



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



DESCIFRANDO LA RELACIÓN ENTRE LA REACTIVIDAD DE LOS ASTROCITOS Y EL DAÑO NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Elena Galea Rodríguez de Velasco

Institut de Neurociències – Universitat Autònoma de Barcelona

Javier Vitorica Ferrández

Facultat de Farmàcia - Universitat de Sevilla

Antonia Gutiérrez Pérez

Facultat de Ciències - Universitat de Màlaga

Joan Xavier Comella Carnicé

VHIR - Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

1. Resumen

Justificación del estudio. La enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD) es un tipo de demencia causada por la neurodegeneración que afecta a más de 46 millones de personas en todo el mundo. Los principales síntomas clínicos incluyen pérdida de memoria, problemas de lenguaje, dificultad para realizar tareas simples, pérdida de capacidad de razonamiento, cambios de humor y cambios de comportamiento. La causa de la LOAD aún no está clara ni existe curación. Los cambios patológicos incluyen placas beta amiloides y ovillos neurofibrilares, así como la pérdida de sinapsis, daño cerebrovascular, cambios metabólicos y activación de células no neuronales como la microglía y los astrocitos (también denominados "astrocitos reactivos"). Los astrocitos son un tipo de célula cerebral que desempeña funciones computacionales y homeostáticas. Los astrocitos son células grandes y tupidas, que presentan un cuerpo celular del que emerge una densa red de procesos primarios y secundarios. Los astrocitos reactivos presentan un cambio morfológico radical que consiste en un aumento del tamaño de los procesos primarios y secundarios, que se detecta con estudios inmunohistoquímicos de la proteína intermedia de filamento GFAP. Los cambios funcionales asociados a esta transformación morfológica son desconocidos. Específicamente, no se ha fijado hasta qué punto la pérdida de la cognición en LOAD se debe al mal funcionamiento de los astrocitos, qué vías astrocíticas están mal reguladas, y cómo impactan en la patogénesis de la enfermedad, en sus síntomas clínicos o biomarcadores. Un problema es que los estudios realizados en ratones han producido resultados contradictorios respecto al papel de los astrocitos en LOAD. Además, los astrocitos producen TNF-alfa, un factor que regula plasticidad sináptica y la supervivencia celular. Para el presente proyecto es particularmente relevante que la producción de TNF-alfa se incrementa dramáticamente en LOAD. Se sospecha, aunque no puede afirmarse con certeza, que el TNF-alfa podría contribuir a la pérdida de las espinas neuronales y a la muerte neuronal. De ser así, el mecanismo no está claro.

Objetivos. El objetivo general ha sido caracterizar la disfunción de los astrocitos en LOAD para avanzar en la cuestión fundamental de la existencia de alteraciones en la relación entre astrocitos y neuronas que puedan conducir a una pérdida de sinapsis y, en última instancia, a la muerte neuronal, con el fin de desarrollar terapias dirigidas a los astrocitos. Cuatro laboratorios han colaborado para abordar cuatro objetivos específicos. El objetivo específico 1 ha sido el estudio estructural y ultraestructural de

los astrocitos utilizando técnicas de imagen avanzadas, incluida la microscopía electrónica. Los materiales de estudio han sido muestras *post mortem* de pacientes con LOAD y modelos animales. El objetivo específico 2 ha sido la identificación del perfil molecular de los astrocitos a través de un análisis informático de datos ómicos de muestras de cerebro humano. El objetivo específico 3 ha consistido en estudios funcionales. En concreto, el análisis de la excitabilidad del calcio por imágenes de calcio, y la fagocitosis por seguimiento subcelular de sondas marcadas. Los materiales de estudio han sido cultivos primarios de astrocitos del cerebro de ratón y astrocitos que sobreexpresan alelos humanos de la apolipoproteína tipo E (ApoE4 y ApoE3). ApoE4 es el factor de riesgo genético más importante en LOAD. Como objetivo específico 4 hemos examinado el efecto del TNF-alfa en modelos animales en los que las vías activadas por este factor han sido manipuladas genéticamente.

2. Resultados

2.1. La enfermedad de Alzheimer causa una disminución en la expresión de FAIM-L (forma larga de la molécula inhibidora apoptótica de Fas), una proteína involucrada en la señalización de TNF-alfa y que promueve la supervivencia neuronal. Descubrimos que FAIM también regula la excitabilidad eléctrica de las neuronas. Esto sugiere que la disminución de la expresión de FAIM-L en la enfermedad de Alzheimer puede no solo contribuir a las acciones neurotóxicas del TNF-alfa liberado por los astrocitos, sino también inducir una excitación aberrante de los circuitos neurales (referencias 1, 3).

- *El amiloide beta reduce la expresión de la FAIM-L neuronal, lo cual transforma la respuesta inflamatoria mediada por el TNF-alfa de protectora a neurotóxica.* Hemos descubierto que FAIM-L está reducido en el hipocampo de pacientes con LOAD. También hemos observado que la corteza entorrinal y el hipocampo de un modelo de ratón de LOAD (PS1M146LxAPP751sl) muestran una reducción de esta proteína antes del inicio de la neurodegeneración. Asimismo, neuronas en cultivo tratadas con las fracciones solubles corticales de estos animales mostraron una disminución en la FAIM-L endógena, efecto que es imitado por el tratamiento con ligandos difusibles derivados de amiloide beta (ADDL). La reducción en la expresión de FAIM-L está asociada con la

progresión de la neurodegeneración porque cambia la respuesta inflamatoria mediada por el TNF-alfa en las neuronas. En este sentido, también hemos demostrado que la protección del TNF-alfa contra la toxicidad de amiloide beta cesa cuando la FAIM-L endógena se reduce usando ARN de horquilla corta (shRNA), o por el tratamiento con ADDL. En conjunto, estos resultados apoyan la idea que los niveles de FAIM-L contribuyen a determinar si el efecto de TNF-alfa en las células neuronales es protector o perjudicial.

- *La deficiencia de FAIM causa epilepsia, hiperexcitabilidad locomotora, cambios cognitivos y alteraciones sociales.* Hemos utilizado ratones *knock-out* (FAIM-KO) para establecer el papel del factor en LOAD. Antes de cruzar los ratones con transgénicos de LOAD, hemos llevado a cabo una caracterización fenotípica de los ratones FAIM-KO para comprender mejor la función de FAIM en el sistema nervioso central adulto (SNC). El estudio está motivado por la observación de que los ratones FAIM-KO sufren ataques epilépticos de manera espontánea. La incidencia de las crisis epilépticas, su gravedad y duración, tanto en condiciones espontáneas como durante la manipulación manual, se cuantificaron en ratones FAIMKO y en ratones controles salvajes (WT) de la misma edad. Los estudios de electrofisiología incluyeron curvas de entrada/salida, facilitación de pulsos pareados, potenciación a largo plazo (LTP) y generación de convulsiones tras la inyección de ácido kaínico (8 mg/kg) en el hipocampo. Se realizó un examen completo de comportamiento y función, con una batería de 8 pruebas que evaluaron cinco dimensiones: funciones motoras y exploratorias, estado emocional, funciones cognitivas, interacción social y funciones ejecutivas. Los ratones FAIM-KO mostraron una actividad recurrente de ataques epilépticos dependiente de la edad, con una rápida recuperación entre las crisis. Los FAIM-KO también presentaron valores de LTP levemente mayores en las propiedades electrofisiológicas estudiadas, así como menor propensión a generar convulsiones del hipocampo tras inyección de ácido kaínico, en comparación con los ratones WT. Finalmente, los ratones FAIM-KO mostraron hiperexcitabilidad locomotora, déficits en la interacción social, conductas de anidación deterioradas, y deficiencia en habilidades de aprendizaje y memoria. Estos estudios sugieren la participación de FAIM en la modulación de la excitabilidad cerebral *in vivo*. Los ratones FAIM-KO podrían proporcionar un modelo genético excepcional para el estudio de los mecanismos derivados de la epilepsia recurrente, y desarrollar fármacos antiepilépticos con validez en LOAD.

2.2. La enfermedad de Alzheimer causa disfunción del sistema endolisosomal en astrocitos. Esto conlleva 3 consecuencias: (i) alteración de la mitofagia, lo cual produce un fallo bioenergético, (ii) alteración de la fagocitosis, provocando la acumulación de neuronas distróficas y la agregación del péptido amiloide beta, debido a que su eliminación es defectuosa, y (iii) aumento de las respuestas de calcio, lo cual, a su vez, puede comprometer la señalización entre neuronas y astrocitos (referencias 2, 4, 5).

- *Caracterización bioinformática del mal funcionamiento de los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer utilizando datos humanos.* El reclutamiento de astrocitos sobreexpresando GFAP alrededor de las placas de amiloide beta en LOAD sugiere que estas células sufren importantes alteraciones fenotípicas y, por lo tanto, funcionales. Sin embargo, se desconoce qué vías astrocíticas están desreguladas en los cerebros humanos con LOAD. El progreso en el conocimiento sobre la contribución de los astrocitos a LOAD se ha visto obstaculizado por la falta de datos humanos. **OBJETIVOS.** Caracterizar la desregulación de vías astrocitarias en LOAD llevando a cabo un análisis bioinformático de datos humanos, para así aclarar la contribución de los astrocitos a la enfermedad, y desarrollar terapias astrocitarias basadas en biología de sistemas. **MÉTODOS.** Primero establecimos la especificidad celular de todos los genes cerebrales usando el método basado en la univariable Tau, junto con la agrupación jerárquica de datos transcriptómicos de astrocitos, neuronas, microglía, células endoteliales y oligodendrocitos, aislados, a su vez, de cortezas de humanos. En segundo lugar, definimos las funciones de estos grupos de genes utilizando tanto plataformas de ontología de genes como por obtención manual. En tercer lugar, utilizamos un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para evaluar estadísticamente los cambios en estos grupos de genes en LOAD, usando datos de *microarrays* y RNAseq de pacientes y sujetos controles de la misma edad. Llevamos a cabo el mismo análisis en neuronas como control positivo. **RESULTADOS.** Los grupos específicos de neuronas relacionados con la estructura sináptica, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión estaban disminuidos, tal y como se esperaba, en LOAD. Los cambios más señalados en astrocitos afectan a genes relacionados con el crecimiento, las vías TGF-beta, el metabolismo energético y el sistema endolisosomal. **CONCLUSIÓN.** La compartimentación celular de los genes expresados diferencialmente en cerebros de pacientes con LOAD respecto a controles sanos sugiere disfunción multiorganelar en los astrocitos.

- *Eliminación por fagocitosis de distrofias presinápticas por astrocitos reactivos en la enfermedad de Alzheimer.* La astrogliosis reactiva, que es un proceso complejo caracterizado por una hipertrofia celular y la regulación positiva de los componentes de los filamentos intermedios, es una característica común en los cerebros de los pacientes con LOAD. Los astrocitos reactivos se encuentran en estrecha asociación con las placas neuríticas; sin embargo, el papel preciso de estas células gliales en la patogénesis de la enfermedad es desconocido. En este estudio, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y microscopía óptica y electrónica, descubrimos que los astrocitos reactivos asociados a la placa envuelven, engullen y pueden digerir distrofias presinápticas en ratones del hipocampo de la proteína precursora amiloide /presenilina-1 (APP/PS1). La microglia, la población fagocítica por excelencia del cerebro, no está involucrada en esta eliminación de neuritas distróficas. Los astrocitos reactivos fagocíticos estaban presentes en el 35% y el 67% de las placas amiloides a los 6 y 12 meses de edad, respectivamente. La proporción de neuritas distróficas engullidas era baja, aproximadamente del 7% del total de distrofias alrededor de las placas en ambas edades. Este hecho, junto con la acumulación de neuritas distróficas durante el curso de la enfermedad, sugiere que la eficiencia del proceso fagocítico de los astrocitos está limitada o deteriorada. También se detectaron, por análisis confocal y ultraestructural, astrocitos reactivos rodeando y envolviendo neuritas distróficas en el hipocampo de pacientes con LOAD. Consideramos que la actividad fagocítica de los astrocitos reactivos podría contribuir a eliminar las sinapsis disfuncionales, o los residuos sinápticos, restaurando así los circuitos neurales deteriorados y reduciendo el impacto inflamatorio de las partes neuronales dañadas, y/o limitando la patología amiloide. Por lo tanto, la potenciación de las propiedades fagocíticas de los astrocitos reactivos puede representar una terapia potencial en LOAD.

- *ApoE4 causa disfunción lisosomal y mitocondrial en los astrocitos.* Las apolipoproteínas (ApoE) son moléculas portadoras de colesterol que, en humanos, presentan tres alelos: E2, E3 y E4. ApoE4 es el factor de riesgo genético más importante de LOAD, pero su mecanismo patogénico, probablemente multifactorial, sigue sin quedar claro. El objetivo de nuestros estudios fue clarificar el efecto de la ApoE4 intracelular en los astrocitos, ya que estas células son las que producen la mayor parte de la ApoE en el cerebro. Postulamos que ApoE4 altera el tráfico normal de lípidos en los astrocitos, lo cual causa una disfunción suborganular. Como materiales de estudio utilizamos astrocitos inmortalizados generados por el grupo del

Dr. Holtzman en los que se había sustituido la ApoE endógena por isoformas humanas de ApoE. Como parámetros funcionales, examinamos las concentraciones de calcio con técnicas de imagen después de manipular los flujos de calcio con una batería de fármacos. La dinámica mitocondrial se estudió mediante el seguimiento de la fusión y la fisión mitocondriales por microscopía de fluorescencia y morfometría computerizada. Encontramos tres diferencias principales entre los astrocitos ApoE4 y ApoE3. En primer lugar, la excitabilidad de los astrocitos medida por las respuestas de calcio provocadas por ATP, noradrenalina y acetilcolina, está regulada por lípidos extracelulares en los astrocitos ApoE3, pero no en los astrocitos ApoE4. Este fenómeno se debe a la imposibilidad de los astrocitos ApoE4 de regular la entrada de calcio extracelular. Por el contrario, los astrocitos ApoE4 tienen una concentración alta de calcio en orgánulos ácidos relacionados con los lisosomas, hecho que provoca que sus respuestas sean siempre más grandes y prolongadas en el tiempo. En segundo lugar, las mitocondrias en los astrocitos con ApoE4 mostraron una fisión defectuosa, como lo demuestra la falta de respuesta a estímulos como la oligomicina, que fragmentan las mitocondrias. También presentaron una mayor motilidad, detectada con medidas de desplazamiento al cuadrado (D2, Imaris), así como una disminución de la expresión de la parkina (proteína clave para la mitofagia), una disminución de la producción de ATP y un aumento de la producción de lactato. En tercer lugar, un estudio de lipidómica no dirigida reveló una proporción reducida de lisofosfatidilcolina/fosfatidilcolina en los astrocitos ApoE4 respecto a los ApoE3. Concluimos que los astrocitos con ApoE4 presentan una alteración de flujos de calcio debido al aumento de la acumulación de calcio en los lisosomas, asociada con un deterioro de la dinámica mitocondrial y un cambio del metabolismo energético a la glucólisis. Estamos identificando los canales de calcio que explican las diferencias entre los astrocitos ApoE3 y ApoE4, y asimismo examinando las relaciones causa-efecto entre la disfunción lisosomal y la mitocondrial en los astrocitos ApoE4, y el papel de los fosfolípidos.

3. Relevancia e implicaciones futuras

- El descubrimiento de que FAIM-L está disminuido en muestras *post mortem* de pacientes de LOAD y de modelos de ratón proporciona una nueva diana para estrategias neuroprotectoras destinadas a preservar la integridad de las neuronas, así como un biomarcador de daño neuronal.

- El descubrimiento de que la depleción de FAIM causa epilepsia, síntoma altamente ignorado en LOAD, y una alteración de los parámetros electrofisiológicos en la corteza cerebral del ratón FAIM-KO, sugieren que FAIM regula la actividad de circuitos cerebrales. Esta evidencia abre el camino a terapias que corrijan exceso de excitabilidad neuronal en LOAD mediante la restauración de la expresión FAIM.
- El fallo multifuncional causado por la disfunción del sistema endolisosomal en los astrocitos, descubierto en varios modelos relacionados con LOAD, sugiere que la recuperación de la función de este orgánulo será clave para alcanzar una mejora global de las funciones homeostáticas y computacionales de los astrocitos. La biología de sistemas será necesaria para identificar nodos diana de terapias multifuncionales, usando mapas de interacción de proteínas astrocíticas.

4. Bibliografía científica generada

1. P. Carriba, S. Jimenez, V. Navarro, I Moreno-Gonzalez, B. Barneda-Zahonero, RS Moubarak, J Lopez Soriano, A. Gutiérrez, J. Vitorica, J.X. Comella.

Amyloid- β reduces the expression of neuronal FAIM-L, thereby shifting the inflammatory response mediated by TNFa from neuronal protection to death.

[Cell Death Dis.](#) 2015 6:e1639. doi: 10.1038/cddis.2015.6.

2. A. Gómez-Arboledas, J.C. Davila, E. Sánchez-Mejías, V. Navarro, C. Nuñez-Diaz, R. Sánchez-Varo, M.V. Sánchez-Mico, L. Trujillo-Estrada, J.J. Fernández-Valenzuela, M. Vizuite, J.X. Comella, E. Galea, J. Vitorica, A. Gutiérrez.

Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease.

Glia 2018, 66:637-653.

3. I. Calleja-Yagüe, E. Sánchez-Mejías, A. Gómez-Arboledas, S. Xu, A. Gruart, K-P. Lam, J. López-Soriano, N. Llecha-Cano, E. Galea, J. Vitorica, A. Gutiérrez, J-M. Delgado-García, J. Huo, J. X Comella, L. Giménez-Llort. M-J. Perez-Garcia.

Fas apoptosis inhibitory molecule deficiency promotes seizure susceptibility, locomotor hyperexcitability, cognitive changes and social alterations.

Sometido a revisión.

4. E. Galea, L. Weinstock, R. Larramona, R. Masgrau, J. Clarimont, A. Lleó, A. Gutiérrez, J. Vitorica, L. Wood.

Identification of Astrocytic Gene Signatures in Alzheimer's disease by Bioinformatic Compartmentalization of Human Brain Transcriptomes into Cell-Specific Gene Clusters.

En preparación.

5. R. Larramona, M. Martínez, M. Vila, M. A. Gutierrez, J. Vitorica, JL García-Ariza, E. Galea, R. Masgrau.

Altered subcellular fluxes in ApoE4 astrocytes.

En preparación.