Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, NANOS i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria

BE

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.

Papel de la Interleucina 6 (IL-6) en la regulación de la expresión de Osteopontina (OPN) y CD44 tras axotomía del nervio facial

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom: BERNARDO
Cognoms: CASTELLANO LOPEZ

Correu electrònic: bernardo.castellano@uab.cat

Dades del centre d'origen

Universitat Autònoma de Barcelona
Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Histologia Mèdica

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2007BE-1 00013

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Células gliales, osteopontina, CD44, axotomía, núcleo facial, Interleucina-6

Data de presentació de la justificació
30/07/09

Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Visttiplau del/de la responsable de la
sol·licitud

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Durante mi estancia en el laborarotio del Profesor Iain L. Campbell (1 de Octubre 2008 a 30 de Enero 2009, he tenido la oportunidad de desarrollar el proyecto titulado "Papel de la interleucina 6 (IL6) en la regulación de la expresión de Osteopontina (OPN) y de CD44 tras axotomía del nervio facial". Tal y como estaba previsto, tras transección del nervio facial, indujimos una reactividad glial en el núcleo facial (NF) localizado en el tronco cerebral, utilizando ratones transgénicos que sobrexpresan IL6 bajo promotor GFAP (tg GFAP-IL6), es decir selectivamente en astrocitos. Hemos utilizado técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, así como también hemos completado el estudio utilizando análisis de RPA, western blotting y citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares. Los resultados obtenidos indican que la OPN se expresa constitutivamente en las neuronas del NF. Tras axotomía del nervio facial, la expresión de OPN y CD44 incrementa en los ratones WT, mientras que en los tg GFAP-IL6 disminuye significativamente, sugiriendo que la IL6 podría estar involucrada en la modulación de la expresión de ambas moléculas. Sin embargo, no hemos visto diferencias en otros receptores de OPN como la integrina Alpha-5. La ctometría de flujo corroboró algunos de los resultados histológicos sobre la reactividad microglial y nos permitió concluir que la proporción de microglía activada (CD11b+/CD45+mid) y macrófagos (CD11b+/CD45+high) que expresan CD44 incrementa en in los tg GFAP-IL6 versus WT donde la mayor parte de microglia activada mostraba un perfil CD11b+/CD45+low. Además de estos resultados científicos, mi estancia en la Universidad de Sydney ha sido muy fructífera puesto que: 1) he adquirido experiencia práctica en algunas técnicas como RPA, western y citometría de flujo; 2) ha servido para estrechar los lazos de colaboración entre ambos laboratorios, lo cual se ha materializado en la petición de un proyecto de investigación conjunto al NIH; 3) Hemos iniciado una nueva línea de investigación creando un ratón transgénico que sobrexpresa IL10 (una citocina anti-inflamatoria) bajo promotor GFAP, el cual constituirá la base de una parte de nuestra investigación futura.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)

During my stay in the laboratory of Profesor Iain L. Campbell (1st October 2008 to 30 January 2009) I have had the oportunity to develop the project entitled: "Role of Interleukin 6 (IL6) in the regulation of Osteopontin (OPN) and CD44 expression after facial nerve axotomy". As projected, we induced a glial reaction in the facial nucleus (FN) located in the brainstem, after facial nerve axotomy (FNA), in transgenic mice that overexpress IL6 under GFAP promotor (tg GFAP-IL6), that is to say IL6 is targeted to astrocytes. We have used histochemical and immunohistochemical techniques and addtionally Ribonuclease Protein Assay for RNAm analyisis, western blotting for protein analysis and flow citometry for cell population identification. The results obtained indicate that OPN is constitutively expressed in motorneurons of the FN. After FNA, OPN and CD44 expression increased in the WT, whereas in tg GFAP-IL6, we found a significative decrease, sugesting that IL6 may be involved in the modulation of both molecules. However, other OPN receptors like Alpha5 integrin do not decrease in axotomized tg GFAP-IL6 mice. Flow citometry analysis corroborate some of the histological observations on microglial reactivity associated to FNA, showing that the proportion of activated microglia (CD11b+/CD45+mid) and macrophages (CD11b+/CD45+high) expressing CD44 in the lesioned FN are increased in tg GFAP-IL6 versus WT where major part of reactive microglia showed a CD11b+/CD45+low profile

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.
In addtion to scientific results, my stay in the University of Sidney has been very fruitful as: 1) I have acquired experience in other techniques including RPA, western immunoblotting and flow cytometry; 2) served to strengthen te relationship between both laboratories and we have applied together to obtain finantiation from NIH; 3) We have initiated a common research project in collaboration by creating a new transgenic mouse overexpressing the anti-inflammatory interleukin-10 under GFAP promotor, which will be the basis of a part or our future research.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Según lo previsto, he podido desarrollar la investigación proyectada en el laboratorio del Profesor Iain L. Campbell en la Universidad de Sydney, Australia. Tal y como se planteaba en la solicitud de la ayuda, el objetivo de la investigación propuesta era desvelar los posibles cambios que la sobrexpresión de interleucina 6 (IL6) podía inducir en la expresión de Osteopontinia (OPN) y de sus receptores, incluyendo integrinas y el receptor CD44, en el núcleo facial tras axotomía del nervio facial, utilizando para ello un ratón transgénico en el que la producción de IL6 se consigue bajo promotor de GFAP.

La experimentación que se proponía inicialmente se basaba en la utilización de técnicas inmunocitoquímicas complementando los resultados con grupos experimentales procesados para la detección de expresión diferencial de RNA mediante técnicas de Ribonuclease Protection Assay (RPA). Aunque no estaba planteado inicialmente en la memoria de solicitud del proyecto, he tenido la oportunidad de aplicar técnicas de detección proteica mediante técnicas de immunoblot (western blot, WB) y técnicas de citometría de flujo. El estudio en microscopía electrónica inicialmente proyectado no pudimos completarlo por problemas técnicos y de tiempo.

Las axotomías unilaterales del nervio facial se realizaron bajo anestesia con ketamina/xilacina. En función de las técnicas empleadas, y tras los tiempos de supervivencia seleccionados los animales se sacrificaron mediante perfusión cardiaca con fijador (estudios

inmunohistoquímicos) o con PBS (para técnicas de RPA, WB e CF). En la Tabla 1 se especifican los diferentes grupos experimentales utilizados detallando los animales utilizados en cada caso. A continuación se incluye un resumen de los resultados obtenidos más relevantes

Estudios histoquímicos e inmunocitoquímicos

Una de las series de los cortes vibratómicos de los diferentes grupos de supervivencia se utilizó para la demostración histoquímica de la NDPasa. Algunas de las series de cortes en criostato se procesaron para la demostración inmunohistoquímica de CD11b, OPN, CD44, la subunidad Alpha-4, la subunidad Alpha-5 y la subunidad Alpha 6 de las integrinas que actuan como receptores de OPN.

El análisis del material histológico procesado para la demostración de OPN y sus receptores, CD44 y otras integrinas, en el ratón transgénico GFAP-IL6, tras axotomía del nervio facial, nos ha permitito establecer que:

En el núcleo facial, la OPN se expresa constitutivamente en las neuronas motoras. En los animales WT, la axotomía del nervio facial produce un aumento tanto de la expresión de OPN como de su receptor, el CD44. Sin embargo, en los animales IL6+, se produce un considerable descenso en la expresión de OPN en el núcleo facial lesionado entre los días 14 y 21 postlesión en comparación con los animales WT axotomizados. Esta menor expresión de la OPN en los animales IL6+ es paralela a un descenso en la expresión de su receptor CD44.

Esta observación sugiere que la sobrexpresión de IL6 puede modular la expresión de ambas moleculas, OPN y CD44. No obstante, es interesante señalar que la expresión de otro de los receptores de la OPN, la integrina Alpha-5 no se encuentra disminuida en el núcleo facial lesionado de los transgénicos de IL6, e incluso hemos observado que se incrementa en relación al WT en tiempos de supervivencia correspondientes a los 14 días postlesión. Estos resultados son de gran interés puesto que en función de su estado de fosforilación la OPN cambia su afinidad por CD44 y otras integrinas y por lo tanto puede desarrollar diferentes efectos biológicos. La interacción OPN/CD44 inhibe la producción de otras interleucinas como la IL10. La ausencia que hemos observado en la expresión de OPN y CD44 probablemente se traduzca en una mayor producción de IL10 que pudiera tener un efecto benéfico en la supervivencia neuronal o en la regeneración, si bien esto tenemos que demostrarlo es futuros estudios. En la Fig. 2 presentamos algunas fotografías de los resultados obtenidos.

Con objeto de dilucidar qué tipos celulares expresan los receptores de la OPN, es decir, CD44, Alpha-4 y Alpha-5, nos queda pendiente además el análisis de las preparaciones que hemos realizado combinando diferentes anticuerpos, entre ellas: CD44/GFAP, CD44/Iba1, Alpha-4/GFAP, Alpha-4/Iba-1, Alpha-5/GFAP y Alpha-5/Iba-1

Estudios de RPA.

Con objeto de complementar las observaciones inmunohistoquímicas con análisis de expresión de RNA, lesionamos animales transgénicos y WT y tras tiempos de supervivencia de 3 días y 14 días postlesión, con ayuda del personal técnico del laboratorio del Profesor Campbell procedimos a la extracción del RNA del tronco cerebral conteniendo el núcleo facial. Utilizamos en cada caso el tronco cerebral ipsilateral (lesionado) y el contralateral (no lesionado) como control. Programamos el procesamos las muestras en dos tandas para la detección RNA de:

1) Interleucinas: IL6, IL4, TNFa, IL1ß, INFg, e IL10
2) Chemokinas: CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CCL12 y CXCL10

Debido a algunos problemas técnicos inesperados no tuviéramos éxito en el desarrollo de esta técnica y dado que la cantidad de RNA que pudimos extraer del tronco cerebral era muy reducida, no pudimos volver a repetir la técnica con la cantidad de muestra restante. Consecuentemente, tuvimos que volver a repetir las lesiones en nuevos grupos de animales y volver a recolectar muestras durante la ultima parte de mi estancia, sin tener tiempo material de realizar los RPA antes de mi regreso a España. En la actualidad, en el laboratorio del Prof. Campbell, han comenzado a procesar estas muestras y esperamos obtener resultados para su análisis e interpretación en las próximas semanas.

Estudios de Western Blot.

Durante mi estancia, tuve la oportunidad de realizar un curso práctico de Analisis de Western Blot en el Bosch Institute que me sirvió de base para planificar la experimentación que precisábamos conjuntamente con el personal técnico de soporte a la investigación del laboratorio del Profesor Campbell. Tal y como se especifica en la Tabla 1 realizamos las axotomías en 4 grupos de animales para aquellos tiempos de supervivencia donde pensamos que podíamos detectar los cambios más significativos en la expresión proteica. Los cerebelos y troncos cerebrales de los animales se procesaron y realizamos una cuantificación de la concentración proteica en todas las muestra previamente a la electroforesis, transferencia e immunoblotting para la detección de OPN, CD44, Alpha-5 integrin, Alpha-6 integrin, ICAM-1, iC3b y galanina. Durante la última parte de mi estancia

testamos y pusimos a punto la concentración óptima de trabajo de la mayor parte de anticuerpos, pero no dió tiempo de procesar todas las muestras. En estos momentos el personal técnico del laboratorio del Profesor Campbell está procesando las muestras.

Estudios de Citometría de flujo

Con objeto de realizar una estimación de la expresión de CD44, el receptor de OPN en las poblaciones de microglía, macrófagos y linfocitos, procesamos diferentes grupos experimentales (Ver tabla I) y realizamos sobre muestras de cerebelo y troncos cerebrales ipsilaterales y contralaterales de los diferentes tiempos de supervivencia las siguientes combinaciones de fluorocromos:

1) CD45 / CD11b / CD44
2) CD3 / CD4 /CD8 y CD44

El análisis de los resultados que hemos estado realizando, tras mi regreso a España, mediante el programa FlowJo, version 8.7, confirman algunos de los resultados que hemos observado mediante técnicas histológicas. Hemos podido constatar que en el ratón transgénico para IL6, en el núcleo facial intacto, existe un mayor porcentaje de células de microglía activadas (CD11b+/CD45+mid) y de macrófagos (CD11b+/CD45+high) que expresan inmunofluorescencia CD44, la cual es prácticamente inexistente en los animales WT, donde las células de microglia expresan mayoritariamente un perfil CD11b+/CD45+low y un porcentaje mínimo son CD44+.

La axotomía del nervio facial induce cambios en el núcleo facial afectado tanto en el WT como en el IL6+ pero con una evolución diferente: En los animales WT los cambios son aparentes a los 14 días postlesión cuando la axotomía induce una clara activación de las células microgliales observándose más perfiles CD11b+/CD45+mid y macrófagos CD11b+/CD45+high que en algunos casos expresan CD44 . A 21 días postlesión estos porcentajes de células reactivas empiezan a disminuir y consecuentemente la expresión de CD44. En los animales transgénicos, también se observan cambios y a partir de los 3 dias ya se observa un aumento del nivel de inmunofluorescencia para CD44 en ambas poblaciones CD11b+/CD45+mid y CD11b+/CD45+high que persisten en los tiempos de 14 y 21 días postlesión indicando que la sobrexpresión de IL6 puede inducir un estado de activación persistente de ambas poblaciones microglía y macrófagos.

No obstante, la expresión de CD44 asociada a células de microglía activada CD11b+/CD45+mid y macrófagos CD11b+/CD45+high es, tanto en el animal WT como en el IL6+, bastante restringida en comparación con la observada en las poblaciones linfocitarias

estudiadas. En este sentido nuestras observaciones indican que todos los linfocitos infiltrados tras la axotomía, tanto en WT como en IL6, ya sean CD4+ o CD8+ son siempre CD44+.

Beneficios derivados de la estancia

Además de los interesantes resultados obtenidos, que serán fuente de publicaciones en revistas especializadas dentro del campo, la estancia en este centro de investigación ha tenido una gran repercusión en las investigaciones que llevamos a cabo y las que plantearemos en el futuro próximo puesto que:

1) Me ha permitido adquirir experiencia en la realización de técnicas como la RPA y la citometría de flujo y en el ulterior análisis de los resultados. Esto es de gran interés para mi equipo de investigación puesto que podremos planificar la investigación futura conjuntando estas técnicas propias de biología molecular e inmunología con las de inmunohistoquímica que de forma rutinaria desarrollamos en nuestro laboratorio.

2) Seguimos trabajando en estrecha colaboración con los miembros del equipo del Prof. Cambpell, procesando y analizando en ambos laboratorios, parte del material generado (western blotting y RPAs)

3) Ha contribuido ha estrechar los lazos de colaboración futura entre ambos laboratorios, hecho que se ha materializado en la petición conjunta de dos ayudas de investigación: una solicitada en la convocatoria del MEC en la que yo aparezco como IP y el Prof. Campbell como Investigador colaborador, y otra ayuda de investiación que hemos solicitado al NIH en la que el Prof. Campbell consta como IP y nuestro laboratorio en la UAB consta como colaborador. El objeto de estas ayudas es extender, en base a los resultados obtenidos, las observaciones a otros modelos de lesión que impliquen el sistema inmunitario en diferente grado.

4) Hemos abordado, conjuntamente entre ambos laboratorios, la creación y caracterización de un ratón transgénico que sobreexpresará Interleucina 10 bajo promotor GFAP. En la actualidad, utilizando las infraestructuras de nuestra univiersidad hemos inyectado ya la construcción que nos ha proporcionado el Prof. Campbell y hemos conseguido 3 líneas de ratones transgénicos viables que estamos amplificando. Con estos ratones transgénicos GFAP-IL10 tenemos un modelo único para proseguir nuestros estudios sobre reactividad glial en un microambiente anti-inflamatorio, no solo utilizando el paradigma de axotomía del nervio facial sino también utilizando otras aproximaciones como la degeneración anterógrada producto de la transección de la via perforante, o bien la inducción de EAE, como modelo de Esclerosis Multiple.)

Tabla 1. Resumen de los diferentes grupos experimentales

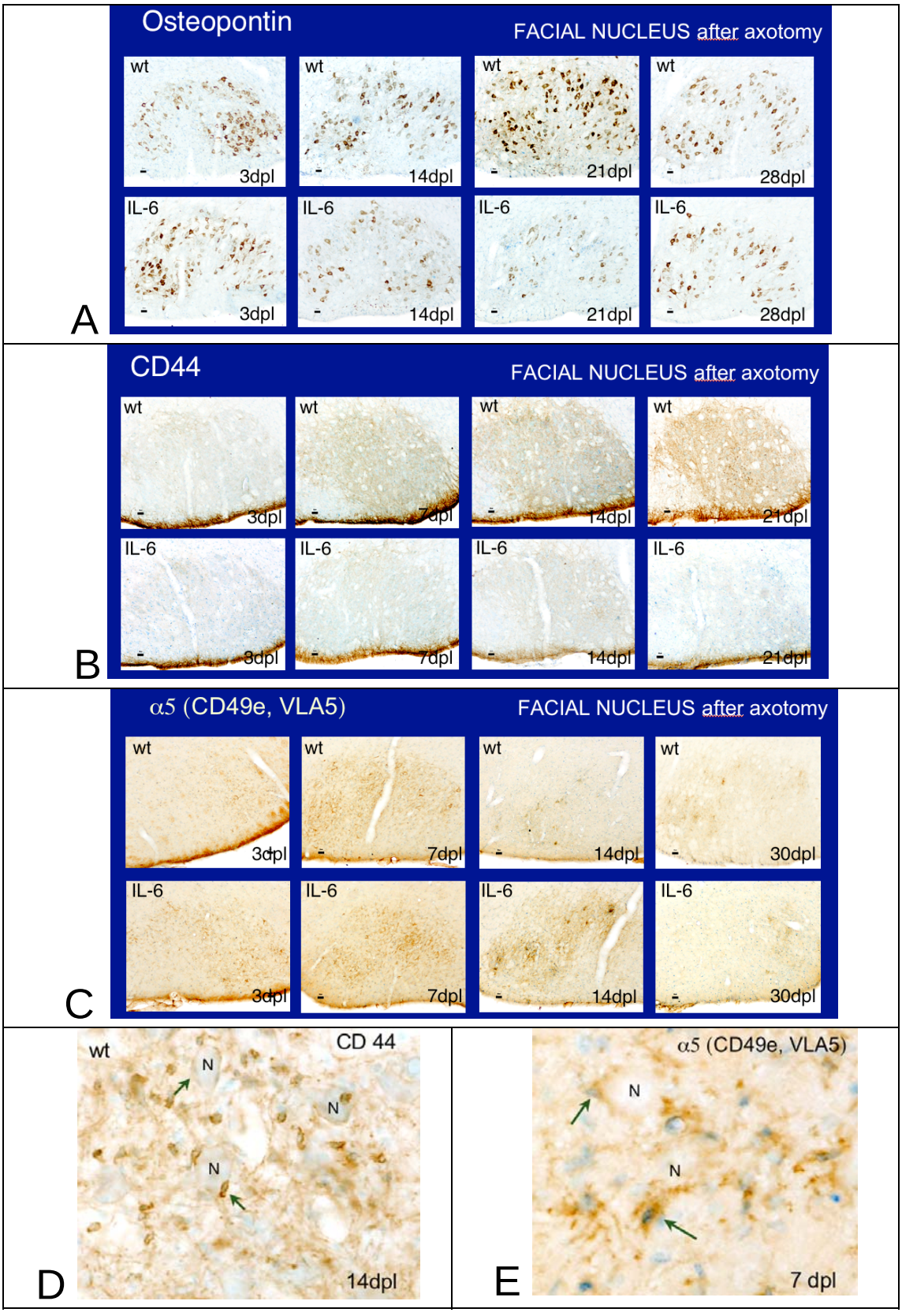
	Tiempos de supervivencia tras axotomía					
Técnicas	1	3	7	14	21	28
Inmunohistoquímica (1)	2WT/2IL6+	4WT/8IL6+ 2WT/2IL6+	4WT/6IL6+ 3WT/2IL6+	7WT/8IL6+ 2WT/2IL6+	4WT/8IL6+ 2WT/3IL6+	4WT/6IL6+ 2WT/2IL6+
RPA (2)		4WT/4IL6+ 3WT/3IL6+		4WT/4IL6+ 3WT/3IL6+		
Western blot	2WT/2IL6+	3WT/3IL6+		3WT/3IL6+	3WT/3IL6+	
Citometría de flujo		3WT/3IL6+		3WT/3IL6+	3WT/3IL6+	

Se indica el número de animales transgénicos (IL6+) y controles (WT) utilizados en cada grupo experimental en los diferentes tiempos de supervivencia. Además de estos animales que fueron axotomizados se incluyeron un mínimo de 2 animales WT y 2 IL6+, controles sin axotomía (sham) en cada grupo experimental.

(1) Se indica en la primera fila los animales procesados para criostato y en la fila inferior los animales procesados con vibratomo
(2) Se indica en las dos filas el número de animales utilizados en los dos experimentos realizados (ver explicación más abajo)

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Fig. 1. Detección inmunohistoquímica de OPN y sus receptores CD44 y la subunidad CD49e de la integrina Alpha-5 ß1. En A, B y C puede compararse las diferencias en la expresión de estas moléculas entre los animales WT y los transgénicos IL6+. Mientras la Osteopontina está asociada a perfiles de motoneuronas (A), puede advertirse en D y E que sus receptores CD44 y Alpha-5 se observan en relación a una población de células perineuronales (flechas)



Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa

Fig. 2. Ribonucleoside Protein Assay (RPA) para Chemokinas. Resultados negativos: problemas técnicos diversos en el procesamiento de las muestras condujeron a que tuvieramos que repetir los grupos experimentales

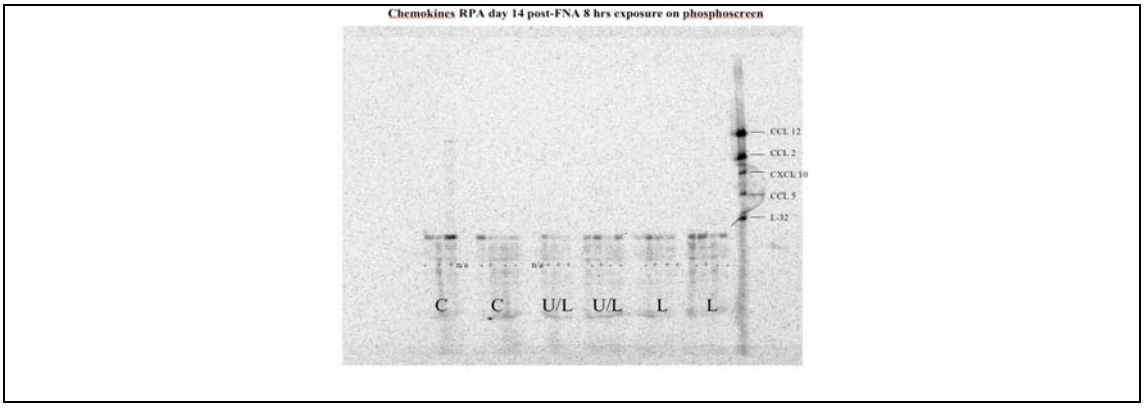
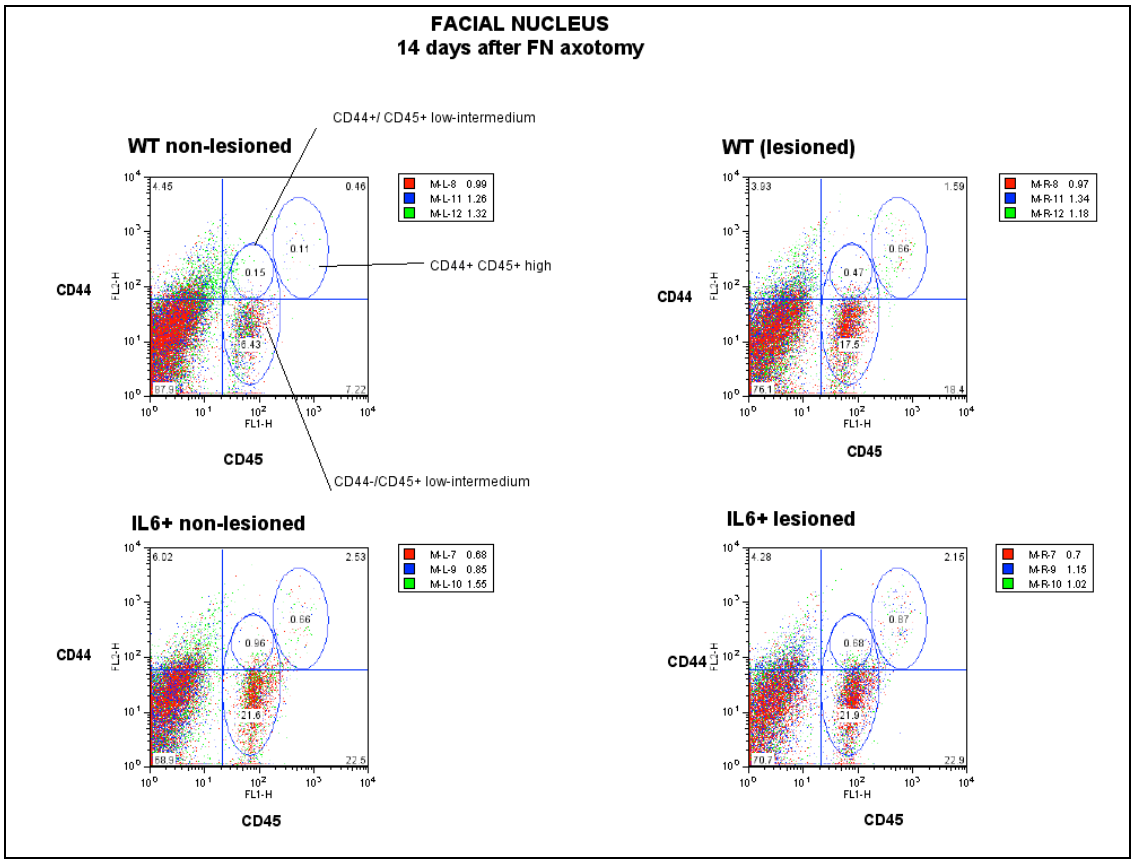



Fig. 3. Citometría de Flujo. Análisis mediante el programa FlowJo de la población microglial y macrófagos que expresan CD44 tras axotomía del nervio facial en los grupos de animales WT e IL-6 a los 14 dias de supervivencia.