

Sinteza proiectului PNCDI2 Idei contract 164/2007 pe anul 2009
Director proiect: Prof. Dr. Alexandru Babeş

Efecte acute și cronice ale BDNF și GDNF asupra activării canalelor termoTRP

Introducere

Neurotrofinele reprezintă o familie de proteine cu rol în supraviețuirea, dezvoltarea și funcționarea neuronilor. Neurotrofinele fac parte din clasa factorilor de creștere și asigură supraviețuirea neuronilor prin prevenirea inițierii morții celulare; de asemenea, au rol în diferențierea celulelor progenitoare pentru a forma neuroni și în diferențierea neuronilor în cursul dezvoltării. În organismul adult, neurotrofinele au rol în semnalizarea celulară și sunt mediatori și modulatori ai durerii inflamatorii. Implicarea neurotrofinelor (NTF) în percepția durerii este bine cunoscută, foarte bine documentată fiind neurotrofina NGF (nerve growth factor) și rolul său pro-algeziec (Nicol, Vasko, 2007; Pezet, McMahon, 2006). Neurotrofinele sunt importante în dezvoltare, fiind esențiale pentru supraviețuirea și diferențierea neuronilor, atât în sistemul nervos periferic, cât și în sistemul nervos central. Sunt importante și în organismul adult, unde îndeplinesc rol de molecule de semnalizare inducând modificări fenotipice ale neuronilor ca răspuns la stimuli nocivi sau leziuni ale sistemului nervos (Sah et al., 2003). Scopul acestui studiu a fost evaluarea efectelor expunerii cronice (12-24h) și acute ale BDNF și GDNF asupra neuronilor senzitivi din DRG, în special asupra canalelor ionice TRPM8, TRPA1 și TRPV1. Toți acești receptori sunt implicați în semnalizarea durerii periferice și sunt modulați de o serie de agenți pro-inflamatori.

Rezultate

1. Co-exprimarea canalelor termoTRP, în neuroni DRG, pe baza sensibilității la frig și mentol, AITC și capsaicină

Există o controversă în ceea ce privește gradul de co-exprimare a canalelor termoTRP în neuronii senzitivi, în special în cazul co-exprimării dintre TRPM8 și TRPA1 sau TRPV1. În culturi primare de neuroni DRG, în mediu fără ser și fără factori neurotrofici (în cazul grupului de control), am identificat câteva populații majore de neuroni, pe baza sensibilității la stimulii folosiți. Am aplicat frig și mentol pentru a identifica neuronii care

exprimă TRPM8, capsaicină, un agonist specific pentru TRPV1 și alilizotiocianat, activator al TRPA1. Astfel, în grupul de control, procentul de neuroni CMS, exprimând cel mai probabil TRPM8, a fost de 9,2% (47 din 513 neuroni). Pragul termic de activare al acestei populații a fost de $25,8 \pm 0,5$ °C (n = 47). În plus, față de această populație, 5 celule au fost activate de frig dar au fost insensibile la mentol și nu au fost incluse în grupul de neuroni CMS. Dintre cei 47 de neuroni CMS, 25 (53.2%) au fost direct activați de mentol 100 μ M iar restul de 22 au fost sensibilizați în prezența mentolului. În grupul de control, 27,5% (141 din 513) dintre neuroni au fost sensibili la AITC (cel mai probabil exprimă TRPA1) și 60,8% (312/513) au fost activați de capsaicină (exprimă TRPV1).

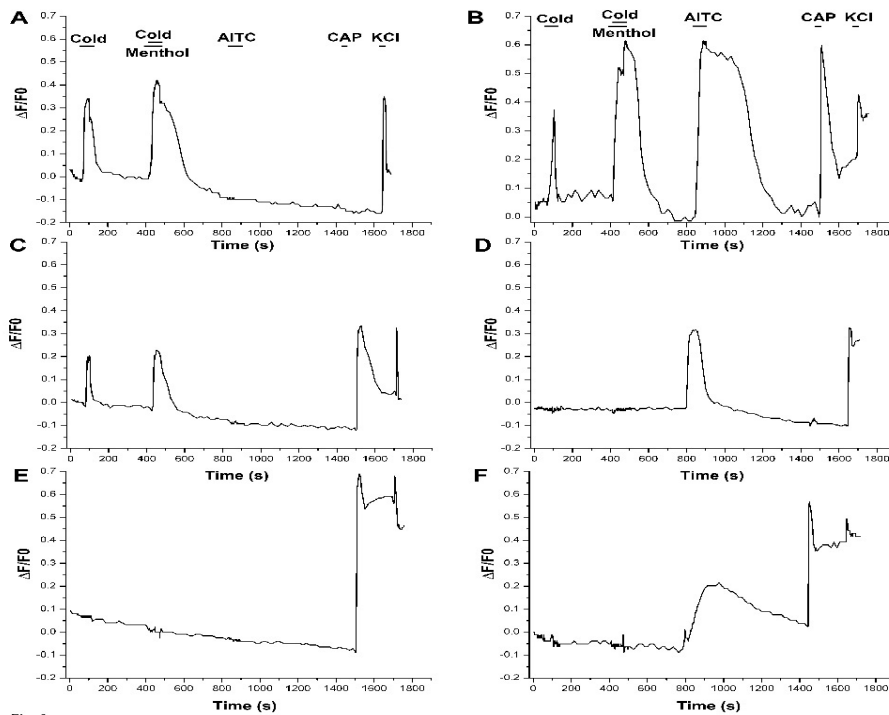


Fig. 3

Fig 3. Exemple reprezentative ale principalelor tipuri de răspunsuri la agoniști ai canalelor termoTRP. **A.** Neuron CMS insensibil la AITC și CAP. **B.** Neuron CMS sensibil atât la AITC cât și la CAP. **C.** Neuron CMS activat de CAP dar nu de AITC. **D.** Neuron sensibil doar la AITC. **E.** Neuron sensibil doar la CAP. **F.** Neuron sensibil la AITc și CAP dar nu la frig și mentol.

În ceea ce privește suprapunerea populațiilor identificate, chiar și în absența factorilor neurotrofici, mai mult de jumătate dintre neuronii CMS au fost activați atât de AITC (53,2%, 25/47) cât și de CAP (53,2%, 25/47), în acord cu date anterioare ale grupului nostru (Babes et al., 2004, 2006; Linte et al., 2007). Datele noastre susțin un grad ridicat de co-exprimare TRPM8/TRPV1 și TRPM8/TRPA1, în acord cu raporturi din literatură privind exprimarea TRPM8 într-o populație de neuroni nociceptivi (Okazawa et al., 2004; Xing et al., 2006). Marea majoritate a neuronilor activați de AITC au fost sensibili și la capsaicină (122/141, 86.5%) și așa cum era de așteptat, o parte din neuronii sensibili la CAP au răspuns și la AITC (39,1%, 122 din 312 neuroni). Tipurile principale de răspunsuri la stimulii din cadrul protocolului de lucru (figura 1) sunt reprezentate în figura 3 iar statistica populațiilor neuronale identificate se regăsește în tabelul 1.

2. Tratamentele cronice cu BDNF crește sensibilitatea la capsaicină și mentol în neuroni DRG de șobolan

Culturile primare de neuroni DRG de șobolan au fost tratate cu BDNF 100 ng/ml timp de 12-24h și apoi analizate cu imagistică de calciu. BDNF a influențat atât proporția de neuroni activați cât și amplitudinea răspunsurilor la unii dintre stimulii testați. Astfel, fracția de neuroni sensibili la capsaicină a crescut semnificativ de la 60,8% în control, până la 75,9% (208/274, χ^2 test, $p < 0,001$, figura 4A), iar amplitudinea medie a răspunsului a crescut atât pentru AITC (de la $0,46 \pm 0,01$, $n = 141$ până la $0,54 \pm 0,02$, $n = 78$, testul t Student, unpaired, $p < 0,01$), cât și pentru capsaicină (de la $0,62 \pm 0,01$, $n = 122$, până la $0,68 \pm 0,01$, $n = 208$, $p < 0,01$). Nivelul de co-exprimare între sensibilitatea la AITC și sensibilitatea la capsaicină a crescut de asemenea, în urma tratamentului cu BDNF, 97,4% (76/78), față de 86,5% în condiții control ($p < 0,01$, figura 4B).

Cu toate că fracția de neuroni sensibili la frig sau amplitudinea răspunsurilor la răcire nu s-au modificat, BDNF a indus o creștere a proporției de neuroni sensibili la mentol de la 13,5% (69/513) până la 19,4% (53/274), $p < 0,05$ (figura 4A). Mai mult, răspunsul la mentol a fost semnificativ mai mare în cazul neuronilor tratați cu BDNF ($0,26 \pm 0,02$, $n = 53$), comparativ cu grupul de control ($0,2 \pm 0,02$, $n = 69$, $p < 0,05$). Această observație, corelată cu o creștere semnificativă a răspunsului la AITC, sugerează că cel

puțin o parte din sensibilitatea la mentol ar putea fi mediată de TRPA1, așa cum s-a propus deja (Karashima et al., 2007).

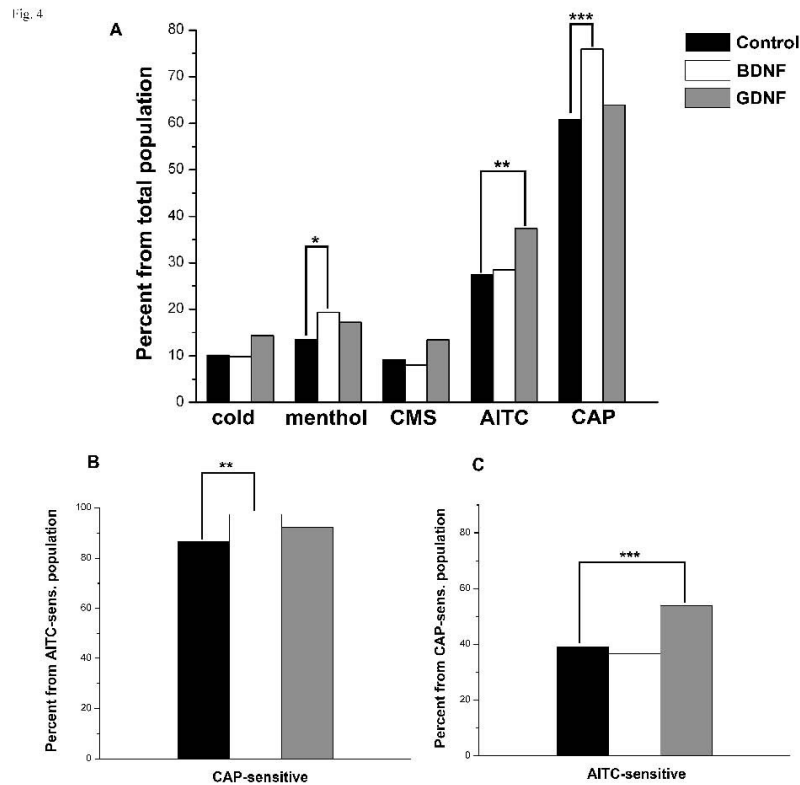


Fig. 4 Efecte ale incubării cronice cu BDNF și GDNF asupra populațiilor neuronale. A. Modificări ale populațiilor CMS, sensibile la frig, mentol, AITC, și CAP, induse de BDNF (alb) și GDNF (gri), comparativ cu controlul (negru). B. Frația de neuroni sensibili la AITC, care răspunde și la CAP a crescut după tratamentul cu BDNF. C. Frația de neuroni sensibili la CAP, care răspunde și la AITC a crescut după tratamentul cu GDNF. Testul χ^2 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3. *Tratamentul cronic cu GDNF crește fracția de neuroni sensibili la AITC*

Neuronii din culturile primare au fost tratați cronic, timp de 12 - 24h cu GDNF 100 ng/ml. Efectele înregistrate pentru această neurotrofină nu au fost la fel de puternice ca în cazul BDNF. GDNF nu a afectat amplitudinile răspunsurilor la frig, mentol, alilizotiocianat sau capsaicină. În schimb, fracția de neuroni sensibili la AITC a crescut semnificativ, după tratamentul cu GDNF, de la 27,5% (141/513) în control, până la 37,4% (117/313) ($p < 0,01$, tabelul 1). De asemenea, a crescut proporția de neuroni

sensibili la capsaicină care au răspuns și la AITC (reflectă gradul de co-exprimare funcțională între TRPA1 și TRPV1), de la 39,1% (122/312) în control, până la 54% (108/200, $p < 0,001$, figura 4C).

O altă observație interesantă este faptul că GDNF a indus creșterea fracției de celule, din totalul de neuroni studiați, care co-exprimă TRPM8 și TRPV1 sau TRPM8 și TRPA1. Astfel, în grupul de control, procentul de neuroni CMS activați de capsaicină a fost de 4,87% (25 din 513) din totalul neuronilor, dar a crescut până la 9,58% (30 din 313) după tratamentul cornic cu GDNF ($p < 0,01$, testul chi square, tabelul 1), sugerând o creștere a gradului de co-exprimare TRPM8/TRPV1. În condiții control, 4,87% (25 din 513) din totalul neuronilor studiați au fost neuroni CMS sensibili la AITC, iar această populație a crescut până la 8,31% (26/313, $p < 0,05$ testul chi square, tabelul 1), după incubare peste noapte cu GDNF, dovadă a creșterii gradului de co-exprimare TRPM8/TRPA1.

4. Aplicarea acută a neurotrofinelor previne desensibilizarea nociceptorilor

O altă problemă abordată în cadrul acestui studiu, a fost efectul acut al BDNF și GDNF asupra activării nociceptorilor de către temperaturi ridicate (45 °C) și de către AITC. Un stimul termic de încălzire, constând într-o rampă de la ~ 32 °C până la ~ 45 °C, a fost aplicat înainte și imediat după expunerea neuronilor la BDNF sau GDNF (100 ng/ml, 7 minute). La sfârșitul experimentului celulele au fost stimulate cu capsaicină 2 μM pentru a identifica neuronii care exprimă TRPV1. Stimulul termic folosit în acest studiu activează cel mai probabil receptorul TRPV1 în neuronii DRG (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Acest fapt este susținut de rezultatele obținute, din 122 de neuroni sensibili la căldură înregistrați, marea majoritate (114, 9,4%) au fost activați și de capsaicină, agonist specific pentru TRPV1. În plus, răspunsurile la căldură și la capsaicină au fost puternic corelate (coeficientul de corelație Pearson $r = 0,41$, $p < 0,0001$). În condiții control (fără tratament cu NTF), stimularea repetată cu căldură a indus o tahifilaxie semnificativă: în cadrul populației de neuroni sensibili la CAP, al doilea răspuns la cald a fost mai mic ($0,49 \pm 0,05$ față de $0,33 \pm 0,05$, testul t Student, paired, $p < 0,0001$, $n = 28$, figura 5A și B). În cazul tratamentului cu BDNF, această reducere semnificativă a amplitudinii răspunsului la cald nu se mai observă: $0,48 \pm 0,03$ pentru primul stimul și $0,47 \pm 0,04$ pentru al doilea stimul, (NS, $n = 33$, figura 5A și B). Ca măsură a magnitudinii tahifilaxiei am folosit raportul dintre amplitudinea răspunsului

la al doilea stimul termic și amplitudinea răspunsului la primul stimul termic. Rezultatele demonstrează că BDNF a înlăturat desensibilizarea neuronilor sensibili la capsaicină indusă de căldură: raportul în cazul grupului de control a fost $0,68 \pm 0,05$ față de $1,10 \pm 0,13$ pentru grupul tratat cu BDNF (testul t Student, unpaired, $p < 0,01$, figura 5C), desensibilizarea fiind practic înlocuită de o ușoară sensibilizare după tratamentul acut cu neurotrofine.

Rezultate similare au fost obținute și pentru cel de-al doilea factor neurotrofic studiat, GDNF: amplitudinile răspunsurilor la cald înainte și după tratamentul cu GDNF au fost $0,40 \pm 0,03$, respectiv $0,43 \pm 0,03$ (NS, $n = 36$, figura 5A și B). Nu se înregistrează o desensibilizare a neuronilor indusă de stimulare termică repetată, ca în cazul grupului de control ($0,49 \pm 0,07$, respectiv $0,36 \pm 0,07$, $n = 15$, $p < 0,05$). În plus, valoarea raportului dintre cele două amplitudini a fost $1,20 \pm 0,11$ pentru grupul tratat cu GDNF comparativ cu $0,74 \pm 0,1$ în cazul grupului de control ($p < 0,05$, figura 5C).

Fig. 5

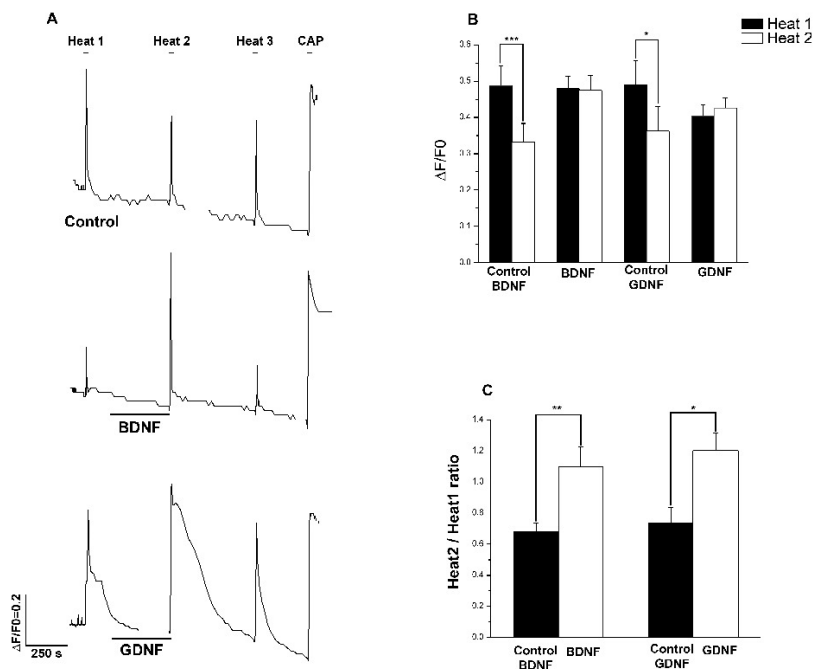


Fig. 5 Aplicarea acută de BDNF sau GDNF previne desensibilizarea răspunsurilor la căldură. **A.** Exemple reprezentative de răspunsuri la căldură (45 °C) și CAP în condiții control (sus), în celule tratate cu BDNF (mijloc) și în celule tratate cu GDNF (jos). **B.**

analiza statistică a experimentelor ilustrate în A., barele reprezintă răspunsurile medii la primul (negru) și al doilea (alb) stimul termic; barele de eroare reprezintă S.E.M. C. Compararea rapoartelor între al doilea și primul răspuns la căldură, ca măsură a gradului de desensibilizare. Testul statistic utilizat a fost testul t Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Pentru a studia efectul aplicării acute a NTF asupra TRPA1 am utilizat un protocol constând în două aplicări succesive de AITC (20 μ M, 1 min), între care a fost aplicată una dintre neurotrofine (100 ng/ml, 7 minute).

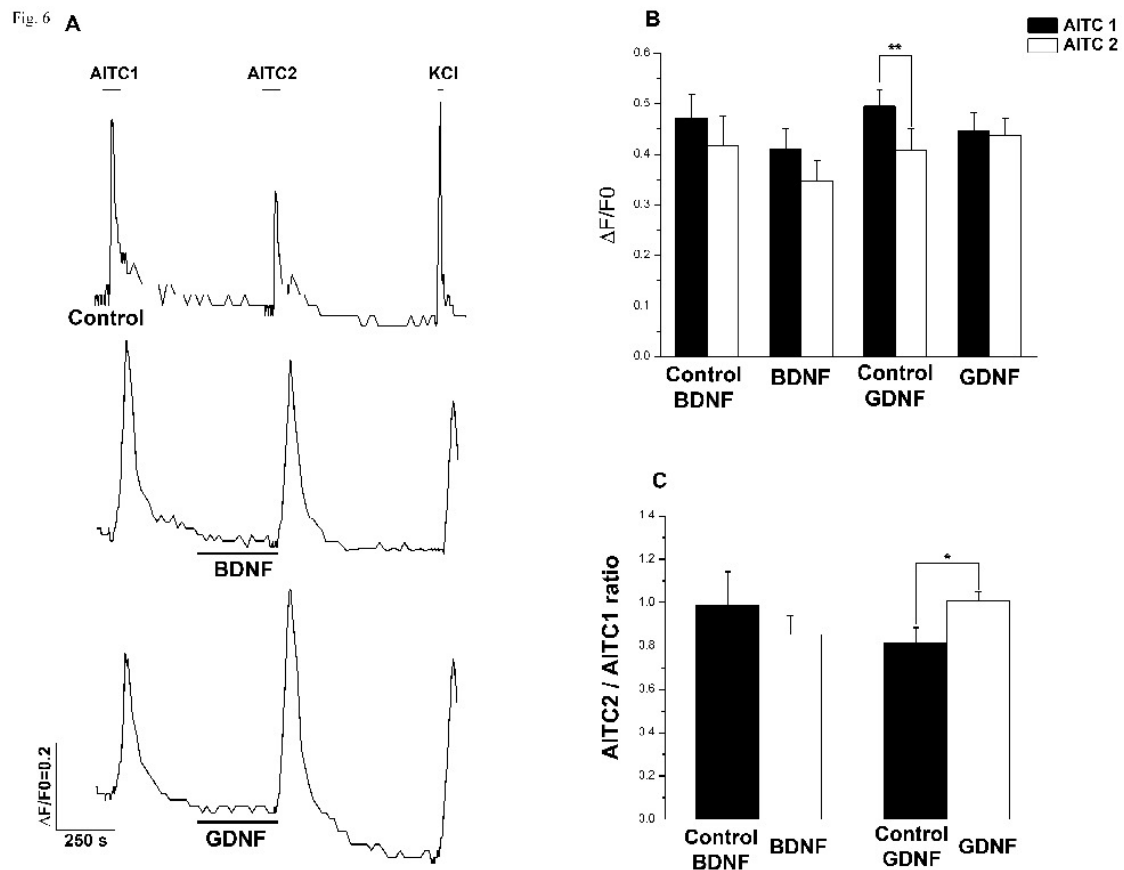


Fig. 6 Aplicarea acută de GDNF previne desensibilizarea răspunsurilor la AITC. **A.** Exemple reprezentative de răspunsuri la aplicări succesive de AITC în condiții control (sus), în celule tratate cu BDNF (mijloc) și în celule tratate cu GDNF (jos). **B.** analiza statistică a experimentelor ilustrate în A., barele reprezintă răspunsurile medii la prima (negru) și a doua (alb) aplicare de AITC; barele de eroare reprezintă S.E.M. **C.**

Comparația rapoartelor între al doilea și primul răspuns la AITC, ca măsură a gradului de desensibilizare. Testul statistic utilizat a fost testul t Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

În grupul de control, aplicarea repetată de AITC s-a soldat cu o tahifilaxie semnificativă, amplitudinea răspunsului scăzând de la $0,49 \pm 0,03$ pentru primul stimul, la $0,41 \pm 0,04$ pentru cel de-al doilea ($p < 0,05$, $n=26$, figura 6A și B). Acest efect a fost anulat de tratamentul cu GDNF: $0,45 \pm 0,04$ respectiv $0,43 \pm 0,03$ (NS, $n = 25$, figura 6A și B). O altă indicație a faptului că GDNF reduce gradul de desensibilizare a neuronilor sensibili la AITC, o reprezintă valoarea raportului dintre cel de-al doilea și primul răspuns la AITC: $0,81 \pm 0,07$ pentru control față de $1,00 \pm 0,05$ pentru neuronii tratați cu GDNF ($p < 0,05$, figura 6C). În schimb, răspunsul neuronilor la AITC nu a fost afectat de tratamentul cu BDNF.

Pentru a reduce efectul variabilității dintre animalele de la care au provenit neuronii studiați, în cazul aplicărilor acute de neurotrofine, au fost realizate controale separate pentru cele două grupuri de celule: tratate cu GDNF sau tratate cu BDNF. Gradul relativ ridicat de variabilitate dintre animale, se observă și din faptul că în cazul controlului pentru BDNF, AITC a indus o tahifilaxie semnificativă, în timp ce acest fapt nu se mai observă în cazul controlului pentru GDNF.

Discuții

Acest studiu a investigat efectele expunerii acute și cronice a neuronilor din ganglionii rădăcinii dorsale la factorii neurotrofici (NTF) BDNF și GDNF. Am studiat modificarea exprimării funcționale a trei canale ionice termoTRP (TRPM8, TRPA1 și TRPV1) în urma incubării cronice cu NTF. Au fost testate și efectele acute ale neurotrofinelor asupra răspunsurilor la căldură nocivă ($\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) și AITC.

În concluzie, rezultatele noastre identifică potențiale mecanisme prin care BDNF și GDNF își exercită efectele pro-algezice. Ambele neurotrofine precum și receptorii lor (trkB and GFR α 1) sunt modulate pozitiv în inflamație (Qiao, Grider, 2007; Cho et al., 1997; Amaya et al., 2004; Malin et al., 2006), indicând faptul că au un rol activ în durerea inflamatorie cronică. Acest studiu furnizează dovezi ale faptului că tratamentul cronic cu BDNF și GDNF induce alterări ale expresiei funcționale ale anumitor canale TRP cu

potențial rol în durerea inflamatorie. În plus, aplicarea acută a respectivelor neurotrofine sensibilizează nociceptorii la stimuli chimici și termici nocivi care pot sta la baza inițierii durerii inflamatorii.

Prof. Dr. Alexandru Babeș