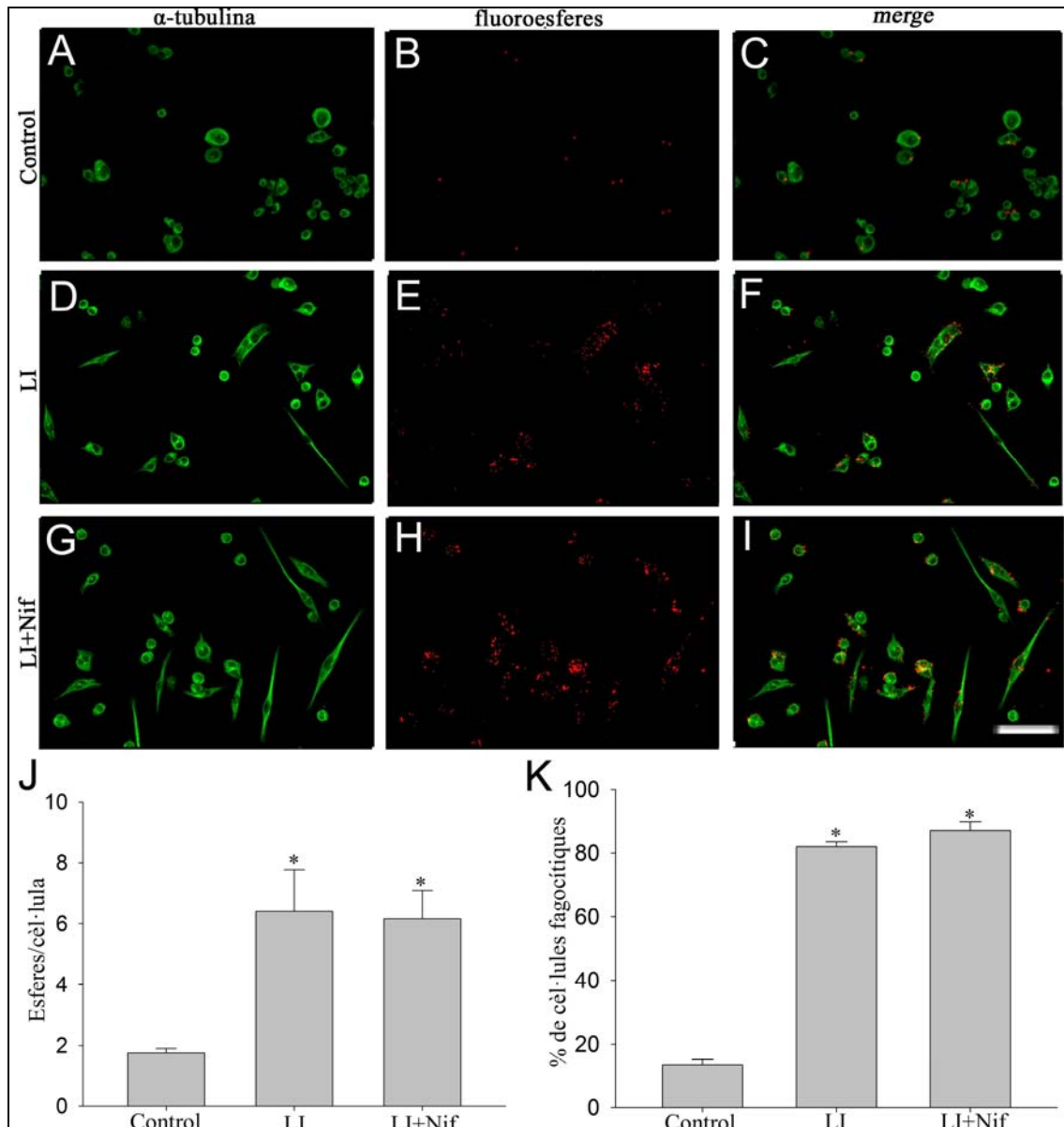


Figura 4.26: La Nif no modifica la capacitat fagocítica de la micròglia BV2 reactiva. La capacitat fagocítica de les cèl·lules BV2 es va estudiar 48 hores després de la activació amb LPS+IFN γ i post-tractades amb Nif 10 μ M. (A) – (I): Microfotografies il·lustratives dels efectes de la Nif sobre la fagocitosis de fluoroesferes (vermell) per part de les cèl·lules BV2 (verd). Els gràfics mostren la quantificació de la capacitat fagocítica de les cèl·lules BV2 mesurat usant l'assaig de fluoroesferes (veure materials i mètodes per detalls). Els paràmetres fagocítics estimats van ser el nombre d'esferes per cèl·lula (J) i el percentatge de cèl·lules fagocítiques (K) (n = 4 cultius diferents, * p < 0.05 respecte les cèl·lules control, LSD Post-hoc). Barra de l'escala 10 μ m.

4.5.4. La microglia reactiva expressa el CCDV tipus L a l'hipocamp lesionat amb NMDA

Com ja hem descrit al seu apartat, davant una lesió amb 20 nmols de NMDA hi ha un procés neurodegeneratiu que a 15 dies post-lesió es caracteritza per una mort neuronal massiva i una reacció glial. A les rates Sham, la immunohistoquímica amb l'anticòs anti α_{1C} de rata va marcar les capes piramidals CA1 a CA3 de l'hipocamp i a la SGZ del DG. La immunoreactivitat específica a α_{1C} era també evident en les dendrites del *stratum radiatum* i, menys densament, al *stratum lacunosum moleculare* de la CA1 (Figura 4.27A). La intensa pèrdua neuronal i desorganització de les capes induïdes per la microinjecció de NMDA va modificar la distribució del marcatge hipocampal amb una reducció a les capes piramidals CA1 i granular del DG, la qual desapareix quasi per complet al *stratum radiatum* de la CA1 (Figura 4.27B). Tot i així, un marcatge no neuronal de α_{1C} de rata es va observar homogeniament distribuït a totes les capes hipocampals lesionades.

L'anàlisi confocal de la doble immunohistoquímica amb anticossos contra α_{1C} de rata i contra GFAP no donava resultats conclouents d'una expressió astrocitària de α_{1C} (Figura 4.27C-H), amb un coeficient de correlació de Pearson negatiu segons l'anàlisi de la imatge MDP (Figura 2.27G i H).

La microscòpia confocal i l'anàlisi de les imatges de la doble histoquímica amb l'anticòs contra α_{1C} de rata i IB4 van revelar una expressió clara del CCDV tipus L a la majoria de la micròglia ameboide reactiva de la formació hipocampal (Figura 4.28G – L). Una anàlisi de la imatge més acurada va revelar el marcatge específic de l'anticòs contra α_{1C} localitzat al citoplasma i a la membrana plasmàtica del $36 \pm 8\%$ de les cèl·lules IB4 positives (Figura 4.28I). El coeficient de Pearson, obtingut a partir de la imatge MDP fou 0,43 (Figura 4.28J – L).

Hi ha marcatge per a α_{1C} que no colocalitza ni amb GFAP ni amb IB4 a algunes cèl·lules de l'hipocamp lesionat. No es va trobar colocalització entre el marcatge amb l'anticòs contra α_{1C} i el marcatge amb IB4 als hipocamps de les rates Sham (Coeficient de Pearson 0,065, Figura 4.28A-F).

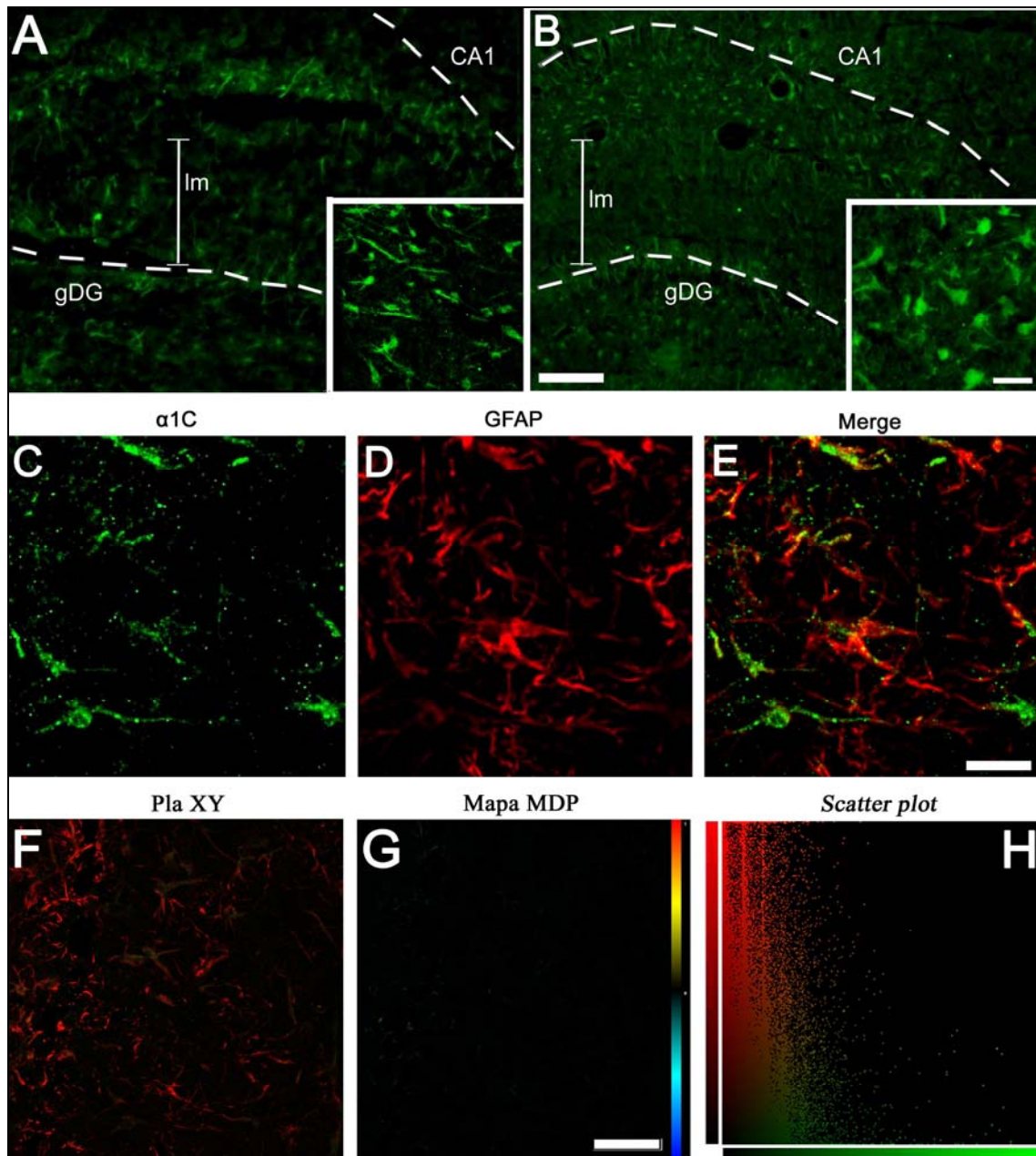


Figura 4.27: La immunolocalització de la subunitat α_{1C} del CCDV a l'hipocamp de les rates lesionades amb NMDA no colocalitza amb el marcatge amb GFAP. (A): Es va observar immunoreactivitat neuronal específica per a α_{1C} a rates Sham (fletxes), amb un marcatge clar als processos neuronals al *stratum radiatum* de la CA1. (B): Es va observar també una immunoreactivitat no neuronal específica per a α_{1C} a rates NMDA (fletxes), la qual era evident a la capa *stratum radiatum* de la CA1. Les línies discontinües delimiten les àrees hipocampals. gDG: Capa granular del gir dentat. Lm: *lacunosum moleculare*. (C) – (E): Imatges apilades de la doble immunohistoquímica de α_{1C} (verd) i GFAP (vermell). La superposició de dues imatges en un pla confocal XY (F) ens dóna una mapa MDP (G) de la imatge que mostra la colocalització dels canals del verd i el vermell i un mapa de dispersió de punts de la imatge (H) que mostra a l'eix d'ordenades, d'esquerra a dreta, l'increment d'intensitat del canal verd 46/46 mentre que, de baix a dalt, l'eix d'abcisses correspon amb l'augment d'intensitat del canal vermell. L'absència de punts grossos a (G) i (H) denota manca de colocalització per ambdós canals, per tant les cèl·lules GFAP positives no expressen α_{1C} . Barres de l'escala: 500 μm per (A) i (B), 40 μm per (C) – (E) i 10 μm per (F) i (G).

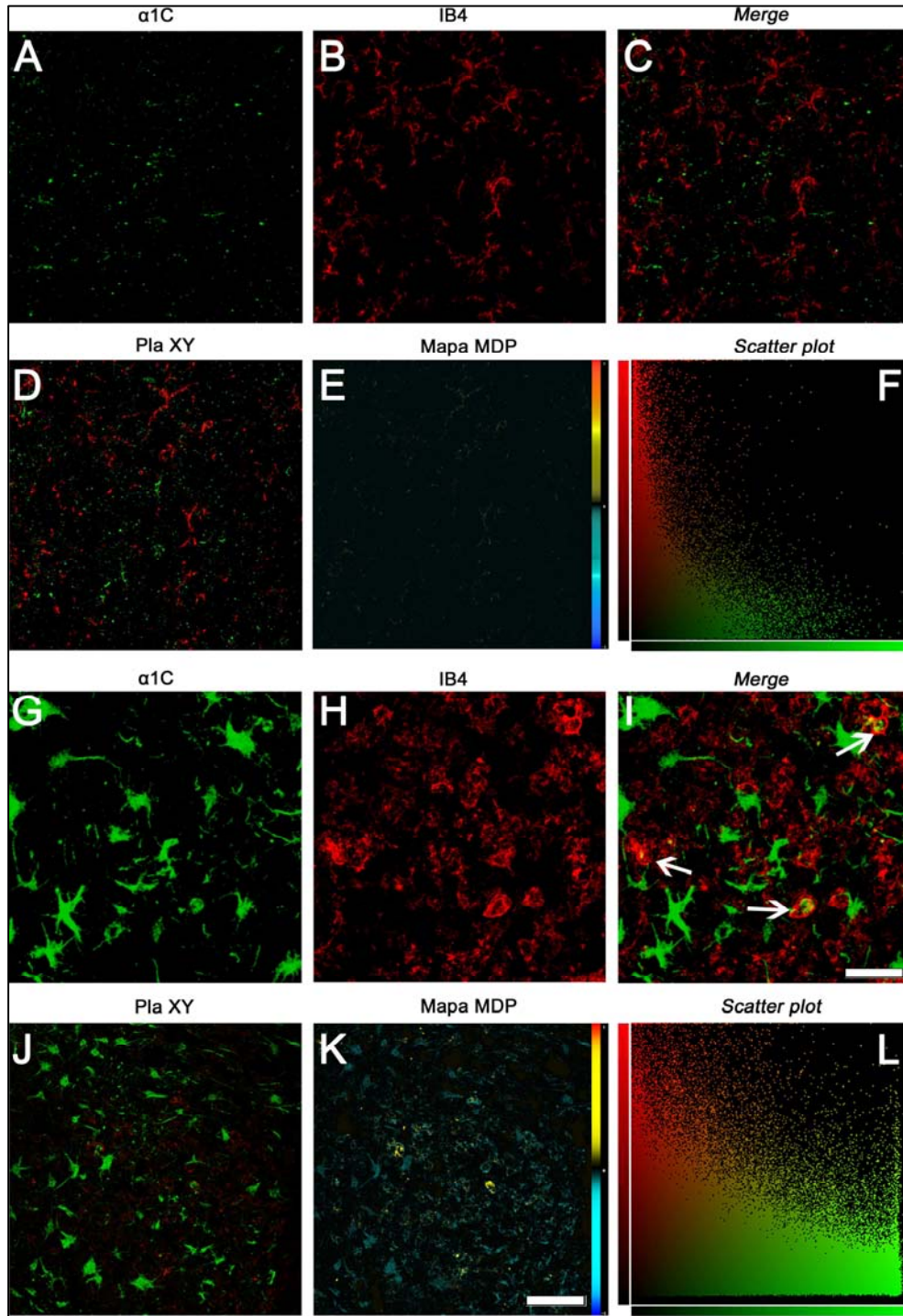


Figura 4.28: Expressió de la subunitat α_{1C} a cèl·lules positives per IB4 a l'hipocamp de les rates NMDA. (A) – (C): Imatges apilades de la doble immunohistoquímica de α_{1C} (verd) i IB4 (vermell) a l'hipocamp de les rates Sham. La manca de píxels vermells a la imatge del XY (D), el mapa MDP (E) i el mapa de dispersió de punts (F) de la imatge denota absència de colocalització a cèl·lules IB4 positives de les rates Sham. (G) – (I): Imatges apilades de la doble immunohistoquímica de α_{1C} (verd) i IB4 (vermell) a l'hipocamp de les rates NMDA. La presència de punts grossos a (J), (K) i (L) denoten la presència de colocalització dels dos canals, on les cèl·lules IB4 positives expressen α_{1C} . Barres de l'escala: 40 μm per (A) – (E) i (J) – (K), i 10 μm per (G) – (I).

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

5.1. LA REACCIÓ MICROGLIAL A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL

La lesió excitotòxica al cervell dels rosegadors és un model clàssic d'estudi alguns dels mecanismes moleculars implicats en els processos neurodegeneratius (Mahy *et al.* 1995, 1999; Bernal *et al.*, 2000) La injecció intracerebral d'agonistes dels receptors de glutamat indueix una lesió que cobreix una zona concreta del cervell on es pot estudiar la naturalesa de la mort neuronal induïda i la reacció inflamatòria que l'acompanya entre d'altres paràmetres bioquímics i tissulars (Mahy *et al.*, 1995; Ramonet *et al.*, 2004a; Rodríguez *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2009).

La toxicitat induïda per NMDA ve mediada principalment per la mobilització de calci lliure citosòlic, que desencadena un procés excitotòxic que s'expandeix amb una massiva pèrdua neuronal i reacció inflamatòria (Robledo *et al.* 1999, Bernal *et al.* 2000). El procés excitotòxic agut es pensa que és sota control pels mecanismes de compensació dins dels 15 dies post-lesió (Sapolsky, 2001). No obstant això, un procés subjacent perdura a llarg termini amb una atròfia tissular progressiva, la pèrdua neuronal i microgliosi crònica, de vegades associada a una reacció astrogliol (Rodríguez *et al.*, 2009, Bernal *et al.*, 2006, Ramonet *et al.*, 2004). Aquesta inflamació dura almenys 38 dies i els seus beneficis poden ser substancials. Quan el procés progressa, la persistent activitat proinflamatòria glial es torna crònica i no controlada i pot conduir directament a la lesió o la mort de les neurones (Andrés *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2012). Això suggereix que les intervencions que promouen la regeneració del teixit danyat dies o setmanes després d'una lesió aguda del SNC haurien d'incloure el tractament de l'excitotoxicitat i el control de les vies neuroinflamatòries.

L'evolució en el temps de la lesió induïda pel NMDA observada en aquest estudi reproduceix globalment resultats previs del grup (Ramonet *et al.*, 2004a; Rodríguez *et al.*, 2009; Batlle *et al.*, 2010). Amb una fase aguda de lesió que s'estén per 5 dies, en els quals ocorren tots els processos de mort neuronal deguda a l'excitotoxicitat pel NMDA. A partir d'aquests 5 primers dies, l'àrea de lesió i la pèrdua neuronal progressen més lentament acompanyades d'un increment també més suau de l'àrea de reacció astrogliol i microglial. El patró temporal de la reacció glial observada coincidia amb les dades ja existents sobre la gliosi reactiva després d'una lesió excitotòxica, amb una proliferació i

reacció astrocitària primerenca al llarg de l'àrea de lesió persistent durant setmanes. Pel que sembla, aquesta astrogliosi reactiva a l'àrea de neurodegeneració primària contribueix a prevenir el dany neuronal secundari al teixit encara intacte (Hailer *et al.*, 2001; Sofroniew, 2005).

Els experiments de qPCR sobre diferents marcadors de lesió mostren aquesta tendència, doncs hem trobat un augment dels nivells de NF-H als 5 dies post-lesió. S'ha demostrat que la lesió excitotòxica amb AMPA i NMDA modifica el metabolisme de NF-H, i indueix l'agregació d'aquests neurofilaments fent les neurones més sensibles al dany (Sanelli *et al.*, 2007).

La proteïna S100 β és una proteïna d'unió a calci específica dels astròcits, especialment abundant al citosol (Donato, 1999). És alliberada pels astròcits com un factor neurotròfic ó tòxic depenent de la seva concentració. La lesió excitotòxica fa augmentar els nivells extracel·lulars de glutamat al llarg del temps, cosa que pot ser un factor per a la inhibició de la secreció de S100 β (Donato *et al.*, 2009). Aquesta inhibició de la producció de S100 β podria contribuir a la baixada de la reactivitat microglial, ja que s'ha discutit que la interacció de S100 β amb el seu receptor RAGE microglial podria estar involucrada en el control de l'estat microglial als processos de neuroinflamació (Bialowas-McGoey *et al.*, 2008).

Els nostres resultats en la histoquímica de IB4 evidenciaven una activació microglial primerenca que persistia fins a almenys 38 dies. Resultats previs del grup van trobar en aquest model que el fenotip microglial presentava una activitat neuroprotectora durant els 5 primers dies després de la lesió, amb una evolució cap a una activitat neurotòxica i pro-inflamatòria que progressa amb el temps (Batlle, 2009; Batlle *et al.*, 2013). Aquests resultats conclouen que l'excitotoxicitat induïda per NMDA indueix una microgliosi crònica amb una activitat neuroprotectora primerenca que precedeix a una activitat citotòxica tardana. Aquest model revela una reacció astrogliol que actua com a un modulador clau de la transició microglial cap a un fenotip citotòxic.

Per tant, atenent a aquesta evolució, el model de lesió excitotòxica a l'hipocamp de la rata és constitueix en una aproximació vàlida per analitzar els efectes d'una inhibició de l'activitat microglial a llarg termini en la progressió dels processos neurodegeneratius.

5.2. EL CANAL K_{ATP} COM A MODULADOR DE L'ACTIVITAT MICROGLIAL

En aquest estudi i altres del nostre laboratori hem descrit l'expressió dels canals de K_{ATP} en la micròglia (Ramonet *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2012a), que controlen l'alliberament d'una diversitat de mediadors inflamatoris, com ara el NO, l'interleucina-6, ó el TNF α (Virgili *et al.*, 2011) i altres vint quimiocines i citocines diferents. En aquesta tesi hem demostrat que la micròglia reactiva augmenta l'expressió dels components del canal K_{ATP} Kir6.1, Kir6.2, SUR1 i SUR2B in vitro i en un model d'excitotoxicitat a l'hipocamp de la rata..

Els nostres resultats demostren que aquesta expressió microglial es veu tant a la membrana plasmàtica com a nivell perinuclear, indicant que hi ha una possible expressió de mito K_{ATP} . Fa més de 20 anys es va proposar un possible canal mito K_{ATP} , diferent tant funcionalment com molecularment del de membrana plasmàtica (Inoue *et al.*, 1991). Inicialment, el mito K_{ATP} funcional es pensava que estava compost al cervell per les subunitats Kir6.1 ó Kir6.2 i SUR2B (Suzuki *et al.*, 1997; Bajgar *et al.*, 2001; Lacza *et al.*, 2003), però un estudi recent ha presentat evidències farmacològiques i de proteòmica del *kenj1* com una subunitat formadora del porus del mito K_{ATP} (Foster *et al.*, 2012). Aquesta composició diferent explicaria per què el mito K_{ATP} és sensible a diversos fàrmacs que no afecten al K_{ATP} de membrana plasmàtica (Hu *et al.*, 1999). Per tant, obridors específics del mito K_{ATP} serien la Dzx i el nicorandil, mentre que el 5-dihydroxidecanoat bloqueja específicament aquest canal (Garlid *et al.*, 1996; Iwai *et al.*, 2000, 2002; Peart and Gross, 2002; Morin *et al.*, 2009).

Donat que els canals regulats per SUR1 són sensitius als canvis en l'estat metabòlic de la cèl·lula, i que la micròglia es troba permanentment rebent senyals de l'ambient, l'expressió dels canals K_{ATP} a la micròglia activada acoblaria el potencial de membrana amb la disponibilitat energètica cel·lular, i la micròglia respondria amb l'adopció d'un fenotip específic per als senyals que l'envolten en funció d'aquesta disponibilitat. L'expressió d'aquest canal podria ser crítica en la determinació, si més no en part, de la participació de la micròglia en el procés patològic.

Altres estudis del grup en models d'isquèmia cerebral mostren que la micròglia de l'àrea peri-infartada, la més reactiva, expressa les subunitats Kir6.2, SUR1 i SUR2B (Ortega *et al.*, 2012). També a un model murí d'EAE s'ha descrit que micròglia no reactiva de la medul·la espinal presenta molt poc marcatge per les subunitats Kir6.1 i

Kir6.2 del canal, mentre que la micròglia més ameboide de la medul·la espinal d'aquests ratolins presenta un clar marcatge per a aquestes subunitats (Virgili *et al.*, 2011). Els nostres resultats de qPCR mostren que les dues subunitats formadores del porus, Kir6.1 i Kir6.2, i les dues subunitats reguladores estudiades, SUR1 i SUR2, es troben expressades a l'hipocamp de la rata amb un augment màxim de les subunitats Kir6.1 i SUR2 a dia 5 post-lesió. Un estudi de Thomzig i col·laboradors suggereix que, en general, al cervell de la rata, l'expressió neuronal de Kir6.2 és major que la de Kir6.1. A l'hipocamp en concret aquesta expressió de Kir6.1 és especialment baixa, amb la excepció de les neurones del DG (Thomzig *et al.*, 2005). A la micròglia en cultiu, tant en la línia BV2 com als cultius primaris de ratolí, s'ha descrit l'expressió de les subunitats Kir6.1 i SUR2, principalment (Zhou *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2012). Així, els nostres resultats de l'augment d'expressió hipocampal d'aquestes dues subunitats després de la lesió excitotòxica podrien reflectir la microgliosi associada. En aquest sentit apunten els resultats de co-localització immunohistoquímica i resultats previs on es va descriure l'expressió de SUR-1 i SUR-2 a la micròglia reactiva de l'hipocamp lesionat amb AMPA (Ramonet *et al.*, 2004), i un augment de l'expressió de Kir6.1 i Kir6.2 a l'hipocamp isquèmic (Yamada *et al.*, 2001).

El canal K_{ATP} pot participar en el control de la intensitat de l'activació microglial, cosa que pot oferir beneficis clínics potencials en la terapèutica de trastorns relacionats amb la inflamació als processos neurodegeneratius. Així l'activació farmacològica dels canals K_{ATP} pot exercir efectes neuroprotectors i anti-inflamatoris en el cervell contra l'isquèmia, els traumatismes i neurotoxines (Goodman and Mattson, 1996; Roseborough *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2011). En previs estudis s'ha descrit que la Dzx modula l'activació microglial induïda per rotenona i disminueix la producció de $TNF\alpha$ i prostaglandina E2 en cultius de microglia BV2 (Zhou *et al.*, 2008). La Dzx també inhibeix la producció in vitro de NO, $TNF\alpha$, interleucina-6, i l'expressió de l'iNOS. En aquest estudi hem demostrat que la incubació amb Dzx de les cèl·lules BV2 activades amb LPS i $IFN\gamma$ va disminuir de forma dràstica l'expressió de set gens que es trobaven augmentats en les cèl·lules activades comparant amb les no activades. Aquests gens es troben regulats sota l' $IFN\gamma$. A la micròglia, l' $IFN\gamma$ indueix l'expressió de moltes molècules del complex major d'histocompatibilitat tipus I i II, de molècules d'adhesió, i de receptors del complement entre d'altres; a més de la secreció de moltes citocines, com el $TNF\alpha$, el NO, i algunes interleucines (Hanisch, 2002). Sembla ser que aquests efectes anti-inflamatòris de la Dzx són específics ja que aquest fàrmac no

modifica la capacitat fagocítica de la micròglia. D'altres gens de la resposta pro-inflamatòria també es veien disminuïts, però ni de manera tan dràstica ni passant tots els tests estadístics de significança. Per tant, la Dzx promou una baixada general de l'expressió dels gens que modelen la capacitat pro-inflamatòria de la micròglia.

A la lesió excitotòxica hipocampal, la dosi de 1 mg/Kg/dia de Dzx limita la lesió hipocampal, preserva les capes neuronals de la mort i atenua la reacció microglial, alentint així el procés neurodegeneratiu hipocampal induït per NMDA. Una part important d'aquest efecte neuroprotector de la Dzx podria estar mediat per la seva activitat anti-inflamatòria microglial. Altres estudis *in vivo* han mostrat efectes neuroprotectors de la Dzx contra un model de lesió neuronal amb rotenona. En aquest model la Dzx va inhibir l'activació microglial i la neuroinflamació, sense afectar l'expressió de la ciclooxygenasa-2 i la fagocitosi (Zhou *et al.*, 2008). Quan es va assajar en un model murí d'EAE, la Dzx oral millorà els signes clínics d'EAE, però no prevenia la malaltia. En aquests ratolins es va trobar una reducció significativa en la pèrdua de mielina axonal i una disminució en l'activació glial i el dany neuronal medul·lars. En aquest model, la Dzx no va afectar el nombre d'infiltració de limfòcits positius per CD3 i CD20 en la medul·la espinal (Virgili *et al.*, 2011). Finalment ratolins 3xTgAD tractats amb Dzx durant 8 mesos van mostrar una millora en l'execució de la prova del laberint d'aigua de Morris, i una disminució de l'acumulació d'oligòmers d'A β i tau hiperfosforilada en l'escorça cerebral i l'hipocamp (Liu *et al.*, 2010). Altres estudis *in vivo* demostren que la Dzx exerceix un efecte anti-inflamatori important en lesions isquèmiques (Goodman and Mattson, 1996), mostrant una recuperació notable en la funció mitocondrial microglial, una reducció de la secreció dels paràmetres proinflamatoris i una reducció de l'àrea infartada (Roseborough *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 2011).

Tot i així tots els efectes *in vivo* de la Dzx no són mediats exclusivament a la micròglia, ja que altres tipus cel·lulars també expressen el canal K_{ATP} o algunes de les seves subunitats. Per exemple, s'ha demostrat que la Dzx facilita la recaptació de glutamat per part dels astròcits, contribuint així a disminuir l'excitotoxicitat (Sun *et al.*, 2008). La Dzx també té un efecte directe sobre les neurones hiperpolaritzant la membrana i reduint la seva hipersensibilitat a glutamat (Goodman and Mattson, 1996).

5.3. EFECTE DE LA DZX SOBRE LA NEUROGÈNESI ASSOCIADA A LA LESIÓ EXCITOTÒXICA HIPOCAMPAL

Un altre aspecte important dels processos neurodegeneratius que cal acabar de caracteritzar és el paper de la micròglia en el procés de neurogènesi adulta. Sobre tot en allò que representen el fenotip neuroprotector i la producció de molècules inflamatòries, sobre la neurogènesi associada als processos neurodegeneratius.

Són molts els estudis que relacionen l'excitotoxicitat amb un augment de la neurogènesi hipocampal i que proposen aquesta associació com una possible teràpia per les malalties neurodegeneratives (Hallbergson *et al.*, 2003; Lie *et al.*, 2004; Raivich, 2005; Schwab *et al.*, 2006; Wieloch and Nikolic, 2006). Resultats previs del grup van demostrar que el NMDA indueix la proliferació i maduració de noves neurones a la capa SGZ del DG, seguint un patró temporal (Batlle *et al.*, 2009). Aquests resultats previs van mostrar que neurones noves generades després de la lesió hipocampal migraven a les capes de l'hipocamp des de la zona subgranular, però mai acabaven d'integrar-se. Això reflecteix un intent d'autoreparació del teixit que no pot compensar el dany. Aquests resultats encaixen amb els resultats obtinguts en aquest estudi ja que a 38 dies post-lesió el nombre de cèl·lules BrdU positives és sensiblement inferior al nombre de cèl·lules que teníem inicialment PSA-NCAM positives. Hi ha varies teories per explicar per què aquest augment de la neurogènesi a temps primerencs després de la lesió excitotòxica és transitori. Una d'elles és: mentre que la disminució de la concentració dels neurotransmissors de manera inicial i els factors neurotròfics alliberats després de la lesió promouen aquesta neurogènesi (Wieloch & Nikolic 2006, Zhao et al. 2008), l'excitotoxicitat crònica genera l'alliberació de glucocorticoides, que inhibeixen la neurogènesi associada a la lesió (Mirescu & Gould 2006). Una altra possibilitat seria que les noves neurones no madurin correctament i acabin donant a lloc a circuits aberrants que afectin negativament el funcionament hipocampal per la qual cosa són eliminades (Parent, 2007).

La proteïna Sp8 és un factor de transcripció que no expressen les neurones hipocampals (Li *et al.*, 2011). Tot i així, nosaltres hem trobat l'expressió d'aquest marcador a l'hipocamp lesionat. Per tant, hi ha d'haver una migració des de zones exteriors a l'hipocamp. La zona subventricular (SVZ) és un nínxol neurogènic, que genera neuroblasts provinents de cèl·lules mare després d'una lesió, com una isquèmia cerebral,

un traumatisme, o altres tipus de lesió, i els envia a les zones afectades, generant el tipus cel·lular pertinent.

Els neuroblasts de la ZSV expressen Sp8, necessari per a la seva diferenciació a neurones positives per la palvalbúmina al bulb olfatori (Li *et al.*, 2011) i el continuen expressant al seu destí inclús quan estan fora del seu nínxol (Wei *et al.*, 2011). Aquest i altres exemples (Young *et al.*, 2007) mostren que aquestes cèl·lules poden acabar expressant calretinina, i que retenen la expressió de Sp8. La calretinina és una proteïna fixadora de calci i es troba expressada en totes les cèl·lules derivades de la via migratòria rostral, les quals generaran, són totes elles, neurones GABAèrgiques (Deiner and Sretavan, 1999). Al nostre estudi, la doble immunohistoquímica amb NeuN mostra que no hi ha cap colocalització de Sp8 amb NeuN a l'hipocamp, però sí una total colocalització amb GFAP. De fet, s'ha arribat trobar que, durant el desenvolupament, els astròcits expressen calretinina (Bastianelli and Pochet 1995, Redecker *et al.*, 1996). És possible que aquestes cèl·lules positives per la GFAP i la Sp8 siguin neuroblasts provinents de la via migratòria rostral que encara estan en fase de diferenciació, o bé astròcits que expressen Sp8. D'altra banda, les neurones que expressen calretinina són un tipus d'interneurona GABAèrgica. Per tant, podria ocórrer que en aquestes condicions aquestes cèl·lules positives per la GFAP, amb morfologia astrocitària, provinguessin de la SVZ o bé fossin astròcits reactius que presenten un fenotip de cèl·lula progenitora.

Fins no fa massa temps, no s'ha tingut en consideració a la microglia com un dels factors que modulen la neurogènesi. Però s'ha demostrat que la neuroinflamació inhibeix la neurogènesi (Ekdahl *et al.*, 2009), com ho fan les citocines derivades dels astròcits, com la IL-6 (Vallières *et al.*, 2002). La reacció microglial aquí observada correlaciona amb el reclutament de neuroblasts PSNA-NCAM positius a l'àrea lesionada. Com a resposta a la lesió neuronal, les cèl·lules microgials alliberen senyals que formen part d'un procés citotòxic-inflamatori però també de reparació i de mecanismes regeneradors (Block *et al.*, 2007). Els efectes de la microglia en la capacitat regenerativa cerebral medien la modulació de processos de neurogènesi (Monje *et al.*, 2003; Whitney *et al.*, 2009) i impliquen l'alliberament d'interleucines i factors de creixement. Experiments *in vitro* han demostrat que la microglia allibera el factor de creixement de fibroblasts 2 (FGF-2) com a resposta al dany neuronal, el qual promou la supervivència de les neurones GABAèrgiques (Nakajima *et al.*, 2007). També durant les lesions excitotòxiques el FGF-2 es regula transcripcionalment a l'alça a les neurones

i és secretat com a resultat de la comunicació neurona-glia per a la neuroprotecció (Figueiredo *et al.*, 2008). *In vivo* FGF-2 augmenta la mobilització i el reclutament induïts per isquèmia de les cèl·lules de la SVZ cap a la capa CA1 lesionada de l'hipocamp (Nakatomi *et al.*, 2002). Així, la reactivitat microglial associada amb la lesió hipocampal crònica participaria en el reclutament de neuroblasts de la SVZ alliberant FGF-2. Aquest seria un efecte específic de lloc ja que a la SGZ de l'hipocamp FGF-2 actua en els processos de proliferació i neurogènesi sota condicions no patològiques, més que no pas en la migració durant la lesió (Picard-Riera *et al.*, 2004). Una de les característiques principals de la neurogènesi és que només una fracció petitíssima de noves neurones s'integra als circuits pre-existents i sobreviu a llarg plaç (Alvarez-Buylla *et al.*, 2008). Això la limita com a mecanisme de recanvi cel·lular, però sobre tot la fa ineficaç com a mecanisme de reparació després d'una lesió. La raó principal d'aquesta supervivència tan limitada seria l'entorn patològic on es troben aquestes neurones noves. No obstant, les cèl·lules progenitores podrien influir en el procés de lesió mitjançant la secreció de molècules neuroprotectores. Aquests senyals específics instruirien la microglia circumdant de forma que limitarien la seva activitat inflamatòria i, mitjançant una comunicació recíproca entre ambdós tipus cel·lulars, facilitarien la incorporació de les neurones noves a les xarxes neuronals ja existents (Ekdahl *et al.*, 2009).

La Dzx augmenta de manera molt significativa la expressió de cèl·lules Sp8 positives a l'hipocamp lesionat. És poc probable que aquest efecte de la Dzx sigui per acció directa en les cèl·lules progenitores hipocampals ja que s'ha demostrat que els neuroblasts de les neurosferes de rata i ratolí no expressen el canal K_{ATP} (Yasuda *et al.*, 2008; Ortega, 2012). Per tant, el bloqueig de l'activitat pro-inflamatòria de la microglia podria ser una causa important de l'augment de reclutament de cèl·lules Sp8 positives a l'hipocamp de rates lesionades amb NMDA i tractades amb Dzx. Altres estudis confirmarien que aquesta inhibició de la neuroinflamació hauria de potenciar la neurogènesi (Monje *et al.*, 2003). Recentment, hi ha hagut temptatives de potenciar la neurogènesi en un model de lesió traumàtica amb un fàrmac antiinflamatori que atenua la reacció de la microglia, la minociclina, però sense efectes en el nombre de cèl·lules proliferants (Ng *et al.*, 2012). Els nostres resultats suggereixen que l'obertura del canal K_{ATP} microglial a la fase crònica després de la lesió cerebral causa una disminució de la producció de citocines pro-inflamatòries *in vivo*, potenciant la migració dels precursors a la zona lesionada per a reparar la regió lesionada i protegir les neurones. Per tant, la potenciació del fenotip

tròfic microglial representaria una nova estratègia que enfortiria els processos regeneratius del cervell endògens, tenint un impacte significatiu en la progressió del pacient. Que el nínxol sigui pro ó anti-neurogènic dependria del grau d'activació de la micròglia i el balanç entre les citocines pro i anti-inflamatòries produïdes (Battista *et al.*, 2006). Per exemple, la micròglia activada en la lesió aguda indueix una resposta inflamatòria detrimental per a la neurogènesi, mentre que la micròglia activada més a llarg termini seria més permissiva per la diferenciació neuronal i la supervivència cel·lular (Ekdahl *et al.*, 2003; Cacci *et al.*, 2008). Això genera la possibilitat que en un ambient crònicament alterat, la micròglia activada pot engegar mecanismes protectors que activin els processos de neurogènesi. De fet, el canal K_{ATP} microglial pot constituir una diana de fàrmacs que reguli l'estat reactiu de la cèl·lula, controlant l'alliberament de mediadors pro-inflamatòris com NO, IL6 ó $TNF\alpha$, o fins i tot modificant la capacitat fagocítica de la micròglia (Virgili *et al.*, 2011, Ortega *et al.*, 2011). Per tant, l'obertura del canal K_{ATP} canviaria l'activitat de la micròglia crònicament reactiva cap a un nou fenotip, similar al neuroprotector capaç d'augmentar l'activació i diferenciació dels precursors neuronals.

5.4. EL CANAL DE CALCI DEPENDENT DE VOLTATGE A LA MICRÒGLIA

Aquí hem demostrat l'expressió de les subunitats $\alpha 1$ del CCDV tipus L a la micròglia reactiva durant la excitotoxicitat a l'hipocamp de la rata i als cultius de cèl·lules BV2, en els quals la Nif bloqueja l'increment de la $[Ca^{2+}]_i$ induïda per K^+ i inhibeix l'activitat pro-inflamatòria de la micròglia reactiva, mentre que el Bay k8644 fa augmentar la elevació de calci intracel·lular induïda per K^+ . L'evidència de corrents del CCDV es limitava a un sol article, on experiments de serjant de voltatge mostraven un petit corrent de calci cap a dins la cèl·lula al 30% de les cèl·lules testades (Colton *et al.*, 1994). Altres evidències indirectes mostren que la incubació de micròglia de rata amb altes concentracions de K^+ potencia la producció de l'anió superòxid induïda pel forbol-12-miristat-13-acetat, un efecte que es veia bloquejat per Nif (Colton *et al.*, 1994). Aquestes observacions farmacològiques són consistents amb els nostres resultats *in vitro* i *in vivo*, que proveeixen de evidències moleculars de la expressió d'un CCDV tipus L funcional a la micròglia reactiva. Per tant, el CCDV tipus L emergeix com a un nou actor a la senyalització mediada per calci a la micròglia.

L'elevació de la $[Ca^{2+}]_i$ basal és un element central en la regulació de certes funcions executives a la microglia activada (Kettenmann *et al.*, 2011). L'activació microglial *in vitro* amb LPS porta a una elevació crònica de la $[Ca^{2+}]_i$ a les cèl·lules microgials i una supressió de la senyalització mediada per calci (Hoffmann *et al.*, 2003). Abaixant la $[Ca^{2+}]_i$ amb àcid-1,2-bis(o-aminofenoxi)età-N,N,N',N'-tetraacètic (BAPTA) va restaurar la eficàcia de la senyalització. El BAPTA també atenuava fortament l'alliberament de NO, TNF α , IL-6, IL-12, i altres quimioquines induïdes per LPS (Färber and Kettenmann, 2006). A més, quan aïllada de pacients de AD en proximitat de plaques d'amiloide i comparada amb la de pacients control, la microglia reactiva tenia un major nivell de calci en estat de repòs i reduïa la seva amplitud de resposta davant l'ATP (McLarnon *et al.*, 2005). Hi ha evidències que indiquen que el CCDV tipus L tindria un paper en aquests canvis de la $[Ca^{2+}]_i$. Per exemple, els pèptids beta-amiloide són capaços de induir una activació microglial *in vitro* i promoure un increment en la $[Ca^{2+}]_i$, efecte que és eliminat per bloquejadors específics del CCDV tipus L com el verapamil, la nifedipina i el diltiazem (Silei *et al.*, 1999). També, a cultius mixtes neurona-microglia es va demostrar que la protecció neuronal de la Nim ve mediada per l'atenuació proinflamàtoria de la microglia, i que la Nim no protegia les neurones soles davant una agressió, indicant així la presència d'aquest canal a microglia (Li *et al.*, 2009). Altres estudis amb verapamil, una altra dihidropiridina, a cultius glia-neurones mostren que hi ha una davallada de la producció de ROS per part de la microglia i una protecció neuronal (Liu *et al.*, 2011). Per tant, fàrmacs específics dels CCDV tipus L inhibeixen la activitat proinflamàtoria de la microglia. Aquests estudis, però, no mostren proves d'expressió del canal a microglia. Tot i així, altres entrades de calci semblen ser importants en la regulació de la activitat microglial. Per exemple, s'ha descrit un rol per al CCDV tipus N a la patogènesis de la EAE regulant la producció microglial de la proteïna MCP-1 (Tokuhara *et al.*, 2010).

La microglia respon al dany potenciant les funcions que involucren una entrada de calci, com la proliferació, la migració, la fagocitosi i la producció de citocines pro-inflamatòries, quimiocines i factors tròfics (Färber and Kettenmann, 2006). Aquesta potenciació de la funció del CCDV tipus L a microglia podria tenir implicacions patofisiològiques diferents. Els efectes de Nif i Nim sobre la secreció de NO i TNF α a les cèl·lules BV2 evidencien un paper d'aquest canal en la síntesis i alliberació de substàncies pro-inflamatòries. Els efectes més aviat discrets del Bay k8644 sobre la secreció de NO i TNF α a cèl·lules no activades suggereixen que el CCDV tipus L no és

suficient per a induir aquest alliberament i té un paper modulador. Aquest resultat pot semblar contradictori amb l'absència d'oscil·lacions de calci i els efectes discrets de la Nif i el Bay k8644 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ que hem trobat en condicions basals. Però els en les nostres condicions, els procediments experimentals poden modificar l'activitat dels canals iònics per a mantenir una concentració de calci estable, tot i que la expressió del CCDV no canviï. Aquesta podria ser la causa de que trobéssim modificacions en el calci només a condicions d'alta despolarització.

L'efecte anti-inflamatori del bloqueig del CCDV tipus L sembla ser específic, ja que la fagocitosi no es trobava modulada per la Nif. Encara que el mateix estímul (l'activació amb LPS i IFN γ) activi les vies de senyalització tant per a la secreció de paràmetres proinflamatoris com per a l'activació de la fagocitosi, aquests processos estan regulats per diferents vies intracel·lulars. A cultius mixtes, els inhibidors del CCDV tipus L com la Nim van inhibir la producció de NO i de TNF α i la secreció de IL-1 β i prostaglandina E2 a cèl·lules microgials estimulades amb LPS, la qual s'acompanya amb una reducció de la degeneració de les neurones dopaminèrgiques (Li *et al.*, 2009). Tot i això, hi ha altres implicacions del CCDV tipus L que no hem d'oblidar. Per exemple, l'expressió d'aquest canal no seria una conseqüència de la activació cel·lular però seria un pas clau en la transició cap al estat activat de la micròglia. A més, altres estudis suggereixen un paper del CCDV tipus L en el control de la proliferació, migració i activació de la micròglia activada. Per exemple, la ccl5, una β -quimiocina involucrada a la resposta immune incloent la migració (Maghazachi, 2000), la secreció (Logan *et al.*, 2003) i la expressió gènica (Crabtree and Olson, 2002) activa específicament un corrent de calci sensitiu a Nim a micròglia (Shideman *et al.*, 2006).

La vulnerabilitat del SNC a les agressions excitotòxiques i a l'hipòxia/isquèmia difereix segons les àrees del cervell (Rodríguez *et al.*, 2001). L'expressió microglial del CCDV tipus L descrita aquí podria contribuir a explicar el per què d'aquesta vulnerabilitat diferencial. Als processos patològics, la micròglia mostra una activació híbrida que inclou accions inflamatòries i altres que serien més característiques de neuroprotecció i reparació (Graeber, 2010). Que la micròglia adopti un fenotip que exacerbarà el dany tissular o promourà la reparació cerebral depèn de la diversitat de les senyals per part de l'ambient de la lesió. De manera similar, els nivells de calci a la micròglia semblen estar regulats per factors del microambient i depèn de l'estat funcional de la cèl·lula (Kettenmann *et al.*, 2011). En conseqüència, l'expressió del CCDV tipus L a la micròglia activada podria ser clau per a determinar, si més no en part, la seva

participació en el procés patogènic. Dins d'aquest marc, els fàrmacs derivats de la dihidropiridina com la Nif i la Nim tenen efectes neuroprotectors (Schurr, 2004) tot i que fins ara entre les seves propietats no s'han contemplat els seus possibles efectes anti-inflamatoris. Així, l'estudi de les potencials propietats immunomoduladores d'aquests fàrmacs ajudaria a clarificar la controvèrsia de l'efectivitat dels antagonistes dels canals de calci en assaigs experimentals i clínics.

5.5. UN POSSIBLE ACOBLAMENT DE L'ACTIVITAT DELS CANALS K_{ATP} I CCDV TIPUS L A LA MICRÒGLIA

Segons s'ha descrit per les cèl·lules β -pancreàtiques, existeix un acoblament de l'activitat del canal K_{ATP} i el CCDV tipus L que controla l'alliberament d'insulina en funció dels nivells de glucosa circulant (Gyulkhanyan *et al.*, 2006). En trobar-se tots dos canals expressats a la micròglia, un acoblament semblant entre les seves activitats podria dur-se a terme. Segons aquest model, el tancament del canal K_{ATP} de membrana provocada per una alta concentració d'ATP intracel·lular a les cèl·lules reactives provocaria una despolarització cel·lular que activaria, entre d'altres, el CCDV tipus L, amb el consegüent increment de la $[Ca^{2+}]_i$. El calci intracel·lular induiria l'activitat microglial pro-inflamatòria per l'activació de factors de transcripció com ara el Factor Nuclear derivat de les cèl·lules T (NFAT) el qual és dependent de calci i media l'expressió microglial de molècules com l'IFN γ i el seu receptor (Hogan *et al.*, 2003; Nagamoto-Combs and Combs, 2010) i quimiocines com el ccl2 i el ccl3 (Kim *et al.*, 2011). El calci citoplasmàtic també pot induir la secreció d'aquestes citocines pro-inflamatòries i quimiocines (Möller, 2002) com s'ha descrit pel ccl5 (Hegg *et al.*, 2000; Shideman *et al.*, 2006). Un altre efecte de l'augment de la concentració de calci intracel·lular seria un increment de l'activitat de la cadena respiratòria mitocondrial i la síntesi d'ATP (Viola and Hool, 2009) que mantindria bloquejat el canal K_{ATP} i alimentaria tot el procés descrit.

En aquest escenari, la Dzx tindria efectes anti-inflamatoris, com mostren els nostres resultats. El mecanisme d'acció de la Dzx i altres KCO no s'ha dilucidat encara. Tot i així, la neuroprotecció de la Dzx podria estar mediada per les seves interaccions al mitocondri, que és el lloc on es genera més ATP a les cèl·lules. A la micròglia reactiva, la Dzx incrementa el flux de potassi dins de la matriu mitocondrial per l'activació del

mitoK_{ATP}, augmentant el volum de la matriu mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2001; Garlid and Paucek, 2003) i ajudant a preservar la integritat estructural i funcional del mitocondri (Holmuhamedov *et al.*, 1999). De la mateixa manera, cèl·lules tractades amb Dzx van mostrar un perfil energètic favorable amb dany limitat després d'episodis d'estrès (Iwai *et al.*, 2000; Holmuhamedov *et al.*, 2004). Com a conseqüència l'obertura del mitoK_{ATP} promouria la translocació de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna, potenciant la síntesis d'ATP (Figura 5). Al final doncs, la Dzx incrementa el quocient ATP/ADP al mitocondri i el citoplasma de la micròglia reactiva (Wang *et al.*, 1999). L'ATP, però, es destina a altres funcions cel·lulars que no es veuen inhibides per la Dzx, com la fagocitosi i altres processos neuroprotectors i regeneradors, baixant el quocient ATP/ADP. Aquest canvi del quocient junt amb la Dzx administrada, obren el canal K_{ATP} de la membrana plasmàtica hiperpolaritzant-la, cosa que tancaria els CCDV, portant finalment a una disminució de la [Ca²⁺]_i i inhibint l'activitat pro-inflamatòria cel·lular (Figura 5). Aquests canvis inclourien una síntesi menor de molècules pro-inflamatòries i la disminució de la producció ROS derivades del mitocondri (Zhou *et al.*, 2008) que resultarien en un manteniment de la integritat del mitocondri i de l'activitat fagocítica.

Per validar aquesta hipòtesi falta però, primer demostrar a les cèl·lules microgials que l'activitat dels canals K_{ATP} modifica el potencial de les membranes cel·lular i mitocondrial interna, de forma que es modifiqui l'activitat dels canals CCDV i la producció cel·lular d'ATP; i després analitzar com la Dzx i altres KCOs modifiquen aquest acoblament. Tot aquest tema obre un nou camp d'estudi, que està desenvolupant-se al nostre grup de recerca.

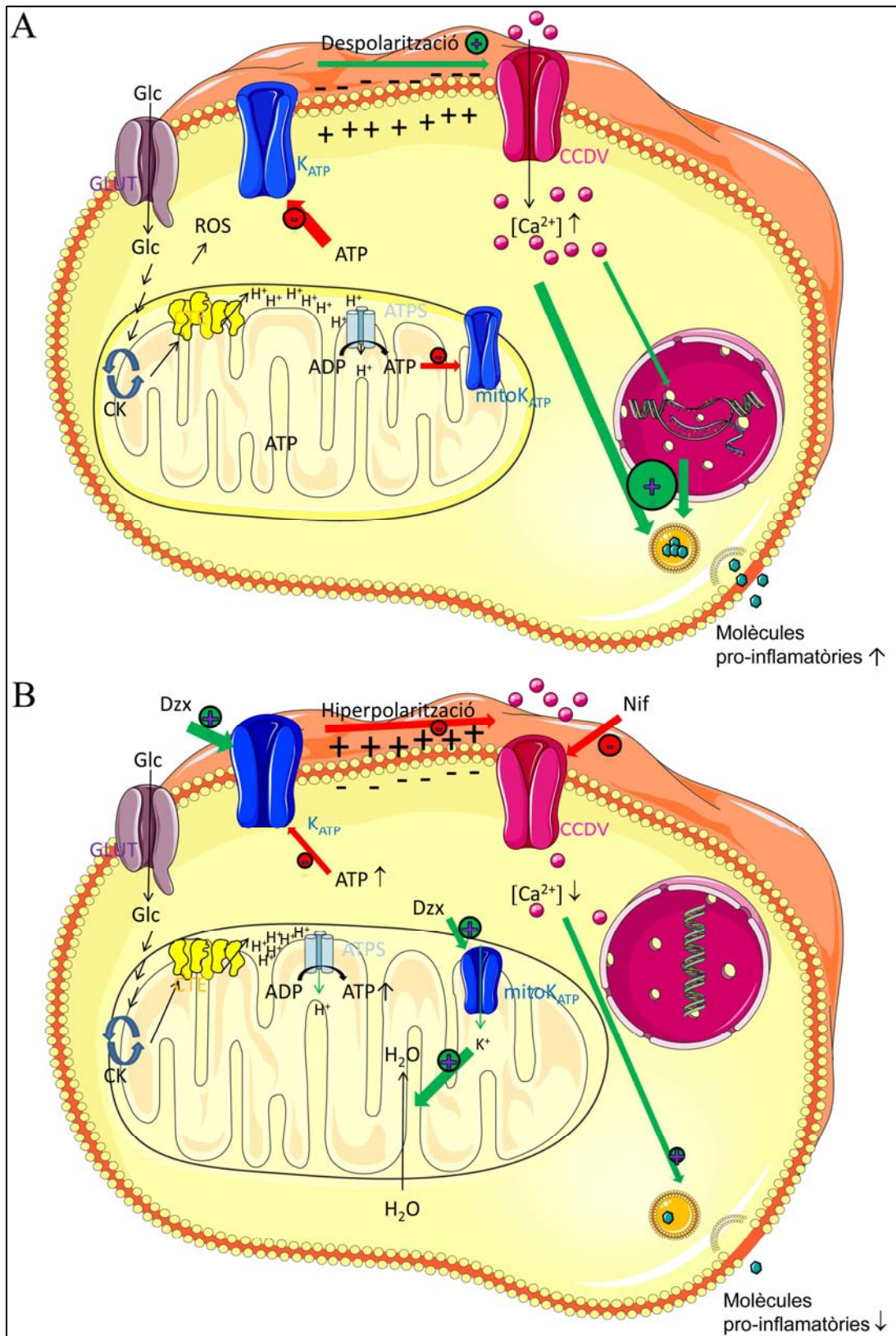


Figura 5.1: Esquema hipotètic de com la activació microglial (A) afecta a la generació de paràmetres proinflamatoris, i com la activació del canal K_{ATP}/inhibició del CCDV tipus L (B) modulen aquesta secreció. ATPS: ATP sintasa. CCDV: Canal de calci dependent de voltatge. CK: cicle de Krebs. CTE: Cadena de transport d'electrons. Dzx: Dzx. Glc: Glucosa. GLUT: Transportador de glucosa. Nif: Nifedipina.

En conclusió, en aquest estudi descrivim que la Dzx minora la progressió de la lesió excitotòxica hipocampal amb una preservació neuronal, reducció de paràmetres inflamatoris i increment dels processos de regeneració tissular. Aquests efectes apunten al canal K_{ATP} com a una molècula clau en el control de l'activitat inflamatòria de la micròglia en la fase crònica de les lesions cerebrals i als processos neurodegeneratius. En aquest sentit, donada l'acció mitocondrial de la Dzx, la modulació de la resposta microglial mitjançant el control de la seva activitat mitocondrial constitueix un enfocament innovador per interferir els processos neurodegeneratius digne de ser explorat en profunditat.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

D'aquesta tesis hem extret les següents conclusions:

1. La línia de cèl·lules microgials BV2 expressa el canal K_{ATP} després d'una estimulació pro-inflamatòria. Quan el canal K_{ATP} és obert amb diazoxida, les cèl·lules BV2 disminueixen l'expressió de molècules pro-inflamatòries com el NO, i el $TNF\alpha$ i les quimiocines *ccl9* i *ccl5*. Aquest efecte anti-inflamatòri de la diazoxida sembla ser específic doncs el fàrmac no modifica la capacitat fagocítica de les cèl·lules BV2.
2. La micròglia reactiva de l'hipocamp de la rata lesionada amb N-metil-D-aspartat expressa els components del canal K_{ATP} . Aquest fet converteix la micròglia en una diana pel tractament amb diazoxida de la neuroinflamació pròpia dels processos neurodegeneratius.
3. La diazoxida administrada diàriament i oral a la rata a partir del dia 8 post-lesió té efectes neuroprotectors i alenteix el procés neurodegeneratiu induït per N-metil-D-aspartat a l'hipocamp en disminuir el tamany de la lesió excitotòxica i preservar les neurones de la mort. Aquesta administració oral diària de diazoxida disminueix la reacció inflamatòria associada a la lesió en disminuir l'àrea de reacció microglial i l'expressió astrogial de GFAP i de proteïna S100 β .
4. La diazoxida augmenta a l'hipocamp el nombre de precursors neuronals i el nombre de noves neurones aparegudes després de la lesió amb N-metil-D-aspartat. La diazoxida també promou l'aparició a l'hipocamp de cèl·lules que expressen GFAP i Sp8, marcadors propis de les cèl·lules de la via migratòria rostral. Això suggereix que la diazoxida promou els processos de reclutament de cèl·lules progenitores i la neurogènesi com a part dels processos de regeneració tissular.
5. La línia de cèl·lules microgials BV2 expressa les subunitats $\alpha 1$ del canal de calci dependent de voltatge tipus L i la seva membrana respon a canvis elèctrics amb corrents de calci sensibles a fàrmacs específics del canal. Aquests fàrmacs modifiquen l'alliberament de NO i el $TNF\alpha$ però no la capacitat fagocítica de les

cèl·lules. La micròglia reactiva de l'hipocamp de la rata lesionada amb N-metil-D-aspartat també expressa la subunitat $\alpha 1$ del canal. Això suggereix un paper important el canal de calci dependent de voltatge de tipus L en el control de l'activitat secretora pro-inflamatòria microglial.

6. El canal K_{ATP} constitueix una diana clau pel control de l'activitat crònica de la micròglia reactiva pròpia dels processos neurodegeneratius. Els KCOs com la diazoxida presenten un potencial terapèutic contra les malalties neurodegeneratives degut a la seva activitat anti-inflamatòria i la promoció dels processos de neurogènesi i regeneració.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

7.1. ARTICLES

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SLB, Persson MAA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15983–15988
- Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R (2001) S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 33:131–142
- Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R (2004) S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta* 1742:169–177
- Ammälä C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1996) Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* 379:545–548
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76–87
- Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117:145–152
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683–686
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT (2008) The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:357–365
- Ammälä C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1996) Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* 379:545–548
- Anderson MJ, Waxman SG (1985) Neurogenesis in adult vertebrate spinal cord in situ and in vitro: a new model system. *Ann N Y Acad Sci* 457:213–233

- Andrés N, Malpesa Y, Rodríguez MJ, Mahy N (2003) Low sensitivity of retina to AMPA-induced calcification. *J Neurosci Res* 72:543–548
- Araque A (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4:3–10
- Ardehali H, O'Rourke B (2005) Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol* 39:7–16
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657–668
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963–970
- Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammälä C, Bokvist K, Rorsman P (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55 Suppl:54–65
- Avila JC d', Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, Massa S, Liu J, Swanson RA (2012) Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation* 9:31
- Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP, Peña DM, Rice ME (2003) Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J Neurosci* 23:2744–2750
- Avshalumov MV, Rice ME (2003) Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11729–11734
- Avshalumov MV, Bao L, Patel JC, Rice ME (2007) H₂O₂ signaling in the nigrostriatal dopamine pathway via ATP-sensitive potassium channels: issues and answers. *Antioxid Redox Signal* 9:219–231
- Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J (2011) Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 258:882–888
- Aziz Q, Thomas AM, Khambra T, Tinker A (2011) The regulation of the KATP channel subunit, KIR6.2, by a CA²⁺-dependent protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1998) A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol* 60:667–687

- Badie B, Schartner J, Klaver J, Vorpahl J (1999) In vitro modulation of microglia motility by glioma cells is mediated by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Neurosurgery* 44:1077–1082; discussion 1082–1083
- Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260:181–186
- Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 276:33369–33374
- Ballanyi K, Kulik A (1998) Intracellular Ca²⁺ during metabolic activation of KATP channels in spontaneously active dorsal vagal neurons in medullary slices. *Eur J Neurosci* 10:2574–2585
- Bastianelli E, Pochet R (1995) Calbindin-D28k, calretinin, and S-100 immunoreactivities in rat pineal gland during postnatal development. *J Pineal Res* 18:127–134
- Bataller R, Gasull X, Ginès P, Hellemans K, Görbig MN, Nicolás JM, Sancho-Bru P, Las Heras D De, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodés J (2001) In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 33:956–962
- Battle M, Ferri L, Andrade C, Ortega FJ, Pugliese M, Mahy N, Rodriguez MJ (Ahead of publication, 2009) Recruitment of Sp8-positive cells in the adult rat hippocampus during chronic neurodegeneration. *Journal of Neurotrauma*
- Battle M, Ferri L, Andrade C, Ortega FJ, Pugliese M, Mahy N, Rodriguez MJ (Ahead of publication, 2010) S100 β potentiates the microglial cytotoxic response to excitotoxicity in rat hippocampus. *Journal of Neurotrauma*
- Battle M, Ferri L, Andrade C, Ortega J, Pugliese M, Mahy N, and Rodríguez MJ. Astroglial activation potentiates the neuroprotective-to-cytotoxic transition of microglial response to excitotoxicity in rat hippocampus (2013) *J Neuroinflamm* (2nd revision)
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23:83–93
- Bean BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153–156

- Bechmann I, Galea I, Perry VH (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28:5–11
- Berg M, Bruhn T, Frandsen A, Schousboe A, Diemer NH (1995) Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. *J Neurosci Res* 40:641–646
- Bernal F, Andrés N, Samuel D, Kerkerian-LeGoff L, Mahy N (2000) Age-related resistance to alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid-induced hippocampal lesion. *Hippocampus* 10:296–304
- Bernal F, Petegnief V, Rodríguez MJ, Ursu G, Pugliese M, Mahy N (2009) Nimodipine inhibits TMB-8 potentiation of AMPA-induced hippocampal neurodegeneration. *J Neurosci Res* 87:1240–1249
- Bernhardi R von, Tichauer J, Eugenín-von Bernhardi L (2011) Proliferating culture of aged microglia for the study of neurodegenerative diseases. *J Neurosci Methods* 202:65–69
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233–238
- Beynon SB, Walker FR (2012) Microglial activation in the injured and healthy brain: What are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience* 225:162–171
- Bialowas-McGoey LA, Lesicka A, Whitaker-Azmitia PM (2008) Vitamin E increases S100B-mediated microglial activation in an S100B-overexpressing mouse model of pathological aging. *Glia* 56:1780–1790
- Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R (2007) S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol* 81:108–118
- Biber K, Sauter A, Brouwer N, Copray SC, Boddeke HW (2001) Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine Secondary Lymphoid-tissue Chemokine (SLC). *Glia* 34:121–133
- Biber K, Dijkstra I, Trebst C, Groot CJA De, Ransohoff RM, Boddeke HWGM (2002) Functional expression of CXCR3 in cultured mouse and human astrocytes and microglia. *Neuroscience* 112:487–497
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM (2007) Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci* 30:596–602

- Bielenberg GW, Burniol M, Rösen R, Klaus W (1990) Effects of nimodipine on infarct size and cerebral acidosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 21:IV90–92
- Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27:229–237
- Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57–69
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res* 31:616–621
- Boku S, Nakagawa S, Koyama T (2010) Glucocorticoids and lithium in adult hippocampal neurogenesis. *Vitam Horm* 82:421–431
- Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF (2006) High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 15:Unit 15.8
- Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci* 12:2049–2058
- Boucsein C, Zacharias R, Färber K, Pavlovic S, Hanisch U-K, Kettenmann H (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 17:2267–2276
- Brockhaus J, Ilschner S, Banati RB, Kettenmann H (1993) Membrane properties of amoeboid microglial cells in the corpus callosum slice from early postnatal mice. *J Neurosci* 13:4412–4421
- Brosnan CF, Battistini L, Raine CS, Dickson DW, Casadevall A, Lee SC (1994) Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci* 16:152–161
- Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 41:242–247
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S (2007) Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18:93–114
- Buchheit KH, Fozard JR (1999) KATP channel openers for the treatment of airways hyperreactivity. *Pulm Pharmacol Ther* 12:103–105

- Burgos M, Pastor MD, González JC, Martínez-Galan JR, Vaquero CF, Fradejas N, Benavides A, Hernández-Guijo JM, Tranque P, Calvo S (2007) PKCepsilon upregulates voltage-dependent calcium channels in cultured astrocytes. *Glia* 55:1437–1448
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:149–160
- Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203–209
- Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894–897
- Campbell JD, Sansom MSP, Ashcroft FM (2003) Potassium channel regulation. *EMBO Rep* 4:1038–1042
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee J-C, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917–924
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo P-M (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507–518
- Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM (2007) A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics* 4:571–579
- Carter SL, Müller M, Manders PM, Campbell IL (2007) Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 55:1728–1739
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411–425
- Chan A, Magnus T, Gold R (2001) Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 33:87–95

- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736–2741
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK (1995) Tumor necrosis factor- α production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* 17:97–105
- Cheung AFP, Pollen AA, Tavaré A, DeProto J, Molnár Z (2007) Comparative aspects of cortical neurogenesis in vertebrates. *J Anat* 211:164–176
- Chung S, Joe E, Soh H, Lee MY, Bang HW (1998) Delayed rectifier potassium currents induced in activated rat microglia set the resting membrane potential. *Neurosci Lett* 242:73–76
- Chung S, Jung W, Lee MY (1999) Inward and outward rectifying potassium currents set membrane potentials in activated rat microglia. *Neurosci Lett* 262:121–124
- Coillie E Van, Aelst I Van, Fiten P, Billiau A, Damme J Van, Opendakker G (1999) Transcriptional control of the human MCP-2 gene promoter by IFN- γ and IL-1 β in connective tissue cells. *J Leukoc Biol* 66:502–511
- Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM (2001) Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 167:623–627
- Colton CA, Jia M, Li MX, Gilbert DL (1994) K⁺ modulation of microglial superoxide production: involvement of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Am J Physiol* 266:C1650–1655
- Craig TJ, Ashcroft FM, Proks P (2008) How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J Gen Physiol* 132:131–144
- Cuadros MA, Navascués J (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173–189
- Cunningham O, Champion S, Perry VH, Murray C, Sidenius N, Docagne F, Cunningham C (2009) Microglia and the urokinase plasminogen activator receptor/uPA system in innate brain inflammation. *Glia* 57:1802–1814
- Curtis MA, Connor B, Faull RLM (2003) Neurogenesis in the diseased adult human brain--new therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Cell Cycle* 2:428–430
- D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, Navarra P, Azzena GB, Grassi C (2004) Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 45:354–363

- David S, Kroner A (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12:388–399
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-B (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752–758
- Das S, Basu A (2008) Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res* 86:1199–1208
- Deiner MS, Sretavan DW (1999) Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci* 19:9900–9912
- Dick GM, Tune JD (2010) Role of potassium channels in coronary vasodilation. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:10–22
- Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6:1127–1134
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14895–14900
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008–1022
- Ehninger D, Kempermann G (2008) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331:243–250
- Eijnde SM Van den, Boshart L, Reutelingsperger CP, Zeeuw CI De, Vermeij-Keers C (1997) Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 4:311–316
- Ekdahl CT, Claasen J-H, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13632–13637
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158:1021–1029
- Ekdahl CT (2012) Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol* 3:41
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16:2508–2521

- Elkabes S, Peng L, Black IB (1998) Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptor and neurotrophin expression. *J Neurosci Res* 54:117–122
- Ellis SL, Gysbers V, Manders PM, Li W, Hofer MJ, Müller M, Campbell IL (2010) The cell-specific induction of CXC chemokine ligand 9 mediated by IFN-gamma in microglia of the central nervous system is determined by the myeloid transcription factor PU.1. *J Immunol* 185:1864–1877
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM (1992) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029–4035
- Färber K, Kettenmann H (2005) Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:133–143
- Färber K, Kettenmann H (2006) Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54:656–665
- Farooqui AA, Horrocks LA (2006) Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist* 12:245–260
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377–391
- Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB (2010) OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci* 13:690–699
- Figueiredo C, Pais TF, Gomes JR, Chatterjee S (2008) Neuron-microglia crosstalk up-regulates neuronal FGF-2 expression which mediates neuroprotection against excitotoxicity via JNK1/2. *J Neurochem* 107:73–85
- Fischer HG, Nitzgen B, Germann T, Degitz K, Däubener W, Hadding U (1993) Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function. *J Neuroimmunol* 42:87–95
- Fischer FR, Santambrogio L, Luo Y, Berman MA, Hancock WW, Dorf ME (2000) Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered

peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J Neuroimmunol* 110:195–208

Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT (2011) Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS ONE* 6:e15973

Foster DB, Ho AS, Rucker J, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B (2012) Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res* 111:446–454

Frandsen A, Schousboe A, Griffiths R (1993) Cytotoxic actions and effects on intracellular Ca²⁺ and cGMP concentrations of sulphur-containing excitatory amino acids in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurosci Res* 34:331–339

Fryer HJ, Knox RJ, Strittmatter SM, Kalb RG (1999) Excitotoxic death of a subset of embryonic rat motor neurons in vitro. *J Neurochem* 72:500–513

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433–1438

Ganter S, Northoff H, Männel D, Gebicke-Härter PJ (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* 33:218–230

Garcia ADR, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233–1241

García-López MA, Sánchez-Madrid F, Rodríguez-Frade JM, Mellado M, Acevedo A, García MI, Albar JP, Martínez C, Marazuela M (2001) CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest* 81:409–418

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271:8796–8799

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81:1072–1082

Garlid KD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606:23–41

- Ge S, Yang C-H, Hsu K-S, Ming G-L, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559–566
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269–287
- Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163–2178
- Goldberg SH, Meer P van der, Hesselgesser J, Jaffer S, Kolson DL, Albright AV, González-Scarano F, Lavi E (2001) CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:127–138
- Goldman S (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 26:590–596
- Gomes-Leal W (2012) Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* 2:345–356
- González-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219–240
- Goodman Y, Mattson MP (1996) K⁺ channel openers protect hippocampal neurons against oxidative injury and amyloid beta-peptide toxicity. *Brain Res* 706:328–332
- Goodwin JL, Uemura E, Cunnick JE (1995) Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of beta-amyloid and IFN-gamma. *Brain Res* 692:207–214
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492–2498
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260–265
- Gowing G, Vallières L, Julien J-P (2006) Mouse model for ablation of proliferating microglia in acute CNS injuries. *Glia* 53:331–337
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89–105
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 66:637–643

- Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft* 12 (1): 426–428.
- Groot CJ De, Woodrooffe MN (2001) The role of chemokines and chemokine receptors in CNS inflammation. *Prog Brain Res* 132:533–544
- Gu W, Brännström T, Wester P (2000) Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1166–1173
- Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75:388–397
- Gyoneva S, Orr AG, Traynelis SF (2009) Differential regulation of microglial motility by ATP/ADP and adenosine. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S195–199
- Gyorgy A, Ling G, Wingo D, Walker J, Tong L, Parks S, Januszkiewicz A, Baumann R, Agoston DV (2011) Time-dependent changes in serum biomarker levels after blast traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 28:1121–1126
- Haas AH de, Boddeke HWGM, Biber K (2008) Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56:888–894
- Hagino Y, Kariura Y, Manago Y, Amano T, Wang B, Sekiguchi M, Nishikawa K, Aoki S, Wada K, Noda M (2004) Heterogeneity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured microglia. *Glia* 47:68–77
- Hailer NP, Grampp A, Nitsch R (1999) Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 11:3359–3364
- Hailer NP, Wirjatijasa F, Roser N, Hischebeth GT, Korf HW, Dehghani F (2001) Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 14:315–326
- Hallbergson AF, Gnatenco C, Peterson DA (2003) Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair. *J Clin Invest* 112:1128–1133
- Hanisch U-K (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140–155
- Hanisch U-K, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387–1394
- Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464:554–561

- Hawkins RA, DeJoseph MR, Hawkins PA (1995) Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. *Cell Tissue Res* 281:207–214
- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2008) Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke* 39:951–958
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D (2006) The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9:1512–1519
- Hegg CC, Hu S, Peterson PK, Thayer SA (2000) Beta-chemokines and human immunodeficiency virus type-1 proteins evoke intracellular calcium increases in human microglia. *Neuroscience* 98:191–199
- Henn A, Lund S, Hedtjörn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M (2009) The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26:83–94
- Heese K, Fiebich BL, Bauer J, Otten U (1997) Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A_{2a}-receptors. *Neurosci Lett* 231:83–86
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rüllicke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11:146–152
- Hinze A, Stolzing A (2011) Differentiation of mouse bone marrow derived stem cells toward microglia-like cells. *BMC Cell Biol* 12:35
- Hirsiger S, Simmen H-P, Werner CML, Wanner GA, Rittirsch D (2012) Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm* 2012:315941
- Hoffmann A, Kann O, Ohlemeyer C, Hanisch U-K, Kettenmann H (2003) Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci* 23:4410–4419
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205–2232

- Holmuamedov EL, Wang L, Terzic A (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol (Lond)* 519 Pt 2:347–360
- Holmuamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, Holmuamedova M, Jahangir A, Terzic A (2002) Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J* 16:1010–1016
- Holmuamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Colombini M, Terzic A (2004) Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett* 568:167–170
- Honda S, Kohsaka S (2001) [Regulation of microglial cell function by ATP]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 21:89–93
- Horn J, Haan RJ de, Vermeulen M, Limburg M (2001) Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke* 32:461–465
- Horn J, Haan RJ de, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M (2001) Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. *Stroke* 32:2433–2438
- Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA (2008) Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* 107:557–56
- Howe ML, Barres BA (2012) A novel role for microglia in minimizing excitotoxicity. *BMC Biol* 10:7Jellinger KA (2003) General aspects of neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl*:101–144
- Hu H, Sato T, Seharaseyon J, Liu Y, Johns DC, O'Rourke B, Marbán E (1999) Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal KATP channels and native cardiac mitochondrial KATP channels. *Mol Pharmacol* 55:1000–1005
- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244–247
- Inoue K (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156–163
- Inoue K, Koizumi S, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M (2009) P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis. *Int Rev Neurobiol* 85:159–163

- Iwai T, Tanonaka K, Koshimizu M, Takeo S (2000) Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br J Pharmacol* 129:1219–1227
- Iwai T, Tanonaka K, Motegi K, Inoue R, Kasahara S, Takeo S (2002) Nicorandil preserves mitochondrial function during ischemia in perfused rat heart. *Eur J Pharmacol* 446:119–127
- Iwamoto K, Bundo M, Yamamoto M, Ozawa H, Saito T, Kato T (2004) Decreased expression of NEFH and PCP4/PEP19 in the prefrontal cortex of alcoholics. *Neurosci Res* 49:379–385
- Jaskolski F, Mulle C, Manzoni OJ (2005) An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *J Neurosci Methods* 146:42–49
- Jamali R, Ludvigsson J, Mohseni S (2002) Continuous monitoring of the subcutaneous glucose level in freely moving normal and diabetic rats and in humans with type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 4:305–312
- Jeon H, Kim J-H, Kim J-H, Lee W-H, Lee M-S, Suk K (2012) Plasminogen activator inhibitor type 1 regulates microglial motility and phagocytic activity. *J Neuroinflammation* 9:149
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD Jr, Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888–893
- Jiang W, Gu W, Brännström T, Rosqvist R, Wester P (2001) Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32:1201–1207
- Jiang K-W, Gao F, Shui Q-X, Yu Z-S, Xia Z-Z (2004) Effect of diazoxide on regulation of vesicular and plasma membrane GABA transporter genes and proteins in hippocampus of rats subjected to picrotoxin-induced kindling. *Neurosci Res* 50:319–329
- Jiang K, Wang J, Zhao C, Feng M, Shen Z, Yu Z, Xia Z (2011) Regulation of gap junctional communication by astrocytic mitochondrial K(ATP) channels following neurotoxin administration in in vitro and in vivo models. *Neurosignals* 19:63–74
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11946–11950

- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:343–347
- Jong EK de, Dijkstra IM, Hensens M, Brouwer N, Amerongen M van, Liem RSB, Boddeke HWGM, Biber K (2005) Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J Neurosci* 25:7548–7557
- Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, Vellis J de (1995) CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 685:55–67
- Kálmán M (1989) Dead cells can be phagocytosed by any neighboring cell in early developing rat brain. *Int J Neurosci* 46:139–145
- Kang J, Yang M, Jou I, Joe E (2001) Identification of protein kinase C isoforms involved in interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase in murine BV2 microglia. *Neurosci Lett* 299:205–208
- Kareva EN, Oleñnikova OM, Panov VO, Shimanovskii NL, Skvortsova VI (2012) [Estrogens and brain]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR*:48–59
- Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2008) Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol* 194:54–61
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10409–10414
- Kempermann G (2002) Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4:17–33
- Kempermann G, Neumann H (2003) Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science* 302:1689–1690
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452
- Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J Neurosci Res* 26:278–287

- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553
- Khosravani H, Zamponi GW (2006) Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86:941–966
- Kim SU, Vellis J de (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302–313
- Kim B, Jeong H, Kim J, Lee SY, Jou I, Joe E (2011) Uridine 5'-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor. *J Immunol* 186:3701–3709
- Kishore P, Boucai L, Zhang K, Li W, Koppaka S, Kehlenbrink S, Schiwiek A, Esterson YB, Mehta D, Bursheh S, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Muzumdar R, Schwartz GJ, Hawkins M (2011) Activation of K(ATP) channels suppresses glucose production in humans. *J Clin Invest* 121:4916–4920
- Koenigsknecht J, Landreth G (2004) Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci* 24:9838–9846
- Kohl A, Dehghani F, Korf H-W, Hailer NP (2003) The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 181:1–11
- Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 13:127–132
- Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H649–657
- Kraft AD, Harry GJ (2011) Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 8:2980–3018
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033
- Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2005) Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 162:89–96
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318

- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149–184
- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H (2009) CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1173:310–317
- Lacza Z, Snipes JA, Kis B, Szabó C, Grover G, Busija DW (2003) Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel in the brain. *Brain Res* 994:27–36
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27:2596–2605
- Lalive PH, Paglinawan R, Biollaz G, Kappos EA, Leone DP, Malipiero U, Relvas JB, Moransard M, Suter T, Fontana A (2005) TGF-beta-treated microglia induce oligodendrocyte precursor cell chemotaxis through the HGF-c-Met pathway. *Eur J Immunol* 35:727–737
- Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460:525–542
- Lawson K (2000) Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int* 57:838–845
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151–170
- Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* 12:309–318
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B (1998) Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 24:437–448
- Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006) Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16:216–224
- Li H, Ao X, Jia J, Wang Q, Zhang Z (2011) Effects of optineurin siRNA on apoptotic genes and apoptosis in RGC-5 cells. *Mol Vis* 17:3314–3325
- Li H, Gang Z, Yuling H, Luokun X, Jie X, Hao L, Li W, Chunsong H, Junyan L, Mingshen J, Youxin J, Feili G, Boquan J, Jinquan T (2006) Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol* 177:3644–3656

- Li W, Gao G, Guo Q, Jia D, Wang J, Wang X, He S, Liang Q (2009) Function and phenotype of microglia are determined by toll-like receptor 2/toll-like receptor 4 activation sequence. *DNA Cell Biol* 28:493–499
- Li X, Sun C, Lin C, Ma T, Madhavan MC, Campbell K, Yang Z (2011) The transcription factor Sp8 is required for the production of parvalbumin-expressing interneurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 31:8450–8455
- Li Y, Hu X, Liu Y, Bao Y, An L (2009) Nimodipine protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *Neuropharmacology* 56:580–589
- Liang J, Takeuchi H, Jin S, Noda M, Li H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A (2010) Glutamate induces neurotrophic factor production from microglia via protein kinase C pathway. *Brain Res* 1322:8–23
- Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM (1995) Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182:1301–1314
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming G, Gage FH (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:399–421
- Liévens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Boscovic O, Samuel D, Kerkerian-Le Goff L, Bates GP (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8:807–821
- Light P (1996) Regulation of ATP-sensitive potassium channels by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1286:65–73
- Limatola C, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Bertollini C, Angelantonio S Di, Ragozzino D, Eusebi F (2005) Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neuroimmunol* 166:19–28
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W (2004) L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92:2633–2641
- Liu B, Hong J-S (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1–7
- Liu F, You Y, Li X, Ma T, Nie Y, Wei B, Li T, Lin H, Yang Z (2009) Brain injury does not alter the intrinsic differentiation potential of adult neuroblasts. *J Neurosci* 29:5075–5087

- Liu D, Pitta M, Lee J-H, Ray B, Lahiri DK, Furukawa K, Mughal M, Jiang H, Villarreal J, Cutler RG, Greig NH, Mattson MP (2010) The KATP channel activator diazoxide ameliorates amyloid- β and tau pathologies and improves memory in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:443–457
- Liu GJ, Kalous A, Werry EL, Bennett MR (2006) Purine release from spinal cord microglia after elevation of calcium by glutamate. *Mol Pharmacol* 70:851–859
- Liu GJ, Nagarajah R, Banati RB, Bennett MR (2009) Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *Eur J Neurosci* 29:1108–1118
- Liu X, Wu J-Y, Zhou F, Sun X-L, Yao H-H, Yang Y, Ding J-H, Hu G (2006) The regulation of rotenone-induced inflammatory factor production by ATP-sensitive potassium channel expressed in BV-2 cells. *Neurosci Lett* 394:131–135
- Liu Y-Q, Cheng M-C, Wang L-X, Zhao N, Xiao H-B, Wang Z-T (2008) Functional analysis of cultured neural cells for evaluating cold/cool- and hot/warm-natured Chinese herbs. *Am J Chin Med* 36:771–781
- Liu Y, Lo Y-C, Qian L, Crews FT, Wilson B, Chen H-L, Wu H-M, Chen S-H, Wei K, Lu R-B, Ali S, Hong J-S (2011) Verapamil protects dopaminergic neuron damage through a novel anti-inflammatory mechanism by inhibition of microglial activation. *Neuropharmacology* 60:373–380
- Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, Weinstein PR, Liu J (2007) Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* 38:146–152
- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179–193
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074–2077
- Loos T, Dekeyser L, Struyf S, Schutyser E, Gijsbers K, Gouwy M, Fraeyman A, Put W, Ronsse I, Grillet B, Opdenakker G, Damme J Van, Proost P (2006) TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Lab Invest* 86:902–916
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193–201

- Lünemann A, Ullrich O, Diestel A, Jöns T, Ninnemann O, Kovac A, Pohl EE, Hass R, Nitsch R, Hendrix S (2006) Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma. *Glia* 53:412–419
- Luzzati F, Marchis S De, Parlato R, Gribaudo S, Schütz G, Fasolo A, Peretto P (2011) New striatal neurons in a mouse model of progressive striatal degeneration are generated in both the subventricular zone and the striatal parenchyma. *PLoS ONE* 6:e25088
- MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14:477–492
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, Garnier P (2009) Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS ONE* 4:e8101
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951–955
- Mahe D, Fisson S, Montoni A, Morel A, Couez D (2001) Identification and IFN γ regulation of differentially expressed mRNAs in murine microglial and CNS-associated macrophage subpopulations. *Mol Cell Neurosci* 18:363–380
- Mahy N, Bendahan G, Boatell ML, Bjelke B, Tinner B, Olson L, Fuxe K (1995) Differential brain area vulnerability to long-term subcortical excitotoxic lesions. *Neuroscience* 65:15–25
- Mahy N, Prats A, Riveros A, Andrés N, Bernal F (1999) Basal ganglia calcification induced by excitotoxicity: an experimental model characterised by electron microscopy and X-ray microanalysis. *Acta Neuropathol* 98:217–225
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–686
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, Rooijen N van, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535–547
- Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N van, Kettenmann H (2005) Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:754–762
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453–461

- Mattsson P, Aldskogius H, Svensson M (1999) Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg* 90:760–765
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285–1291
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66–71
- McKay SM, Brooks DJ, Hu P, McLachlan EM (2007) Distinct types of microglial activation in white and grey matter of rat lumbosacral cord after mid-thoracic spinal transection. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:698–710
- McLarnon JG, Zhang L, Goghari V, Lee YB, Walz W, Krieger C, Kim SU (1999) Effects of ATP and elevated K⁺ on K⁺ currents and intracellular Ca²⁺ in human microglia. *Neuroscience* 91:343–352
- McLarnon JG, Franciosi S, Wang X, Bae JH, Choi HB, Kim SU (2001) Acute actions of tumor necrosis factor-alpha on intracellular Ca(2+) and K(+) currents in human microglia. *Neuroscience* 104:1175–1184
- McLarnon JG (2005) Purinergic mediated changes in Ca²⁺ mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. *J Neurosci Res* 81:349–356
- McLarnon JG, Choi HB, Lue L-F, Walker DG, Kim SU (2005) Perturbations in calcium-mediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. *J Neurosci Res* 81:426–435
- McLaurin J, Almazan G, Williams K, Antel JP (1995) immortalization and characterization of rat microglial cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21:302–311
- Meeuwssen S, Bsibsi M, Persoon-Deen C, Ravid R, Noort JM van (2005) Cultured human adult microglia from different donors display stable cytokine, chemokine and growth factor gene profiles but respond differently to a pro-inflammatory stimulus. *Neuroimmunomodulation* 12:235–245
- Merrill JE (1991) Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* 13:130–137
- Merrill JE (1992) Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci* 14:1–10
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE (1993) Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151:2132–2141

- Meyer FB, Anderson RE, Yaksh TL, Sundt TM Jr (1986) Effect of nimodipine on intracellular brain pH, cortical blood flow, and EEG in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 64:617–626
- Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369–415
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P (2009) Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210:3–12
- Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ (2000) Investigation of the molecular assembly of beta-cell K(ATP) channels. *FEBS Lett* 482:59–64
- Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ (2001) Molecular structure of the glibenclamide binding site of the beta-cell K(ATP) channel. *FEBS Lett* 499:154–160
- Mikhailov MV, Campbell JD, Wet H de, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MSP, Ford RC, Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* 24:4166–4175
- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4:507–512
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch U-K, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2⁺ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544–1553
- Ming G, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250
- Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16:233–238
- Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* 50:1023–1029

- Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A (2003) Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* 979:65–70
- Mizuno T (2012) The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012:737846
- Möller T (2002) Calcium signaling in microglial cells. *Glia* 40:184–194
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760–1765
- Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A (2009) Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem* 16:4382–4398
- Mrak RE, Griffin WS (2001) The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:915–922
- Müller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL (2010) Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36:368–387
- Nagamoto-Combs K, Combs CK (2010) Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT (nuclear factor of activated T cells). *J Neurosci* 30:9641–9646
- Nagano T, Kimura SH, Takai E, Matsuda T, Takemura M (2006) Lipopolysaccharide sensitizes microglia toward Ca(2+)-induced cell death: mode of cell death shifts from apoptosis to necrosis. *Glia* 53:67–73
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Kurihara T, Kohsaka S (2000) Ceramide-enhanced urokinase-type plasminogen activator (uPA) release is mediated by protein kinase C in cultured microglia. *Glia* 32:226–233
- Nakajima K, Kohsaka S (2004) Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4:65–84
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429–441
- Napoli I, Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158:1030–1038

- Neher JJ, Neniskyte U, Zhao J-W, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC (2011) Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol* 186:4973–4983
- Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC (2011) Neuronal Death Induced by Nanomolar Amyloid β Is Mediated by Primary Phagocytosis of Neurons by Microglia. *J Biol Chem* 286:39904–39913
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288–295
- Ng SY, Semple B, Morganti-Kossmann MC, Bye N (2012) Attenuation of microglial activation with minocycline is not associated with changes in neurogenesis after focal traumatic brain injury in adult mice. *Journal of Neurotrauma*
- Nicholls DG, Vesce S, Kirk L, Chalmers S (2003) Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* 34:407–424
- Nichols CG (2006) KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440:470–476
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1999) Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 66:69–73
- Niidome T, Nonaka H, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2009) Basic fibroblast growth factor promotes the generation of microtubule-associated protein 2-positive cells from microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1018–1022
- Niki I, Coles B, Ashcroft FM, Ashcroft SJ (1997) Effects of protein phosphorylation on the sulphonylurea receptor of the pancreatic beta-cell. *Adv Exp Med Biol* 426:59–69
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318
- Nomura T, Yabe T, Rosenthal ES, Krzan M, Schwartz JP (2000) PSA-NCAM distinguishes reactive astrocytes in 6-OHDA-lesioned substantia nigra from those in the striatal terminal fields. *J Neurosci Res* 61:588–596
- Nörenberg W, Gebicke-Haerter PJ, Illes P (1994) Voltage-dependent potassium channels in activated rat microglia. *J Physiol (Lond)* 475:15–32
- Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E, Jay TM (2000) Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci* 18:281–287

- O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL (2002) IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* 39:85–97
- Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S (2010) P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58:790–801
- Olah M, Ping G, Haas AH De, Brouwer N, Meerlo P, Der Zee EA Van, Biber K, Boddeke HWGM (2009) Enhanced hippocampal neurogenesis in the absence of microglia T cell interaction and microglia activation in the murine running wheel model. *Glia* 57:1046–1061
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HWGM (2011) Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:108–118
- Olney JW, Gubareff T de (1978) Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* 271:557–559
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916–3924
- Omari KM, John GR, Sealson SC, Raine CS (2005) CXC chemokine receptors on human oligodendrocytes: implications for multiple sclerosis. *Brain* 128:1003–1015
- Ortega FJ, Gimeno-Bayon J, Espinosa-Parrilla JF, Carrasco JL, Batlle M, Pugliese M, Mahy N, Rodríguez MJ (2012a) ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats. *Experimental Neurology*
- Ortega FJ, Jolkkonen J, Mahy N, Rodríguez MJ (2012b) Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* (Epub)
- Ovanesov MV, Ayhan Y, Wolbert C, Moldovan K, Sauder C, Pletnikov MV (2008) Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation* 5:50
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581–618
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479–494
- Pang Y, Campbell L, Zheng B, Fan L, Cai Z, Rhodes P (2010) Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. *Neuroscience* 166:464–475

- Parent JM (2003) Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 9:261–272
- Parent JM (2007) Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:529–540
- Park HY, Kim G-Y, Choi YH (2012) Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- κ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Int J Mol Med* 30:204–210
- Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309–13317
- Peart JN, Gross GJ (2002) Sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels and myocardial ischemic preconditioning. *J Cell Mol Med* 6:453–464
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427–434
- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375–382
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421–431
- Petegnief V, Ursu G, Bernal F, Mahy N (2004) Nimodipine and TMB-8 potentiate the AMPA-induced lesion in the basal ganglia. *Neurochem Int* 44:287–291
- Petrova TV, Hu J, Eldik LJ Van (2000) Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res* 853:74–80
- Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RHC, Cuzner ML, Polman CH, Uitdehaag BMJ, Thompson EJ, Giovannoni G (2002) Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 125:1462–1473
- Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76:223–231
- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30:527–535

- Polazzi E, Monti B (2010) Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol* 92:293–315
- Polikov VS, Su EC, Ball MA, Hong J-S, Reichert WM (2009) Control protocol for robust in vitro glial scar formation around microwires: essential roles of bFGF and serum in gliosis. *J Neurosci Methods* 181:170–177
- Praag H van, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427–13431
- Praag H van, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034
- Presta M, Urbinati C, Dell'era P, Lauro GM, Sogos V, Balaci L, Ennas MG, Gremo F (1995) Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human fetal microglia cells. *Int J Dev Neurosci* 13:29–39
- Price J, Thurlow L (1988) Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104:473–482
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227–1235
- Qin H, Yeh W-I, Sarno P De, Holdbrooks AT, Liu Y, Muldowney MT, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Fox TH 3rd, Park K, Harrington LE, Raman C, Benveniste EN (2012) Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:5004–5009
- Qin X, Sun Z-Q, Dai X-J, Mao S-S, Zhang J-L, Jia M-X, Zhang Y-M (2012) Toll-like receptor 4 signaling is involved in PACAP-induced neuroprotection in BV2 microglial cells under OGD/reoxygenation. *Neurol Res* 34:379–389
- Quast U, Cook NS (1989) In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 250:261–271
- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77:1165–1232
- Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28:571–573
- Rami A, Kriegstein J (1994) Neuronal protective effects of calcium antagonists in cerebral ischemia. *Life Sci* 55:2105–2113

- Ramonet D, Pugliese M, Rodríguez MJ, Yebra L de, Andrade C, Adroer R, Ribalta T, Mascort J, Mahy N (2002) Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases. *J Physiol Paris* 96:307–312
- Ramonet D, Rodríguez MJ, Pugliese M, Mahy N (2004a) Putative glucosensing property in rat and human activated microglia. *Neurobiol Dis* 17:1–9
- Ramonet D, Rodríguez MJ, Fredriksson K, Bernal F, Mahy N (2004b) In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus* 14:586–594
- Ramonet D, Yebra L de, Fredriksson K, Bernal F, Ribalta T, Mahy N (2006) Similar calcification process in acute and chronic human brain pathologies. *J Neurosci Res* 83:147–156
- Rando TA (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441:1080–1086
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119–145
- Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, Kovac AD, Gerard C, Boddeke HWGM, Nitsch R, Kettenmann H (2004) CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci* 24:8500–8509
- Rappert A, Biber K, Nolte C, Lipp M, Schubel A, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2002) Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. *J Immunol* 168:3221–3226
- Redecker P, Cetin Y, Korf HW (1996) Differential immunocytochemical localization of calretinin in the pineal gland of three mammalian species. *J Neurocytol* 25:9–18
- Renzo MF Di, Bertolotto A, Olivero M, Putzolu P, Crepaldi T, Schiffer D, Pagni CA, Comoglio PM (1993) Selective expression of the Met/HGF receptor in human central nervous system microglia. *Oncogene* 8:219–222
- Reynolds EE, Dubyak GR (1985) Activation of calcium mobilization and calcium influx by alpha 1-adrenergic receptors in a smooth muscle cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 130:627–632
- Righi M, Mori L, Libero G De, Sironi M, Biondi A, Mantovani A, Donini SD, Ricciardi-Castagnoli P (1989) Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 19:1443–1444

- Rio JA del, Soriano E (1989) Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 49:311–317
- Robin E, Simerabet M, Hassoun SM, Adamczyk S, Tavernier B, Vallet B, Bordet R, Lebuffe G (2011) Postconditioning in focal cerebral ischemia: role of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel. *Brain Res* 1375:137–146
- Robledo P, Ursu G, Mahy N (1999) Effects of adenosine and gamma-aminobutyric acid A receptor antagonists on N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Hippocampus* 9:527–533
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942–964, table of contents
- Rodrigo GC, Standen NB (2005) ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des* 11:1915–1940
- Rodríguez MJ, Bernal F, Andrés N, Malpesa Y, Mahy N (2000) Excitatory amino acids and neurodegeneration: a hypothetical role of calcium precipitation. *Int J Dev Neurosci* 18:299–307
- Rodríguez MJ, Ursu G, Bernal F, Cusí V, Mahy N (2001) Perinatal human hypoxia-ischemia vulnerability correlates with brain calcification. *Neurobiol Dis* 8:59–68
- Rodríguez MJ, Martínez-Sánchez M, Bernal F, Mahy N (2004) Heterogeneity between hippocampal and septal astroglia as a contributing factor to differential in vivo AMPA excitotoxicity. *J Neurosci Res* 77:344–353
- Rodríguez MJ, Prats A, Malpesa Y, Andrés N, Pugliese M, Batlle M, Mahy N (2009a) Pattern of injury with a graded excitotoxic insult and ensuing chronic medial septal damage in the rat brain. *J Neurotrauma* 26:1823–1834
- Rodríguez MJ, Pugliese M, Mahy N (2009b) Drug abuse, brain calcification and glutamate-induced neurodegeneration. *Curr Drug Abuse Rev* 2:99–112
- Rodríguez MJ, Martínez-Moreno M, Ortega FJ and Mahy N (2013) Targeting microglial KATP channels to treat neurodegenerative diseases: a mitochondrial issue. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Sotmès).
- Rogers LA, Cowan WM (1973) The development of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in the chick. *J Comp Neurol* 147:291–320
- Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9:339–349

- Röhl C, Lucius R, Sievers J (2007) The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res* 1129:43–52
- Rom S, Rom I, Passiatore G, Pacifici M, Radhakrishnan S, Valle L Del, Piña-Oviedo S, Khalili K, Eletto D, Peruzzi F (2010) CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. *FASEB J* 24:2292–2300
- Romero-Grimaldi C, Gheusi G, Lledo P-M, Estrada C (2006) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis enhances both subventricular zone neurogenesis and olfactory learning in adult mice. *Eur J Neurosci* 24:2461–2470
- Roseborough G, Gao D, Chen L, Trush MA, Zhou S, Williams GM, Wei C (2006) The mitochondrial K-ATP channel opener, diazoxide, prevents ischemia-reperfusion injury in the rabbit spinal cord. *Am J Pathol* 168:1443–1451
- Rosenblum WI (2003) ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation. *Stroke* 34:1547–1552
- Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217–242
- Rossi-George A, Guo C-J, Oakes BL, Gow AJ (2012) Copper modulates the phenotypic response of activated BV2 microglia through the release of nitric oxide. *Nitric Oxide* 27:201–209
- Roy M, Richard J-F, Dumas A, Vallieres L (2012) CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation* 9:18
- Sanelli T, Ge W, Leystra-Lantz C, Strong MJ (2007) Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. *J Neurol Sci* 256:39–51
- Sandin M, Jasmin S, Levere TE (1990) Aging and cognition: facilitation of recent memory in aged nonhuman primates by nimodipine. *Neurobiol Aging* 11:573–575
- Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6295–6300
- Sapolsky RM (2001) Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem* 76:1601–1611
- Sarit B-S, Lajos G, Abraham D, Ron A, Sigal F-B (2012) Inhibitory role of kinins on microglial nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Peptides* 35:172–181

- Saura J, MacGibbon G, Dragunow M (1997) Etoposide-induced PC12 cell death: apoptotic morphology without oligonucleosomal DNA fragmentation or dependency upon de novo protein synthesis. *Brain Res Mol Brain Res* 48:382–388
- Saura J, Petegnief V, Wu X, Liang Y, Paul SM (2003) Microglial apolipoprotein E and astroglial apolipoprotein J expression in vitro: opposite effects of lipopolysaccharide. *J Neurochem* 85:1455–1467
- Saura J, Tusell JM, Serratosa J (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44:183–189
- Saura J, Angulo E, Ejarque A, Casadó V, Tusell JM, Moratalla R, Chen J-F, Schwarzschild MA, Lluís C, Franco R, Serratosa J (2005) Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem* 95:919–929
- Saura J (2007) Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation* 4:26
- Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:195–203
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78:3–13
- Schwab JM, Brechtel K, Mueller C-A, Failli V, Kaps H-P, Tuli SK, Schluesener HJ (2006) Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol* 78:91–116
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2012) The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*
- Schänzer A, Wachs F-P, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004) Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237–248
- Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 11:3648–3658
- Scriabine A, Schuurman T, Traber J (1989) Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. *FASEB J* 3:1799–1806

- Schwartz M, Butovsky O, Brück W, Hanisch U-K (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29:68–74
- Seo DR, Kim KY, Lee YB (2004) Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. *Neuroreport* 15:1157–1161
- Shi N-Q, Ye B, Makielski JC (2005) Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *J Mol Cell Cardiol* 39:51–60
- Shideman CR, Hu S, Peterson PK, Thayer SA (2006) CCL5 evokes calcium signals in microglia through a kinase-, phosphoinositide-, and nucleotide-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 83:1471–1484
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52:557–594
- Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett* 123:229–231
- Shin SM, Cho KS, Choi MS, Lee SH, Han S-H, Kang Y-S, Kim HJ, Cheong JH, Shin CY, Ko KH (2010) Urokinase-type plasminogen activator induces BV-2 microglial cell migration through activation of matrix metalloproteinase-9. *Neurochem Res* 35:976–985
- Silei V, Fabrizi C, Venturini G, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F, Lauro GM (1999) Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Res* 818:168–170
- Simard AR, Rivest S (2007) Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 504:716–729
- Simard JM, Woo SK, Tsybalyuk N, Voloshyn O, Yurovsky V, Ivanova S, Lee R, Gerzanich V (2012) Glibenclamide-10-h Treatment Window in a Clinically Relevant Model of Stroke. *Translational stroke research* 3:286–295
- Skak K, Gotfredsen CF, Lundsgaard D, Hansen JB, Sturis J, Markholst H (2004) Improved beta-cell survival and reduced insulinitis in a type 1 diabetic rat model after treatment with a beta-cell-selective K(ATP) channel opener. *Diabetes* 53:1089–1095
- Skaper SD (2011) Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:44–56

- Small DL, Monette R, Buchan AM, Morley P (1997) Identification of calcium channels involved in neuronal injury in rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 753:209–218
- Sobrado M, López MG, Carceller F, García AG, Roda JM (2003) Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 118:107–113
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400–407
- Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM (1999) Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103:807–815
- Soto C (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4:49–60
- Soto D, Comes N, Ferrer E, Morales M, Escalada A, Palés J, Solsona C, Gual A, Gasull X (2004) Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3650–3661
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10–18
- Standridge M, Alemzadeh R, Zemel M, Koontz J, Moustaid-Moussa N (2000) Diazoxide down-regulates leptin and lipid metabolizing enzymes in adipose tissue of Zucker rats. *FASEB J* 14:455–460
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164–1178
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immune system. *Sci Am* 273:54–55, 58–61
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL (2004) Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208–212
- Streit WJ (2006) Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 29:506–510

- Streit WJ, Xue Q-S (2009) Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:371–379
- Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* Appendix 3:Appendix 3B
- Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Conti B, Hashimoto M (2009) Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment. *J Neuroimmunol* 207:24–31
- Sun X-L, Zeng X-N, Zhou F, Dai C-P, Ding J-H, Hu G (2008) KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 33:1336–1342
- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241:693–697
- Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marbán E, Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 88:570–577
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 30:111–120
- Suzumura A, Sawada M, Itoh Y, Marunouchi T (1994) Interleukin-4 induces proliferation and activation of microglia but suppresses their induction of class II major histocompatibility complex antigen expression. *J Neuroimmunol* 53:209–218
- Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T (2006) Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1088:219–229
- Tan J, Town T, Saxe M, Paris D, Wu Y, Mullan M (1999) Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10. *J Immunol* 163:6614–6621
- Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y (2006) Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 112:195–204
- Taylor DL, Diemel LT, Cuzner ML, Pocock JM (2002) Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and

neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 82:1179–1191

Thomzig A, Wenzel M, Karschin C, Eaton MJ, Skatchkov SN, Karschin A, Veh RW (2001) Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol Cell Neurosci* 18:671–690

Toba Y, Pakiam JG, Wray S (2005) Voltage-gated calcium channels in developing GnRH-1 neuronal system in the mouse. *Eur J Neurosci* 22:79–92

Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, Praag H van, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727–734

Tornovsky S, Crane A, Cosgrove KE, Hussain K, Lavie J, Heyman M, Nesher Y, Kuchinski N, Ben-Shushan E, Shatz O, Nahari E, Potikha T, Zangen D, Tenenbaum-Rakover Y, Vries L de, Argente J, Gracia R, Landau H, Eliakim A, Lindley K, Dunne MJ, Aguilar-Bryan L, Glaser B (2004) Hyperinsulinism of infancy: novel ABCC8 and KCNJ11 mutations and evidence for additional locus heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:6224–6234

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803–815

Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8:e1000527

Tremblay M-È, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064–16069

Turrin NP, Rivest S (2006) Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Mol Neurobiol* 34:221–242

Tymianski M, Tator CH (1996) Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38:1176–1195

Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE (2002) Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 22:486–492

Verkhatsky A (2007) Calcium and cell death. *Subcell Biochem* 45:465–480

Verkhatsky A, Toescu EC (1998) Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci* 21:2–

- Vinet J, Weering HR van, Heinrich A, Kälin RE, Wegner A, Brouwer N, Heppner FL, Rooijen N van, Boddeke HW, Biber K (2012) Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 9:27
- Viola HM, Hool LC (2010) Cross-talk between L-type Ca²⁺ channels and mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:229–235
- Virgili N, Espinosa-Parrilla JF, Mancera P, Pastén-Zamorano A, Gimeno-Bayon J, Rodríguez MJ, Mahy N, Pugliese M (2011) Oral administration of the KATP channel opener diazoxide ameliorates disease progression in a murine model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 8:149
- Viviani B, Corsini E, Galli CL, Marinovich M (1998) Glia increase degeneration of hippocampal neurons through release of tumor necrosis factor- α . *Toxicol Appl Pharmacol* 150:271–276
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974–3980
- Wali B, Ishrat T, Atif F, Hua F, Stein DG, Sayeed I (2012) Glibenclamide Administration Attenuates Infarct Volume, Hemispheric Swelling, and Functional Impairments following Permanent Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke Res Treat* 2012:460909
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP 2nd, Scheffler B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815–825
- Walz W, Bekar LK (2001) Ion channels in cultured microglia. *Microsc Res Tech* 54:26–33
- Wang Y, Hirai K, Ashraf M (1999) Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res* 85:731–741
- Wang X, Li X, Schmidt DB, Foley JJ, Barone FC, Ames RS, Sarau HM (2000) Identification and molecular characterization of rat CXCR3: receptor expression and interferon-inducible protein-10 binding are increased in focal stroke. *Mol Pharmacol* 57:1190–1198
- Weering HRJ van, Boddeke HWGM, Vinet J, Brouwer N, Haas AH de, Rooijen N van, Thomsen AR, Biber KPH (2011) CXCL10/CXCR3 signaling in glia cells differentially affects NMDA-induced cell death in CA and DG neurons of the mouse hippocampus. *Hippocampus* 21:220–232

- Wei B, Nie Y, Li X, Wang C, Ma T, Huang Z, Tian M, Sun C, Cai Y, You Y, Liu F, Yang Z (2011) Emx1-expressing neural stem cells in the subventricular zone give rise to new interneurons in the ischemic injured striatum. *Eur J Neurosci* 33:819–830
- Wen J, Ribeiro R, Zhang Y (2011) Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. *J Neuroinflammation* 8:38
- Wieloch T, Nikolich K (2006) Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol* 16:258–264
- Wikinski SI, Acosta GB (1995) [Role of excitatory amino acids in neuropathology]. *Medicina (B Aires)* 55:355–365
- Williams K, Bar-Or A, Ulvestad E, Olivier A, Antel JP, Yong VW (1992) Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:538–549
- Witting A, Müller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* 75:1060–1070
- Wollmer MA, Lucius R, Wilms H, Held-Feindt J, Sievers J, Mentlein R (2001) ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 115:19–27
- Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Höjeberg B, Link H (1996) Shift from anti- to proinflammatory cytokine profiles in microglia through LPS- or IFN-gamma-mediated pathways. *Neuroreport* 7:1893–1898
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2010) Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 11:298–308
- Xu J, Kim S, Chen M, Rockow S, Yi SE, Wagner AJ, Hay N, Weichselbaum RR, Li W (1995) Blockage of the early events of mitogenic signaling by interferon-gamma in macrophages in response to colony-stimulating factor-1. *Blood* 86:2774–2788
- Yamada K, Ji JJ, Yuan H, Miki T, Sato S, Horimoto N, Shimizu T, Seino S, Inagaki N (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* 292:1543–1546
- Yamada K, Inagaki N (2005) Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol* 38:945–949
- Yamagata T, Muroya K, Mukasa T, Igarashi H, Momoi M, Tsukahara T, Arahata K, Kumagai H, Momoi T (1995) Hepatocyte growth factor specifically expressed in

microglia activated Ras in the neurons, similar to the action of neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 210:231–237

Yamakage M, Namiki A (2002) Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49:151–164

Yasuda T, Bartlett PF, Adams DJ (2008) K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 37:284–297

Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:8286–8296

Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong J-S (2010) Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol* 41:232–241

Zhang SC, Fedoroff S (1998) Modulation of microglia by stem cell factor. *J Neurosci Res* 53:29–37

Zhang L, Himi T, Murota S (2000) Induction of hepatocyte growth factor (HGF) in rat microglial cells by prostaglandin E(2). *J Neurosci Res* 62:389–395

Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho K-L, Morshead C, Chopp M (2004) Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:441–448

Zhang H, Wang F-W, Yao L-L, Hao A-J (2011) Microglia--friend or foe. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:869–883

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming G-L, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3–11

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–660

Zhou F, Yao H-H, Wu J-Y, Ding J-H, Sun T, Hu G (2008) Opening of microglial K(ATP) channels inhibits rotenone-induced neuroinflammation. *J Cell Mol Med* 12:1559–15700

Zhou J, Tang PCY, Qin L, Gayed PM, Li W, Skokos EA, Kyriakides TR, Pober JS, Tellides G (2010) CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *J Exp Med* 207:1951–1966

- Zhu D, Li R, Liu G, Hua W (1999) Nimodipine inhibits calcium-independent nitric oxide synthase activity in transient focal cerebral ischemia rats and cultured mouse astroglial cells. *Life Sci* 65:PL221–231
- Zielasek J, Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* 6:191–122
- Zindler E, Zipp F (2010) Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24:551–562
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2010) Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 140:798–804

7.2. LLIBRES

Alzheimer A. “Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe.” *Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten* edited by Nissl F, Alzheimer A. Jena: Verlag von Gustav Fischer 1910, p. 401–562.

Del Rio Hortega. “Cytology and cellular pathology of the nervous system”. Vol. 2. Edited by Penfield W. New York: Hoeber. 1932, p. 482-534.

Freshney RI. “Culture of Specific Cell Types. In: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique.” New York: Alan R. Liss. Press. 1987.

Frommann C. “Untersuchungen über die Gewebsveränderungen bei der Multiplen Sklerose des Gehirns und Rückenmarks.” Jena: Verlag von Gustav Fischer. 1878.

Glees P. “Neuroglia, Morphology and Function”. Oxford, UK: Blackwell Scientific. 1955.

Ortega FJ, Vidal-Taboada JM, Mahy N. and Rodríguez MJ. “Molecular Mechanisms of Acute Brain Injury and Ensuing Neurodegeneration.” *Capítol del llibre: “Brain Damage - Bridging Between Basic Research and Clinics”*. Edited by Alina González-Quevedo. InTech, 2011.

Paxinos G, Watson C. “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.” Second Edition, Academic Press. 1986.

Rogers AW. “Techniques of Autoradiography”. New York: Elsevier Sci. 1973.

Vidal-Taboada JM, Mahy N. and Rodríguez MJ. “Microglia, Calcification and Neurodegenerative Diseases.” Capítol del llibre: “Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring”. Edited by Raimond Chuen-Chung Chang. InTech, 2011.

7.3. TESIS

Batlle M. “Noves neurones en el procés neurodegeneratiu a l’hipocamp de la rata adulta: una neurogènesi exògena?” 2009.

Ortega FJ. “K_{ATP} channel blockade instructs microglia to foster brain repair and neurogenesis after stroke.” 2012.

Rodríguez MJ. “Progresividad de los efectos del glutamato en el sistema nervioso central: aspectos experimentales y clínicos.” 2000.

7.4. RECURSOS WEB

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

7.5. APORTACIONES A CONGRESSOS

Rodríguez MJ, Pugliese M, Mahy N (2007) K_{ATP} channel modulates microglia activity and neuronal loss. Proceedings of the VIII European Meeting of glial cells in health and disease H904C0241: 125-129.

