

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA

Eventos tempranos condicionantes
de enfermedades neurodegenerativas

*Early events as conditioning factors
of neurodegenerative diseases*

*Eventos precoces condicionantes de doenças
neurodegenerativas*

Héctor Coirini, María Sol Kruse, Mariana Rey, Marina
Roxana Di Pilla, María Cristina Vega

Resumen

Estudios clínicos sugieren que las complicaciones obstétricas están relacionadas con el desarrollo de alteraciones funcionales en el sistema nervioso central del individuo adulto. Una hipótesis establecida indica que las enfermedades neurodegenerativas estarían asociadas a un proceso iniciado por un estrés oxidativo temprano, y mediante distintos modelos experimentales tratamos de identificar cambios que pueden producirse durante la preñez, o al momento del nacimiento, relacionados con trastornos conductuales o cognitivos descriptos en enfermedades neurodegenerativas. De esta manera mediante una asfixia perinatal global que no afecta la sobrevivencia del individuo, hemos descripto alteraciones en las sinapsis de neocórtex e hipocampo, observando agregación proteica y ubiquitinación aumentada así como cambios en el contenido de actina, mientras que en retina describimos alteraciones en la actividad de la óxido nítrico sintasa. Resultados similares fueron reproducidos *in vitro* usando cultivos organotípicos, donde las estructuras del cerebro y las conexiones entre los diferentes núcleos se conservan. En un tercer modelo donde se induce una diabetes gestacional (DG) hemos evidenciado alteraciones importantes en las vías de señalización intracelular en cerebro embrionario involucradas en el proceso de muerte celular programada. En este mismo modelo estamos evaluando los efectos de la DG sobre la expresión de receptores hepáticos X y su relación con la expresión de la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: estrés oxidativo * cultivos organotípicos * asfixia perinatal * óxido nítrico sintasa * enfermedad de Alzheimer * diabetes gestacional * retina

Summary

Clinical studies suggest that obstetric complications are related to the development of functional alterations in the central nervous system of an adult. An established hypothesis suggests that neurodegenerative diseases would be associated

to a process initiated by early oxidative stress. Then, using different experimental models, early changes that may occur during pregnancy or at the perinatal period related to behavioral or cognitive disorders described in neurodegenerative diseases are identified. Using the model of perinatal asphyxia without affecting the survival of the individual, changes in neostriatum and hippocampus synapses, such as increased protein aggregation and ubiquitination as well as changes in the actin content have been described. On the other hand, in the retina, alterations of nitric oxide synthase were also observed. Similar results were reproduced in vitro using organotypic cultures where the brain structures and connections between different nuclei are preserved. In a third model, induction of gestational diabetes (GD) has shown significant alterations in the intracellular signaling pathways involved in the embryonic brain related to programmed cell death. In this model, we are currently evaluating the effects of GD on the levels of liver X receptors and their possible relationship with the expression of Alzheimer disease.

Key words: oxidative stress * organotypic cultures * perinatal asphyxia * nitric oxide synthase * Alzheimer disease * gestational diabetes * retina

Resumo

Estudos clínicos sugerem que as complicações obstétricas estão relacionadas com o desenvolvimento de alterações funcionais no sistema nervoso central do indivíduo adulto. Uma hipótese estabelecida indica que as doenças neurodegenerativas estariam associadas a um processo iniciado por um estresse oxidativo precoce, e através de diferentes modelos experimentais procuramos identificar alterações que podem ser produzidas durante a prenhez, ou no momento do nascimento, relacionados com transtornos de conduta ou cognitivos descritos em doenças neurodegenerativas. Deste modo, mediante uma asfixia perinatal global que não afeta a sobrevivência do indivíduo, temos descrito alterações nas sinapses de neocórtex e hipocampo observando agregação proteica e ubiquitinação aumentada bem como alterações no conteúdo de actina, ao passo que em retina descrevemos alterações na atividade da óxido nítrico sintase. Resultados similares foram reproduzidos in vitro usando culturas organotípicas, onde as estruturas do cérebro e as conexões entre os diferentes núcleos se conservam. Num terceiro modelo onde se induz uma diabetes gestacional (DG) temos evidenciado alterações importantes nas vias de sinalização intracelular em cérebro embrionário envolvidas no processo de morte celular programada. Neste mesmo modelo estamos avaliando os efeitos da DG sobre a expressão de receptores hepáticos X e sua relação com a expressão da doença de Alzheimer.

Palavras chave: estresse oxidativo * culturas organotípicas * asfixia perinatal * óxido nítrico sintase * doença de Alzheimer * diabetes gestacional * retina

Un gran número de estudios clínicos sugieren que las complicaciones obstétricas estarían relacionadas con el desarrollo de alteraciones funcionales en el sis-

tema nervioso central (SNC) del individuo adulto. Procesos neurodegenerativos, tales como la espasticidad cerebro-espinal, una retinopatía proliferativa isquémica (RPI), el desencadenamiento de la esquizofrenia y hasta el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, tienen su origen en edad temprana, no solo en la expresión precoz de la disfunción sino por la presencia de un preconditionamiento del individuo a otros factores desencadenantes. Ciertas complicaciones que ocurren durante el desarrollo fetal o incluso en la etapa posnatal temprana, como una injuria cerebral, procesos inflamatorios o el desarrollo a una resistencia a insulina, además de alteraciones cromosómicas o genéticas, pueden generar una expresión clínica particular, la cual en principio no es deletérea pero que a largo plazo, se convierte en un importante factor de riesgo. La hipótesis general es que las enfermedades neurodegenerativas, estarían asociadas a un proceso iniciado por un estrés oxidativo temprano. El daño producido en el sistema nervioso central durante el período perinatal, afectaría principalmente el desarrollo neuronal y glial conduciendo a anomalías en la respuesta celular o grupo de células involucradas, a corto, mediano y largo plazo. La evaluación de las alteraciones y su comparación entre sistemas similares, permitirá entonces establecer parámetros para la detección temprana de anomalías y plantear el desarrollo de posibles terapias paliativas.

En nuestro laboratorio se utilizan modelos experimentales relacionados, a fin de reproducir complicaciones que pueden producirse durante la preñez, o al momento del nacimiento, evaluando su efecto a largo plazo sobre cambios que se producen a nivel celular y bioquímico.

Asfixia perinatal

La asfixia perinatal es considerada como una de las más comunes de las complicaciones obstétricas, produce una injuria hipóxico-isquémica del sistema nervioso central, generalmente asociada con una cascada de eventos moleculares, que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis. Entre los mecanismos nocivos implicados más importantes, se encontraría la liberación de aminoácidos excitatorios que generan un aumento del calcio intracelular con liberación de óxido nítrico (NO) y la producción de especies reactivas del oxígeno. En el modelo experimental utilizado se produce una asfixia global al momento del nacimiento y luego se evalúan cambios estructurales y ultraestructurales, (1) así como alteraciones en la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) en animales adultos o a edades tempranas, utilizándose también metodologías físicas y farmacológicas, a fin de prevenir o revertir la aparición de las anomalías provocadas por la asfixia.

Alteraciones sinápticas en el cerebro

Las sinapsis de neocórtex e hipocampo, presentan características diferentes en cuanto a las densidades post-sinápticas (DPSs). Las alteraciones en estas estructuras durante un proceso hipóxico-isquémico, asociadas a la producción de NO, provocan alteraciones estructurales en las sinapsis que llevan a la muerte neuronal. Estos cambios así como el posible daño en las proteínas específicas que forman parte de estas estructuras, han sido vinculados con agregación proteica y ubiquitinación sináptica. (2). Una de las posibles proteínas dañadas sería la F-actina, la cual está altamente concentrada en las espinas dendríticas, por lo que cambios en el contenido de actina podrían estar relacionados con la patología de la hipoxia (3).

Asfixia perinatal y retina

Un alto porcentaje de niños prematuros con algún grado de asfixia, desarrollan una RPI como consecuencia de la variación de los niveles de oxígeno durante el desarrollo de la vasculatura retiniana (4). Estudios realizados en el laboratorio han indicado que ratas sometidas a una asfixia perinatal en normotermia presentan RPI. Esta patología pudo ser evidenciada por fondo de ojo, en animales adultos y se encontró asociada a cambios en la expresión de la isoenzima inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) a 21 y 30 días posteriores a la asfixia (5) con un marcado aumento en la inmunorreactividad para iNOS en la epirretina. Asimismo, la actividad de esta enzima determinada a 7, 15, 21, 30 y 60 días de edad presentó un aumento con la edad en ratas C con valores máximos a los 30 días de edad, mientras que los animales AP presentaron en cambio una actividad mayor que los controles a los 21 días de edad que se mantuvo en todas las edades (6).

Diabetes gestacional

Alteraciones en la progenie de madres diabéticas

En este modelo se induce una diabetes experimental no controlada en animales preñados, que conlleva alteraciones endocrino-metabólicas, un medio interno alterado para el desarrollo fetal y a un trabajo de parto complicado con riesgos perinatales. Estudios preliminares se enfocaron sobre posibles alteraciones en las vías de señalización intracelular en cerebro embrionario de madres diabéticas, utilizando técnicas de *western blot* para evaluar la expresión de p-Akt, Bax y Caspasa-3 a una edad embrionaria de 19 días, observándose una disminución de la p-Akt y de la proteína Bax indicando la existencia de múltiples alteraciones en las vías de señalización que conducen a un proceso defectuoso de

muerte celular programada, lo cual podría estar relacionado con la susceptibilidad de la progenie de madres diabéticas a ciertas patologías (7).

Asociación con enfermedad de Alzheimer

La progenie de madres con diabetes presenta un aumento en el riesgo a desarrollar obesidad y/o diabetes tipo II a edades tempranas. Estas complicaciones (obesidad y diabetes) han sido vinculadas con un aumento significativo en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (AD). Tanto en la diabetes tipo II como en la AD existe una deficiencia en la respuesta a insulina y alteraciones en el metabolismo de colesterol. Los niveles de insulina y colesterol tienen papeles críticos en los procesos metabólicos básicos de los tejidos periféricos pero ambos actúan también como moléculas reguladoras de la función neuronal, teniendo una acción de importancia sobre los procesos de memoria y en las enfermedades neurodegenerativas. Los receptores hepáticos X (LXR) recientemente descritos, se encuentran involucrados en el control del metabolismo energético interviniendo tanto en el metabolismo lipídico como en el de hidratos de carbono y ambos metabolismos están altamente correlacionados con las patologías descritas anteriormente. Hemos iniciado estudios de caracterización y localización de los LXR en el cerebro de animales nacidos de madres con diabetes experimental a fin de evaluar si estas alteraciones pueden estar asociadas al riesgo de desarrollar AD (8).

Cultivos organotípicos

Con el fin de estudiar en detalle los procesos moleculares provocados por una asfixia global, iniciamos estudios con cultivos organotípicos, para ello se utilizan cortes de tejido cerebral, los cuales son mantenidos con vida, durante 21 días; esto permite evaluar cambios estructurales una semana después de provocarles una asfixia-hipoxia *in vitro*. Asimismo con este modelo podemos evaluar la acción de compuestos neuroprotectores a un proceso excitotóxico. Uno de los agentes evaluados fue alopregnanolona (Alo) utilizando cultivos organotípicos de estriado (St) e hipocampo (Hc). Luego de 1h de hipoxia todos los cultivos presentaron un aumento de LDH que fue mayor y significativo a las 24h post-hipoxia, provocando un aumento en las neuronas positivas para NADPH en St (38%) pero no en Hc. Ensayos con microscopía confocal mostraron un aumento de la señal de GFAP 24h después de la hipoxia. El pretratamiento con Alo provocó una disminución de la señal de GFAP que fue dosis dependiente (50nM y 5μM) en ambos tejidos siendo significativo en el hipocampo [9].

Otros proyectos

El laboratorio desarrolla proyectos en colaboración entre los que se destaca la evaluación de la interacción de diversos esteroides sintéticos, análogos de metabolitos reducidos de progesterona, producidos en el Departamento de Química Orgánica, FCEyN-UBA [10, 11], los cuales interactúan con el receptor para GABA tipo A. Seguida la caracterización del comportamiento de unión a los distintos sitios de ese receptor se realizan estudios sobre las características neuroprotectoras de estos, ante los eventos hipóxico-isquémico en cultivos organotípicos, tejido fresco e *in vivo*.

10. Alvarez LD, Veleiro AS, Baggio RF, Garland MT, Edelsztein VC, Coirini H, *et al.* Synthesis and GABA(A) receptor activity of oxygen-bridged neurosteroid analogs. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 3831-8.
11. Durán FJ, Edelsztein VC, Ghini AA, Rey M, Coirini H, Dauban P, *et al.* Synthesis and GABA(A) receptor activity of 2,19-sulfamoyl analogues of allopregnanolone. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 6526-33.

Referencias bibliográficas

1. Cezal E, Capani F, Selvín-Testa A, Funes MR, Coirini H, Loidl CF. Neostriatal cytoskeleton changes following perinatal asphyxia: effect of hypothermia treatment. *Int J Neurosci* 2006; 116: 697-714.
2. Capani F, Saraceno GE, Botti V, Aon-Bertolino L, de Oliveira DM, Barreto G, *et al.* Protein ubiquitination in post-synaptic densities after hypoxia in rat neostriatum is blocked by hypothermia. *Exp Neurol* 2009; 219: 404-13.
3. Capani F, Saraceno E, Boti VR, Aon-Bertolino L, Fernández JC, Gato F, *et al.*, Ellisman MH, Coirini H. A tridimensional view of the organization of actin filaments in the central nervous system by use of fluorescent photooxidation. *Biocell* 2008; 32: 1-8.
4. Larrea P, Franco, P, Rey Funes M, Loidl CF, Capani F, Coirini H. Alteraciones en la retina de animales sometidos a asfixia perinatal detectados mediante métodos clínicos. I Congreso Nacional de Investigación en Visión y Oftalmología. 2005, Libro de resúmenes, 32.
5. Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, López EM, López-Costa JJ, Coirini H, Loidl CF. Hypothermia prevents the development of ischemic proliferative retinopathy induced by severe perinatal asphyxia. *Exp Eye Res* 2010; 90: 113-20.
6. Rey-Funes M, Ibarra ME, Dorfman VB, Serrano J, Fernández AP, Martínez-Murillo R, *et al.* Hypothermia prevents nitric oxide system changes in retina induced by severe perinatal asphyxia. *J Neurosci Res* 2011; 89: 729-43.
7. Barutta J, Kruse MS, Coirini, H. Phospho-Akt and apoptotic proteins expression in the embryonic brains from diabetic rats (enviado a publicar).
8. Di Pilla MR, Vega MC, Bruno MA, Coirini H. Distribución de los receptores hepáticos X en el cerebro de animales nacidos de madres con diabetes experimental. III Jornada Interna de Investigación, Universidad Católica de Cuyo. Nov. 2010. Abstract CM06.
9. Kruse MS, Rey M, Barutta J, Coirini H. Allopregnanolone effects on astrogliosis induced by hypoxia in organotypic cultures of striatum, hippocampus, and neocortex. *Brain Res* 2009; 1303: 1-7.