



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

IDIBAPS



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

Tesis doctoral presentada por
Kamil Pérez Capote
Barcelona, febrero 2006

DISCUSIÓN GENERAL

5- DISCUSIÓN GENERAL

El funcionamiento normal del cerebro depende de las estrechas interacciones que se establecen entre las neuronas y las células gliales tanto durante el desarrollo como en el adulto. Además, la interacción entre estas dos poblaciones celulares también es esencial en la respuesta del SNC en condiciones patológicas (Polazzi y Contestabile, 2002; Chen y Swanson, 2003). Tanto la astroglia como la microglía son capaces de responder al daño neuronal con cambios morfológicos y funcionales constituyendo lo que se denomina activación glial o glía reactiva. Se ha sugerido que la activación glial contribuye a la disfunción neuronal y a la consecuente muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Edleston y Mucke, 1993; Kreutzberg, 1996; González-Scarano y Baltuch, 1999; Liu y Hong, 2003). Se desconoce la naturaleza de las señales que inducen la activación glial en respuesta al daño neuronal y es cuestionado el papel nocivo o beneficioso de la glía reactiva para las neuronas. Se sabe que la glía reactiva es capaz de producir factores de crecimiento, citocinas, NO y neuropéptidos que pueden tener efectos tanto sobre las neuronas como sobre las propias células gliales y que pueden estar relacionados con procesos de neuroprotección o de neurodegeneración (Raivich y cols., 1999; Streit y cols., 1999). Se ha propuesto que en presencia de daño neuronal tanto el contacto directo entre las neuronas y las células gliales como los factores solubles que secretan las neuronas dañadas juegan un papel relevante en la respuesta frente a un estímulo (Neumann, 2001). La activación de las células gliales después de una lesión neuronal principalmente refleja un mecanismo fisiológico cuyo objetivo primordial es la neuroprotección. Sin embargo, la pérdida de la comunicación específica entre las neuronas dañadas y las células gliales puede promover una activación excesiva que conlleve a un estado de inflamación persistente, y como consecuencia, inducir y/o exacerbar la neurodegeneración (Streit, 1996; Bruce-Keller, 1999; Streit y cols., 1999; Streit, 2002; Hanisch, 2002).

Dada la complejidad que supone estudiar los mecanismos moleculares implicados en la activación glial *in vivo*, se han desarrollado distintos modelos experimentales de activación glial *in vitro*, que han proporcionado informaciones muy valiosas acerca de la respuesta de las células gliales frente a una variedad de estímulos.

Se pueden utilizar diferentes tipos de cultivos para estudiar la función de las células gliales: cultivos enriquecidos en determinado tipo de célula glial, cultivos mixtos de glía o de neurona-glía o cocultivos de neurona-glía. Es importante tener en cuenta que aunque la utilización de cultivos nos permite estudiar de manera simplificada el tipo de alteraciones que se producen en respuesta a un estímulo nocivo, el comportamiento de los diferentes tipos celulares del sistema nervioso no es el mismo cuando se encuentran aislados que cuando están en interacción entre sí. Dentro de este contexto durante el desarrollo de esta tesis abordamos el estudio de las interacciones neurona-glía mediante aproximaciones *in vitro* utilizando cultivos primarios de células de cerebelo. La ventaja de utilizar este tipo de cultivos es que de manera muy sencilla a partir de una población de células obtenida mediante un protocolo único pueden obtenerse cultivos enriquecidos en neuronas, cultivos neurona-glía y cultivos mixtos de glía (principalmente astrocitos y microglía). A nosotros nos interesaban sobretudo los cultivos neurona-glía, puesto que se conoce que el comportamiento tanto de las neuronas como de las células gliales es distinto cuando estas se encuentran solas que cuando están mezcladas. Sin embargo, el poder disponer paralelamente de cultivos enriquecidos en neuronas y cultivos de glía nos ha permitido poner de manifiesto cuáles de los efectos que hemos detectado son debidos a la interacción neurona-glía y cuáles no.

Por una parte, los resultados obtenidos muestran cómo la presencia de células gliales puede modificar la respuesta neuronal a un determinado estímulo, en nuestro caso el aminoácido excitatorio glutamato. Hemos visto que la presencia de glía resulta neuroprotectora frente a la toxicidad del glutamato a las concentraciones más bajas de glutamato utilizadas, mientras que a concentraciones elevadas de glutamato la presencia de glía resulta neurotóxica. El efecto neuroprotector de la glía frente a la toxicidad del glutamato ha sido descrito previamente en la bibliografía. Lo que nos sorprendió es que este efecto neuroprotector fuera sustituido por un efecto neurotóxico a elevadas concentraciones de glutamato. En un principio atribuimos este hecho a que probablemente la glía había pasado de un estado de reposo o quiescencia a un estado activado. De hecho, pudimos comprobar la existencia de cambios morfológicos en la glía en presencia de elevadas concentraciones de glutamato, lo que estaría a favor de la presencia de glía reactiva. También hemos comprobado que estos cambios sufridos por las células gliales no son debidos a un efecto directo del glutamato sobre ellas, sino que

son consecuencia de la muerte neuronal por él inducida. La activación glial en estas condiciones podría deberse tanto a la pérdida de comunicación entre las neuronas y las células gliales como a la liberación de factores por las neuronas dañadas.

Para corroborar el hecho de que la presencia de activación glial pudiera exacerbar los efectos neurotóxicos del glutamato pretratamos nuestros cultivos con LPS, agente ampliamente utilizado para inducir activación glial, a una concentración que por sí sola no inducía muerte neuronal pero sí era capaz de inducir cambios reactivos en las células gliales. Con ello pudimos comprobar que realmente la presencia de la glía en estado activado producía un incremento en la neurotoxicidad del glutamato. Estos resultados tienen importancia en cuanto a que muestran que la glía reactiva además de incrementar el efecto tóxico del glutamato puede hacer que una concentración no neurotóxica de glutamato se transforme en neurotóxica. Por lo tanto, estos datos están a favor de la hipótesis de que la preexistencia de cierta reactividad glial en el cerebro puede hacer que las neuronas vean alterado su funcionamiento en respuesta a un estímulo que en condiciones normales resultara inofensivo. Esto se ha postulado que podría tener un papel importante en el desarrollo y progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas (Sapp y cols., 2001; Teismann y cols., 2002; Orr y cols., 2002; Nagele y cols., 2004; Blasko y cols., 2004; Shin y cols., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, la interacción existente entre las neuronas y las células gliales, ya sea física como a través de factores solubles, determina el buen funcionamiento del cerebro. En presencia de daño neuronal, se ha sugerido que alteraciones en los contactos neurona-glía y los factores liberados por las neuronas dañadas pueden tener un papel importante en la activación glial. En base a esto, caracterizamos distintos aspectos del patrón de activación glial que resultaba en nuestros cultivos neurona-glía al inducir muerte neuronal con glutamato. También estudiamos si este patrón de activación glial podía estar modificado al inducir un tipo de muerte neuronal distinta a la producida por el glutamato, que induce muerte neuronal por excitotoxicidad. Para ello, consideramos un modelo experimental ampliamente utilizado para inducir muerte apoptótica en las neuronas granulares de cerebelo en cultivo, basado en cultivar estas células en ausencia de las concentraciones despolarizantes de potasio que necesitan para sobrevivir. Partíamos de la idea de que el tipo de muerte neuronal determina los cambios que se producen en la interacción física

neurona-glía y los factores liberados por las neuronas dañadas y por lo tanto pueden determinar el patrón de activación glial resultante. Los resultados obtenidos corroboraban totalmente esta hipótesis. Así, pudimos comprobar que en respuesta a la muerte neuronal por excitotoxicidad las células gliales respondían mostrando un patrón de activación relacionado con una respuesta inflamatoria, acompañada de proliferación y fagocitosis. Por el contrario, la respuesta inflamatoria y la proliferación estaban ausentes en la glía en respuesta a la muerte neuronal por apoptosis, mientras que las células gliales claramente incrementaban su actividad fagocítica y de manera más inmediata que en el otro modelo de muerte neuronal. Las diferencias existentes en los dos patrones de activación glial en respuesta a la muerte neuronal pueden venir explicadas por las diferencias en el proceso de muerte neuronal en los dos modelos experimentales utilizados. En el caso de muerte neuronal por excitotoxicidad tras el tratamiento con elevadas concentraciones de glutamato, las neuronas experimentan una muerte rápida, que probablemente va acompañada de un vertido al espacio extracelular de material celular altamente reactivo y nocivo para las neuronas vecinas, que es capaz de inducir una respuesta rápida en las células gliales. Esta respuesta tiene un aspecto positivo en cuanto a que las células gliales eliminan este material del medio para mantener la homeostasis celular, pero al mismo tiempo provoca una respuesta inflamatoria que puede a su vez amplificar la activación glial y resultar perjudicial para las neuronas vecinas. En el caso de la muerte neuronal por apoptosis, las neuronas experimentan en fases muy iniciales del programa de muerte una serie de cambios en la membrana celular, como la externalización de la fosfatidilserina, que actúan como señal para que las células gliales se activen e inicien la fagocitosis de las neuronas destinadas a morir al mismo tiempo que inhiben la reacción inflamatoria. Esta respuesta presenta las ventajas, respecto a la anterior, de que dado que la fagocitosis se induce de manera muy rápida las neuronas dañadas no acaban vertiendo al espacio extracelular su contenido, además de que la ausencia de respuesta inflamatoria elimina aspectos negativos de la activación glial, en cuanto a la producción de factores neurotóxicos y la amplificación de la activación glial.

Los resultados obtenidos también muestran que no existe un patrón único de activación glial, sino que los diferentes aspectos asociados a este fenómeno no tienen por qué coexistir, de manera que puede ser posible actuar potenciando los efectos

beneficiosos e inhibiendo los aspectos nocivos de la activación glial. Esto tiene especial relevancia dado que, en determinados procesos neurodegenerativos en los que se ha descrito la presencia de activación glial, se ha postulado que mientras ciertos aspectos de la activación glial son negativos, otros pueden tener un efecto beneficioso. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer se ha sugerido el efecto beneficioso que puede tener la actividad fagocítica de la microglía activada, por lo que respecta a la eliminación de los depósitos de β -amiloide, y el efecto nocivo de los productos potencialmente neurotóxicos producidos por la glía activada que potencian la extensión de una respuesta inflamatoria (Akiyama y cols., 2000; Rogers y Lue, 2001; Rogers y cols., 2002). Por lo tanto, sería muy interesante profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares implicados en cada uno de los aspectos que pueden constituir el proceso de activación glial, a fin de poder actuar sobre ellos desde un punto de vista terapéutico.

El trabajo realizado ha servido, entre otros aspectos, para llegar al convencimiento de que un proceso bastante conocido y ampliamente estudiado como la activación glial puede ser mucho más sutil de lo que puede aparentar. Estudios *in vivo* muestran que la activación glial en respuesta al daño neuronal cursa con una serie de cambios morfológicos y funcionales que suelen ir acompañados de migración, proliferación y fagocitosis. Generalmente, cuando se estudia la activación glial *in vitro* utilizando agentes con una acción directa sobre las células gliales, como por ejemplo el LPS o diferentes citocinas, se observan cambios muy aparentes en la morfología celular y en la expresión de una serie de factores relacionados con una reacción inflamatoria. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido muestran que no siempre se producen todos estos cambios a la vez, incluso en situaciones en las que el resultado final es el mismo: la muerte neuronal. Por lo tanto, la activación glial es un proceso que no sólo se produce frente a estímulos muy diferentes, sino que también tiene la capacidad de responder de forma diferencial a estos estímulos.