

## *4. Discusión*

#### **4.1. Justificación del modelo**

Al realizar un estudio sobre la reactividad glial en ratas tratadas con antipsicóticos pretendemos mejorar nuestra comprensión de la actuación de estos fármacos, e indirectamente, del papel de la glía en el funcionamiento del Sistema Nervioso Central. No se trata de un estudio acerca de ninguna patología mental ni podremos obtener inferencias acerca de ellas, pues nuestro modelo experimental no lo plantea siquiera. No obstante, a través del efecto de los antipsicóticos sobre las células gliales, tal vez podamos entrever una parte de su acción terapéutica.

Este trabajo se encuadra dentro de una línea de investigación que cuenta con una larga trayectoria en nuestro Departamento. En los primeros años 80 comenzó la colaboración entre el Profesor Amat y el Profesor Ledesma, catedráticos de Anatomía y Psiquiatría respectivamente, ambos muy motivados por la perspectiva de intentar comprender la repercusión que el tratamiento con neurolépticos tenía sobre las sinapsis de ciertas regiones del SNC. Las primeras comunicaciones a congresos ya reflejan el hallazgo de alteraciones ultraestructurales inducidas por el tratamiento, en particular las conocidas

“sinapsis abiertas” (Amat y col., 1981a y b), y lo mismo cabe decir de los trabajos que siguieron en las dos últimas décadas del siglo XX.

Al comienzo de este siglo se produjo un cambio notable con la realización de una Tesis Doctoral (Ruano, 2003) que ponía el foco, por vez primera, en la glía, si bien en su relación con las sinapsis. Llegados a este punto, y coincidiendo con las nuevas publicaciones que alumbraban y valoraban el papel de la glía en la función del sistema nervioso, había que plantearse si los astrocitos sufrían alguna modificación, respondían *per se* al tratamiento antipsicótico. En una primera aproximación era obligado examinar varios tratamientos y distintos territorios neurales; por ello elegimos la microscopía de luz y la inmunohistoquímica para marcar los astrocitos.

#### **4.1.1 ¿Por qué estudiar la reactividad a GFAP de los astrocitos después de un tratamiento con antipsicóticos?**

La identificación de los astrocitos maduros a través de la detección de GFAP es habitual desde hace 40 años (Eng y col., 1971). Es, por tanto, un método contrastado que ha contribuido de manera notable a establecer los nuevos conocimientos sobre la glía, y ha confirmado la existencia de varios subtipos de astrocitos, incluyendo los fibrosos y los citoplasmáticos ya referidos (Walz, 2000). A pesar de los años transcurridos, a día de hoy no se conoce con certeza el significado de la expresión de GFAP y sus modificaciones en el SNC.

Sabemos que ambos tipos de astrocitos contienen GFAP, aunque no siempre son inmunorreactivos para esta proteína cuando se tiñen. Para este fenómeno hay varias explicaciones; así, se ha propuesto que la expresión de GFAP puede ser muy baja en parte de los astrocitos, hasta el punto que sea indetectable con las técnicas empleadas (Walz, 2000). Esta idea

concuerta con los datos obtenidos en modelos de lesión y trauma cerebral, circunstancias en las que se advierte un aumento de la reactividad a GFAP sin proliferación celular; es decir, que en tales circunstancias algunas células que normalmente no expresan GFAP empezarían a expresarla (Walz, 2000; Wilhelmsson y col., 2006).

Otra explicación para la existencia de supuestos astrocitos negativos a GFAP es que el método inmunohistoquímico podría reconocer tan sólo la GFAP incorporada al citoesqueleto de los astrocitos, siendo incapaz de marcar las subunidades solubles, lo que resultaría en un falso negativo (Stichel et al., 1991). Así pues, un incremento en el número de células reactivas a GFAP supone, generalmente, que dichas células se han activado y están modificando sus prolongaciones, pero no tiene relación directa con una posible proliferación celular. Es en este sentido como interpretaremos el aumento en el número de células reactivas a la proteína glial fibrilar ácida que hemos observado en este trabajo, como signo de plasticidad de los astrocitos que se activan.

Un problema (o una virtud) que tiene la utilización de GFAP como marcador es que el marcaje está preferentemente en las prolongaciones celulares, lo que muchas veces impide ver la célula completa y puede conducir a errores en las descripciones. Por ello se han utilizado otros marcadores como la proteína ligadora de Ca S100b, que expresan los astrocitos maduros. Pero la S100b sólo tiñe el cuerpo celular, por lo que no es en absoluto óptima para reconocer la morfología de las células o los cambios que ésta pueda sufrir (Raponi et al., 2007). En otros estudios se identifica a los astrocitos mediante marcadores de los transportadores de glutamato, como el GLT-1 o el GLAST, aunque este método tiene los mismos inconvenientes y limitaciones que la S100b (Kimelberg, 2004; Nishiyama et al., 2005).

La disposición espacial de los astrocitos permite que cada uno tenga su propia “área de influencia”, con sus prolongaciones ocupando un espacio que tiende a ser cúbico, con escaso solapamiento de las prolongaciones que se conectan vía gap junctions formando un sincitio (Distler et al., 1991). En cada área de influencia podría haber hasta 100 mil sinapsis. Tal disposición no es bien reconocible mediante el marcaje con GFAP pues, en el caso del hipocampo, parece que sólo el 15% de las prolongaciones serían reactivas a la proteína (Bushong et al., 2002).

Ya que disponemos de un marcador de prolongaciones gliales, vamos a precisar que, entre ellas, podemos distinguir las que se relacionan con las sinapsis (entendemos que la mayoría de las localizadas en la sustancia gris), que mantienen con ellas una relación muy estrecha, y, por otro lado tendríamos las que contactan con los vasos sanguíneos cerebrales mediante extensiones o pies terminales que sirven para recoger sustratos metabólicos (glucosa) o para transmitir mensajes que regulan el diámetro vascular (la perfusión cerebral) en relación con la actividad de las neuronas (Mulligan y MacVicar, 2004). En ambos casos las posibles modificaciones tendrán gran interés.

#### **4.2 Los astrocitos son células muy importantes en la función del SNC y pueden ser claves para entender la enfermedad mental.**

Como hemos señalado en el capítulo de introducción, en pocos años el papel de la glía ha centrado la atención de muchos estudiosos, pasando de ser considerada como un elemento secundario que servía a la cohesión estructural del SN y como células de soporte al servicio de las neuronas, a ser las células que llevan a cabo un gran número de tareas esenciales, sin las cuales las neuronas no podrían cumplir con su papel.

Las células gliales son más numerosas que las neuronas en el SNC de los mamíferos; no obstante el que la proporción sea de 10 a 1 como se ha señalado por parte de algunos autores (Coyle y Schwarcz, 2000), puede ser un mito no demostrado que ha conseguido llegar a los libros de neurociencia como el de Kandel o el de Bear (véase Hilgetag y Barbas, 2009). En todo caso hemos de tener en cuenta que, en relación con los roedores de nuestro estudio, los humanos tenemos una proporción células gliales/neuronas mayor, especialmente en la corteza frontal, el área comúnmente asociada con la función cognitiva. Parece probable que a lo largo de la evolución, la emergencia de conexiones más complejas se haya acompañado de un sistema que permitiera ajustar el incremento en la demanda metabólica y facilitase una transmisión más eficiente (Sherwood y col., 2006). Por ello los vertebrados habrían desarrollado células especializadas en cumplir tales demandas, un rol asignado a las células macrogliales.

Nuestras observaciones no nos permiten aportar datos de interés en la discusión acerca de la proporción glía/neurona, puesto que las células marcadas con GFAP no representan al total de células macrogliales, sino un porcentaje variable e indeterminado. Por tanto aunque, según la reacción a GFAP en las ratas del grupo control, podría pensarse que la proporción glía/neurona es mayor en el hipocampo y en el complejo amigdalino que en el resto de las regiones estudiadas, no podemos concluir que sea así, al no haberse precisado el porcentaje de astrocitos reactivos en cada región.

Como apuntamos en el capítulo de introducción, los astrocitos son los responsables prácticamente de todo lo que no sea transmitir el potencial de acción, de manera que el funcionamiento neuronal está ligado completamente al de los astrocitos hasta el punto de que las disfunciones astrocitarias tienen un impacto directo sobre la actividad neuronal. La consecuencia de esta nueva visión es la importancia que empiezan a tener los

astrocitos en la patología neurológica y mental (De Keyser y col., 2008). De hecho, en un estudio reciente se señala que en la esquizofrenia, la mayoría de los genes alterados tienen que ver con la glía (Sugai y col., 2004), por lo que es lícito pensar que los fármacos que normalizan el cuadro clínico tendrán alguna repercusión sobre las células alteradas.

### **4.3 ¿Cómo interpretar las modificaciones en la reactividad a GFAP evidenciadas en el presente trabajo?**

En algunos territorios nuestras observaciones demuestran que, tras el tratamiento antipsicótico, se produce un aumento del número de células reactivas a GFAP (como en el núcleo Accumbens o la corteza cingular), lo que puede interpretarse como gliosis o astrogliosis reactiva, si bien este concepto se introdujo originalmente en relación con circunstancias de lesión y/o enfermedad del sistema nervioso.

Muy recientemente, Sofroniev (2009) definía la astrogliosis reactiva como el *“conjunto de cambios moleculares, celulares y funcionales que suceden en los astrocitos en respuesta a cualquier forma de lesión o enfermedad del SNC, incluyendo las alteraciones sutiles o poco perceptibles”* (subtle perturbations). Entendemos que dentro de esas alteraciones sutiles se pueden incluir los cambios que se producen como consecuencia del tratamiento con antipsicóticos, por lo que, en lo sucesivo, hablaremos de **gliosis reactiva** para calificar el incremento en la expresión de GFAP observada en los grupos de animales experimentales de nuestro trabajo.

Según estos autores, la astrogliosis reactiva no es un proceso en que la respuesta es de tipo “todo o nada”, sino que admite grados que van de suave a moderada, lo que supondría el primer nivel, a severa y difusa (segundo nivel) o severa con formación de cicatriz glial, que sería el último; (véase

Sofroniev y Vinters, 2010). A nuestro juicio, la que observamos en este trabajo merece, en todos los casos, incluirse en la categoría suave a moderada, caracterizada según los autores citados porque en ella no se pierde la disposición espacial característica, ni se produce solapamiento de las prolongaciones astrocitarias, si bien aumenta el número de células reactivas a GFAP debido a que se incrementa su expresión en células que no la expresaban en condiciones normales, lo que puede dar la falsa impresión de que existe proliferación (Wilhelmsson y col., 2006; Sofroniev y Vinters, 2010).

#### **4.4 Una explicación para la gliosis tras el tratamiento antipsicótico**

Ya no existen dudas acerca de la participación de la glía en la acción terapéutica de los antipsicóticos y otros neurofármacos. Hace unos años se demostró que el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina o con el antipsicótico olanzapina podía incrementar la proliferación glial en el córtex prefrontal y la proliferación neuronal en el giro dentado (Kodama y col., 2004). Otros estudios han encontrado incremento en el contenido de S100 en el hipocampo tras el tratamiento con fluoxetina (Manev y col., 2001). Si como se ha propuesto, existiera una hipofunción glial en la depresión, los antidepresivos podrían actuar sobre las células gliales revirtiendo la mencionada hipofunción.

Tal vez la demostración más clara de la acción directa de los antipsicóticos sobre la glía sea el estudio de Quincozes-Santos y col. (2010), que analizaron los efectos del tratamiento con haloperidol o risperidona sobre cultivos de células astrogiales C6. En este modelo, utilizado con frecuencia para estudiar la función de las células gliales, la risperidona incrementaba significativamente la captación de glutamato y la actividad glutamina sintetasa o el contenido en glutatión, mientras que el haloperidol no modificó ninguno de estos parámetros, si bien aumentaba la producción de radicales libres. En suma,

según estos autores el efecto de los antipsicóticos de segunda generación sobre la glía sería más acusado que el de los antipsicóticos típicos, dato que no concuerda del todo con su efecto sobre la reactividad a GFAP.

Otros estudios han señalado que en la esquizofrenia y en la depresión hay una pérdida de astrocitos en varias áreas corticales, como la corteza prefrontal o cingular anterior (Cotter y col., 2001; 2002), o bien han referido disminución de los astrocitos alrededor de los vasos, sugiriendo una pérdida o menoscabo de las funciones metabólicas y homeostáticas ligadas a estas células (Webster y col., 2001).

En relación con la esquizofrenia, la glía y el tratamiento antipsicótico conviene recordar algunos estudios clínico-patológicos, que han mostrado que la expresión del transportador glial de glutamato EAAT2 se encuentra aumentada en esquizofrénicos sin tratar (Matute y col., 2005), y que los antipsicóticos como la clozapina disminuyen este transporte en la corteza cerebral hasta en un 70% (Vallejo-Illarramendi y col., 2005; Melone y col., 2001) y también en hipocampo y corteza cingular, parietal y frontal (Schmitt y col., 2003). Tampoco es sencillo interpretar estos datos si se cotejan con los de Quincozes-Santos y col. (2010), que encontraron un incremento de la captación de glutamato tras el tratamiento con risperidona, aunque el efecto de ambos pueda interpretarse en el mismo sentido.

Así es. Estos hallazgos se interpretan a la luz de la teoría hipoglutamatérgica sobre la etiopatogenia de la esquizofrenia, que apunta que el cuadro clínico se explica por una hipofunción de los receptores de glutamato, sobre todo los de tipo NMDA (Tsai y coyle, 2002), lo que se ha comprobado postmortem en cerebros de enfermos (Konradi y Heckers, 2003). De acuerdo con los estudios citados en el párrafo anterior, la disminución del transmisor sería debida a su paso a las células gliales por el exceso de transportadores tipo

EAAT2 en ellas, y el efecto del neuroléptico conseguiría disminuir el transporte y normalizar sus niveles en las sinapsis (véase Javitt, 2007), o bien, al decir de Quincoces-Santos y col. (2010), un incremento en la maquinaria astrocitaria de producción de glutamina, aumentaría la disponibilidad de glutamato en las neuronas.

Por otro lado se ha señalado que en ciertas capas de la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos disminuía la reactividad a GFAP (Rajkowska y col., 2002), y que los antipsicóticos, tanto los típicos (haloperidol, clorpromacina) como los atípicos (olanzapina, risperidona) pueden aumentar la densidad glial y el espesor cortical en áreas prefrontales de monos, lo que ha llevado a proponer que parte de su mecanismo de acción, para normalizar el desequilibrio de los neurotransmisores en la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos, sea la proliferación glial (Selemon y col., 1999).

Al decir de Selemon y col. (1999) los antipsicóticos pueden incrementar el número de las células gliales, pero su estudio no trata de proliferación sino de densidad celular. Nuestro estudio inmunohistoquímico también detecta un mayor número de astrocitos reactivos a GFAP en varias regiones tras el tratamiento, lo que no es condición suficiente para deducir que existe proliferación glial. En realidad nosotros pensamos que no existe proliferación pues no hemos visto ningún otro signo indicativo de que así suceda, como la presencia de imágenes de mitosis en las zonas cercanas a la luz ventricular ni en en giro dentado; no obstante sería conveniente llevar a cabo un estudio concreto de proliferación celular en animales tratados con antipsicóticos para aclarar este punto.

Para explicar la moderada gliosis observada en algunas regiones cerebrales en las ratas tratadas, hemos de relacionar la activación astrocitaria que conduce a una mayor producción de la proteína GFAP reactiva

con los efectos que conocemos de los antipsicóticos. De acuerdo con Sofroniev (2009) entre las circunstancias que determinan un aumento de la GFAP están, el aumento en la transmisión de glutamato y el incremento en los niveles de AMPc. ¿Es posible que estas circunstancias se produzcan en las ratas tratadas con antipsicóticos?

Los fármacos empleados tienen en común su afinidad por los receptores D2 de dopamina, receptores que realizan su acción a través de proteínas Gi (inhibidora), es decir, que el efecto de la estimulación de los receptores D2 es la disminución de los niveles de AMPc, de lo cual no podemos inferir que el bloqueo de los mismos por el tratamiento antipsicótico comporte aumento de dichos niveles. De hecho se ha comprobado que el haloperidol incrementa los niveles de AMPc e IP3 en el estriado de rata in vivo (Kaneko y col., 1992; Turalba y col., 2004), pero los resultados son variables con los antipsicóticos de segunda generación y el efecto depende de la región (Molteni y col., 2009)

En cuanto al efecto del tratamiento sobre la transmisión glutamatérgica, hemos de señalar que es un campo de trabajo de enorme complejidad, que no podemos abordar en profundidad en esta discusión. Baste señalar que todos los tratamientos no producen los mismos efectos y que en estos se mezclan modificaciones de los diversos receptores y transportadores de glutamato, de manera que la repercusión tendrá que ver con la expresión de aquellos receptores y transportadores en las distintas regiones. Esta es una visión excesivamente simplificada, puesto que el tratamiento antipsicótico modifica la actividad de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, y, a través de ellos, de los sistemas gabaérgico y del propio glutamatérgico (véase Bartolomeis y col., 2005).

Para lo que interesa al desarrollo de nuestro estudio basta señalar que el tratamiento antipsicótico, en general, se acompaña de un incremento en la transmisión glutamatérgica neuronal, que puede deberse en parte al bloqueo dopaminérgico y que, a su vez, activa a los astrocitos y pone en marcha múltiples efectos en cascada (Hansson y Ronnback, 2003) que pueden explicar la gliosis reactiva. El efecto estaría mediado según algunos por una reducción de los transportadores gliales de glutamato (Melone y col., 2001; Bartolomeis y col., 2005) pero también por un incremento en el número de receptores glutamatérgicos (Bartolomeis y col., 2005) y se traduciría en una mayor disponibilidad de glutamato en las sinapsis y una activación astrocitaria.

Para finalizar este apartado hemos de señalar que la polimerización de la GFAP está regulada por fosforilación inducida por receptores glutamatérgicos, como por ejemplo mGlu tipo II en hipocampo y NMDA en cerebelo (Rodnight y col., 1997; Kommers y col., 1999; Kommers y col., 2002; Battu y col., 2005), receptores que están regulados al alza tras el tratamiento antipsicótico.

En suma, pensamos que el aumento en la GFAP (gliosis reactiva) que detectamos tras el tratamiento en el núcleo Accumbens y en capas profundas del córtex cingular, así como en capas superficiales del córtex dorsolateral y alrededor de los vasos en otras localizaciones, se explica fácilmente mediante el incremento en la actividad del sistema glutamatérgico que producen los antipsicóticos. Quedaría por dilucidar si la actuación de los antipsicóticos que determina tal incremento en la actividad glutamatérgica tiene lugar primariamente sobre los astrocitos o sobre las neuronas, lo cual no puede establecerse en este trabajo, pero puede ser objeto de nuevos estudios.

#### 4.5 La activación de los astrocitos cambia su morfología.

Cada una de las funciones mediadas por los astrocitos que hemos citado, requiere que estas células respondan a los cambios que se producen en su entorno, y las posibles respuestas pasan –mayoritariamente– por la capacidad de los astrocitos de modificar la morfología de sus prolongaciones y la expresión de ciertas moléculas en su interior. Los astrocitos tienen una plasticidad estructural potencial muy importante, pueden alargar sus prolongaciones o retraerlas en ciertas circunstancias, como cambios en el nivel de estrógenos (García-Segura y col., 1996), para alcanzar los vasos sanguíneos o en paralelo con las prolongaciones neuronales para monitorizar la actividad sináptica (Cornell-Bell y col., 1990a; Bushong y col., 2002). Dicha plasticidad es posible gracias a los filamentos intermedios, como la GFAP, que se incorpora al citoesqueleto para influir en la morfología de las prolongaciones. Las moléculas de GFAP están en un estado que fluctúa entre la polimerización y la despolimerización (montaje/desmontaje).

La incorporación de la GFAP al citoesqueleto está mediada por señales como el glutamato,  $Ca^{++}$  o S100b (Rodnight y col., 1997; Kommers y col., 2002; Frizzo y col., 2004; Chang y col., 2005). La GFAP, el componente más conocido del citoesqueleto astrocitario, se expresa en las prolongaciones como ya hemos señalado y es el marcador identificador estándar de los astrocitos maduros en el SNC. Si bien no conocemos completamente el papel de la GFAP y otros filamentos, sabemos que sus niveles de expresión influyen en la estructura y función de los astrocitos y de las neuronas, así como en la conducta animal, lo que sugiere que esta proteína juega un papel importante en la fisiología cerebral.

Cuando disminuye la expresión de GFAP los astrocitos reducen drásticamente la extensión de sus prolongaciones. Los ratones con expresión de GFAP alterada tienen las prolongaciones de los astrocitos más cortas y delgadas que los normales (McCall y col., 1996; Shibuki y col., 1996). En conjunto, los cambios en la expresión de GFAP, que se traducen en cambios en la morfología de los astrocitos, tienen su impacto en funciones homeostáticas, como el metabolismo o la regulación iónica.

La propia supervivencia y crecimiento neuronales están influidas por la actividad de los astrocitos (Goldberg y Barres, 2000). A este respecto recordemos que la pérdida de GFAP se traduce en anomalías en la sustancia blanca cuyos síntomas, como los de la esquizofrenia, se evidencian en la edad adulta (Liedtke y col., 1996). Recientemente se ha sabido que la enfermedad de Alexander, una patología neurodegenerativa, está causada por mutaciones que afectan al gen que regula la expresión de GFAP (Brenner y col., 2001). Las mutaciones producen agregados citoplasmáticos de GFAP en los astrocitos llamados fibras de Rosenthal (Perng y col., 2006).

Los astrocitos y la GFAP tienen un papel en la plasticidad sináptica, pues cuando se altera su expresión aparecen cambios en la conducta, tipo incremento en LTP y disminución de LTD en cerebelo (McCall y col., 1996; Shibuki y col., 1996). El mecanismo tiene que ver con la polimerización de la GFAP que, como mencionamos antes, está regulada por fosforilación inducida por receptores mGlu tipo II en hipocampo y NMDA en cerebelo (Kommers y col., 1999; Kommers y col., 2002; Battu y col., 2005).

En nuestro caso entendemos que el aumento en la expresión de GFAP, tanto cuantitativa como cualitativa (más células reactivas y con más prolongaciones), en aquellas regiones en que tiene lugar, sucede para conseguir una mejora de la interacción con las neuronas y del cumplimiento de las

funciones que realizan los astrocitos (mejora del aporte sanguíneo, captación y reciclado de glutamato, control de la función sináptica, etc).

#### **4.6 El marcaje de los pies terminales de los astrocitos**

Los astrocitos realizan un seguimiento de la actividad neuronal en su región y regulan el flujo sanguíneo de acuerdo con las necesidades, de manera que haya glucosa disponible, bien de sus reservas de glucógeno o de los vasos vecinos. Para ello los astrocitos se disponen físicamente estableciendo un puente de continuidad entre los vasos y las neuronas (Simard y col., 2003; Zonta y col., 2003), contactando con aquellos a través de las prolongaciones que conocemos como pies terminales. Esta disposición sirve, además, a la regulación del flujo sanguíneo cerebral induciendo vasodilatación o vasoconstricción en función de las necesidades.

Hace una década Webster y col. (2001) observaron, en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos, una disminución de los astrocitos reactivos a GFAP próximos a los vasos sanguíneos.

Nosotros, en la corteza dorsolateral hemos detectado que el marcaje de los pies terminales es más bien escaso, incrementándose de manera importante tras el tratamiento con los antipsicóticos de segunda generación RPD y ZSD. También hemos notado un incremento del marcaje de los pies terminales en las ratas tratadas con antipsicóticos típicos en varias localizaciones (estriado, hipotálamo, complejo amigdalino). A nuestro juicio, un incremento del marcaje de la GFAP alrededor de los vasos debe interpretarse como una reacción glial para reforzar la conexión entre vasos y neuronas, mejorando la nutrición y el aporte de oxígeno en el territorio donde se observa.

#### 4.7 Hallazgos en animales controles

El estudio de territorios tan distintos como la corteza cingular, la amígdala y el hipotálamo nos ha permitido constatar que la distribución y la reactividad a GFAP de los astrocitos en un territorio cerebral son específicas de cada área. Las regiones que se reconocen por su distribución de neuronas muestran patrones de densidad astrocitaria que son consistentes dentro de los mismos territorios, lo que ya había sido señalado (Emsley y Macklis, 2006).

En el presente trabajo esta especificidad de área ha condicionado, en parte, nuestros hallazgos ya que en algunos territorios, como el hipocampo y la amígdala, la abundancia de elementos reactivos en los animales controles ha dificultado la detección de modificaciones tras el tratamiento. Por el contrario, allí donde la reactividad a GFAP era escasa en las ratas control, como en el caso de la corteza cingular o el núcleo Accumbens, resulta más patente el incremento inducido por el antipsicótico.

En conjunto nuestros datos parecen decir que en muchos de los territorios estudiados la reactividad glial es poco patente y muestra cierta heterogeneidad, es decir, existen diferencias entre animales, para las mismas regiones. Es lo que sucede en la corteza dorsolateral y cingular, en el estriado el núcleo Accumbens o el hipotálamo. Esto puede ser normal si la expresión de GFAP guarda relación con la actividad neuronal en las citadas regiones, pero no explica la mayor reactividad que, de manera constante, se aprecia en los territorios del hipocampo y el complejo amigdalino. Por el momento carecemos de referencias publicadas para contrastar estos datos, por lo que tampoco podemos ir más allá en la discusión de este punto.

#### **4.8. Hallazgos generales en animales tratados con antipsicóticos**

Tras el tratamiento con los antipsicóticos, tanto los de primera como los de segunda generación, lo que vamos a encontrar en general, con las puntualizaciones que precisaremos más adelante, es a) una ausencia de respuesta o b) un incremento en los elementos reactivos a la GFAP (mayor o menor según el territorio analizado). Si tenemos en cuenta que no hay región, de las estudiadas por nosotros, en que el tratamiento se asocie a una disminución en el número de astrocitos reactivos, podemos decir que nuestros hallazgos no se corresponden con los de Konopaske y col. (2007; 2008) que encontraron en el macaco una reducción del número de astrocitos, detectados con S100, tras un tratamiento crónico (17 a 27 meses) con HP y OZP. Tampoco concuerdan con los resultados de Fatemi y col. (2008) que, mediante western blots, observaron una reducción de la GFAP en la corteza prefrontal de ratas tratadas con clozapina.

No obstante los trabajos citados son difícilmente comparables con el nuestro pues difieren en demasiados aspectos: el de Konopaske en la especie (y por ende su metabolismo de las drogas), la dosis, la duración del tratamiento, el área examinada, el marcador empleado, etc; el de Fatemi en el antipsicótico y el territorio analizado

Sin embargo nuestro estudio sí concuerda en cierta medida con otros que plantean que, tras el tratamiento con antipsicóticos, se incrementa la glía reactiva (Selemon y col., 1999; Toro y col., 2006; Steffek, 2007). En el caso de Toro y colaboradores, el análisis está realizado en la corteza prefrontal de pacientes humanos y el resultado indica de manera precisa que antes del tratamiento existe una disminución en la expresión de GFAP que se incrementa tras el tratamiento antipsicótico.

Hay otros trabajos que nos pueden ayudar a comprender la relación de la glía con la esquizofrenia y el papel de los antipsicóticos. Según la hipótesis glutamatérgica de la enfermedad antes citada (bastante admitida en la actualidad y que no es incompatible con la dopaminérgica), se produciría una disminución de la transmisión de este neurotransmisor en la corteza prefrontal de los afectados. Ya dijimos que el cuadro se explica por la hipofunción de los receptores NMDA de glutamato (Tsai y Coyle, 2002; Konradi y Heckers, 2003), pero otros autores postulan que podría deberse a un incremento en la captación glial de glutamato; de hecho, en pacientes esquizofrénicos, los astrocitos de esta región tienen aumentada la expresión del transportador GLT-1 (equivalente del EAAT2 de los roedores) y de su ARNm (Matute y col., 2005). Según estos autores la hiperfunción del citado transportador de glutamato sería responsable de la hipofunción del neurotransmisor, al retirarlo demasiado pronto de la sinapsis, lo que reduciría su disponibilidad, y ésta se normalizaría tras el tratamiento con clozapina (Melone y col., 2001).

También debe tener un papel el déficit en los transportadores neuronales de glutamato que han reportado Nudmamud-Thanoi y col. (2007). Ciertamente es que, como hemos señalado repetidamente, nuestro trabajo no es comparable con los que tratan de establecer los posibles trastornos de la función glial o neuronal que tienen lugar en la esquizofrenia, pero la efectividad de los antipsicóticos en esta enfermedad, y su repercusión sobre la expresión de GFAP nos obliga a buscar la relación entre estas variables.

Aunque la función más evidente de la GFAP puede ser la de constituir el soporte mecánico de las prolongaciones de los astrocitos, existen más datos que relacionan la expresión de GFAP y los transportadores de glutamato y la transmisión glutamatérgica en general. Ya señalamos con anterioridad que el tratamiento antipsicótico aumenta la transmisión neuronal vía glutamato, y que tal incremento activaba a los astrocitos (Hansson y

Ronnback, 2003). También sabemos que la incorporación de la GFAP al citoesqueleto de los astrocitos está mediada por señales como el glutamato (Rodnight y col., 1997).

Por otro lado, Hughes y col. (2004) señalaron que en ausencia de GFAP (ratones KO) en los astrocitos corticales, el GLT-1 (o EAAT2) no es transportado a la superficie de estas células, pero tampoco el EAAT3 (transportador neuronal) se expresa en la superficie de las neuronas. Este dato nos parece de gran importancia pues correlaciona positivamente la expresión de GFAP y la actividad de transporte de glutamato, tanto en astrocitos como en neuronas, de manera que parece lícito postular que un incremento en la expresión de GFAP tras el tratamiento antipsicótico, estaría en relación más con el aumento en la expresión y el transporte de glutamato que con su reducción.

Otro aspecto interesante fue estudiado por Zagami y col. (2005), en cultivos de astrocitos, comprobando que los cambios de fenotipo consecutivos a agresiones (por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se relacionan con cambios en la función y localización de los transportadores de glutamato, lo que puede representar un componente vital de las funciones homeostáticas de los astrocitos en respuesta a las agresiones.

Asimismo parece haber una relación entre los niveles de dopamina y la expresión del transportador glial GLT-1, de manera que *in vitro*, añadiendo dopamina disminuye la expresión del transportador (Brito y col., 2009). En relación con este punto cabe plantearse si el bloqueo de los receptores de dopamina (y otros) que tiene lugar tras el tratamiento antipsicótico aumentaría la expresión del transportador.

Si resumimos lo expuesto en los últimos párrafos veremos que los estudios referidos correlacionan positivamente la expresión de GFAP y la función transportadora de glutamato por los astrocitos y las neuronas, lo que

también concuerda con el trabajo de Quincoces-Santos y col. (2010) realizado sobre cultivos de células C6, mientras que otros trabajos citados más arriba indicaban que la clozapina disminuiría la hiperfunción de GLT-1, aumentada en los afectados por la esquizofrenia (Melone y col., 2001; Matute y col., 2005).

A primera vista parece que la visión de los diferentes autores es difícil de compaginar, pero los supuestos de los estudios son bien distintos; en los primeros casos relacionamos nivel de GFAP y transporte de glutamato y en el segundo tratamiento con clozapina y transporte de glutamato, en el estudio *in vitro* el tratamiento con risperidona y la captación de glutamato. ¿Cómo interpretar el aumento en la GFAP reactiva que encontramos nosotros en las ratas tratadas?; ¿no resulta contradictorio relacionar una mayor profusión de las prolongaciones gliales con una disminución en el transporte de glutamato?, es decir, ¿por qué incrementar la complejidad del árbol de las prolongaciones de los astrocitos si necesitamos menos espacio para insertar moléculas transportadoras? Seguramente ha de haber algún otro factor involucrado y su esclarecimiento requerirá nuevos estudios.

Ciertamente el puzzle que emerge de estas consideraciones es de una complejidad que excede los objetivos de nuestro trabajo (y, por qué no decirlo, nuestra capacidad de comprensión) pues las moléculas que se alteran tras el tratamiento son muchas y de gran importancia en el funcionamiento del SNC (dopamina, glutamato, serotonina, GABA, acetilcolina, histamina, etc). Al administrar un antipsicótico modificamos los niveles de la mayoría de los neurotransmisores, de sus transportadores y sus receptores, es decir, modificamos la actividad de la mayoría de los miles de millones de sinapsis existentes en el sistema nervioso, y también actuamos directa e indirectamente sobre la actividad y la morfología de los astrocitos.

Por todo ello no es de extrañar que surjan divergencias entre las diferentes aproximaciones, y queda claro que hacen falta más estudios para esclarecer la relación de la GFAP con el transporte de glutamato, con la actividad general de este sistema de neurotransmisión y con las enfermedades neurológicas y mentales. Una vez presentadas las distintas visiones y las divergencias entre los resultados de unos y otros (que podrían no ser más que de enfoque o interpretación), se trataría de ver cómo encuadrar los datos obtenidos en una interpretación acorde con el paradigma neurobiológico aceptado a día de hoy.

En este sentido nos planteamos: ¿qué significado tendría el incremento en la reactividad a la GFAP tras la administración de los antipsicóticos?, y complementariamente, ¿por qué el aumento en la expresión de la proteína glial se limita a unos territorios concretos? Lógicamente esta pregunta sirve tanto para los de primera como para los de segunda generación, pues todos inducen un incremento de la GFAP (gliosis reactiva) en Accumbens y corteza cingular.

Para intentar responder hemos de volver a recordar que la GFAP es un componente clave del citoesqueleto de los astrocitos y que participa en procesos tales como la extensión y cantidad de las prolongaciones celulares, de manera que su incremento mejoraría la estrecha relación glía/neurona, la tarea de control (homeostasis) del medio extracelular que realizan los astrocitos y, en particular, el nivel de transmisión glutamatérgica (Steffek, 2007; Middeldorp y Hol, 2011).

En suma, según esta visión, la gliosis reactiva al tratamiento antipsicótico que detectamos mediante el aumento en la reacción a la GFAP, cumpliría una función más o menos relevante en la mejora de la relación funcional entre las neuronas y los astrocitos, especialmente en su participación

en la regulación de la transmisión excitadora vía glutamato o en los desequilibrios en la transmisión dopaminérgica. Este papel funcional no se limita a la expresión de transportadores gliales de glutamato, pues también influiría en la expresión de los transportadores neuronales, la producción del cofactor D-serina o la conversión de glutamato en glutamina (véase Steffek, 2007).

En cuanto a la cuestión de que el aumento de la reactividad a la GFAP tenga lugar sobre todo en cierta región del núcleo Accumbens y en las capas profundas de la corteza cingular, lógicamente no disponemos de una explicación precisa, pero podemos plantear que tal particularidad se ha de deber a las características neuroquímicas de sus neuronas y sus astrocitos, es decir, a su peculiar conectividad (dopaminérgica, serotoninérgica, colinérgica o peptidérgica) y a las repercusiones que el tratamiento antipsicótico tiene sobre los diferentes sistemas neurotransmisores de estas regiones, que incluye el efecto sobre los niveles de los propios transmisores, los receptores y los transportadores. Para una visión más completa remitimos a las excelentes revisiones publicadas recientemente (Abi-Dargham y Guillin, 2007; Molteni y col., 2009; Hunsberger y col., 2009; Sofroniev y Vinters, 2010; Middeldorp y Hol, 2011; Sidoryk-Wegrzynowicz y col., 2011).

#### **4.9. Hallazgos relacionados con tratamientos concretos**

Aunque no ha sido objeto de cuantificación, hemos de mencionar que los antipsicóticos típicos incrementan la GFAP reactiva en la corteza dorsolateral. Para explicar este hallazgo recordemos que el incremento es llamativo especialmente en la capa superficial (aunque específico de cada uno de los antipsicóticos), una capa donde escasean las neuronas pero son muy abundantes las sinapsis. Si pensamos que la estabilización de las sinapsis y la

transmisión en esta región puede ser una de las consecuencias del tratamiento y una de las funciones que desempeña la glía, concluiremos que la activación de los astrocitos corticales tendría que ver con la regulación de la transmisión en esta zona de la corteza.

Otra de las regiones donde aumentan los astrocitos marcados con GFAP es el estriado dorsal. En este caso el incremento se aprecia sobre todo en los animales tratados con antipsicóticos típicos y tras la inyección de ZSD. Teniendo en cuenta la complejidad de las conexiones de esta parte del estriado (tálamo, corteza motora y premotora, sustancia negra), resulta imposible dilucidar el significado de tal respuesta, si podría explicarse como reacción a los trastornos en la neurotransmisión en esta zona (relacionados con los efectos secundarios del tratamiento) o si simplemente serían reflejo de la función global homeostática y neuroprotectora de los astrocitos. Sí resulta llamativo el que estos territorios (sobre todo los más rostrales) formen parte del estriado asociativo, relacionado con la corteza cognitiva y que otra de las regiones cuya glía se activa, el núcleo Accumbens, forme parte del estriado ventral, relacionado con los aspectos emocionales de la conducta. Para más información véase Pérez-Costas y col (2010).

#### **4.10. Perspectivas de cara al futuro**

Una vez comprobada la participación de los astrocitos en la respuesta al tratamiento antipsicótico y habiendo detectado los lugares en que la respuesta glial es más patente, podemos continuar nuestra línea de trabajo por diversas vías. Por un lado consideramos que sería interesante emplear modelos animales de patología mental o neurodegenerativa, para comprobar si en esas circunstancias se advierte una respuesta semejante. Por otro lado deberíamos explorar las modificaciones de alguno de los sistemas de

neurotransmisión más importantes en estas patologías, como el glutamatérgico o el dopaminérgico, de manera global, es decir, para una circunstancia concreta, estudiar qué pasa con los receptores y transportadores con o sin tratamiento.

Otra línea de trabajo que puede ser de gran interés tiene que ver con el empleo de modelos de esquizofrenia o depresión, su tratamiento y el análisis de la respuesta glial en la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas involucrados en las respuestas homeostáticas y neuroprotectoras de la glía.

También sería deseable realizar algún estudio ultraestructural de las regiones más relevantes. La microscopía electrónica aporta información complementaria y de gran relevancia para comprender la estrecha relación funcional entre astrocitos y neuronas.

En otro orden de cosas podría ser muy interesante estudiar otros fenómenos que pueden suceder en los modelos experimentales mencionados, como la posibilidad de que el propio modelo de enfermedad o el tratamiento produzcan proliferación celular o muerte por apoptosis.