UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Propuesta TFG. Curso 2026/2027

GRADO: Grado en Biología

CÓDIGO DEL TFG: 200-011-2026/2027

1. DATOS BÁSICOS DEL TFG:

Título: Estudio del papel de la fosfatidilserina en la fagoptosis microglial de células de Purkinje en el cerebelo postnatal de ratón.

Descripción general (resumen y metodología):

La microglía constituye la población de células inmunitarias de origen macrofágico residentes en el sistema nervioso central (SNC). En los últimos años diferentes investigadores han descubierto que las células microgliales pueden realizar una gran diversidad de funciones en el SNC, tanto durante el desarrollo como en el adulto, normal o patológico. Entre ellas, se ha demostrado que las células microgliales de diferentes especies, incluidos los primates, son capaces de promover procesos de muerte celular programada (apoptosis) en subpoblaciones celulares específicas durante el desarrollo del SNC (Marín-Teva et al., 2004, 2011, 2014; Mallat et al., 2005; Bessis et al., 2007; Wakselman et al., 2008; Cunningham et al., 2013; Anderson et al., 2019). En un estudio pionero demostramos por primera vez que las células microgliales promueven la apoptosis de algunas células de Purkinje en el cerebelo de ratones postnatales de 3 días de vida (P3) mediante un mecanismo que incluye la formación de contactos fagocíticos y la producción de moléculas citotóxicas como las especies reactivas de oxígeno, el cual fue denominado “muerte celular promovida por fagocitosis” (Marín-Teva et al., 2004), y más recientemente “fagoptosis” (Brown y Neher, 2012). Además, nuestros resultados sugieren fuertemente que células de Purkinje comprometidas a morir deberían expresar en su superficie señales "eat-me" aún no caracterizadas que facilitarían su reconocimiento por las células microgliales y que estimularían el proceso de fagoptosis.

En los mamíferos, la señal "eat-me" mejor caracterizada es la fosfatidilserina (PS) (Lemke, 2013; Sierra et al., 2013), que es un fosfolípido presente en las membranas celulares de los eucariotas que muestra una marcada asimetría en su distribución en la bicapa lipídica. En las células sanas, se localiza en la monocapa interna de fosfolípidos de la membrana celular. Sin embargo, durante la apoptosis o en los estados de estrés celular, el PS se externaliza a la monocapa externa de la membrana celular, actuando potencialmente como una señal de fagocitosis sobre las células microgliales u otros fagocitos profesionales (Sierra et al., 2013; Brown y Neher, 2014). La externalización de PS puede estimular la fagocitosis de las células apoptóticas mediante la unión a receptores localizados en la membrana del fagocito, como Tim-4, BAI1, Estabilina-2, proteínas de la familia CD300, RAGE, integrinas alfavbeta3 o alfavbeta5, receptores de tirosina-quinasa de la familia Tyro3-Axl-Mertk (TAM) y CD91 (Park y Kim 2017). Esta unión puede ser directa o indirecta, a través de moléculas puente liberadas al espacio extracelular, como el MFG-E8, Gas6, proteína S, calreticulina o el componente C1q del complemento. Sin embargo, los receptores y las moléculas puente que participan en la fagocitosis de las células apoptóticas que expresan PS durante el desarrollo del SNC todavía no han sido bien caracterizadas.

Es importante destacar que en los últimos años diferentes estudios in vitro e in vivo sugieren fuertemente que la fagoptosis microglial de las neuronas también podría desempeñar un papel importante en los procesos neurodegenerativos (Neher et al., 2011, 2012, 2013; Fricker et al., 2012, 2018; Neniskyte et al., 2011, 2014, 2016; Neniskyte and Brown, 2013; Brown and Neher, 2012, 2014; Zhao et al., 2015; Breslstaff et al., 2018). Estos estudios mostraron que la microglía reconoce la PS, expuesta de forma reversible en la superficie externa de la membrana de las neuronas apoptóticas, como una señal de "eat-me". Así, por ejemplo, se demostró que las células microgliales, estimuladas in vitro por tratamiento con el péptido beta-amiloide o en presencia de neuronas con inclusiones de proteína tau (características de la enfermedad de Alzheimer), liberan

MFG-E8, que media la unión de la PS del superficie neuronal al receptor de vitronectina (integrina alfavbeta3/5), presente en la membrana microglial, promoviendo así la fagoptosis microglial de las neuronas con la intervención de especies reactivas de oxígeno (Neniskyte et al., 2011, 2016; Neniskyte y Brown, 2013; Breslstaff et al., 2018). También es sabido que las células microgliales también pueden expresar receptores de tirosina quinasa TAM y sus ligandos, los cuales constituyen otro sistema de receptores importante y moléculas puente para el reconocimiento de PS que podrían contribuir a la fagocitosis de las neuronas apoptóticas, actuando sinérgicamente con el sistema receptor de vitronectina. En este sentido, investigadores de dos grupos dirigidos por los Profesores Axel Nimmerjahn y Greg Lemke, demostraron que los receptores de tirosina quinasa TAM son actores clave en el mecanismo de la fagocitosis microglial de las células con PS externa en su superficie, presente en el cerebro adulto después de la aplicación intracraneal de vectores basados en adenovirus (Tufail et al., 2017) o en regiones neurogénicas del SNC (Fourgeaud et al., 2016). Es bien sabido que los receptores TAM están involucrados en la fagocitosis de las células apoptóticas y que regulan la respuesta inmune innata en los fagocitos profesionales (Rothlin et al., 2007; Lemke, 2013; Zagórska et al., 2014). Además, la activación de los receptores TAM depende de la externalización de PS en la superficie celular de las células apoptóticas y está mediada por sus ligandos Gas6 y proteína S, que se unen directamente a la PS, actuando como un puente con los receptores TAM (Lemke, 2013). Aunque todos los receptores TAM (Tyro3, Axl y Mertk) se expresan en el SNC, Axl y Mertk son los únicos expresados en microglía (Grommes et al., 2008; Fourgeaud et al., 2016). Un trabajo de los grupos de los Dres. Nimmerjahn y Lemke demostró que las células apoptóticas o estresadas pueden rescatarse de la muerte y la fagocitosis microglial mediante la inhibición de la externalización de PS en las células apoptóticas o la eliminación de los receptores TAM o sus ligandos en las células microgliales. Estos resultados sugieren fuertemente que estas células mueren por un proceso de fagoptosis dependiente de los receptores TAM microgliales. Esto concuerda con los resultados observados en un modelo de ratón con isquemia cerebral focal que muestran que la eliminación de Mertk reduce los déficits motores y la fagocitosis de las neuronas (Neher et al., 2013).

En el presente trabajo se realizará un estudio del grado de externalización de la PS en las células de Purkinje que muestran contactos fagocíticos con células microgliales y que expresan marcadores apoptóticos como la caspasa-3 activada en el cerebelo P3 de ratones C57BL/6. Para este propósito, utilizaremos un indicador de la viabilidad celular y la apoptosis sensible a la polaridad (pSIVA), que es un derivado de la anexina B12 que no puede atravesar las membranas celulares y que emite fluorescencia verde solo al unirse a la PS expuesta en la superficie externa de la membrana celular. pSIVA tiene las ventajas adicionales de que se une de forma reversible a la PS, puede usarse tanto in vivo como in vitro y que resiste los métodos convencionales de fijación histológica. Realizaremos cultivos organotípicos de cerebelo de ratón P3 como se ha descrito anteriormente (Marín-Teva et., 2004) que serán tratados con pSIVA y posteriormente fijados e inmunomarcados con diferentes combinaciones de anticuerpos, como anti-calbindina (un marcador de células de Purkinje), anti-caspasa-3 activada y anticuerpos específicos para células microgliales como anti-Iba1. Además, se utilizará la isolectina B4 de Griffonia simplicifolia, que marca tanto las células microgliales como las células endoteliales. También realizaremos inyecciones estereotáxicas in vivo de pSIVA en el cerebelo de ratones P3 que posteriormente se fijarán, seccionarán y tratarán con las mismas técnicas de marcaje utilizadas para los cultivos organotípicos. Alternativamente, también se usarán anticuerpos anti-PS como se ha descrito previamente (Zhao et al., 2015). Las observaciones de estos experimentos se realizarán en un microscopio confocal. Además, se realizarán observaciones con un microscopio electrónico de transmisión para estudiar a nivel ultraestructural los contactos fagocíticos de las céulas microgliales con las neuronas de Purkinje.

Tipología: Trabajos experimentales, de toma de datos de campo o de laboratorio.

Objetivos planteados:

El objetivo del presente estudio es analizar el papel de la fosfatidilserina en la fagoptosis microglial de las células de Purkinje del cerebelo de ratón durante el desarrollo postnatal.

Bibliografía básica:

Anderson et al. (2019) J Neurosci. 39(11):2025-2040.
Bessis et al. (2007) Glia. 55:233-8.
Brelstaff et al. (2018) Cell Rep. 24:1939-1948.
Brown and Neher (2012) Trends Biochem Sci. 37:325-332.
Brown and Neher (2014) Nat Rev Neurosci. 15:209-216.
Cunningham et al. (2013) J Neurosci. 33:4216-4233.
Fourgeaud et al. (2016) Nature. 532:240-244.
Fricker et al. (2012) J Neuroinflammation. 9:196.
Fricker et al. M, (2018) Physiol Rev. 98:813-880.
Grommes et al. (2008) J Neuroimmune Pharmacol. 3:130-140.
Lemke (2013) Cold Spring HarbPerspect Biol. 5:a009076.
Mallat et al. (2005) Curr Opin Neurobiol. 15:101-107.
Marín-Teva et al. (2004) Neuron. 41:535-547.
Marín-Teva et al. (2011) Neuron Glia Biol. 7:25-40.
Marín-Teva et al. (2014) En: ME Tremblay, A Sierra (eds.) Microglía in Health and Disease, Springer, New York. pp.175-192.
Neher et al. (2011) J Immunol.186:4973-4983.
Neher et al. (2012) Front Pharmacol. 3:27.
Neher et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA. 110:E4098-107.
Neniskyte and Brown (2013) J Neurochem. 126:312-317.
Neniskyte et al. (2011) J Biol Chem. 286:39904-39913.
Neniskyte et al. (2014) FEBS Lett. 588:2952-2956.
Neniskyte et al. (2016) Int J Biochem Cell Biol. 81:346-355.
Park SY, Kim IS. (2017) Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. Exp Mol Med. 49(5):e331.
Rothlin et al. (2007) Cell. 131:1124-1136.
Sierra et al. A, (2013) Front Cell Neurosci. 7:6.
Tufail et al. (2017) Neuron. 93:574-586.
Wakselman et al. (2008) J Neurosci. 28:8138-8143.
Zagórska et al. (2014) Nat Immunol. 15:920-928.
Zhao et al. (2015) EMBO Mol Med. 7:1179-1197.

Recomendaciones y orientaciones para el estudiante:

Plazas: 1

2. DATOS DEL TUTOR/A:

Nombre y apellidos: JOSÉ LUIS MARÍN TEVA

Ámbito de conocimiento/Departamento: BIOLOGÍA CELULAR

Correo electrónico: jlmarin@ugr.es

3. COTUTOR/A DE LA UGR (en su caso):

Nombre y apellidos:

Ámbito de conocimiento/Departamento:

Correo electrónico:

4. COTUTOR/A EXTERNO/A (en su caso):

Nombre y apellidos:

Correo electrónico:

Nombre de la empresa o institución:

Dirección postal:

Puesto del tutor en la empresa o institución:

Centro de convenio Externo:

5. DATOS DEL ESTUDIANTE:

Nombre y apellidos: SARA DEL OLMO MARTINEZ

Correo electrónico: saradelolmo@correo.ugr.es