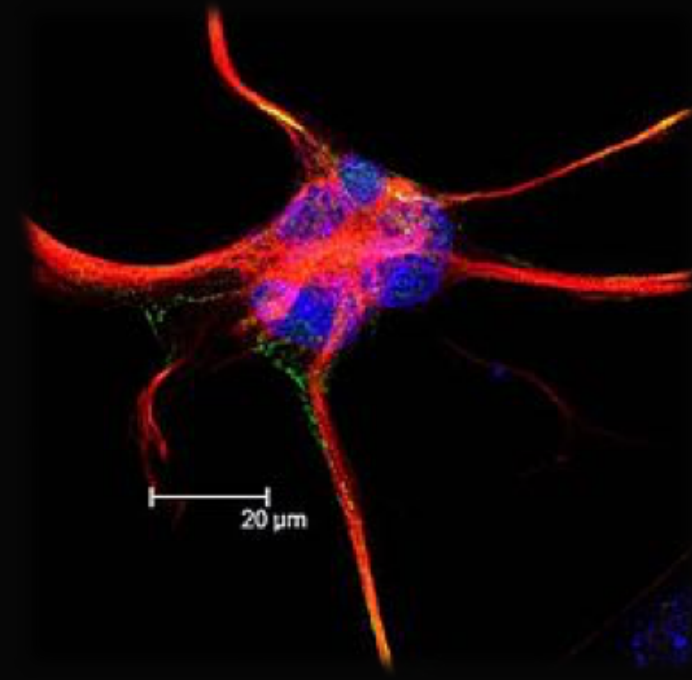


La liberación de GABA por los astrocitos reactivos perjudica a la memoria en modelos de ratón de Enfermedad de Alzheimer

Presentado por Aizpurua de Arteche, G.¹, Ciriza Roustán, F.¹

¹Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid



INTRODUCCIÓN

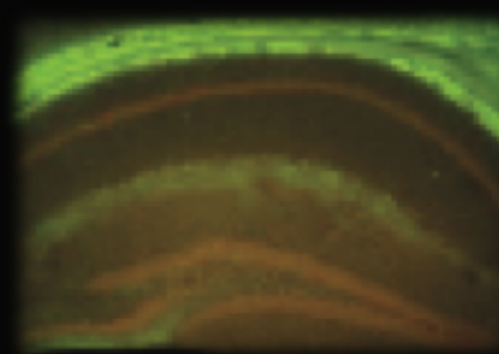
En la Enfermedad del Alzheimer (AD), el fallo en la memoria es una de las características más importantes. Aunque se ha visto que existen astrocitos reactivos alrededor de placas de β -amiloide, su papel dentro del fallo en la memoria ha sido poco descrito. En este artículo, mostramos que el número anormal de astrocitos es el causante del aumento de concentración del neurotransmisor GABA gracias a la enzima monoamina oxidasa-B (Maob) y su liberación masiva mediante el canal 1 de bestrofina (Best1). En el giro dentado del hipocampo, el GABA liberado reduce la probabilidad de espiga de las células granulares debido a la actuación presináptica de los receptores de GABA. Mediante la supresión de la producción o la liberación de GABA de los astrocitos se repone la probabilidad de pico desapareada, la plasticidad sináptica y el aprendizaje de la memoria en ratones. Al observar los cerebros humanos con AD, existe una relación entre la presencia de Maob y la producción de GABA, las cuales están significativamente sobrerreguladas. En este artículo se propone una inhibición de la liberación o la producción de GABA en el astrocito como una terapia efectiva para tratar el fallo en la memoria de pacientes con AD.

¿QUÉ SABEMOS?

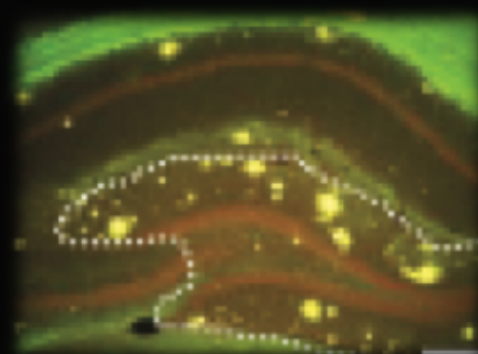
La Enfermedad del Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que provoca pérdida en la memoria y muerte neuronal. Esto se debe a la existencia de acumulaciones de la proteína β -amiloide y a la disfuncionalidad d el proteína tau. Uno de de los lugares del cerebro más afectados es el hipocampo y dentro de este, el giro dentado (GD). Diversos estudios encontraron astrocitos llamados reactivos por su actuación anormal debido a cambios tanto morfológicos como genéticos cerca de las placas, con un aumento en los niveles de Calcio que provoca una mayor liberación de neurotransmisores como GABA. Este neurotransmisor es el inhibidor por excelencia del Sistema Nervioso y se ha encontrado una mayor concentración de GABA en el giro dentado en enfermos de AD. GABA es sintetizado por la glutamato descarboxilasa y su liberación puede ser fásica (de terminal presináptico a postsináptico) o tónica (liberado por astrocitos).

Tiene tres tipos de receptores (GABA_A, GABA_B y GABA_C). El efecto de este aumento de GABA en AD provoca una pérdida de memoria en la Enfermedad del Alzheimer. La liberación de GABA tónica es propia del cerebelo, en donde para su liberación se usa los canales Best1 que liberan glutamato en condiciones normales. Toda esta información nos hace formularnos algunas preguntas que se resolverán en este artículo por lo que los OBJETIVOS serán:

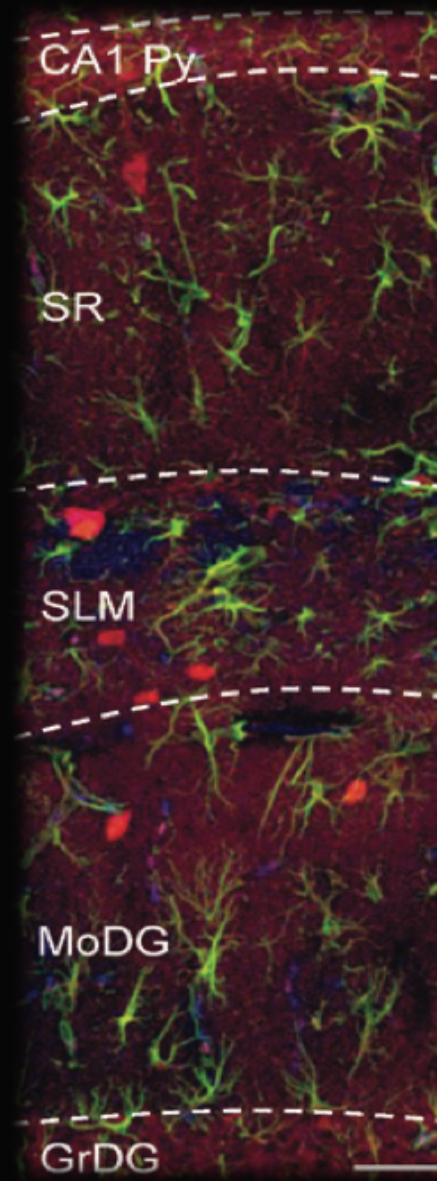
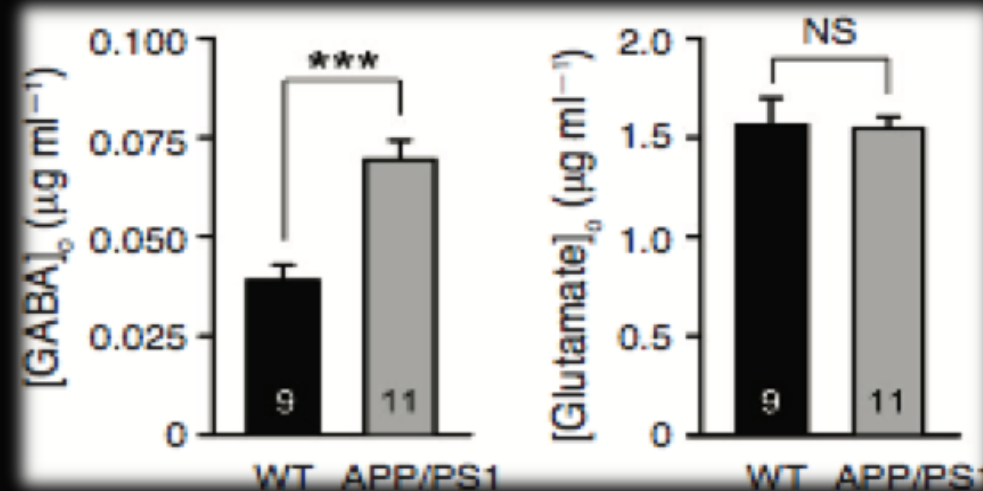
1. Entender cómo se libera GABA en el GD y qué tipo de liberación se produce
2. Demostrar la relación entre el aumento de astrocitos reactivos y la liberación anormal de GABA
3. Conocer los mecanismos por lo que aumenta la expresión de GABA
4. Testar alguna posible terapia para el fallo en la memoria delos pacientes de AD
5. Extrapolar los resultados encontrados en ratón a seres humanos.



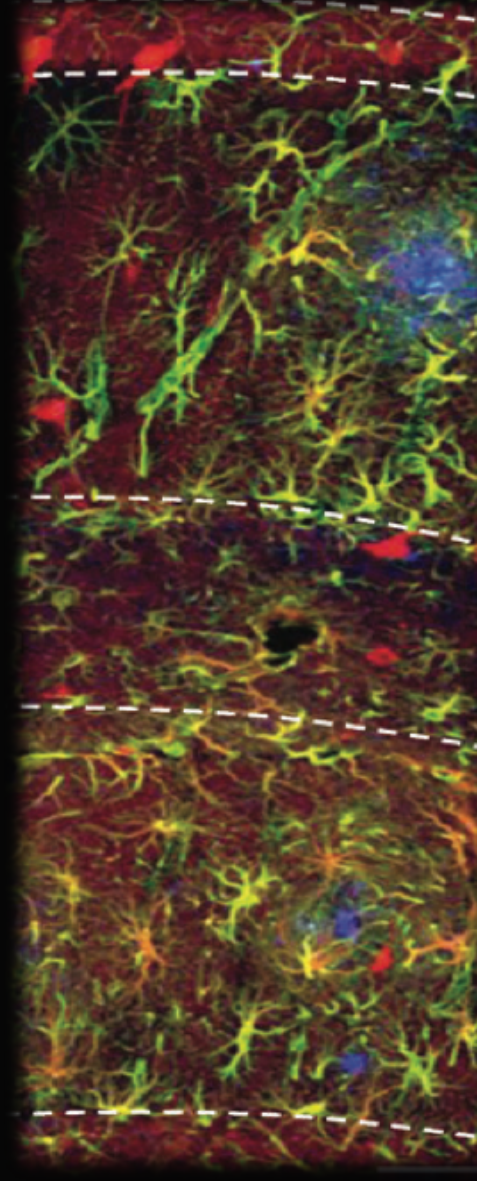
wt



APP/PS1



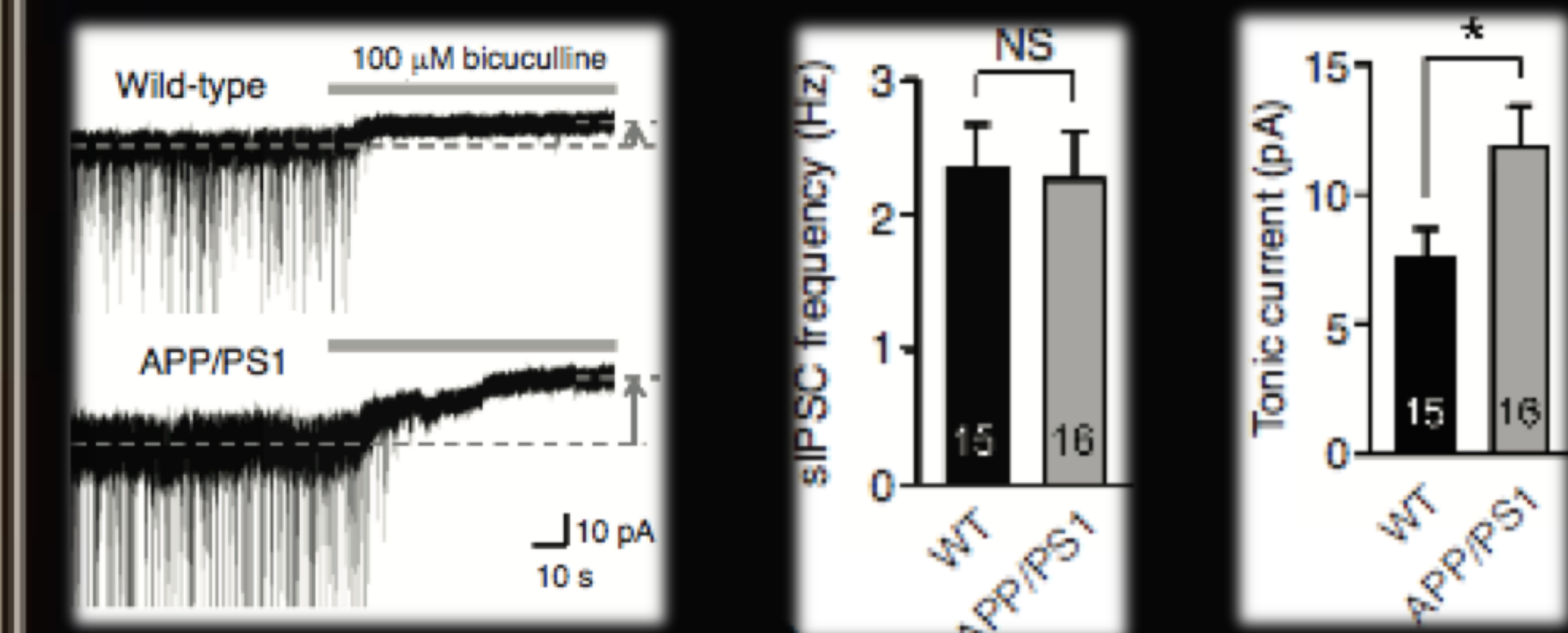
wt



APP/PS1

RESULTADOS

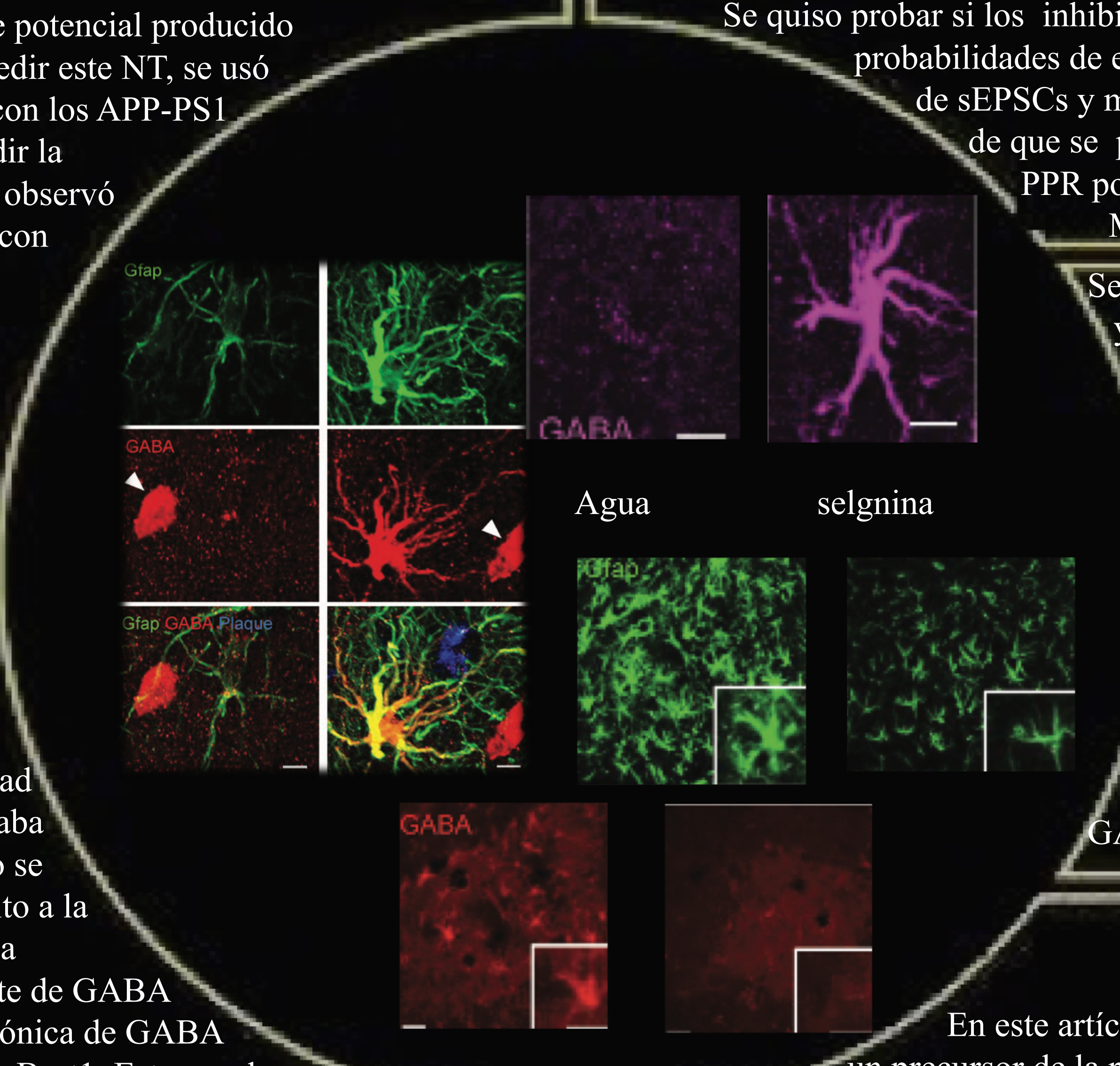
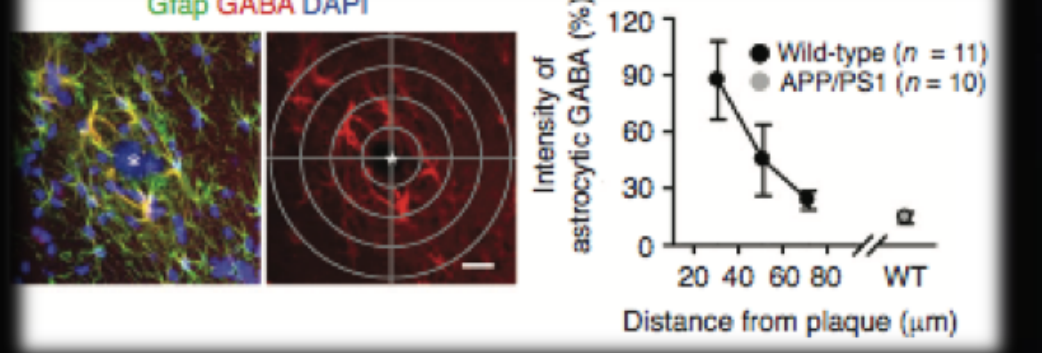
Debido al conocimiento de la existencia de una liberación tónica exclusiva en su mayoría en el cerebelo, se estudió cuál era la propia del hipocampo en ratones con AD. Durante diversos estudios, se vio que los ratones mutados en la proteína amiloide empezaban a desarrollar placas a las 6 semanas de edad, sin embargo, no había muerte celular hasta los 12 meses y la pérdida de memoria se daba a partir de los 9 meses por lo que se empezó a estudiar el papel de los astrocitos alrededor de las placas, su liberación de GABA y el papel de esta dentro del funcionamiento de la memoria. Como ya hemos visto antes, existen dos tipos de liberación de GABA: fásica y tónica. Para entender el tipo de liberación que se da en la Enfermedad del Alzheimer se realizó un voltage-clamp donde se estudiaba las dos liberaciones dentro de estos ratones. Al estudiar la liberación fásico se midió en células granulares el cambio de potencial producido por el movimiento de GABA entre membranas (para solo medir este NT, se usó un inhibidor de receptor de glutamato). Al comparar los wt con los APP-PS1 no se pudo observar ninguna diferencia, mientras que al medir la liberación tónica con ayuda de un antagonista de GABA_A se observó una diferencia entre la liberación tónica de ratones mutados con los de wt.



Para comprobar este hecho, se midieron mediante inmunofluorescencia la presencia de GABA en astrocitos reactivos, donde se vio que el incremento de estos en organismos con AD era muy grande. No obstante, verdaderamente, la cantidad de GABA neuronal no cambiaba sino que solo se incrementaba la astrocitaria, es decir la de liberación tónica. Gracias a esto se pudo hacer una relación inversa entre la distancia del astrocito a la placa y la inmunorreactividad de GABA. Mediante la técnica sniffer-patch se midió la liberación de esa cantidad abundante de GABA astrocitaria pudiendo confirmarse que había una liberación tónica de GABA por parte de los astrocitos reactivos por medio de los canales Best1. Este canal se localiza también en cerebelo y en astrocitos liberando glutamato, además, se observo que la cantidad del nivel de Best 1 expresado era la misma en sujetos wt que en enfermos, sin embargo, su distribución era diferentes pues en sujetos wt estaba dispuesta en microdominios mientras que en ratones enfermos, su distribución era mayoritariamente en el soma del astrocito. A continuación quiso probarse si el GABA era sintetizado por el Maob, una de las tres enzimas fundamentales de la Putrescina, que es un compuesto que, junto a la Cadaverina, se encargan de la degradación de aminoácidos. Para comprobarlo se emplearon anticuerpos contra la putrescina, y se observó una mayor inmunorreactividad en los ratones APP/PS1, especialmente alrededor de placas amiloides. Para observar la relación entre Maob y APP/PS1, se realizó un ensayo colorimétrico y se observó una diferencia significativa de mayor actividad en el Giro Dentado (DG).

Para estudiar el papel del Maob en la síntesis del GABA, empleamos un inhibidor de Maob, la Selegilina, los resultados obtenidos sugieren que la putrefacción por Putrescina mediada por Maob es responsable de la producción de GABA en astrocitos. Se quiso por tanto comprobar si el exceso del GABA se debía a una sobreproducción del mismo, o a un déficit en su catabolismo, para ello se comprobó la expresión de la GABA transaminasa que es la enzima encargada de catabolizar el GABA, y se observó mayor cantidad de esta en neuronas que en astrocitos. Para comprobar si la Putrescina y la Beta Amiloide 42 causan la producción de GABA mediada por Maob, se realizó un sniffer-patch y se observó que tras tratamiento con Putrescina, la liberación de GABA por los astrocitos era considerablemente mayor. A continuación se probó que Best1 es responsable de la liberación de GABA en astrocitos del hipocampo.

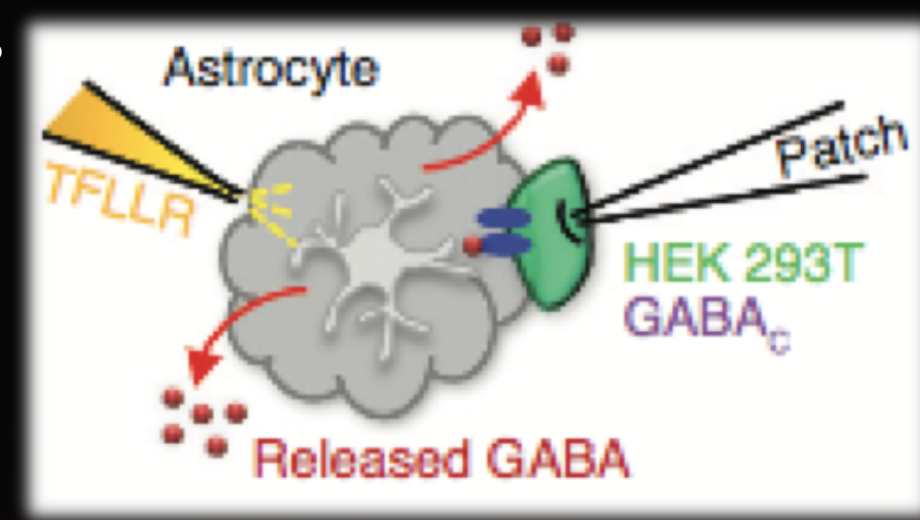
Se quiso probar si los inhibidores de Maob rescatan las probabilidades de espiga desapareada, y por medio de sEPSCs y mEPSCs se llegó a la conclusión de que se puede devolver las neuronas su PPR por medio de tratamiento con Selegilina ósilenciando el Maob o Best-1 mediando Maob sh-RNA ó Best-1 sh-RNA.



Se quiso probar si un inhibidor de Maob devuelve la plasticidad sináptica y la memoria, mediante sEPSCs en eGD, y se observó que era mucho más desapareado, sin embargo se podía devolver a su estado original mediante tratamiento con Selegilina. Para reafirmar estos resultados se realizaron experimentos con ratones, en cualquiera de los casos se obtuvo como resultado que se puede devolver la memoria a los ratones por medio de tratamiento con Selegilina. El problema de esto era la poca efectividad de la Selegilina en tratamientos de largo tiempo, se buscó un inhibidor alternativo: Safinamida, un inhibidor altamente reversible y selectivo de Maob que se mostró eficaz al devolver la probabilidad de espiga de forma prolongada. Por último, se analizó cerebros de sujetos humanos para demostrar un aumento en la presencia de astrocitos reactivos y de neurotransmisor GABA, pudiendo encontrar una relación positiva entre las expresiones.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

En este artículos se ha usado como modelo animal ratones mutados (APP/PS1) en un precursor de la proteína amiloide para que puedan desarrollar AD con mayor similitud a la Enfermedad del Alzheimer. Además se han llevado a cabo diversos experimentos para medir la liberación de GABA como sniffer patch o un whole-cell patch clamp. Estas técnicas nos permite medir el cambio de potencial que se produce a la entrada y salida de algún neurotransmisor. Otro de los métodos usados es la inmunohistoquímica que nos otorga conocer la localización de moléculas específicas gracias a la unión de un anticuerpo a estas. También se ha utilizado otras tinciones como de oro o de fluorescencia. Ha sido necesario realizar PCR-RT cuantitativas y estudiarla actividad enzimática mediante ensayos enzimáticos. Para finalizar, decir que para la corroboración de Este experimento ha sido necesario el uso de otros ratones mutados (5XFAD) y muestras de cerebros humanos enfermos y wt.



RESUMEN

Esta investigación se ha centrado en mecanismos celulares y moleculares de la síntesis de GABA en astrocitos reactivos de ratones con Alzheimer.

En primer lugar, los astrocitos normales carecen del neurotransmisor GABA, sin embargo, se ha probado que en los astrocitos reactivos el GABA se libera de los mismos a través del canal Best1 que es específico de Glutamato y GABA. Al ser liberado, se activan los receptores del mismo, GABA_A y GABA_B, que inhiben fuertemente la liberación sináptica, lo que lleva a una disminución de la probabilidad de espiga en neuronas del gránulo dentado, lo que supone una pérdida de plasticidad sináptica y memoria.

Previamente se sabía la importancia del Beta Amiloide y su relación con la creación de astrocitos reactivos a partir de astrocitos normales, y se observó en animales una relación entre la aparición de placas amiloides y la pérdida de capacidad cognitiva debido a la astrocitosis y la producción de GABA, lo cual en este artículo se ha demostrado que es un proceso reversible si se emplean inhibidores de la generación de GABA en estados tempranos de la enfermedad.

AUTORES

Seonmi Jo^{1,2,13}, Oleg Yarishkin^{2,13}, Yu Jin Hwang³, Ye Eun Chun^{2,4}, Mijeong Park^{4,5}, Dong Ho Woo², Jin Young Bae⁶, Taekeun Kim², Jaekwang Lee², Heejung Chun², Hyun Jung Park⁷, Da Yong Lee², Jinpyo Hong², Hye Yun Kim³, Soo-Jin Oh⁵, Seung Ju Park², Hyo Lee², Bo-Eun Yoon², YoungSoo Kim³, Yong Jeong⁸, Insoo Shim⁷, Yong Chul Bae⁶, Jeiwon Cho^{4,5}, Neil W Kowall⁹⁻¹¹, Hoon Ryu^{3,9-11}, Eunmi Hwang², Daesoo Kim¹ & Justin Lee^{2,4,5,12}.

¹Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon, Republic of Korea.²WCI Center for FunctionalConnectomics, Brain Science Institute, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul, Republic of Korea.³Center for Neuro-Medicine, Brain ScienceInstitute, KIST, Seoul, Republic of Korea.⁴Neuroscience Program, Korea University of Science and Technology, Daejeon, Republic of Korea.⁵Center for Neuroscience,Brain Science Institute, KIST, Seoul, Republic of Korea.⁶Department of Anatomy and Neurobiology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea.⁷Department of Science in Korean Medicine, Graduate School, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Republic of Korea.⁸Department of Bio and Brain Engineering, KAIST, Daejeon, Republic of Korea.⁹Boston University Alzheimer's Disease Center, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA.¹⁰Department of Neurology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA.¹¹VA Boston Healthcare System, Boston, Massachusetts, USA.¹²KU-KIST Graduate School of Converging Science of Technology, Korea University, Seoul, Republic of Korea.¹³These authors contributed equally to this work