



UNIVERSITAT DE BARCELONA



IDIBAPS



RESPUESTA DE LAS CÉLULAS GLIALES AL DAÑO NEURONAL *IN VITRO*

Tesis doctoral presentada por
Kamil Pérez Capote
Barcelona, febrero 2006

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Las células gliales en el sistema nervioso central.

La existencia de las células gliales o glía fue descrita por primera vez en 1856, cuando Rudolph Virchow reconoció la presencia de un componente intersticial o tejido conjuntivo en el sistema nervioso envolviendo los componentes nerviosos y que denominó *Nervenkitt* o neuroglía (**Figura 1**). En 1865 Otto Deiters fue el primero en identificar en el sistema nervioso central (SNC) células que no eran neuronas y que correspondían a las células del tejido conjuntivo, a las que se llamó células de Deiters. Probablemente Camillo Golgi supuso el inicio del estudio de las células gliales puesto que su técnica de impregnación argéntica (1885-1886) permitió identificar morfológicamente de manera fiable los distintos tipos celulares del sistema nervioso de los vertebrados. Describió las células gliales como células conjuntivas aracnoideas o estrelladas sin prolongación nerviosa. En 1893 Michael van Lenhossek introdujo el término de astrocito para hablar de las células de neuroglía de forma estrellada. También en 1893 William Lloyd Adriezen clasificó la glía en fibrosa, principalmente presente en la materia blanca, y protoplasmática, principalmente en la materia gris. La glía fibrosa estaba constituida por células estrelladas, con prolongaciones largas, delgadas y poco ramificadas. La glía protoplasmática estaba constituida por células con numerosas prolongaciones en todas direcciones, cortas y ramificadas. Santiago Ramón y Cajal atribuyó el nombre de astrocitos a estos dos tipos de glía y más tarde describió la presencia del *tercer elemento* celular del SNC (1913) además de los astrocitos y las neuronas. En 1921 Pío del Río-Hortega, discípulo de Cajal, describió un nuevo tipo celular en el SNC, la microglía (*células de Hortega*). Además también fue el primero en teñir y definir otro tipo de células gliales, los oligodendrocitos a los que inicialmente denominó como *glía interfascicular*. Paralelamente Wilder Penfield (1924) presentó un estudio sobre la oligodendroglía. A principios del siglo XX quedaron pues definidos los tres tipos principales de células gliales en el SNC: astrocitos, microglía y oligodendrocitos (**Figura 2**). La proporción relativa de cada uno de estos tipos celulares varía con la especie, la región cerebral analizada e incluso con la edad (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

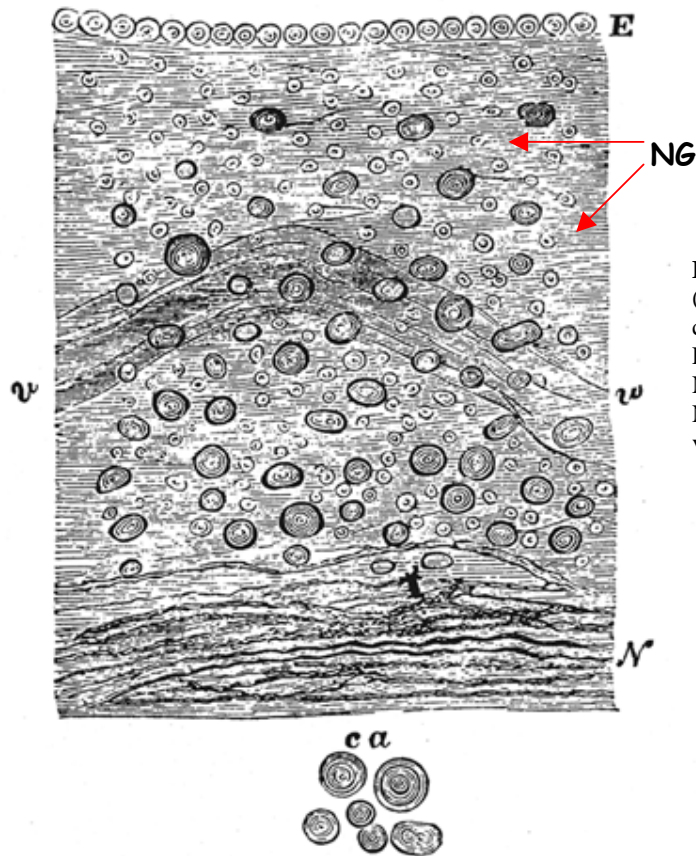


Figura 1. *Nervenkitt* o neuroglía (Virchow, 1856).
 ca: cuerpos amiloides
 E: epéndimo
 N: fibras nerviosas
 NG: neuroglía
 vw: vasos sanguíneos

La mayoría de los estudios sobre el SNC hasta la década de los 80 se centraron, fundamentalmente, en la fisiología y desarrollo neuronal. En contraste, a las células gliales se les había prestado, comparativamente, muy poca atención. El escaso conocimiento que se tenía de estos tipos celulares era consecuencia de dificultades metodológicas de distinta índole que no permitían abordar el estudio de su origen y fisiología. En la actualidad, con el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos y de células, inmunocitoquímicas y de biología molecular, se ha podido profundizar en el estudio de la estructura y funcionamiento de las células gliales y se está comprobando su importancia en el sistema nervioso tanto en condiciones normales como patológicas (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998). Durante mucho tiempo las células gliales han sido consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso; hoy en día, el concepto sobre sus funciones en la fisiología del cerebro ha cambiado y se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de las señales nerviosas (Kirchhoff y cols., 2001).

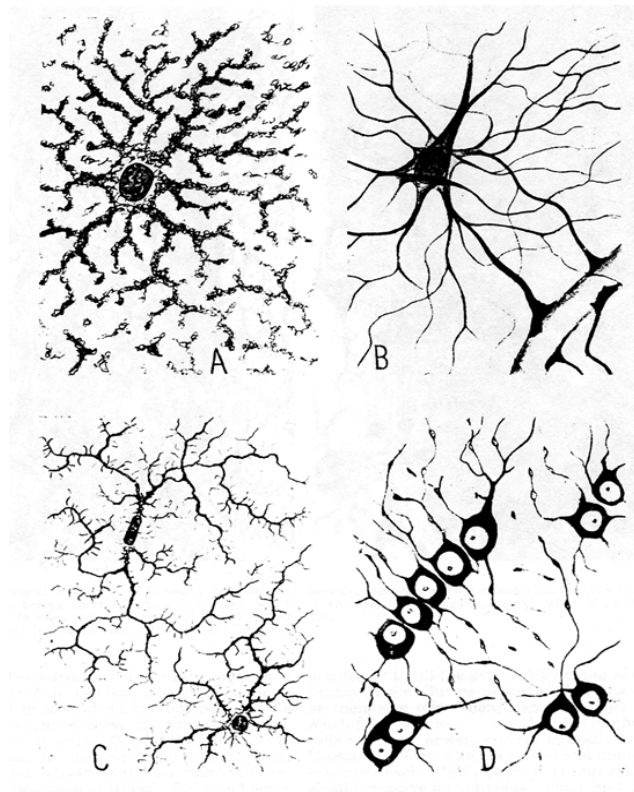


Figura 2. Principales tipos de células gliales del SNC humano (del Río-Hortega, 1920). A: astroglia protoplasmática de la materia gris, B: astroglia fibrosa de la materia blanca, C: microglía, D: oligodendrocitos de la materia blanca.

Durante el desarrollo embrionario, la glía conduce la migración de las neuronas y participa en la decisión sobre su organización dentro del cerebro. En el organismo adulto, los oligodendrocitos sintetizan y mantienen las vainas de mielina que recubren los axones neuronales facilitando la rapidez de la propagación del impulso nervioso, la microglía constituye el sistema inmune del cerebro por su capacidad de respuesta ante la invasión de microorganismos y la eliminación de los restos celulares y la astroglia proporciona el soporte nutricional y trófico a las neuronas vecinas, modula su actividad sináptica regulando los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores (Travis, 1994). En condiciones fisiológicas las células gliales desempeñan funciones tales como la producción de factores neurotróficos, regulación de la homeostasis del entorno neuronal, mantenimiento de la capacidad de señalización de las células nerviosas y la preservación de las sinapsis. Ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera

gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada” (Raivich y cols., 1999). Pero no toda la glía responde de la misma manera cuando se produce un daño neuronal. En este sentido, se ha de señalar que generalmente los oligodendrocitos no muestran cambios reactivos después de lesiones en el SNC y que, al igual que las neuronas, son más susceptibles cuando el daño es sostenido. Por lo tanto, la astrogλία y la microglía son las dos mayores poblaciones de células gliales reactivas (Streit y cols., 1999).

1.1.1-Tipos mayoritarios de células gliales.

1.1.1.1- Astrogλία.

Los astrocitos representan la población de células gliales más abundante del cerebro, constituyendo más del 50 % del total celular de la corteza cerebral. Santiago Ramón y Cajal los describió como células de formas estrelladas con un soma circunscrito al núcleo, del cual parten una serie de prolongaciones en sentido más o menos radial (**Figura 3**). Estudios ultraestructurales han revelado la presencia de numerosos microtúbulos y microfilamentos en el citoplasma, que se han denominado gliofilamentos. Uno de los gliofilamentos más importantes, que se extiende por el soma y las prolongaciones, está constituido por la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), cuya presencia permite la identificación de las células astrogliales con métodos de microscopía electrónica e inmunocitoquímica (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998). En cultivos de astrocitos de neonatos, la coexpresión de la GFAP con otro componente de los gliofilamentos, la proteína vimentina, se consideraba hasta hace bien poco como el marcador de astrocitos indiferenciados. No obstante, estudios con ratones deficientes en vimentina han demostrado que esta proteína es esencial para el correcto ensamblaje de la GFAP en aquellas regiones del SNC donde ambas proteínas están presentes (Galou y cols., 1996). Asimismo, se han sugerido otros marcadores para la astrogλία mediante técnicas inmunocitoquímicas, como la enzima específica glial glutamina sintetasa, la α -isoenzima de enolasa, la proteína S-100 β y la proteína SC1 (Mckinnon y Margolskee, 1996; Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Tal como se ha mencionado anteriormente, *in vivo* se han descrito morfológicamente dos tipos mayoritarios de células astrogliales: los astrocitos fibrosos y los protoplasmáticos. Además, se han descrito otros tipos ya sea en el sistema

nervioso en desarrollo (glía radial) o en regiones concretas del SNC adulto (células de Müller de la retina, glía de Bergmann del cerebelo y tanicitos). Los astrocitos fibrosos o estrellados predominan en la materia blanca y se caracterizan por tener unas prolongaciones largas, cilíndricas y lisas que en ocasiones se apoyan en las paredes de los vasos. Los astrocitos protoplasmáticos están localizados preferentemente en la materia gris y son más ramificados, con prolongaciones cortas y rugosas (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998). En el cerebro normal, la mayoría de los astrocitos protoplasmáticos son GFAP negativos, lo cual dificulta su detección con las técnicas inmunocitoquímicas de rutina existentes. Aunque este tipo de astrocitos posee inmunoreactividad para la anhidrasa carbónica, la proteína S-100 β o la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la detección de estos antígenos está limitada sólo al cuerpo celular y a unas pocas ramificaciones (Raivich y cols., 1999). *In vitro* resulta más difícil identificar estos dos tipos de astrocitos, ya que su aspecto puede variar según la composición del medio de cultivo (concentración de suero, factores de crecimiento, AMPc,...) (Peuchen y cols., 1997). En cultivos primarios de astrocitos se han descrito dos poblaciones distintas, los denominados astrocitos de tipo I, que no presentan prolongaciones y constituyen la subpoblación predominante, y los astrocitos de tipo II, con prolongaciones y presentes en menor proporción. Los astrocitos tipo I y tipo II, además de diferenciarse morfológicamente, difieren en sus antígenos de superficie, origen embrionario, sistemas de transporte activo y expresión de receptores y canales iónicos (Inagaki y cols., 1991; Seidman y cols., 1997). De todas maneras, ninguna de estas clasificaciones engloba la gran heterogeneidad de astrocitos existentes, puesto que existen evidencias que apuntan que su morfología puede variar en presencia de neuronas y neurotransmisores, durante ciertos estados patológicos o entre diferentes regiones cerebrales (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Inicialmente, los astrocitos se consideraban elementos de soporte pasivo de las neuronas en el cerebro. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que desempeñan un papel importante en muchos de los aspectos de la función y disfunción del SNC. De manera similar a las células mesenquimáticas en los tejidos periféricos, los astrocitos proporcionan el soporte físico a las neuronas vecinas, a las meninges y a los vasos sanguíneos. Proveen metabólicamente de manera optimizada los nutrientes a las neuronas, sus dendritas y sinapsis, y mantienen estable el pH extracelular eliminando el

CO₂ que las neuronas generan como producto del metabolismo aerobio que desarrollan normalmente. Los astrocitos también intervienen en la modulación de las concentraciones de neurotransmisores, principalmente del glutamato, en el espacio extracelular y se encargan de mantener los gradientes iónicos dependientes de energía (Ca²⁺, Na⁺, K⁺). Se les ha implicado en el control de la barrera hematoencefálica (BHE) y juegan un papel protector frente a la toxicidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), H₂O₂, metales y xenobióticos, ya que poseen sistemas enzimáticos específicos para su eliminación. Se ha descrito que los astrocitos tienen una importante función reguladora en la inducción de uniones estrechas entre las células endoteliales y del fenotipo ramificado de la microglía y de los monocitos derivados de la sangre. La astrogliá también provee de numerosos factores tróficos (NGF, factor de crecimiento nervioso; CNTF, factor neurotrófico ciliar; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF-1, factor 1 de crecimiento similar a la insulina; TGF- α , factor de necrosis tumoral α) a las neuronas y oligodendrocitos vecinos, particularmente después de una lesión. Asimismo, durante el desarrollo embrionario son los encargados de favorecer la migración de las neuronas sirviendo de guía para el crecimiento de los axones. Además, se ha demostrado que los astrocitos incrementan el número de sinapsis funcionales maduras de las neuronas del SNC y que son requeridos para el mantenimiento sináptico *in vitro*. Para llevar a cabo todas estas funciones la astrogliá requiere de una considerable cantidad de energía metabólica. A diferencia de las neuronas, los astrocitos establecen contacto con los vasos sanguíneos y tienen acceso a la glucosa que se transporta por la circulación sanguínea. La glucosa que se utiliza en el cerebro es captada por los astrocitos, quienes actúan como intermediarios en su transporte hasta las neuronas. Además, el astrocito, a diferencia de la neurona, es capaz de almacenar glucógeno como fuente de energía (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998; Raivich y cols., 1999; Dong y Benveniste, 2001; Chen y Swanson, 2003).

Los astrocitos expresan en su membrana celular una multitud de receptores capaces de responder ante varios compuestos neuroactivos tales como: las purinas ATP, UTP y adenosina; aminoácidos como el glutamato y el GABA (ácido γ -aminobutírico); péptidos como el VIP (péptido intestinal vasoactivo) y la endotelina-1; aminas como la noradrenalina, histamina, dopamina y serotonina; así como también diversas citocinas y factores de crecimiento. La función *in vivo* de estos receptores, con excepción del

glutamato y algún otro, así como su contribución a la fisiología del SNC están aún por establecer. Además, los astrocitos poseen un número importante de transportadores en las membranas celulares para varios de los compuestos neuroactivos antes mencionados (Peuchen y cols., 1997). Estos transportadores activan selectivamente diferentes vías de transducción de señales que operan en la astroglia y que involucran a la proteína quinasa C (PKC), la tirosina quinasa y las proteínas quinásas activadas por mitógenos (MAPKs) (Malarkey y cols., 1995). Los astrocitos también expresan receptores nucleares para las hormonas esteroideas y tiroideas y poseen muchas de las vías necesarias para la síntesis y metabolismo de estas hormonas (Carlson y cols., 1996; García-Segura y cols., 1996). Recientemente se ha descubierto que los astrocitos son capaces de sintetizar y liberar muchos componentes de las vías secretoras de estas hormonas (Papura y cols., 1995) y de sintetizar varios esteroides y eicosanoides (Martin, 1992).

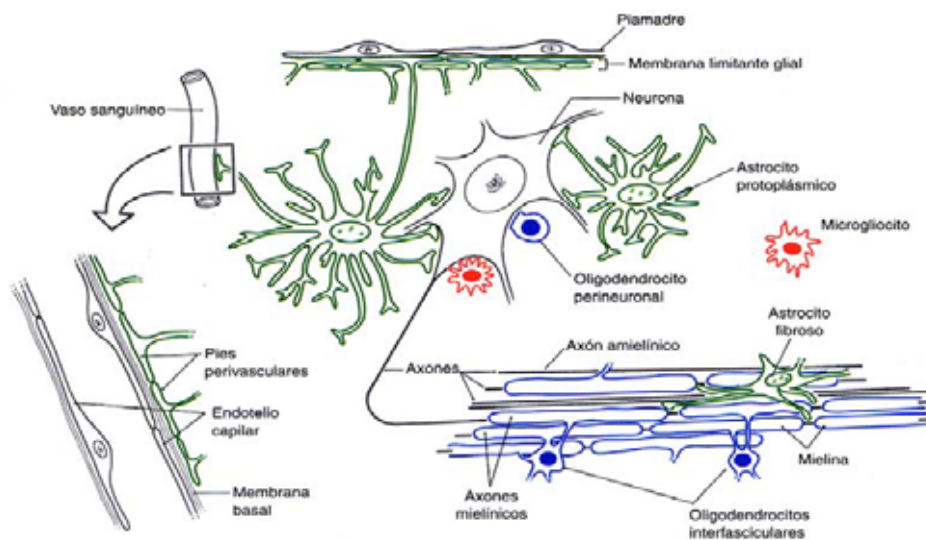


Figura 3. Interacciones entre los distintos tipos celulares del SNC (Hutchins y cols., 2003).

1.1.1.2- Oligodendroglía.

Los oligodendrocitos sintetizan y mantienen una de las estructuras celulares más altamente especializadas del organismo, las vainas de mielina, que recubren los axones neuronales facilitando la rapidez de la propagación del impulso nervioso (**Figura 3**). Un único oligodendrocito puede mielinizar entre unos 30-40 axones (Jessen, 2004). Fueron descritos por Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río-Hortega como células neurogliales

multipolares con una enorme variabilidad morfológica. Pueden ser identificados y clasificados teniendo en cuenta su localización, marcadores específicos y recambio de DNA en tres tipos: oligodendrocitos satélites, interfasciculares e intermedios. Los oligodendrocitos satélites son de pequeño tamaño (10 μm), su localización está restringida a la materia gris y rodean toda la superficie del cuerpo neuronal, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento de la fisiología de las neuronas. Los oligodendrocitos interfasciculares tienen un tamaño medio (20 μm), que puede disminuir en el adulto (10-15 μm), presentan un núcleo que ocupa un elevado porcentaje del volumen total de la célula, se localizan en la materia blanca donde se disponen en paralelo a lo largo de los axones mielinizados, son los responsables de los procesos de mielinización durante el desarrollo y se encargan de mantener las vainas de mielina en el adulto. Los oligodendrocitos intermedios se cree que son células precursoras que pueden dar lugar tanto a los interfasciculares como a los satélites y que se distribuyen ampliamente a través de las materias blanca y gris (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998, Ness y cols., 2005).

Diferentes técnicas inmunocitoquímicas permiten la identificación de los oligodendrocitos utilizando un amplio rango de anticuerpos contra marcadores de superficie e intracelulares. Los anticuerpos A2B5, O4 y O1 identifican el progenitor de oligodendrocitos temprano, el progenitor de oligodendrocitos tardío y los oligodendrocitos postmitóticos inmaduros respectivamente. Los marcadores de superficie celular son muy ventajosos en estudios con cultivos celulares, pero algunos son sensibles a detergentes, marcan inespecíficamente a la mielina y requieren de técnicas especiales para su empleo en el tejido intacto. Entre ellos tenemos a los galactocerebrósidos (O1), gangliósidos (LB1, R24) y los sulfátidos (O4). La identificación de progenitores de oligodendrocitos jóvenes y adultos también se puede llevar a cabo con el empleo del anticuerpo NG2, que marca el proteoglicano condroitín sulfato NG2. La utilización de anticuerpos contra la proteína básica de la mielina (MBP), que representa el 30% del contenido proteico de la mielina en el SNC, permite el marcaje del cuerpo celular así como de las vainas de mielina de oligodendrocitos maduros. La 2'3'-nucléotido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) se ha descrito como marcador intracelular de los cuerpos celulares de oligodendrocitos maduros mielinizados (Ness y cols., 2005). Otros marcadores específicos de oligodendrocitos son

el Rip, las anfoterinas P-30 y HMG-1, la isoenzima anhidrasa carbónica II y la transferrina (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Se ha sugerido que los oligodendrocitos, además de producir y mantener las vainas de mielina y regular la función de los axones, también están implicados en el control del ambiente iónico del neuropilo, sobre todo en lo que se refiere al transporte de agua y cloro. Además, se ha demostrado que poseen receptores muscarínicos, receptores para hormonas tiroideas, receptores nucleares para 3,5,3'-triiodotironina, receptores de glutamato de tipo AMPA/KA, y receptores para factores de crecimiento derivados de plaquetas (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Existen muchas proteínas relacionadas con la mielina aunque no forman parte de ella, que se localizan en otras membranas gliales asociadas y son importantes para que la formación y mantenimiento de los axones mielinizados ocurra con normalidad. Una de estas proteínas es la glicoproteína mielin-oligodendrocito (MOG), que es específica del SNC y se localiza selectivamente en la superficie exterior de las vainas de mielina y de los oligodendrocitos (Iglesias y cols., 2001).

Los oligodendrocitos poseen una capacidad de regeneración muy limitada, por lo que la lesión de unos pocos puede originar un área de desmielinización apreciable. Se sabe que son el tipo celular más vulnerable y los primeros elementos nerviosos que degeneran en las enfermedades del SNC donde la mielina está afectada (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998). Al igual que las neuronas, son altamente susceptibles a lesiones mediadas por estrés oxidativo, aminoácidos excitatorios, privación de factores tróficos y la activación de vías apoptóticas (Ness y cols., 2005).

1.1.1.3- Microglía.

A inicios del siglo XX, Pío del Río-Hortega describió la existencia de las células microgliales como una entidad glial independiente, íntimamente relacionada con las patologías del cerebro (**Figura 3**). La microglía representa un 10-20 % del total de la población de células gliales, se distribuye de manera ubicua en el SNC y está funcionalmente relacionada con los macrófagos de los tejidos periféricos y otras células del linaje monocítico. De acuerdo con lo postulado por del Río-Hortega, la idea que actualmente sostiene la mayoría de los neurobiólogos es que la microglía residente tiene un origen mesodérmico, es decir, que deriva de células precursoras de la médula ósea.

Estas células invaden el SNC en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario (**Figura 4**), se establecen dentro de su parénquima y dan lugar a las ramificaciones típicas que presenta la microglía residente (Raivich y cols., 1999, Gehrman y cols., 1995). Existen estudios *in vitro* que sugieren un origen neuroectodérmico (Federoff y cols., 1997), pero esta idea cada vez es menos aceptada (Guillemin y Brew, 2004).

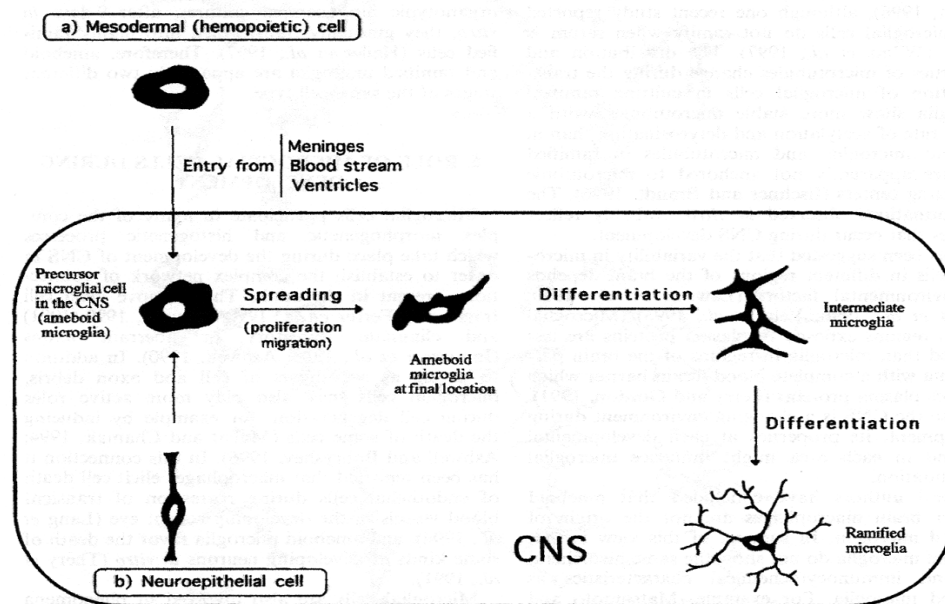


Figura 4. Esquema representativo del origen y la diferenciación de las células microgliales durante el desarrollo del SNC (Cuadros y Navascués, 1998).

En el SNC en desarrollo la microglía es mayoritariamente ameboide y a medida que avanza la maduración del SNC, desde la etapa fetal hasta inicios del período postnatal, se va diferenciando hacia células altamente ramificadas (**Figura 4**). Muchos estudios sostienen la idea de que la microglía ameboide que se encuentra perinatalmente sobretodo en áreas de la materia blanca, como el cuerpo caloso supraventricular, está constituida por macrófagos cerebrales que participan en la eliminación de las células muertas y/o de axones transitorios. Sin embargo, existe un gran número de estudios que evidencian que esta apariencia de la microglía primitiva similar a la de los macrófagos puede reflejar un estadio de inmadurez e indiferenciación. La microglía ameboide está virtualmente ausente en la materia gris (Streit y cols., 1999). En el SNC adulto, en condiciones normales, encontramos la microglía en estado de reposo o quiescente. La

microglía en reposo posee largas ramificaciones, que en la materia blanca se orientan en paralelo a las fibras nerviosas y en la materia gris adoptan una morfología estrellada (Raivich y cols., 1999).

Después de una lesión en el SNC se produce la activación de la microglía, que transforma su fenotipo de forma ramificada a una forma más redondeada o ameboides, parecida a la morfología de los macrófagos (Streit y cols., 1999). El avance de las técnicas de biología molecular e inmunológicas ha facilitado establecer un claro concepto de la activación microglial. Este fenómeno se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, inmunofenotípicos y funcionales, que pueden ir asociados a proliferación, migración y fagocitosis. Morfológicamente la microglía muestra un incremento en el tamaño del cuerpo celular, el engrosamiento de las ramificaciones proximales y una disminución de las ramificaciones distales. A nivel molecular, la activación parece avanzar a través de una serie de pasos que difieren respecto al estado de reposo en cuanto a la expresión de moléculas de adhesión celular, en la organización del citoesqueleto y en la presentación de antígenos. Entre los cambios inmunofenotípicos más destacables se incluye la expresión *de novo* de ciertas inmunomoléculas, algunas similares al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que sólo están presentes en células del sistema inmune. En términos de cambios funcionales, la microglía activada es capaz de liberar muchas sustancias mediadoras, factores de crecimiento, compuestos citotóxicos tales como ROS, óxido nítrico (NO) o proteasas, y citocinas inflamatorias como IL (interleucina)-1, IFN- γ (interferón γ) y TNF- α (Raivich y cols., 1999; Gehrman y cols., 1995). En una primera fase de activación la microglía se activa según estos criterios pero no es fagocítica. En una segunda fase, particularmente si ocurre degeneración de terminales y/o de neuronas, la microglía además se transforma en células fagocíticas. Se pueden distinguir dos tipos diferentes de microglía activada: la hipertrófica pero no fagocítica y la microglía totalmente fagocítica (Gehrman y cols., 1995).

Frecuentemente se hace referencia a las células de la microglía como los macrófagos residentes del SNC. Esta afirmación es correcta en el sentido de que la microglía posee un gran potencial para convertirse en fagocitos cuando es necesario, pero es importante señalar que en el SNC normal la microglía en reposo no se ocupa de la actividad fagocítica o pinocítica. La única población celular que representa los

macrófagos constitutivos dentro del SNC es la formada por las células perivasculares o pericitos, mientras que la microglía representa una población de fagocitos facultativa. La naturaleza facultativa de la microglía para fagocitar se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Streit y cols., 1999).

Existen diversos marcadores ampliamente utilizados para el reconocimiento de las células microgliales, entre ellos varios anticuerpos y varias lectinas (Thomas, 1992; Acarín y cols., 1994). Los anticuerpos disponibles se han obtenido contra antígenos específicos de macrófagos y por lo tanto reconocen preferencialmente las formas ameboide y reactiva de la microglía. Algunos de estos anticuerpos marcan tenuemente la microglía ramificada, como el OX-42 (también denominado MAC-1 o CD11b) mientras que otros no la marcan en absoluto, como el CD68 (o ED1). Sin embargo, *in vitro* todos estos anticuerpos suelen marcar tanto la microglía quiescente como la activada. A pesar de que las lectinas también marcan los vasos sanguíneos y los plexos coroideos, dentro del parénquima del SNC son marcadores específicos de las células microgliales, ya que no marcan neuronas, astrocitos ni oligodendrocitos. Existen diferentes tipos de lectinas, entre ellas la lectina de tomate, pero todas reconocen selectivamente residuos de D-galactosa tanto en las formas ramificadas como en las ameboides de la microglía.

1.1.2- Función de las células gliales.

1.1.2.1- Soporte trófico de las neuronas.

Los astrocitos están considerados como los principales candidatos en el aporte de nutrientes a las neuronas, debido a su localización exclusiva estableciendo contacto tanto con los vasos sanguíneos como con los cuerpos celulares de las neuronas (**Figura 5**). La glucosa es la principal fuente de energía del cerebro, por lo que el suministro continuo de glucosa por parte de la circulación sanguínea es esencial para el funcionamiento normal del cerebro. La glucosa es captada por el cerebro por difusión facilitada por las células endoteliales de los vasos sanguíneos y transportada según el gradiente de concentración existente hacia a los astrocitos y las neuronas (revisado en Peuchen y cols., 1997). Los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 son los encargados de regular los niveles intracelulares de glucosa en respuesta a requerimientos fisiológicos y patológicos. Tanto en las células endoteliales como en los

astrocitos y las neuronas está presente el transportador de glucosa GLUT1, mientras que el GLUT3 se localiza principalmente en neuronas (Olson y Pessin, 1996). En los astrocitos, la glucosa es metabolizada a piruvato mediante la glicolisis, el cual a su vez es convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (isoenzima LDH5 astrogliar). El lactato es exportado por los astrocitos y captado por las neuronas mediante transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT1 en astrocitos y MCT2 en neuronas). En las neuronas, el lactato es convertido a piruvato (isoenzima LDH1 neuronal) y utilizado en la mitocondria para la generación de ATP mediante fosforilación oxidativa. Por lo tanto, el lactato es un sustrato metabólico suplementario para las neuronas, capaz de mantener los niveles de ATP y promover la supervivencia neuronal. En cultivos de ratón, la producción y liberación de lactato es siete veces superior en los astrocitos que en las neuronas (revisado en Kahlert y Reiser, 2004).

En mamíferos la glicolisis tiene lugar tanto en astrocitos como en neuronas, pero las reservas de glucógeno y la enzima que cataliza su degradación se localizan exclusivamente en los astrocitos (Dringen y Hamprecht, 1993). Una parte de la glucosa que es captada por los astrocitos se acumula en forma de glucógeno (**Figura 5**) (Maher y cols., 1994; Wiesinger y cols., 1997), el cual representa una fuente de energía disponible para las neuronas en ausencia de glucosa o cuando los astrocitos son activados por neurotransmisores (revisado en Takuma y cols., 2004).

Además, los astrocitos son capaces de secretar neurotransmisores (glutamato, purina, taurina), factores de crecimiento y citocinas (TNF- α ; IL-6) a través de mecanismos dependientes de transportadores, que pueden modular de manera continua las acciones de las neuronas vecinas. Entre los factores liberados por los astrocitos que promueven la supervivencia neuronal tenemos neurotrofinas (el NGF; el BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; el GDNF, factor neurotrófico derivado de la glía y el bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico), citocinas (la IL-6; el TGF- β , factor de crecimiento transformante β), quimiocinas (RANTES y la proteína inflamatoria de macrófagos), el inhibidor del activador de plasminógeno 1, la eritropoyetina y la lipocortina 1, entre otros. Muchos neurotransmisores regulan la liberación de estos factores neuroprotectores por parte de los astrocitos. Estos factores neuroprotectores derivados de los astrocitos también promueven la supervivencia y proliferación de los propios astrocitos (revisado en Takuma y cols., 2004).

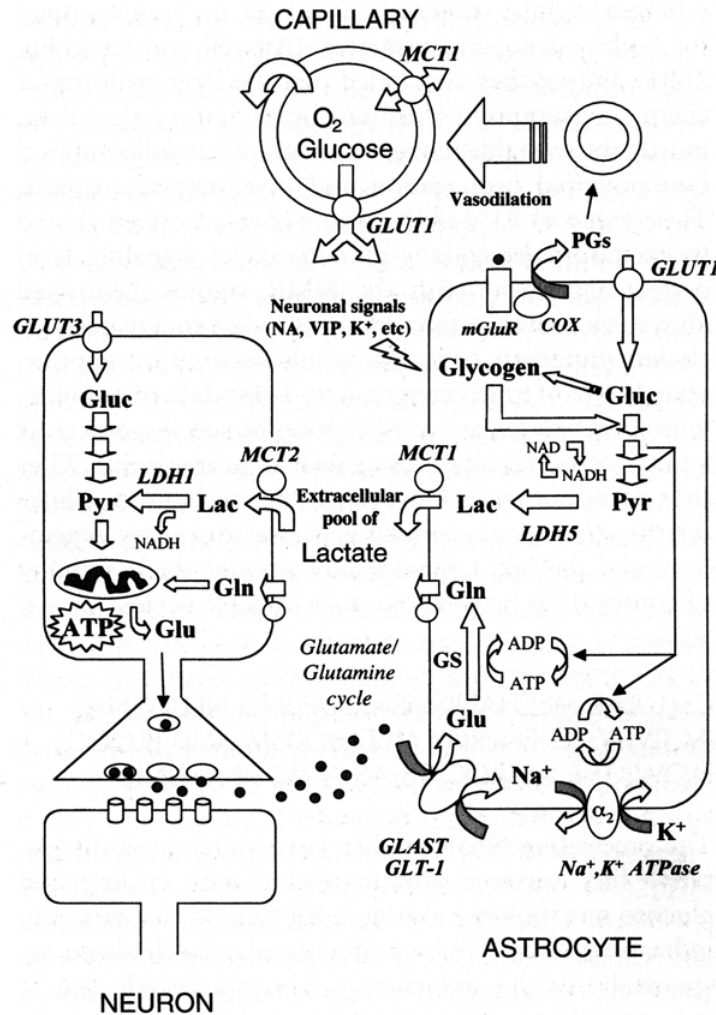


Figura 5. Papel de los astrocitos en el metabolismo energético de las neuronas y en el ciclo glutamato-glutamina (Pellerin y Magistretti, 2005). GLAST: transportador de glutamato y aspartato, Gln: glutamina, GLT-1: transportador de glutamato de tipo 1, Glu: glutamato, Gluc: glucosa, GLUT: transportador de glucosa, Lac: lactato, LDH: enzima lactato deshidrogenasa, MCT: transportador de ácidos monocarboxílicos, PGs: prostaglandinas, Pyr: piruvato.

Recientemente se ha sugerido que los astrocitos regulan la microcirculación del cerebro. En respuesta a la actividad neuronal se generan oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los astrocitos, que se propagan de unos astrocitos a otros hasta llegar a los pies astrocitarios que están en contacto con los vasos sanguíneos. Estas oscilaciones pueden inducir la secreción de prostaglandinas por los astrocitos o pasar a las células endoteliales y generar la liberación de prostaglandinas, que actúan directamente sobre las células de la musculatura lisa mediando la dilatación

de los vasos cerebrales (Fellin y Carmignoto, 2004). De esta manera se modifica el aporte sanguíneo y por lo tanto el aporte de nutrientes al cerebro (**Figura 5**).

1.1.2.2- Modulación de los niveles de glutamato extracelular.

El ácido L-glutámico es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de mamíferos, pero puede resultar tóxico cuando se encuentra en concentraciones elevadas. La concentración extracelular de glutamato normalmente es mantenida por debajo de los 10 μ M, mientras que los niveles intracelulares oscilan entre 1-10 mM. (Erecinska y Silver, 1990; Chen y cols., 2003). La liberación excesiva de glutamato en el espacio sináptico constituye un evento inicial y crítico en la muerte neuronal mediada por Ca^{2+} y está implicada en muchos procesos neurodegenerativos (Meldrum, 2000). La terminación de las acciones postsinápticas del glutamato durante la transmisión de señales entre las neuronas y la eliminación de las excesivas concentraciones de glutamato están garantizadas por un sistema de recaptación de glutamato de elevada afinidad, representado por una familia de glicoproteínas transmembranales especializadas, los transportadores de glutamato. Hasta la fecha se han identificado y clonado cinco tipos diferentes de transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de Na^+ : GLAST (o EAAT1), GLT-1 (o EAAT2), EAAC1 (o EAAT3), EAAT4 y EAAT5 (Anderson y Swanson, 2000; Danbolt, 2001; O'Shea, 2002). Los miembros de esta familia de transportadores se localizan tanto en neuronas como en astrocitos: EAAC1 en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, GLAST en la glía de Bergmann, GLT-1 en los astrocitos del hipocampo y la corteza cerebral, EAAT4 principalmente confinado a las dendritas de Purkinje cerebelares y EAAT5 selectivamente en la retina (Gadea y López-Colomé, 2001). La distribución de los diferentes transportadores de glutamato varía según la región, el tipo celular y la etapa de desarrollo. Aunque generalmente está aceptado que GLAST y GLT-1 son gliales y EAAT3, EAAT4 y EAAT5 neuronales, estudios recientes demuestran la existencia de un patrón de expresión más complejo que esta simple segregación de transportadores de glutamato neuronales y gliales (Hu y cols., 2003). En el cerebro adulto, las membranas de los astrocitos que están en contacto directo con las terminales nerviosas, axones y espinas presentan densidades más elevadas de GLT-1 y GLAST que las que están en contacto con los capilares, la pía y las raíces dendríticas, lo cual es consistente con la

importancia de los transportadores astrocitarios para la eliminación del glutamato del espacio extracelular después de la transmisión sináptica (Chaudhry y cols., 1995). El funcionamiento de los transportadores de glutamato depende principalmente de gradientes de Na^+ y K^+ , los cuales son mantenidos por la Na^+/K^+ -ATPasa. La entrada de glutamato dentro de los astrocitos es un proceso que requiere energía (Bouvier y cols., 1992).

Los astrocitos son los responsables de la recaptación de la mayor parte de glutamato y de su metabolismo en el cerebro. Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, poseen una elevada actividad glutamina sintetasa, una enzima exclusiva de las células gliales que convierte el glutamato en glutamina a través de una reacción de amidación que consume energía. La glutamina, que no posee actividad como neurotransmisor, puede ser liberada y captada por las neuronas en cuyo interior es reconvertida a glutamato por una glutaminasa, una enzima que se activa por fosfato y que también está presente en los astrocitos. Alternativamente, el glutamato puede funcionar como sustrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, donde es convertido a 2-oxoglutarato. De esta manera se estimula la glicolisis, que representa una vía de destoxicación del glutamato en astrocitos, y se potencia la exportación de lactato, que es una eficiente fuente de energía para las neuronas (Hertz y cols., 1998, Hertz y cols., 1999). Las concentraciones extracelulares de glutamato determinan la prevalencia entre la síntesis de glutamina (a bajas concentraciones) y el metabolismo oxidativo del glutamato (a elevadas concentraciones) (McKenna y cols., 1996).

El glutamato también es capaz de regular su propio transporte. Estudios recientes demuestran que la regulación al alza de la recaptación de glutamato por los astrocitos inducida por el glutamato es resultado de un incremento de la expresión de GLAST en la superficie celular (revisado en Gadea y López-Colomé, 2001).

La presencia de citocinas inflamatorias tales como el $\text{IFN-}\gamma$, el $\text{TNF-}\alpha$ y la IL-1 puede atenuar de manera dosis dependiente la recaptación de glutamato. Este efecto está mediado por la liberación de NO como consecuencia de la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Además, el NO es capaz de incrementar drásticamente la liberación del glutamato intracelular, que puede alcanzar el orden de mM en los astrocitos, en un modo NO/guanilato ciclasa dependiente. En consecuencia, el NO juega

un papel en la modulación de la recaptación de glutamato por parte de los astrocitos (Ye y Sontheimer, 1998b).

El envejecimiento del cerebro parece afectar la recaptación del glutamato (Segovia y cols., 2001). Los mecanismos que modulan el papel de los astrocitos durante este proceso son de gran importancia. Existen trabajos que describen un incremento en el número y/o la reactividad de los astrocitos durante el envejecimiento (David y cols., 1997). No obstante, poco se conoce sobre el envejecimiento del propio astrocito (Cotrina y cols., 2001). Estudios *in vitro* muestran que astrocitos de hipocampo adulto presentan un incremento en la recaptación basal de glutamato (Gottfried y cols., 2002). Sin embargo, estudios *in vivo* muestran que la liberación basal de glutamato parece incrementarse con la edad en el hipocampo (Massieu y Tapia, 1997). Estas observaciones sugieren que se podría tratar de fenómenos compensatorios.

Se ha descrito que la microglía también es capaz de expresar transportadores de glutamato tanto *in vivo* como *in vitro* (Kondo y cols., 1995), aunque poco se conoce sobre su regulación en estas células. Existen varias evidencias que indican que los transportadores de glutamato microgliales pueden ser inducidos (Persson y cols., 2005). La recaptación de glutamato por la microglía es aproximadamente un 10% del valor medido en astrocitos, lo que sugiere diferencias entre estos dos tipos celulares en cuanto a las funciones fisiológicas de la recaptación de glutamato (Leonova y cols., 2001). Por otra parte, se ha sugerido la existencia de un control recíproco para los transportadores de glutamato entre los astrocitos y la microglía y que ciertos factores podrían regularlos de manera diferente (Persson y cols., 2005; Fine y cols., 1996; Liao y Chen, 2001). El transporte de glutamato por parte de la microglía en cierto modo podría constituir un mecanismo de reserva, que compensaría la disminución en la recaptación astrogliar durante eventos patológicos del SNC.

1.1.2.3- Mantenimiento de la homeostasis iónica.

El mantenimiento de un ambiente iónico interno estable es imprescindible para una actividad cerebral normal. Las células gliales son esenciales para el mantenimiento del K^+ extracelular a niveles compatibles con una función neuronal continua. Como consecuencia directa de la actividad neuronal hay una rápida liberación de K^+ al medio extracelular. Una de las principales funciones de los astrocitos es mantener los niveles

de K^+ extracelular, a partir de tres mecanismos distintos: difusión pasiva, transporte activo y redistribución espacial. En presencia de una actividad neuronal normal, el K^+ entra en los astrocitos por transporte pasivo a través de cotransportadores Cl^-/K^+ . Sin embargo, cuando se produce una elevación marcada del K^+ extracelular, los astrocitos captan el K^+ de manera activa a través de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. Esta bomba de los astrocitos es diferente de la neuronal y es capaz de funcionar a niveles de K^+ extracelular mucho más elevados teniendo así una capacidad amortiguadora mayor. La redistribución espacial de K^+ se consigue de forma pasiva a través de la interconexión de los astrocitos formando un sincitio mediante uniones *gap*, que son permeables al K^+ . Los astrocitos también pueden tamponar el K^+ liberándolo directamente desde sus extremos terminales (pies astrocitarios) a los capilares sanguíneos. Mediante estos mecanismos se consigue una rápida redistribución del K^+ desde las áreas perineuronales hasta las perivasculares o desde las regiones de elevada actividad neuronal hasta las regiones menos activas (revisado por Gee y Keller, 2005). En el proceso de redistribución del K^+ a través del sincitio glial es especialmente importante el papel de la taurina (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998). La taurina es un β aminoácido que ejerce efectos osmorreguladores en el cerebro y que se expresa predominantemente en las células gliales del núcleo supraóptico (Simard y Nedergaard, 2004).

La homeostasis del K^+ y la del agua están íntimamente relacionadas en el cerebro. La captación de K^+ por parte de las células gliales provoca un incremento en la osmolaridad intracelular que los astrocitos compensan con una entrada de agua. Dado que los canales de K^+ no admiten el paso de agua, los flujos de agua que la acompañan deben ser mediados por canales diferentes. Las aquaporinas son canales de membrana relacionados con el movimiento de agua. La entrada de agua implica un incremento del volumen de los astrocitos, que se corrige rápidamente mediante la salida de metabolitos y corrientes de Cl^- y de K^+ (Simard y Nedergaard, 2004).

La actividad metabólica y la actividad nerviosa resultan en cambios en el pH intracelular y extracelular en el sistema nervioso, que deben ser contrarrestados para que éste pueda seguir funcionando normalmente (revisado en Deitmer y Rose, 1996; Chesler, 2003). La regulación del contenido de H^+ en el sistema nervioso depende de distintos procesos: tamponamiento de H^+ en el citoplasma celular, secuestro de H^+ en compartimentos intracelulares, difusión de CO_2 , actividad de la enzima anhidrasa

carbónica y transporte de equivalentes ácido/base a través de la membrana celular. Las células gliales participan en estos procesos y por lo tanto tienen un papel importante en contrarrestar alteraciones del equilibrio ácido/base que se dan en el sistema nervioso. La actividad metabólica de las células va asociada a una producción de H^+ . Estos iones no atraviesan de manera pasiva las membranas celulares y deben ser extraídos por transporte activo para mantener el pH intracelular cercano a 7. El cotransportador Na^+/HCO_3^- electrogénico y reversible, que sólo ha sido identificado en células gliales, desempeña un papel central en la regulación tanto del pH intraglial como del pH extracelular. Otros transportadores, presentes tanto en astrocitos como en neuronas, participan en la extracción del H^+ desde el citoplasma hacia el espacio extracelular, como el intercambiador de Na^+/H^+ y los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- dependientes e independientes de Na^+ . La liberación de neurotransmisores va asociada a una alcalinización del medio extracelular. La anhidrasa carbónica, que cataliza la reacción reversible $CO_2 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ y se encuentra en células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) pero no en neuronas, es esencial para un adecuado funcionamiento del sistema de tamponamiento CO_2/HCO_3^- en la regulación rápida de una alcalinización extracelular.

1.1.2.4. Las células gliales y la barrera hematoencefálica.

La BHE está formada por las células endoteliales que bordean la microvasculatura cerebral (revisado en Abbot, 2002; Ballabh y cols., 2004; Abbot, 2005; Haseloff y cols., 2005). Constituye un mecanismo de gran importancia para la protección del cerebro frente a fluctuaciones en la composición del plasma y la presencia de agentes circulantes capaces de perturbar la función neuronal, como neurotransmisores o xenobióticos. La BHE también juega un papel importante en la regulación homeostática del microambiente cerebral necesario para una actividad estable y coordinada de las neuronas. El fenotipo de la BHE se desarrolla bajo la influencia de las células cerebrales asociadas, en especial la astrogliá debido a su cercana proximidad anatómica. Las prolongaciones de los astrocitos recubren la mayor parte de la superficie de las membranas externas del endotelio cerebral (**Figura 6**). La presencia de los astrocitos contribuye a la formación de las uniones estrechas intercelulares entre las células endoteliales e incrementa la expresión y función de

muchos de los transportadores endoteliales. Factores solubles derivados de los astrocitos son capaces de inducir el fenotipo de la BHE en células endoteliales en cultivo. Aunque la naturaleza química de la señal inductora aún se desconoce, se han identificado varias moléculas candidatas, como la IL-6, el TGF- β , el GDNF, el bFGF y esteroides como la hidrocortisona.

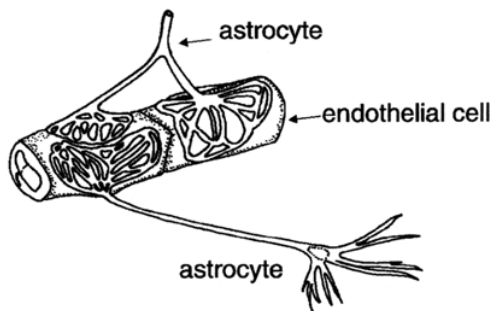


Figura 6. Esquema de la disposición de las prolongaciones de los astrocitos en la superficie de los capilares cerebrales (Abbot, 2002).

1.1.2.5- Protección frente al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo está involucrado en muchas de las patologías severas del SNC, tales como la isquemia y la excitotoxicidad, y en muchas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (revisado en Kahlert y Reiser, 2004; Takuma y cols., 2004; Chen y Swanson, 2003). Un desequilibrio entre la producción de ROS, generadas principalmente en el compartimento mitocondrial, y la capacidad antioxidante resulta en el estrés oxidativo. Este desequilibrio puede ser inducido por numerosos factores: metales de transición, el péptido β -amiloide (A β), citocinas inflamatorias, aminoácidos excitatorios, el NO y desacopladores del transporte de electrones mitocondrial. La formación de ROS es prevenida por antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, los tocoferoles y el glutatión reducido (GSH), así como por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa.

El sistema antioxidante más eficiente del cerebro es el del glutatión. Los astrocitos contienen mayores concentraciones de GSH y de enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión que las neuronas. Además, las células gliales son capaces de producir SOD y secretarla al espacio extracelular. El sistema del glutatión es importante

para la protección de las neuronas frente a la muerte celular mediada por NO. La reacción entre el NO y el anión superóxido puede dar lugar a la formación del anión peroxinitrito, un agente fuertemente oxidante capaz de reducir la tasa respiratoria mitocondrial y vaciar las reservas de ATP. Cuando las neuronas son cultivadas en presencia de astrocitos son más resistentes a las lesiones inducidas por NO, H₂O₂ y superóxido que cuando están solas. Además, astrocitos en los que está disminuido el GSH muestran una capacidad reducida en la protección de las neuronas frente al estrés oxidativo. Existen evidencias que apuntan que los efectos neuroprotectores de los astrocitos son mediados por la transferencia del GSH o sus precursores a las neuronas. Al igual que el GSH, el ascorbato es un importante antioxidante que está presente en el cerebro en concentraciones milimolares. Hay evidencias que sugieren un ciclo de ascorbato entre neuronas y astrocitos. Las neuronas liberan el ascorbato oxidado (deshidroascorbato), que es captado por los astrocitos, reconvertido a ascorbato y liberado teniendo lugar la recaptación neuronal. Además, se sabe que el deshidroascorbato atraviesa la BHE rápidamente y es convertido a ascorbato presumiblemente en los astrocitos. Todos estos hallazgos enfatizan el papel prominente de los astrocitos en la defensa contra la muerte neuronal mediada por estrés oxidativo.

La microglía también juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo, al poseer un sistema altamente eficiente para el transporte de cisteína (Rimaniol y cols., 2000).

1.1.3- Activación de las células gliales.

Tal como ya se ha comentado al principio de esta introducción ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada” (**Figura 7**). Se trata de una respuesta inflamatoria multifactorial que proporciona mecanismos de defensa frente a diversidad de agresiones y que va dirigida a eliminar los agentes nocivos y a inhibir sus efectos perjudiciales. Numerosas evidencias sugieren que la inflamación en el cerebro juega un papel en muchos trastornos neurológicos degenerativos tales como las enfermedades de

Parkinson, Alzheimer, Huntington, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica; en infecciones como la malaria, meningitis y demencias asociadas al SIDA; en isquemias e infartos y en el envejecimiento del cerebro. La respuesta inflamatoria del cerebro está producida por las células gliales, en especial la microglía. Se considera que el microambiente del SNC en estado normal inhibe tónicamente la activación glial y que ésta se origina en aquellas zonas donde se ha producido muerte o lesión neuronal o donde existe una disrupción en la comunicación entre las células gliales y las neuronas (Edleston y Mucke, 1993; Kreutzberg, 1996; González-Scarano y Baltuch, 1999; Liu y Hong, 2003). La activación glial puede ser iniciada o modificada por moléculas que comúnmente son cosecretadas durante la neurotransmisión (fractalkina y ATP) (Elkabetz y cols., 1996; Hanisch, 2002). Al activarse, las células gliales experimentan una serie de cambios morfológicos y de expresión de su perfil antigénico, son capaces de migrar a los sitios de la lesión, donde proliferan, expresan moléculas del MHC de clase II y moléculas coestimuladoras que les permiten actuar como células presentadoras de antígeno y además pueden adquirir un fenotipo fagocítico. Además, las células gliales activadas producen una gran variedad de factores neurotóxicos y proinflamatorios que incluyen a las citocinas, metabolitos de los ácidos grasos y radicales libres como el ión superóxido y el NO, que son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria (Hanisch, 2002; van Rossum y Hanisch, 2004; Ladeby y cols., 2005; Kim y Vellis, 2005). La activación glial puede resultar beneficiosa, en el sentido de que puede promover la reparación de tejidos, la eliminación de restos celulares o la destrucción de patógenos. Sin embargo, una activación excesiva puede ser extremadamente nociva e inducir y/o exacerbar la neurodegeneración (Streit, 1996; Streit y cols., 1999; Streit, 2002; Hanisch, 2002).

1.1.3.1- Producción de citocinas y otros factores inmunoreguladores.

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que incluyen a interleucinas, interferones, factores de necrosis tisular, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y quimiocinas. Las citocinas generalmente son secretadas, pero también pueden expresarse en la superficie celular. Presentan un elevado pleiotropismo, son redundantes en sus acciones y muchas son producidas como precursores biológicamente inactivos, como por ejemplo el TNF- α y la IL-1 β . Participan en una amplia gama de

respuestas biológicas, incluidas el crecimiento, el desarrollo, la modulación de la inflamación y de las respuestas inmunes, así como la regulación de la homeostasis. Se sabe que su producción se induce rápidamente después de una lesión tisular, infecciones o inflamación (Allan y Rothwell, 2001).

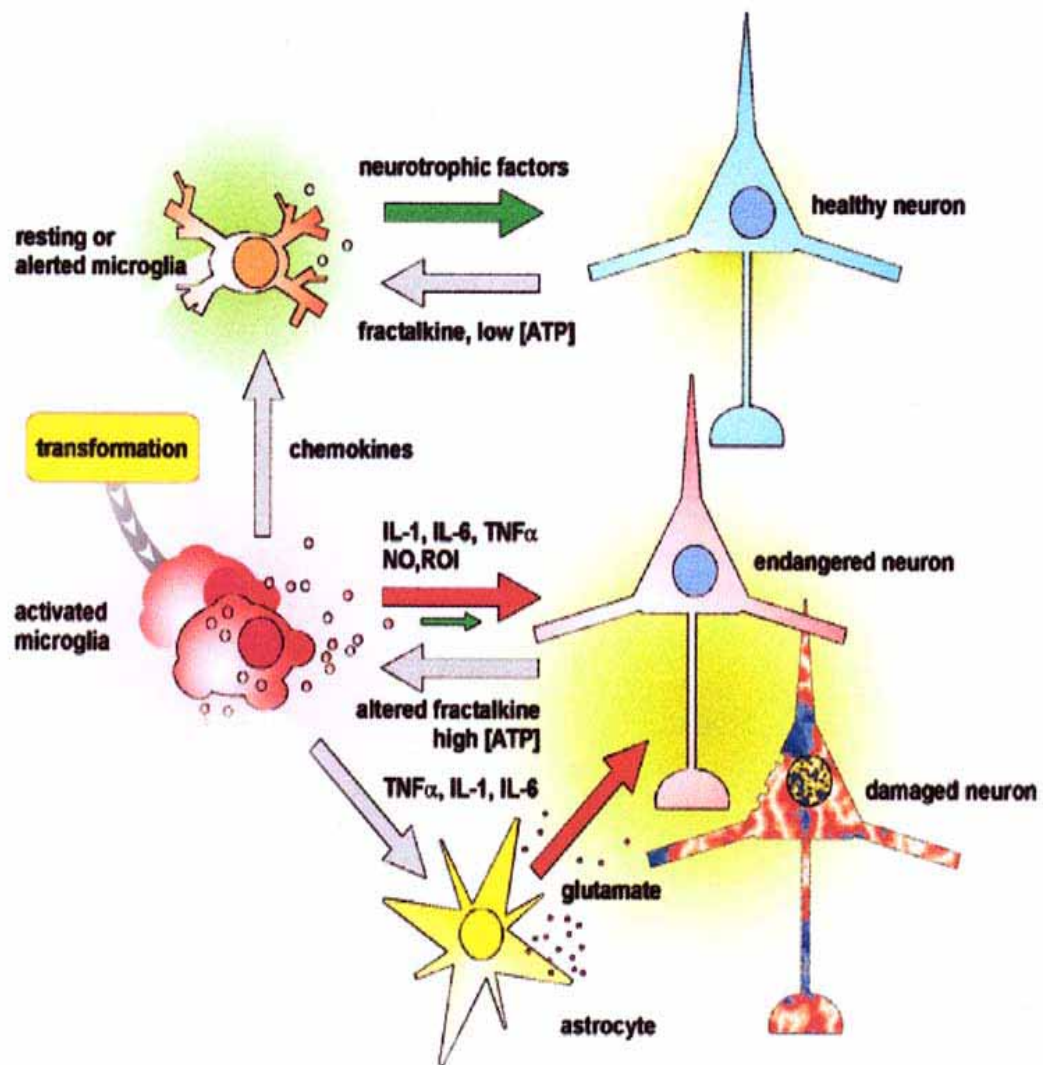


Figura 7. Activación glial en respuesta al daño neuronal. Alteraciones en la comunicación entre las células gliales y las neuronas y producción de citocinas proinflamatorias (Hanisch, 2002).

En el SNC normal la expresión de citocinas es limitada, pero cada vez son mayores las evidencias que apuntan que una sobreproducción de citocinas proinflamatorias por parte de las células del SNC contribuye a los cambios fisiopatológicos observados en varias enfermedades neurológicas y en lesiones del cerebro (**Figura 8**). Los estímulos que inducen la expresión de citocinas en el cerebro, que parece ocurrir mucho antes de que sea detectable la muerte celular, son desconocidos. Las citocinas pueden ejercer sus acciones directamente sobre las neuronas (observado comúnmente *in vitro*) o sobre las células gliales, la vasculatura cerebral y parámetros fisiológicos como la temperatura y el flujo sanguíneo (Allan y Rothwell, 2001). La producción de citocinas y quimiocinas por parte de la glía reactiva ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo la microglía su mayor fuente (Dong y Benveniste, 2001; Aloisi, 2001; Hanisch, 2002). La síntesis constitutiva de citocinas por parte de la microglía quiescente es improbable, excepto para las neurotrofinas (Elkabes y cols., 1996). No obstante, la falta de evidencias de una expresión basal de citocinas no excluye la posibilidad de que estas puedan producirse y secretarse en cantidades indetectables pero funcionales (Hanisch, 2002). El TNF- α y la IL-1 son las dos citocinas proinflamatorias por excelencia que producen las células gliales, principalmente la microglía, y los macrófagos derivados de la sangre durante la inflamación del SNC (debido a infecciones bacterianas o virales, isquemia, infartos, excitotoxicidad o lesiones mecánicas). Estas citocinas poseen la capacidad de inducir la expresión de moléculas de adhesión y la síntesis de quimiocinas en las células endoteliales cerebrovasculares y en los astrocitos, las cuales facilitan la extravasación y el reclutamiento de leucocitos al SNC (Aloisi, 2001).

Aunque todos los tipos celulares del SNC pueden expresar TNF- α , la microglía es su mayor fuente después de una lesión. El TNF- α actúa sobre dos receptores de elevada afinidad, TNF-R1 y TNF-R2, que se expresan tanto en las neuronas como en las células gliales y comparten algunas de las rutas de señalización con el receptor principal de la IL-1 (IL-1R1), como la del NF κ B (factor nuclear *kappa* B) y las MAPKs. La bioactividad del TNF- α está influenciada por proteínas endógenas que se unen a él, que son fragmentos solubles de su receptor capaces de bloquear la actividad de esta citocina. El TNF- α secretado por la microglía puede ser inhibido por la fractalkina, quimiocina que se expresa predominantemente en las neuronas. Por otra parte, el TNF- α puede

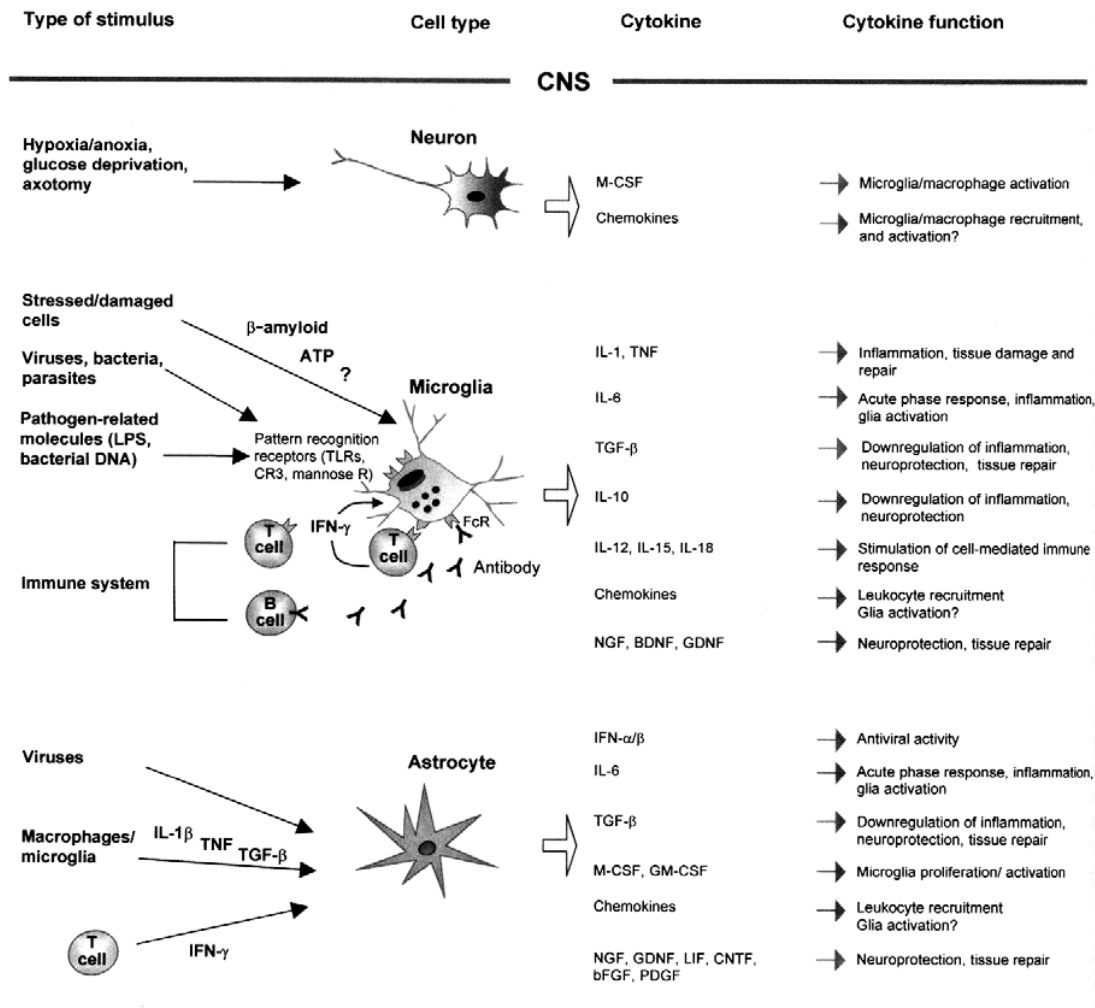


Figura 8. Producción de citocinas en el SNC en respuesta a distintos estímulos (Aloisi, 2005).

inducir la secreción de IL-10, que a su vez inhibe la expresión de TNF- α , representando un mecanismo autorregulatorio de retroalimentación negativa. El lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS) induce la síntesis y secreción de TNF- α por la microglía y los astrocitos en cultivo, que es potenciada por la presencia de IFN- γ . El TNF- α microglial parece ser crítico en la estimulación en los astrocitos de la secreción de glutamato y de otras citocinas (factores estimuladores de colonias e IL-6) e incluso induce la expresión de su propio gen, sugiriendo un ciclo de retroalimentación positiva de expresión de TNF- α . Aunque el TNF- α ejerce efectos tóxicos directamente sobre las estructuras neuronales y la mielina, también es capaz de estimular la supervivencia neuronal y la proliferación. Se han descrito acciones neuroprotectoras del TNF- α , pero en cualquier

caso son modestas en comparación con las que ejercen las neurotrofinas y los factores de crecimiento (Allan y Rothwell, 2001; Hanisch, 2002; Benveniste, 1995).

La IL-1 es una citocina implicada en muchas neuropatologías que presenta dos formas, IL-1 α y IL-1 β . La astrogliá, la microglía y la oligodendroglía son capaces de secretar IL-1. La expresión de IL-1R1 ha sido observada en varias regiones del SNC, tanto en neuronas como en glía. A este receptor se unen con igual afinidad la IL-1 α y la IL-1 β en asociación con ciertas proteínas accesorias. No obstante, evidencias indirectas indican la unión de IL-1 a otros receptores dentro del SNC. La actividad de la IL-1 está regulada por un antagonista de su receptor, el IL-1ra. Se conoce que tanto la IL-4 como la IL-13 pueden interferir en la bioactividad de la IL-1 ya que potencian la síntesis del IL-1ra. Además de su papel en la inflamación, la IL-1 ejerce acciones durante el desarrollo del SNC sobre la proliferación y la diferenciación y modula la eficacia sináptica de las poblaciones neuronales, especialmente en el hipocampo. La administración de IL-1ra recombinante en el cerebro o en la periferia de roedores provoca una inhibición marcada del daño cerebral causado por la isquemia cerebral, lesiones cerebrales o excitotoxinas. Esto sugiere una contribución directa de la IL-1 a la neurodegeneración inducida experimentalmente. En respuesta al daño cerebral, la IL-1 β es la que más rápidamente se expresa dentro de la familia de la IL-1. Se ha observado experimentalmente que la administración de anticuerpos contra IL-1 β es neuroprotectora. La IL-1 induce la producción de otras moléculas inflamatorias como la colagenasa, la fosfolipasa A2 y las prostaglandinas. También estimula la secreción de otras citocinas como la IL-6, TNF- α , TGF- β y factores estimuladores de colonias (Allan y Rothwell, 2001; Hanisch 2002; Benveniste, 1995).

La IL-6 es una citocina con acciones pro o antiinflamatorias dependiendo del balance neto de citocinas presentes y es producida tanto por la microglía como por los astrocitos. Durante las primeras fases de lesiones del SNC la microglía parece ser la mayor productora de IL-6, que actuaría sobre los astrocitos incorporándolos en la tarea de reparación de tejidos. Su secreción puede ser inducida por IL-1, TNF- α , IFN- γ +IL-1, LPS, ionóforos de calcio y norepinefrina (Hanisch 2002; Benveniste, 1995).

La microglía también produce citocinas antiinflamatorias como el TGF- β , la IL-10 y el IL-1ra, mientras que los astrocitos secretan TGF- β y posiblemente IL-10. El balance entre citocinas pro y antiinflamatorias es crucial en la gradación y resolución de

la cascada inflamatoria. Existen pocos estudios *in vitro* sobre la regulación de la producción de citocinas en la microglía, que indican que el IFN- γ inhibe la producción de IL-10 y de IL-1ra y que mediadores antiinflamatorios como la IL-4 y la prostaglandina PEG₂ ejercen el efecto contrario. Tanto la microglía como la astrogliá producen grandes cantidades de PGE₂ *in vitro*, la cual es capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias y NO por la microglía, así como la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC de clase II. Por lo tanto, la producción de PGE₂ por parte de las células gliales podría constituir otro factor que contribuye a la regulación local de las respuestas inmunes e inflamatorias (Aloisi, 2001). Se ha observado un incremento en los niveles de prostanoïdes (prostaglandinas y tromboxanos) y de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en muchas de las patologías inflamatorias del SNC.

1.1.3.2- Producción de NO.

El NO es un mensajero fisiológico de vida media corta y altamente difusible que parece jugar dos papeles diferentes en el cerebro: puede actuar como una molécula de señalización intracelular que regula una gran variedad de procesos fisiológicos (plasticidad sináptica, flujo sanguíneo y desarrollo) pero también se puede comportar como una molécula citotóxica tanto para organismos patógenos como para las propias células del organismo durante enfermedades (revisado en Chen y Swanson, 2003; Brown y Bal-Price, 2003). El NO a concentraciones fisiológicas es relativamente poco reactivo y la mayoría de sus acciones fisiológicas son mediadas por su unión a iones Fe²⁺ en el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, causando su activación y la producción de GMPc. Sin embargo, el NO puede generar otros derivados mucho más reactivos, que en conjunto se conocen como especies reactivas de nitrógeno tales como NO₂⁻, N₂O₃⁻ y aniones peroxinitrito.

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es la encargada de su síntesis conjuntamente con la L-citrulina a partir del aminoácido L-arginina. El cerebelo es la región que produce la mayoría del NO presente en el SNC. Existen tres isoformas de la NOS: la nNOS, que constitutivamente se expresa en neuronas y es activada por calcio/calmodulina, particularmente después de la estimulación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA; la eNOS, expresada constitutivamente en células endoteliales cerebrales y algunos astrocitos y regulada por calcio/calmodulina y

fosforilación/desfosforilación, y la iNOS, que normalmente no se expresa en el cerebro sano pero es inducida en las células gliales y endoteliales por citocinas pro-inflamatorias, componentes bacterianos o víricos y/o hipoxia. Se requiere la presencia de elevados niveles de varias citocinas para la inducción de iNOS, lo que sugiere que esta isoforma no desempeña su papel en la fisiología normal del SNC. En neuronas es rara la detección de iNOS, aunque en cultivo se ha observado que algunos tipos neuronales presentan una cierta expresión inducida por citocinas.

La inducción de la expresión de iNOS es uno de los cambios característicos de la activación glial que ocurre durante la respuesta inflamatoria. La producción de NO como consecuencia de la inducción de esta isoforma en las células gliales se ha observado en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Una vez que se expresa iNOS se producen niveles elevados de NO continuamente, en mayor proporción que los que puede producir nNOS. Hay cierta controversia sobre qué células gliales expresan iNOS en el cerebro de los roedores. Si bien está aceptada su inducción en la microglía activada, no está tan claro en el caso de los astrocitos. En contraste con la glía de roedores, la expresión de iNOS en la microglía humana no se induce y en astrocitos humanos es muy fácil inducir niveles elevados de expresión de iNOS. También se ha descrito la inducción de iNOS por varios mediadores inflamatorios en oligodendrocitos de roedores, en células endoteliales cerebrales y en fibroblastos.

1.1.3.3- Factores de transcripción.

En un proceso complejo como es la activación glial, en el que se altera la expresión de una gran cantidad de genes, los factores de transcripción juegan un papel clave. Existen varios factores de transcripción que se han relacionado con la activación glial, entre ellos:

AP-1 (proteína activadora-1): Se ha descrito bien su activación en astrocitos activados, por ejemplo por LPS, péptido A β o IL-1 β (Tanaka y cols., 1997; Rubio, 1997; Liu y cols., 2000). Su papel en la activación de la microglía, si lo tiene, no es conocido. Es necesario para la expresión de GFAP (Masood y cols., 1993) y se cree que promueve también la expresión astrogliar de vimentina, proteína precursora del péptido β -amiloide (APP), IL-8 o HSP-32 (proteína de estrés térmico-32).

C/EBP α (proteína α de unión a secuencias CCAAT y potenciadoras): No se

expresa en cerebro en condiciones basales. En cerebro de rata sometido a hipoxia/isquemia se induce su expresión en microglía activada (Walton y cols., 1998). No se ha estudiado en cultivo. Se cree que podría ser un factor pro-inflamatorio al promover la expresión de los receptores de M-CSF (factor estimulador de colonia de macrófagos) y GM-CSF (factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos).

C/EBP β (proteína β de unión a secuencias CCAAT y potenciadoras): Expresado en astrocitos *in vitro* y activado por LPS, IL-1 β , IFN- γ o IL-6 (Cardinaux y cols., 2000). No se ha descrito su expresión en microglía ni hay estudios *in vivo*. Promueve la expresión de IL-6 (Schwaninger y cols., 2000) y de genes involucrados en el metabolismo del glucógeno en astrocitos (Cardinaux y cols., 1996). Se ha propuesto también que participa en el control de la expresión de iNOS (Galea y Feinstein, 1999), IL-1 β y TNF α (Akira y cols., 1990).

C/EBP δ (proteína δ de unión a secuencias CCAAT y potenciadoras): Como en el caso de C/EBP β , regula la expresión de genes de gran importancia en la activación glial como iNOS, COX-2 y TNF- α . Se ha descrito que estímulos proinflamatorios incrementan la expresión de este factor en astrocitos y que como en el caso de C/EBP β su expresión cerebral aumenta en la enfermedad de Alzheimer (Cardinaux y cols., 2000; Li y cols., 2004).

Los C/EBPs son una familia de factores de transcripción que, por la implicación que han tenido en el trabajo experimental de esta tesis, se tratarán con más profundidad más adelante.

CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc): Al contrario que la mayoría de los factores de transcripción citados, la activación de CREB está relacionada con la inhibición de la activación de la microglía. Se ha comprobado que agentes que producen un incremento de AMPc inhiben la producción de moléculas proinflamatorias y promueven la síntesis de moléculas neuroprotectoras y/o inmunosupresoras (Levi y cols., 1998; Ajmone-Cat y cols., 2003)

NF κ B: Es el activador de expresión génica mejor caracterizado en procesos inflamatorios. Se le atribuye un papel central en el control de la activación glial (O'Neil y Kaltschmidt, 1997; Ghosh, 1999). Se trata de una familia de factores de transcripción que por la implicación que ha tenido en el trabajo experimental de esta tesis, se desarrollará con más profundidad más adelante.

PPAR- γ (receptor γ de peroxisomas activado por proliferación): Como en el caso de CREB, la activación de PPAR- γ tiene consecuencias inhibitorias sobre la activación glial. Es una de las dianas de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La activación de PPAR- γ por ligandos específicos inhibe en microglía la expresión de IL-6, TNF- α , iNOS o MHC de clase II inducida por A β (Combs y cols., 2000) o LPS (Bernardo y cols., 2000).

PU. 1: Se expresa en cerebro solamente en microglía y de forma constitutiva (Walton y cols., 2000). Se cree que es un determinante de la especificidad celular de la expresión de CD40, CD11b o el receptor de M-CSF. La inhibición de PU. 1 podría tener efectos inhibidores sobre la microglía activada, como sugiere el hecho de que en ratones deficientes para PU. 1 no se observan macrófagos (Scott y cols., 1994).

STATs (transductor de señales y activador de la transcripción): Dentro de esta familia de factores de transcripción se ha involucrado a STAT-1 α en la activación glial, particularmente en la inducida por IFN- γ . Se ha descrito que STAT-1 α promueve la expresión de CD40 (Nguyen y Benveniste, 2000 a, b), Fas (Lee y cols., 2000) y GFAP (Kahn y cols., 1997). También se cree que STAT-3 puede jugar un papel al haberse observado su expresión en astrocitos y microglía en cerebro de rata después de un episodio de hipoxia/isquemia (Justicia y cols., 2000), así como STAT-5a y STAT-5b, cuya expresión es inducida en microglía por GM-CSF (Liva y cols., 1999).

NF κ B

La familia de factores de transcripción NF κ B es una de las mejor caracterizadas. En los mamíferos está constituida por homo o heterodímeros de cinco proteínas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 y p52. Según las subunidades que contengan estos dímeros la afinidad por los genes diana varía (Baeuerle y Henkel, 1994; Beg y Baldwin, 1993). A diferencia de otros factores de transcripción, las proteínas NF κ B residen principalmente en el citoplasma en forma inactiva unida a la proteína inhibidora I κ B en las células no estimuladas (**Figura 9**). Después de la activación por una variedad de agentes extracelulares I κ B es fosforilada, ubiquitinizada y degradada por un proteosoma, facilitando la translocación de NF κ B al núcleo y el consecuente incremento en la expresión de sus genes diana. Se desconoce la quinasa responsable de la fosforilación de I κ B y las señales que provocan su activación. En el cerebro de mamíferos, el

heterodímero más común es p50/p65, que puede estar constitutivamente activo o formando un complejo con el inhibidor I κ B. NF κ B se expresa tanto en neuronas como en células gliales y sus genes diana codifican proteínas con actividades inmunes e inflamatorias: citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α), moléculas de adhesión (ICAM-1, molécula 1 de adhesión intercelular; VCAM-1, molécula 1 de adhesión celular vascular), enzimas (iNOS y COX-2), inmunoreceptores, interferones y proteínas de respuesta aguda (**Figura 9**). Además, participa en el desarrollo neuronal, en la plasticidad sináptica y en especial, en la respuesta a lesiones y procesos neurodegenerativos. Se ha detectado activación de NF κ B en cerebros de pacientes afectados por diversas enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica. También se ha detectado que NF κ B se activa en el SNC como consecuencia de infecciones víricas. Las señales que desencadenan la activación de NF κ B en el SNC pueden ser clasificadas en dos grandes grupos. El primero incluye señales que también operan en la periferia, como son citocinas inflamatorias (IL-1 y TNF- α), ésteres de forbol, estrés oxidativo, luz ultravioleta y productos bacterianos y víricos. El segundo representa señales específicas del SNC, que incluyen la despolarización, neurotransmisores como el glutamato y los opioides, el NGF y diversos estímulos neurotóxicos como el péptido A β , la proteína tau fosforilada y el glutamato a concentraciones tóxicas. Entre los genes relevantes para la función del SNC que podrían ser regulados por los miembros de la familia NF κ B destacan los que codifican citocinas inflamatorias (G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; IL-6, TNF- α , GM-CSF), quimiocinas (MCP-1, proteína 1 quimiotáctica de monocitos; IL-8), MHC de clase I, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), ciertas enzimas (SOD, COX-2, iNOS), APP, el factor de transcripción pro-apoptótico p53 y neuropéptidos (dinorfina y proencefalina) (O'Neill y Kaltschmidt, 1997; Grilli y Memo, 1999).

Dada la participación del NF κ B en diferentes patologías del SNC, el estudio de moléculas capaces de inhibir su activación y/o su actividad transcripcional ha acaparado un gran interés. Se han identificado distintas moléculas con efectos inhibitorios sobre NF κ B: los glucocorticoides, que inducen la transcripción del gen I κ B y pueden además interactuar directamente con las subunidades activadas de NF κ B e inhibirlas, los salicilatos (agentes antiinflamatorios) y la curcumina (agente antitumoral con

propiedades antiinflamatorias y antioxidantes), que inhiben la fosforilación de I κ B y su degradación y la herbimicina A (inhibidor de tirosín quinasas), que modifica covalentemente la subunidad p50 e interfiere con su actividad de unión al DNA (Grilli y Memo, 1999).

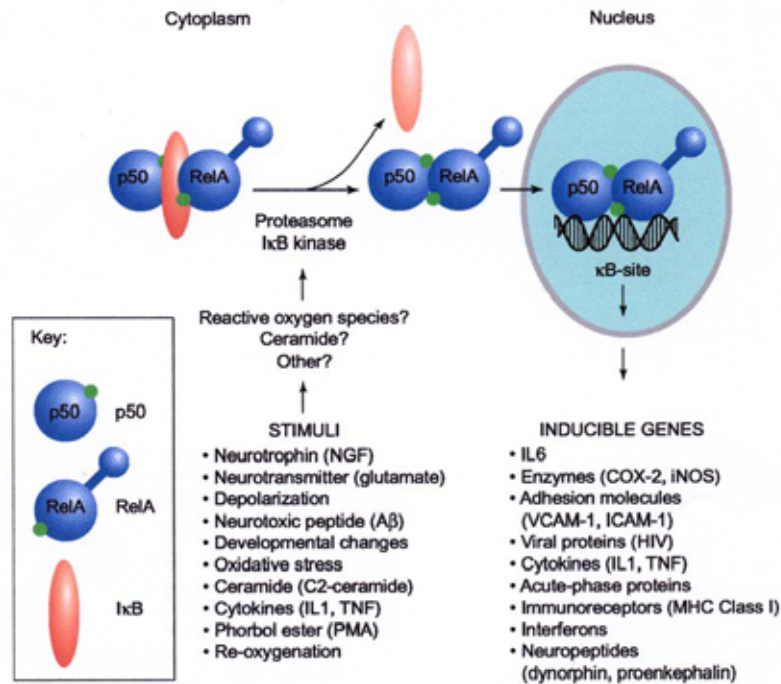


Figura 9. Activación del factor de transcripción NF κ B. Estímulos que la desencadenan y genes que regula en el SNC (O'Neill y Kaltschmidt, 1997).

C/EBPs

Los C/EBPs constituyen una subfamilia dentro de la familia de factores de transcripción bZIP, cuyos miembros presentan homologías estructurales y funcionales entre sí. El C/EBP prototípico tiene un dominio de activación no conservado, una región básica de unión al DNA conservada y un dominio de dimerización rico en leucina (*zipper* o cremallera de leucina) en el carboxilo terminal altamente conservado. Hasta la fecha se han clonado los genes de seis miembros de la familia de los C/EBPs en varias especies y la nomenclatura que sistemáticamente se utiliza para denominarlos es la propuesta por Cao y cols. (1991): C/EBP α , - β , - δ , - γ , - ϵ y - ζ . La dimerización de los C/EBPs es un requisito previo para su unión al DNA. Las proteínas C/EBPs son capaces

de formar homodímeros y heterodímeros en todas las combinaciones intrafamiliares posibles (con otros C/EBPs y otros bZIP) e incluso con otros factores de transcripción (no bZIP). Por ejemplo, está demostrada la interacción física y funcional entre los miembros de las familias de C/EBPs y de NFκB (Stein y cols., 1993), en particular la de C/EBPβ con la subunidad p65 de NFκB (**Figura 10**) (Xia y cols., 1997). Los complejos de C/EBPs y de NFκB son capaces de promover la actividad transcripcional de genes que codifican diferentes proteínas de fase aguda (Poli, 1998). Los C/EBPs actúan como reguladores claves en numerosas respuestas celulares tales como el control del crecimiento, de la diferenciación celular y del metabolismo energético. También juegan un papel en la regeneración hepática, en procesos inmunes e inflamatorios y en varias enfermedades. En mamíferos, la expresión y funciones biológicas de los miembros de la familia de los C/EBPs han sido extensivamente analizadas en una gran variedad de sistemas, sobretodo en el hepático, el hematopoiético y en adipocitos. Sin embargo, se conoce mucho menos sobre la expresión y función de los C/EBPs en el cerebro, donde C/EBPα, C/EBPβ y C/EBPδ son los que más ampliamente se expresan (revisado en Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998; Poli, 1998; Ramji y Foka, 2002).

La actividad y/o niveles de expresión de C/EBPα, C/EBPβ y C/EBPδ son modulados diferencialmente en respuesta a estímulos inflamatorios, como el LPS y varias citocinas. Así, la expresión del mRNA de C/EBPβ y C/EBPδ es inducida por estímulos inflamatorios en varios tipos celulares (hepatocitos, macrófagos, células mesangiales renales y astrocitos), mientras que el mRNA de C/EBPα es inhibido en las mismas condiciones (Ramji y Foka, 2002). Además se han identificado sitios de unión de los C/EBPs en las regiones reguladoras de toda una batería de genes involucrados en la respuesta inflamatoria: los que codifican las citocinas inflamatorias IL-6, IL-1β y TNF-α; otras citocinas como IL-8 y IL-12; proteínas importantes en las funciones de los granulocitos y macrófagos como son la iNOS y la COX-2, entre otras (Poli, 1998; Caivano y cols., 2001; Chen y cols., 2005). La inducción tanto de C/EBPβ como de C/EBPδ ocurre relativamente tarde después de un estímulo inflamatorio, por lo que es muy probable que factores como el NFκB y los STATs, cuya activación es más rápida y transitoria, sean los responsables de las primeras fases de inducción de genes mientras que en unas pocas horas intervienen también los C/EBPs. Se ha demostrado que STAT3

(Figura 10) está involucrado en la regulación al alza de los promotores génicos de C/EBP β y C/EBP δ inducida por IL-6 (Poli, 1998; Ramji y Foka, 2002).

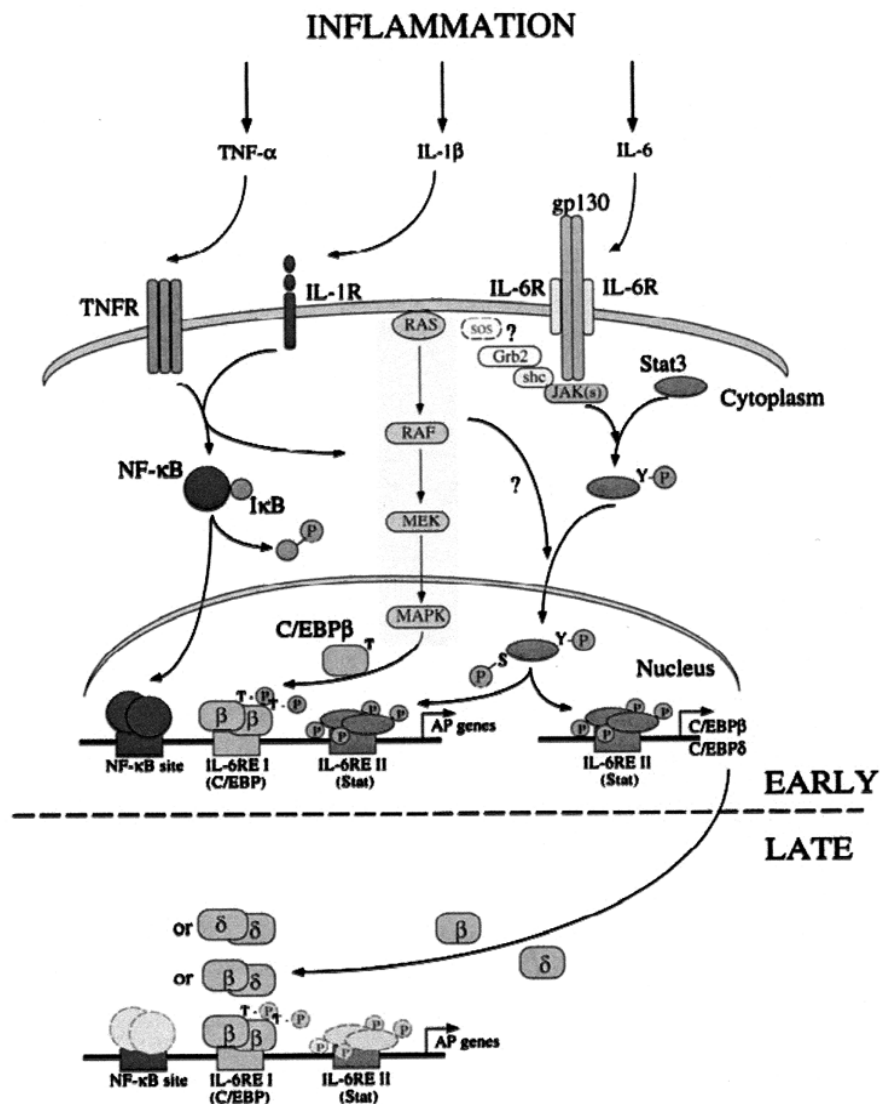


Figura 10. Activación de los factores de transcripción NFκB, C/EBPβ y C/EBPδ en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias durante la neuroinflamación (Poli, 1998).

Los astrocitos expresan basalmente C/EBP β y δ *in vitro* y su expresión se incrementa cuando se tratan con las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (Cardinaux y cols., 2000), IL-1 β +IFN- β (Kim y cols., 2004), IL-1+IFN- γ (Pahan y

cols., 2002), noradrenalina, VIP y PACAP (polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria) (Cardinaux y Magistretti, 1996), glutamato (Yano y cols., 1996) o adenosina (Schwaninger y cols., 2000). Las células microgliales también expresan *in vitro* C/EBP β y δ . Estudios con células de la línea murina microglial BV2 muestran activación de C/EBP β después del tratamiento con LPS (Chen y cols., 2004), IFN- γ (Jana y cols., 2001), IFN- γ +CD40 (Jana y cols., 2002), el monómero p40 de la IL-12 (Jana y cols., 2003), el neuroantígeno MBP unido a las células T (Dasgupta y cols., 2003). Una inducción moderada de C/EBP β y δ también se ha observado en microglía de ratón tratada con TNF- α +IFN- γ (Paglinawan y cols., 2003). En muchos de estos estudios se ha podido apreciar una activación sinérgica de C/EBP β y NF κ B y la inducción, por parte de ambos, de genes relacionados con la inflamación (iNOS, TNF- α , IL-6 e IL-1 β). Por consiguiente C/EBP β y C/EBP δ podrían ser factores de transcripción primordiales en las células gliales durante la inflamación del cerebro.

1.1.3.4- Proliferación.

El sistema nervioso adulto de vertebrados en estado normal es un tejido relativamente quiescente en términos de proliferación celular. Sin embargo, los astrocitos mantienen su capacidad proliferativa en respuesta a estímulos apropiados en muchas regiones del SNC adulto (Nakatsuji y Miller, 1998). En condiciones patológicas como las que acompañan a la inflamación o al daño en el SNC tales como trauma, infartos y trastornos desmielinizantes (Norton y cols., 1992), se produce una estimulación local de la proliferación de los astrocitos. En el caso de que las lesiones afecten la integridad de la BHE, la proliferación de los astrocitos (glía reactiva) es necesaria para restablecerla de manera que el SNC continúe aislado del resto del organismo. Sin embargo, la proliferación de los astrocitos también puede crear matrices que inhiban la regeneración y la remielinización (Levison y cols., 2000). La proliferación de los astrocitos puede ser influenciada por una gran variedad de factores, que pueden derivar de la microglía (IL-6, IL-1, IFN- γ y TNF), de las neuronas (bFGF, el K⁺ y el ATP), de los oligodendrocitos (MBP) y de la sangre (trombina, insulina, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento derivado de plaquetas y esteroides). La proliferación de los astrocitos también puede ser influenciada por factores derivados de ellos mismos, tales como la proteína S-100 β y el factor de maduración glial (Ramírez-

Expósito y Martínez-Martos, 1998). El bFGF es un potente mitógeno para los astrocitos y juega un papel fundamental en la proliferación astrocitaria después de lesiones y en tumorigénesis (Riboni y cols., 2000).

La microglía también mantiene la capacidad de proliferación en el SNC adulto sano, que se activa como respuesta a lesiones o patologías (revisado en Cuadros y Navascués, 1998; Gehrmann y cols., 1995; Kim, S.U. y Vellis, J., 2005). La proliferación de las células microgliales depende de factores extracelulares cerebrales. Estudios *in vitro* han evidenciado que factores como la IL-1 β , el IFN- γ y la IL-4, así como las neurotrofinas NGF, BDNF y NT-3 (neurotrofina 3), tienen ciertos efectos sobre la proliferación microglial. Sin embargo, los mitógenos más efectivos para la microglía en cultivo son el M-CSF y el GM-CSF.

1.1.3.5- Fagocitosis.

En el cerebro adulto, la mayoría de las funciones fagocíticas están inhibidas en la microglía ramificada o en reposo. Sin embargo, en la mayoría de las patologías del SNC, desencadenadas tanto por señales endógenas (muerte y/o disfunción neuronal, agregación anormal de proteínas o interacciones celulares inmunes) como exógenas (infecciones), la microglía pasa del estado de reposo al activado y puede adquirir un fenotipo amebode fagocítico (**Figura 11**) (Vilhardt, 2005). La presencia de células fagocíticas se ha observado en diversas patologías cerebrales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la isquemia, enfermedades infecciosas, intoxicaciones y trauma. Estas células fagocíticas pueden corresponder tanto a microglía activada como a macrófagos. Cabe considerar, no obstante, que no toda la microglía activada se convierte en fagocítica. El reconocimiento y la eliminación de las células muertas o en proceso de muerte por fagocitos es un proceso de gran importancia para la protección de los tejidos frente a la liberación de sustancias citotóxicas ó antigénicas liberadas por estas células.

En muchos modelos experimentales *in vivo*, como por ejemplo la transección del nervio facial, la desaferentación del giro dentado, lesiones corticales o neuronas periféricas axotomizadas, se ha detectado actividad fagocítica de la microglía eliminando los restos celulares (Streit y cols., 1999, Kim y Vellis, 2005). Estudios realizados *in vitro* también han demostrado la capacidad fagocítica de la microglía.

Beyer y cols. (2000) observaron que la mayoría de células microgliales en cultivo preservaban la capacidad de transformar su morfología en ameboide y fagocitar. También observaron que aunque varios estímulos pueden transformar la microglía en fagocito, los cambios que experimentan estas células dependen del material que se fagocita. Además, cuando hay muerte neuronal se ha demostrado que el fenómeno de fagocitosis presenta diferencias dependiendo de si la muerte es apoptótica o necrótica. En el caso de muerte neuronal por necrosis, factores solubles liberados por las neuronas que están muriendo son suficientes para inducir actividad fagocítica en la microglía. Sin embargo, en el caso de muerte neuronal apoptótica es necesario el contacto célula-célula para que se produzca la fagocitosis (Witting y cols. 2000). La fagocitosis de las neuronas apoptóticas por la microglía requiere la presencia de señales de superficie específicas de las neuronas que facilitan la unión y endocitosis por parte de la microglía. Dentro de estas señales, la mejor caracterizada es la externalización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática de las neuronas apoptóticas, la cual es

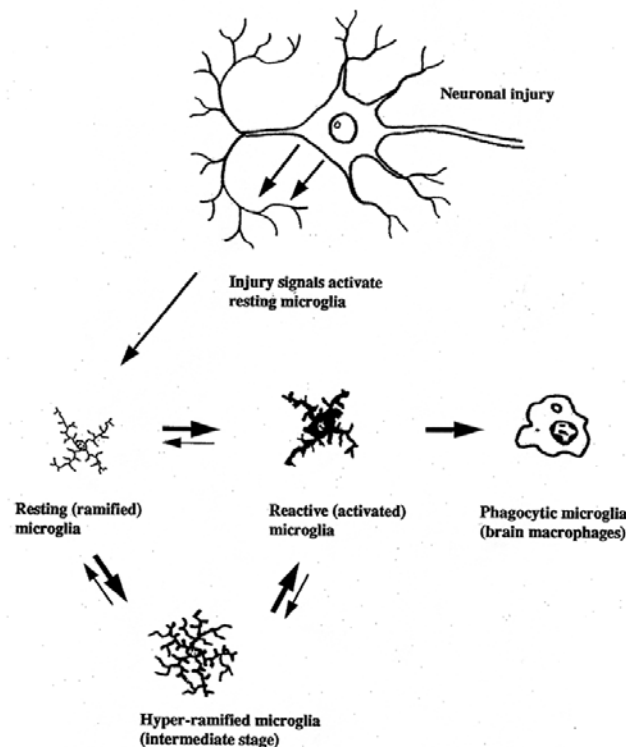


Figura 11. Plasticidad funcional de la microglía en respuesta a lesiones neuronales y adquisición del fenotipo fagocítico (Streit y cols., 1999).

reconocida específicamente por un receptor presente en macrófagos y en las células microgliales (Adayev y cols., 1998; Fadok y cols., 2000). Esta interacción inhibe la respuesta inflamatoria en las células microgliales activadas (Fadok y cols., 1998; De Simone y cols., 2002; De Simone y cols., 2003).

Los astrocitos son fagocitos mucho menos eficientes que la microglía y su actividad fagocítica sólo se pone de manifiesto *in vivo* cuando la capacidad fagocítica de la microglía ha alcanzado su máximo límite (Magnus y cols., 2002).

1.2- Comunicación bidireccional entre las neuronas y las células gliales.

1.2.1- Interacciones neurona-glía en condiciones fisiológicas.

Aunque las células gliales no son eléctricamente excitables ni establecen sinapsis con las neuronas, mantienen un diálogo continuo entre ellas y con las neuronas de un modo bastante complejo, asegurando el soporte estructural, metabólico y trófico durante toda la vida. Durante el desarrollo, la glía radial interactúa con los axones determinando su trayectoria y su correcta conectividad. Las neuroregulinas y los receptores erbB, factores de crecimiento y diferenciación de la familia del factor de crecimiento epidérmico y sus receptores tirosina quinasa, representan dos señales moleculares que regulan las interacciones entre las neuronas migratorias y las fibras de la glía radial (Aschner y cols., 2002). Las interacciones neurona-glía juegan papeles críticos en la diferenciación y supervivencia neuronal, así como en la formación, función y mantenimiento de las sinapsis. Se ha demostrado *in vitro* que la presencia de astrocitos incrementa significativamente el número total de contactos sinápticos que las neuronas pueden establecer entre ellas. Las señales astrocitarias, aún no identificadas, además de incrementar el número de sinapsis funcionales maduras en el SNC, también son necesarias para mantener una conectividad sináptica eficiente. Esto sugiere la posibilidad de un papel activo de la glía en el fenómeno de plasticidad sináptica (Bezzi y Volterra, 2001).

Las respuestas inmunes están fuertemente inhibidas en el cerebro en condiciones normales. Existen evidencias de que las neuronas controlan el estado de activación de la microglía, contribuyendo a su estado quiescente (**Figura 12**). Uno de los mecanismos sugeridos de cómo las neuronas controlan la activación microglial es la interacción del ligando CD200, una glicoproteína de membrana neuronal, con sus receptores presentes

en la microglía (Neumann, 2001). Estudios con cultivos de células microgliales han demostrado la regulación de la función microglial también por las neurotrofinas NGF, BDNF y NT-3, que incrementan la secreción por parte de la microglía de moléculas neuroprotectoras y suprimen la producción constitutiva e inmunoestimulada de NO, que es potencialmente neurotóxico (Polazzi y Contestabile, 2002). En estudios *in vitro* también se ha observado que la presencia de neuronas inhibe la activación microglial y se sugiere un papel de las interacciones neurona-glía vía NCAM (molécula de adhesión celular de tipo neuronal) en este fenómeno (Chang y cols., 2000; Chang y cols., 2001). La fractalkina es una quimiocina que parece funcionar como una importante molécula señalizadora en la comunicación entre las neuronas y la microglía. La fractalkina se expresa de manera constitutiva en el cerebro, predominantemente en las neuronas, y su receptor específico (CX3CR1) está localizado en la microglía. La presencia de la fractalkina en la membrana neuronal informa a las células microgliales de una actividad normal por parte de las neuronas (Harrison y cols., 1998, Hanisch, 2000). Por otra parte, las neuronas pueden controlar el número de células microgliales activadas ya que pueden inducir su apoptosis (Ogata y Schubert, 1996; Kingham y cols., 1999; Polazzi y Contestabile, 2003). La inducción de apoptosis en la microglía activada por las neuronas representa una manera eficiente de evitar la excesiva y potencialmente dañina activación microglial.

En el SNC adulto, la interacción metabólica entre las neuronas y los astrocitos es crucial para el metabolismo energético en el cerebro, así como para la síntesis *de novo* de glutamato y GABA y la finalización de la actividad glutamatérgica y GABAérgica mediante la recaptación de estos neurotransmisores por los astrocitos (**Figura 13**) (Aschner y cols., 2002). En especial, la recaptación del glutamato es de vital importancia para prevenir la sobreestimulación de sus receptores y la consiguiente excitotoxicidad. El suplemento de energía proporcionado por la glía a las neuronas mediante la liberación de lactato viene dado en función de los niveles de actividad sináptica en curso. Se ha demostrado que el consumo de glucosa para la generación de lactato por los astrocitos está directamente acoplado a la captación de glutamato sináptico (Vernadakis, 1996; Deitmer, 2000; Bezzi y Volterra, 2001).

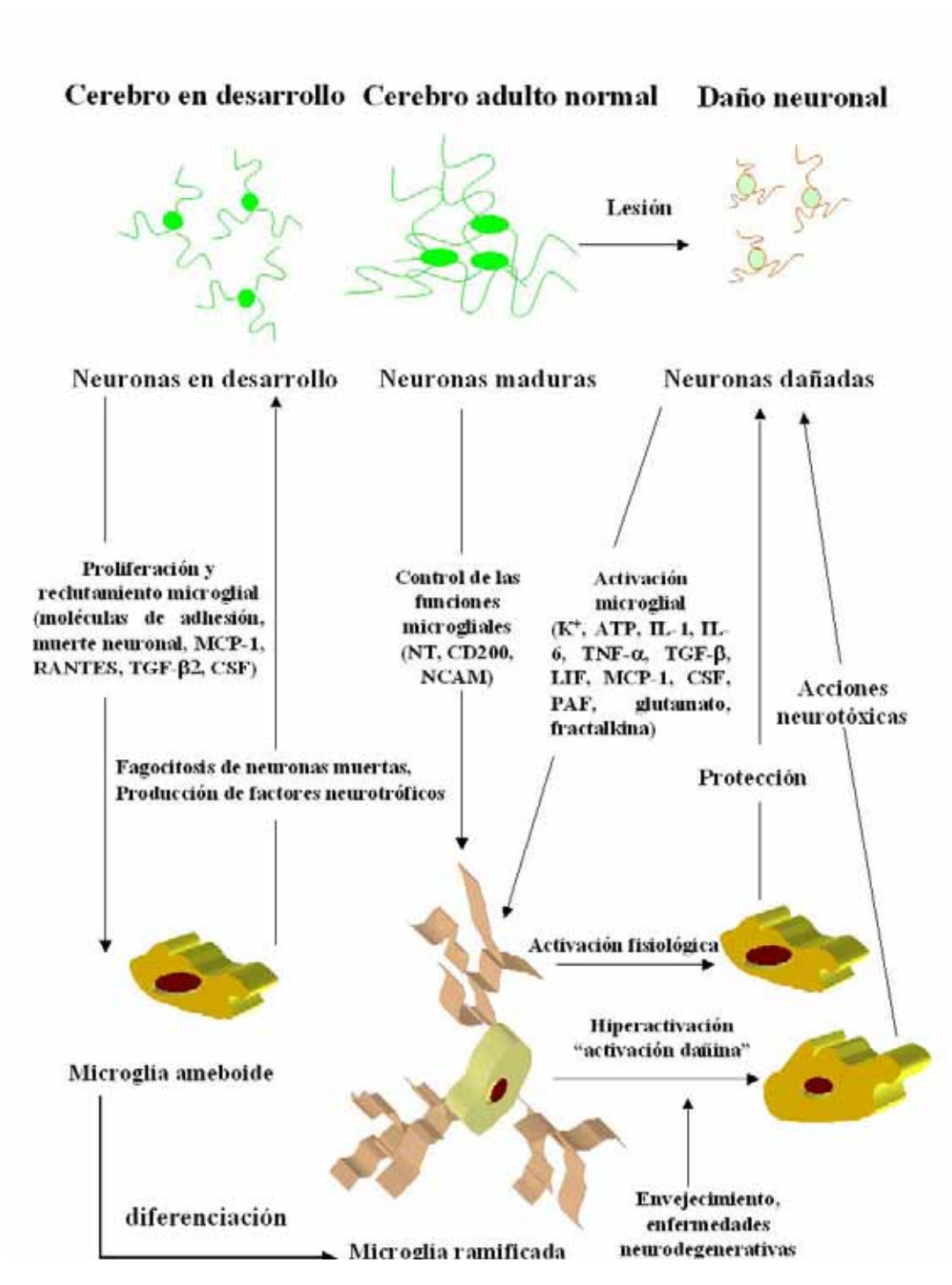


Figura 12. Esquema del papel de la microglía en el SNC durante el desarrollo, en el adulto y en procesos neuropatológicos. Factores que median la comunicación entre la microglía y las neuronas (Adaptado de Polazzi y Contestabile, 2002).

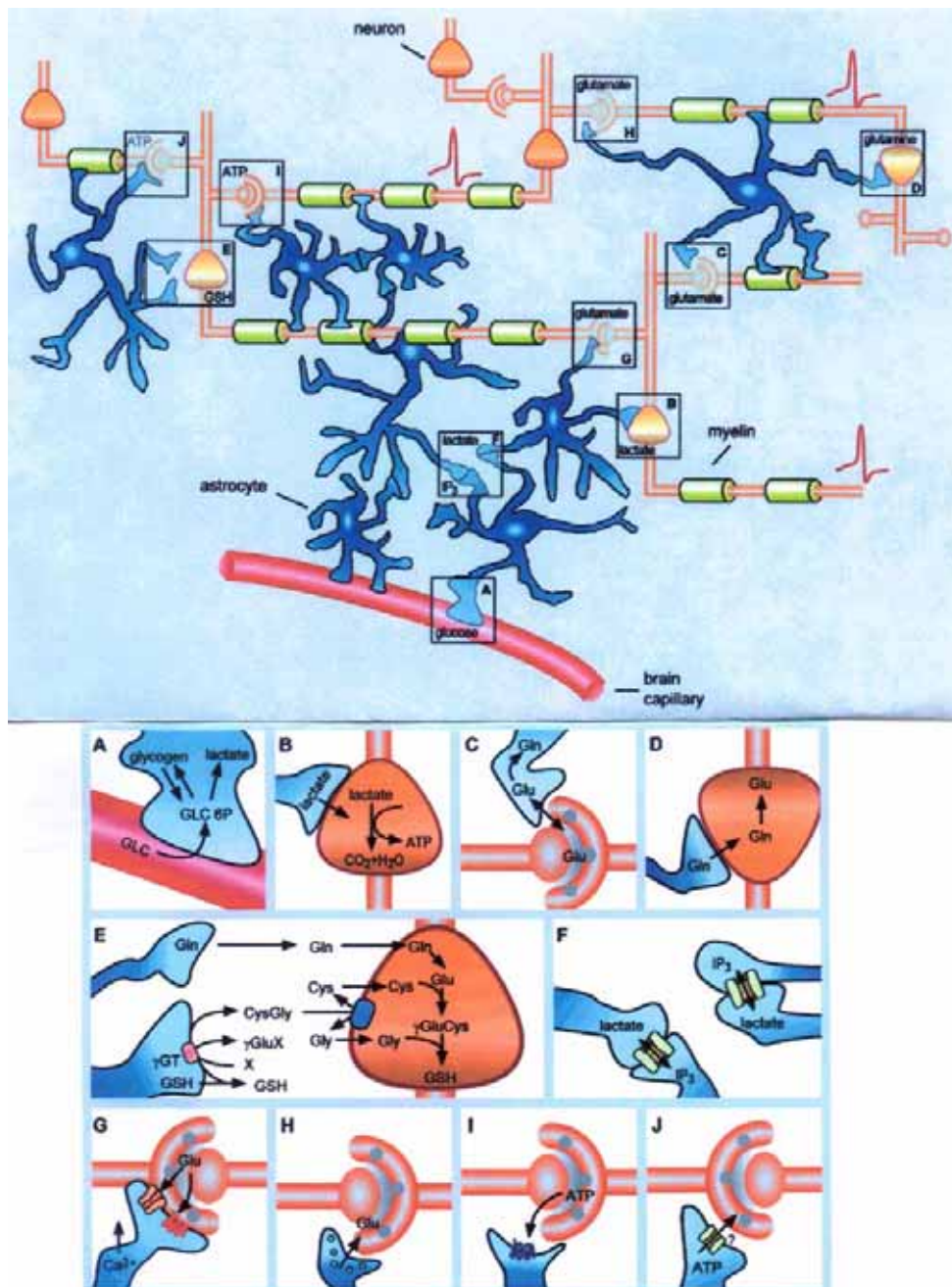


Figura 13. Diferentes vías de comunicación entre los astrocitos y las neuronas. A, B: suministro de lactato desde los astrocitos a las neuronas; C, D: Ciclo de glutamato-glutamina; E: Suministro de precursores de glutacion desde los astrocitos a las neuronas; F: Comunicación entre los astrocitos mediada por las uniones gap; G: Activación de los receptores de glutamato astrogliales; H: Liberación de glutamato por los astrocitos; I, J: Señalización entre los astrocitos y las neuronas mediada por el ATP (Kirchhoff y cols., 2001).

Los astrocitos también tienen un papel en la defensa frente al daño neuronal mediado por el estrés oxidativo (**Figura 13**). Para el mantenimiento de concentraciones estables de GSH las neuronas dependen de los grupos tiol derivados de los astrocitos, pues en general los niveles de GSH son menores en neuronas que en astrocitos, lo que las hace más susceptibles al incremento en los niveles intracelulares de ROS (Kirchhoff y cols., 2001; véase también apartado 1.1.2).

Los astrocitos envuelven las terminales nerviosas, lo cual los hace perfectamente accesibles a la comunicación con las sinapsis. Hasta hace poco se creía que los astrocitos sólo eran elementos de soporte pasivos de la sinapsis neuronal. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los astrocitos son algo más que simples espectadores en el diálogo que sostienen las neuronas durante las sinapsis (**Figura 14**) (Araque y cols., 1999; Fields y Stevens-Graham, 2002). Los astrocitos también expresan un conjunto de receptores de neurotransmisores, de modo que pueden comportarse como dianas adicionales de las señales neuronales. Se ha demostrado que los astrocitos responden a la actividad neuronal adyacente con elevaciones transitorias, a menudo repetitivas, de la $[Ca^{2+}]_i$, que son mediadas principalmente por la activación de receptores metabotrópicos. Dependiendo del nivel de actividad neuronal, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por neurotransmisores puede quedar restringido a las prolongaciones de un único astrocito o propagarse en forma de corrientes oscilatorias (ondas) de Ca^{2+} a las prolongaciones de otro astrocito, representando una forma de excitabilidad que constituye un sistema de procesamiento de información en paralelo a los circuitos neuronales. Estas elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ regulan la secreción de varias moléculas señalizadoras, incluso de neurotransmisores como el glutamato, en los astrocitos activados que pueden influenciar la actividad neuronal. La capacidad de los astrocitos de secretar glutamato en respuesta a un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ está a favor de la existencia de una comunicación recíproca entre neuronas y astrocitos. Es posible que estas señales de elevación de $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos inducidas por las neuronas representen una retroalimentación que modula la excitabilidad neuronal o la transmisión sináptica (Vernadakis, 1996; Carmignoto, 2000). Hasta hace unos años se pensaba que las ondas de Ca^{2+} se propagaban entre los astrocitos sólo por la difusión de mediadores intracelulares, como el inositol trifosfato, a través de las uniones *gap*. Sin embargo, en cultivos de astrocitos se ha podido apreciar la propagación de estas ondas incluso en

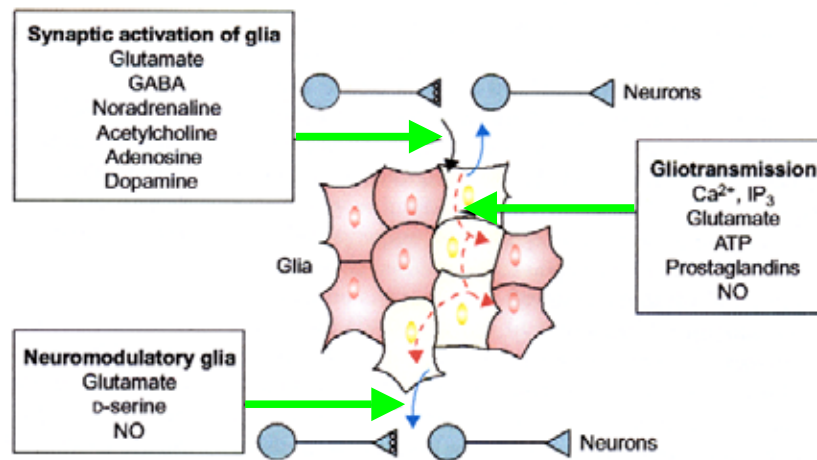


Figura 14. Señalización mediada por ondas de calcio intracelular entre neuronas y astrocitos (Bezzi y Volterra, 2001). El color amarillo indica las células astrogliales donde tiene lugar un incremento de calcio intracelular en respuesta a la actividad neuronal. La flecha negra indica la activación sináptica de la astrogliá. Las flechas rojas indican la propagación de las ondas de calcio entre los astrocitos. Las flechas azules indican la liberación de neuromoduladores por los astrocitos.

zonas libres de células, sugiriendo la existencia de una vía de señalización extracelular (Kirchhoff y cols., 2001; Bezzi y Volterra, 2001). Se ha observado que cuando la actividad sináptica es baja, las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en las prolongaciones de los astrocitos inducen la secreción rápida de glutamato, cuya acción queda restringida al espacio presináptico de las sinapsis activas. Se ha confirmado que este glutamato de origen astrocitario ejerce un papel modulador en la transmisión sináptica pues es capaz de desencadenar aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas vecinas. La respuesta de los astrocitos a actividades sinápticas bajas o moderadas representa un mecanismo de retroalimentación de señales a corta distancia que afectan localmente la transmisión sináptica. Cuando la actividad neuronal es elevada, la propagación de las ondas de Ca^{2+} entre astrocitos vecinos desencadena la secreción de moléculas señalizadoras, como glutamato y prostaglandina PEG_2 , lejos del sitio inicial de activación y modula sinapsis bastante distantes que no estaban activas, representando un modo de señalización a larga distancia de los astrocitos. Como las neuronas ejercen un control directo y dinámico sobre la frecuencia de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos, la liberación de moléculas por parte de los astrocitos en respuesta a un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ también está bajo el control de las neuronas. Esta ruta de señalización a larga distancia no sólo permite que las neuronas transfieran señales a los astrocitos, sino

también a otras células del SNC como la microglía o las células endoteliales de las arteriolas cerebrales (Fellin y Carmignoto, 2004). Aunque esta forma de señalización no representa un modo de transferencia de información tan rápido como la transmisión sináptica neuronal, es posible que transporte información relevante. Todas estas observaciones indican que los mecanismos que sustentan el procesamiento de la información en el SNC son mucho más complejos y plásticos de lo que previamente se consideraba.

1.2.2- Interacciones neurona-glía en patologías del SNC.

Como ya se ha mencionado, en el cerebro adulto la microglía es mantenida en estado quiescente en condiciones normales y las neuronas contribuyen significativamente en el control negativo de sus funciones inmunes. Sin embargo, durante el envejecimiento la microglía escapa de los efectos supresores del ambiente del SNC y tiene lugar una activación microglial progresiva, que es mucho más drástica en condiciones patológicas. En las lesiones del SNC la presencia de microglía activada está limitada a aquellas áreas ocupadas por las neuronas dañadas y sus ramificaciones (**Figura 12**). Después de isquemias y lesiones excitotóxicas o traumáticas se ha descrito una rápida migración de las células microgliales a los sitios de lesión. En varias enfermedades neurodegenerativas también se ha descrito que la microglía alcanza un estado de activación, ya sea directamente por la acción de agentes infecciosos (como el virus de la inmunodeficiencia humana en la demencia asociada al SIDA) o indirectamente por la degeneración neuronal (como en la enfermedad de Alzheimer) y/o de otros elementos del SNC (como en el caso de la degeneración de oligodendrocitos en la esclerosis múltiple). La microglía es capaz de promover la supervivencia o exacerbar la muerte neuronal dependiendo de la naturaleza de las señales neuronales que regulan su activación. Los diferentes tipos de señales neuronales y las subsiguientes respuestas microgliales son altamente específicas gracias a la proximidad que hay entre estos dos tipos celulares. Esto permite que las interacciones sólo ocurran entre células vecinas y que los factores liberados tanto por las neuronas como por la microglía sean efectivos a concentraciones muy bajas. La activación microglial después de una lesión neuronal es un mecanismo fisiológico que tiene como objetivo la neuroprotección. Sin embargo, la pérdida de la comunicación específica entre las neuronas dañadas y la microglía puede

provocar que esta última adquiriera un estado de activación que produzca una inflamación persistente cuyo resultado final sea la exacerbación de la neuropatología (Streit y cols., 1999; Bruce-Keller, 1999).

Los mecanismos cerebrales que participan en la activación microglial no son del todo conocidos, en particular las señales liberadas por las neuronas sanas o dañadas que intervienen en su modulación y que en cierto modo delimitan la inflamación cerebral. Hay estudios que demuestran que al inicio de las primeras etapas de lesión neuronal tiene lugar la inducción de genes específicos en la microglía, como el mrf-1 (factor 1 de respuesta microglial, Tanaka y Koike, 2002) y el gdc-10 (gen de muerte de células granulares-10, Origasa y cols., 2001) cuyas funciones exactas se desconocen, pero su expresión refleja la existencia de una comunicación bidireccional activa entre las neuronas dañadas y la microglía. La ruptura de la fractalkina de las membranas neuronales y la consecuente liberación de una forma activa difusible representa un evento temprano en la respuesta inflamatoria frente a lesiones neurotóxicas, influenciando la respuesta microglial en los primeros estadios de daño neuronal (Polazzi y Contestabile, 2002). En situaciones de isquemia, inflamación, SIDA y meningitis otro candidato que se ha descrito que participa en la mediación de las interacciones entre las neuronas dañadas y la microglía es el PAF (factor activador de plaquetas) producido por estas neuronas (Aihara y cols., 2000). Además, una actividad eléctrica y sináptica alterada en las neuronas dañadas puede ser detectada por las células microgliales como el inicio de estados neuropatológicos gracias a su patrón exclusivo de canales de potasio, responsable de su rápida capacidad de respuesta a la despolarización neuronal. La liberación o salida del ATP de neuronas dañadas también puede inducir la activación microglial (Streit y cols., 1999; Bruce-Keller, 1999).

1.2.2.1- Papel neuroprotector.

Desde un punto de vista fisiológico, la activación de las células gliales después de una lesión del SNC tiene como objetivo principal minimizar las consecuencias nocivas de la presencia de neuronas dañadas. Este objetivo se consigue, por una parte, eliminando las células muertas y por otra, mediante la producción de factores neuroprotectores en respuesta a moléculas liberadas por las neuronas que están muriendo. De esta manera las células gliales ofrecen soporte a las neuronas restantes.

Una función de los astrocitos reactivos es aislar el área dañada después de una lesión cerebral, formando una barrera denominada gliosis anisomórfica que dará lugar a la cicatriz glial. Los astrocitos reactivos producen metaloproteasas de matriz extracelular y sus inhibidores, que participan en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular e influyen en la arquitectura de la cicatriz glial después de la lesión. En presencia de daño neuronal asociado a alteraciones en la BHE los astrocitos reactivos promueven la reparación de la misma mediante la producción de componentes de matriz extracelular. Después de una isquemia cerebral hay un incremento en la expresión de la SOD, de la GSH peroxidasa y de la metalotioneína en astrocitos, indicando una capacidad elevada de reducción de ROS. Los astrocitos reactivos también sobreexpresan neuropilina-1 y VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), que promueven la angiogénesis después de una isquemia cerebral. Aunque todos estos resultados sugieren que los astrocitos juegan un papel importante en la recuperación funcional después de un infarto cerebral, no existen confirmaciones directas de ello (revisado en Chen y Swanson, 2003).

Varios estudios indican también el papel potencial de las células microgliales en la supervivencia de neuronas lesionadas y en la promoción de neuroregeneración. Experimentalmente se ha podido observar que produciendo una lesión reversible como es la axotomía del nervio facial, las señales emitidas por las neuronas dañadas inducen la producción de factores tróficos por la microglía perineuronal, que promueven la regeneración de las motoneuronas axotomizadas (Streit, 1993; Streit y cols., 1999).

Las células gliales secretan una variedad de factores tróficos bajo condiciones normales tales como NGF, bFGF, TGF- β , PDGF, BDNF, CNTF entre otros. Es probable que alguno de estos factores influya en la supervivencia neuronal y la plasticidad del cerebro después de una lesión, partiendo de la observación de que al menos *in vitro* ayudan a la regeneración y reparación tisular. Los astrocitos reactivos incrementan notablemente la expresión de NGF, bFGF, BDNF y neuroregulinas, que estimulan la regeneración de neuritas (Raivich y cols., 1999; Chen y Swanson, 2003). La microglía reactiva también puede proteger a las neuronas a través de la secreción de factores neurotróficos como el bFGF y el NGF, incrementando la resistencia de las neuronas expuestas a la transmisión sináptica excitotóxica (Bruce-Keller, 1999). Existen evidencias que demuestran que la activación microglial atenúa las lesiones isquémicas o

las excitotóxicas en roedores, previene la apoptosis *in vitro*, e incrementa la regeneración de neuritas y la recuperación funcional después de lesiones (Polazzi y Contestabile, 2002).

Se ha demostrado que la microglía libera moléculas capaces de rescatar a las neuronas de la muerte apoptótica y que, a su vez, señales difusibles procedentes de las neuronas potencian estas propiedades neuroprotectoras de la microglía (Polazzi y cols., 2001). También se ha observado que el medio condicionado de células microgliales tiene un efecto neuroprotector tras la inducción de muerte neuronal por glutamato (Watanabe y cols., 2000). Por otra parte, la fagocitosis de neuronas apoptóticas por la microglía inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-12) sin afectar la secreción de moléculas antiinflamatorias y potencialmente neuroprotectoras (IL-10 y el TGF- β 1, Magnus y cols., 2001).

1.2.2.2- Papel neurotóxico.

Como se ha comentado en el apartado anterior, la glía activada como consecuencia de un daño neuronal tiene un papel beneficioso cuya finalidad sería la recuperación funcional de las neuronas dañadas mediante la secreción de factores tróficos. Sin embargo, esta respuesta beneficiosa de la glía puede transformarse en neurotóxica para aquellas neuronas que tienen pocas posibilidades de recuperarse. Una excesiva activación glial aguda o una activación glial crónica puede provocar un daño neuronal e incluso glial severo (van Rossum y Hanisch, 2004).

Se ha sugerido que la microglía activada juega un papel patogénico en diversas enfermedades del SNC, incluidas la enfermedad de Alzheimer (Benveniste y cols., 2001), la de Parkinson (Wu y cols., 2002), la esclerosis múltiple (Benveniste, 1997) y la encefalitis espongiiforme (Rezaie y Lantos, 2001). Hay evidencias que indican que la activación microglial también juega un papel importante en el trauma e isquemia cerebrales (Mabuchi y cols., 2000; Kyrkanides y cols., 2001; Schwab y cols., 2001).

Estudios *in vitro* indican que las células microgliales activadas son capaces de inducir muerte neuronal a través de diversos mecanismos relacionados con la liberación de moléculas citotóxicas como NO, ROS, proteasas, intermediarios del ácido araquidónico, aminoácidos excitatorios y ciertas neurotoxinas aún no identificadas (**Figura 7**) (Streit y cols., 1999, Raivich y cols., 1999, Polazzi y Contestabile, 2002).

Estudios *in vivo* muestran que la expresión de iNOS en astrocitos, microglía y macrófagos infiltrados es detectable a pocas horas de la isquemia cerebral, en las placas seniles presentes en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, en zonas de la sustancia negra que contienen neuronas dopaminérgicas en proceso de degeneración en pacientes de Parkinson, en infecciones víricas por el HIV (Brown y Bal-Price, 2003). En modelos experimentales de isquemia cerebral se ha observado la presencia de alteraciones funcionales en los astrocitos, que impiden una correcta comunicación entre astrocitos y neuronas y cuyo resultado es una disfunción neuronal (Vernadakis, 1996; Aschner y cols., 2002). En la isquemia cerebral y en modelos de lesiones excitotóxicas se han detectado efectos neurodegenerativos debidos a la producción de grandes cantidades de IL-1 β por las células gliales activadas, particularmente por la microglía (Raivich y cols., 1999). La presencia de citocinas inflamatorias puede modificar las propiedades funcionales de los astrocitos y, en consecuencia, provocar perturbaciones en las redes de señalización entre las neuronas y los astrocitos (**Figura 15**) (Bezzi y Volterra, 2001; Aschner y cols., 2002).

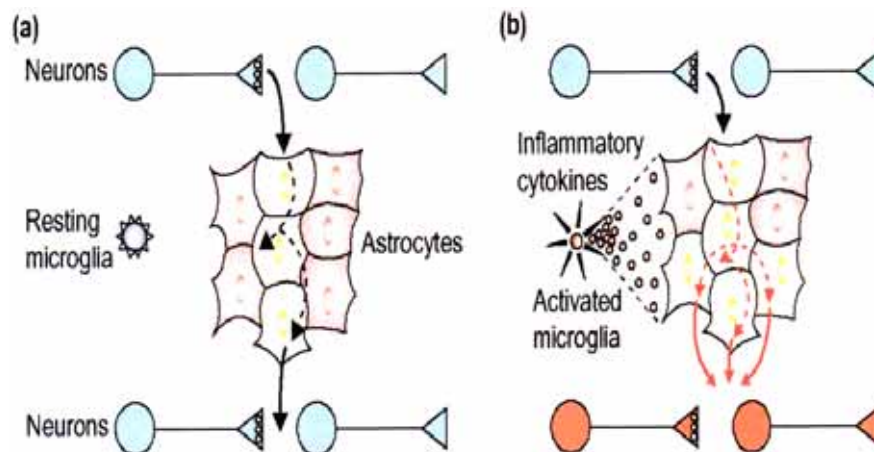


Figura 15. Redes de señalización entre neuronas y astrocitos (Bezzi y Volterra, 2001). a) En condiciones normales la actividad sináptica da lugar a una comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos y la microglía permanece en estado quiescente. Las flechas negras indican la comunicación definida en la figura 14. b) En presencia de una reacción inflamatoria local la microglía se activa y migra hacia el sitio de la lesión donde puede liberar varias citocinas, tales como IL-1 β , TNF- α y IL-6. Estas citocinas alteran las propiedades de los astrocitos alterando su comunicación con las neuronas y provocando neurodegeneración.

1.3- Muerte neuronal.

Las neuronas de los mamíferos están entre los tipos celulares de vida más larga en el organismo. A pesar del descubrimiento reciente de que las células madre neuronales pueden proliferar en el cerebro adulto, se ha aceptado como un dogma que la mayoría de neuronas del SNC perduran durante toda la vida del organismo. No obstante, las neuronas no son invulnerables. Durante el desarrollo embrionario normal, el sistema nervioso se remodela mediante el proceso de muerte neuronal: el exceso de neuronas se elimina para asegurar una adecuada y precisa conexión pre y postsináptica. Se trata de una muerte programada imprescindible para un adecuado desarrollo del sistema nervioso. Además de este proceso, las células también pueden morir de forma prematura en cualquier momento de la vida del individuo cuando se producen situaciones neurotóxicas agudas o crónicas causadas por factores accidentales o genéticos (revisado en Yuan y cols., 2003).

En un estudio clásico de muerte celular durante el desarrollo embrionario, Schweichel y Merker (1973) clasificaron los tipos de muerte celular en tres categorías basadas en diferencias morfológicas y ultraestructurales. El tipo 1 de muerte celular, que previamente había sido denominado como muerte por apoptosis por Kerr y cols. (1972), se caracteriza por una condensación del citoplasma, picnosis nuclear, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, adquisición por parte de las células de formas redondeadas y, en ocasiones, formación de cuerpos apoptóticos (**Figura 16**). El segundo tipo de muerte celular descrito se caracteriza por la aparición de muchas vacuolas autofágicas de origen lisosomal en el interior de la célula, hinchamiento mitocondrial, engrosamiento del retículo endoplasmático y aparato de Golgi y rotura de las membranas celulares y nucleares. La picnosis nuclear, que era una característica de la apoptosis, aquí puede aparecer como un fenómeno tardío pero es menos prevalente. Este segundo tipo de muerte fue definido como muerte autofágica. El tercer tipo de muerte celular descrito se diferencia del tipo 2 en que no hay participación de los lisosomas. Este tipo de muerte se caracteriza por un hinchamiento de los orgánulos celulares, formación de vacuolas no lisosomales, cariólisis y rotura de la membrana celular. Este tipo de muerte celular se conoce como necrosis o muerte celular necrótica (**Figura 17**).

Se cree que la muerte neuronal que se produce durante el desarrollo embrionario ocurre, al menos en parte, mediante apoptosis. Además, durante esta fase también se ha

descrito la presencia de muerte neuronal por autofagia. Por otra parte, aunque la necrosis se ha asociado con frecuencia con muerte neuronal patológica, algún tipo de muerte neuronal que se observa durante el desarrollo tiene características de necrosis (revisado en Clarke, 1999; Edinger y Thompson, 2004; Yuan y cols., 2003). Mientras que una elevada tasa de muerte es bien tolerada e incluso necesaria en el sistema nervioso durante el desarrollo, una tasa incrementada de muerte neuronal en el sistema nervioso adulto es signo de presencia de enfermedad neurodegenerativa. Los distintos tipos de muerte celular que hemos mencionado pueden coexistir en varias enfermedades del SNC.

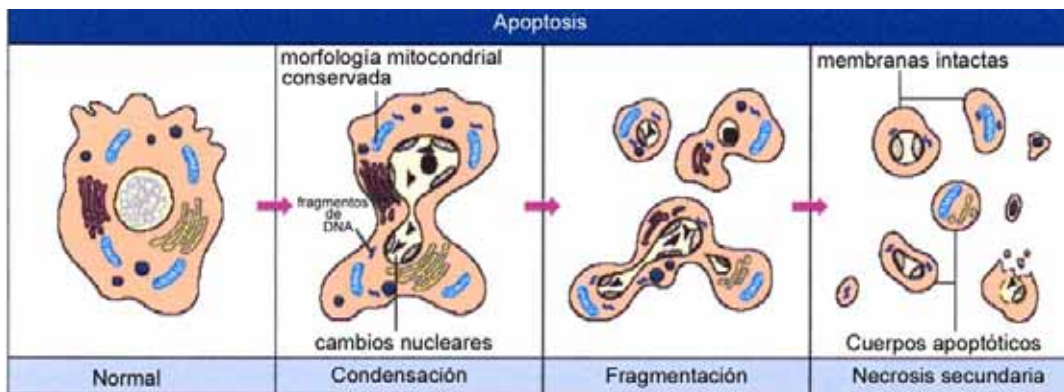


Figura 16. Esquema de los principales cambios morfológicos en presencia de muerte celular por apoptosis (Manual *Apoptosis and cell proliferation*, Boehringer Mannheim 1998).

En la muerte celular por apoptosis se ha comprobado que juegan un papel importante: las caspasas (una familia de cisteín proteasas), unas proteínas adaptadoras necesarias para la activación de las caspasas (Apaf-1) y la familia de proteínas Bcl-2 (asociadas a mitocondria). Estos factores controlan la apoptosis en muchos sistemas, incluidas las neuronas (Yuan y cols., 2003). Existen dos rutas principales involucradas en la muerte neuronal por apoptosis: a) la vía intrínseca o del daño mitocondrial, en la que se produce la liberación de citocromo c al citosol, seguida de la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa efectora caspasa-3 que provoca la fragmentación del DNA y b) la extrínseca o de activación de receptores de muerte, en la cual la unión de ligandos a los receptores de Fas y de la familia del TNF induce la activación de las caspasas efectoras antes de que se produzcan alteraciones mitocondriales (Lossi y Merighi, 2003).

La muerte celular por necrosis se ha considerado tradicionalmente un tipo de muerte patológica sin ninguna regulación, pero la observación repetida de este tipo de muerte en distintas situaciones fisiológicas o patológicas sugiere que, al menos en algunos casos, puede ser un proceso celular regulado (revisado en Yuan y cols., 2003; Edinger y Thompson, 2004). Por consiguiente, se puede considerar que hay una muerte necrótica regulada que se produce de forma natural y otra que ocurre en condiciones patológicas que no está regulada. En ambos casos se trata de procesos independientes de caspasas. La muerte por necrosis se caracteriza por la pérdida inmediata de la capacidad de la célula de sintetizar ATP. Contrariamente, el inicio del programa de muerte por apoptosis es dependiente de energía y está asociado al mantenimiento de la capacidad de síntesis de ATP hasta fases finales del proceso.

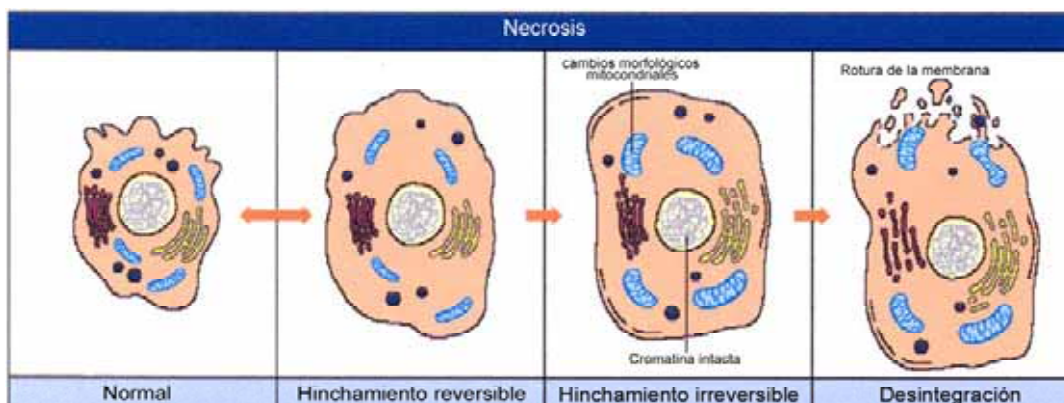


Figura 17. Esquema de los principales cambios morfológicos en presencia de muerte celular por necrosis (Manual *Apoptosis and cell proliferation*, Boehringer Mannheim 1998).

Aunque la apoptosis y la necrosis han sido contempladas normalmente como dos tipos de muerte distintos, cada vez hay más evidencias de que en realidad representan los dos extremos de un amplio rango de tipos de muerte celular clasificadas en función de sus características morfológicas y bioquímicas, donde la necrosis representaría el resultado de no poderse poner en funcionamiento de manera completa el proceso apoptótico (Leist y Nicotera, 1998). Esto sugiere la posible existencia de vías alternativas de ejecución de la muerte celular, que se van activando en función de la intensidad de la señal que desencadena la muerte. Aunque en algunos casos los procesos de muerte incluyen mecanismos que siguen la secuencia de acontecimientos que desde el punto de vista ultraestructural y bioquímico caracterizan la muerte por apoptosis o

por necrosis, en otras ocasiones no se cumplen todos los requisitos que permiten caracterizar un determinado proceso de muerte como apoptótica ni tampoco como necrótica. Incluso un mismo estímulo puede inducir apoptosis o necrosis en función de su intensidad, la subpoblación neuronal implicada, la especie, la edad o el genotipo del organismo en cuestión. Este sería el caso de la muerte inducida por aminoácidos excitatorios.

Desde un punto de vista clásico, se entiende por excitotoxicidad la propiedad del glutamato y sus análogos de causar neurodegeneración aguda a través de la estimulación excesiva de los receptores ionotrópicos postsinápticos de aminoácidos excitatorios. Cada uno de los tres subtipos principales de estos receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y KA) es capaz de mediar la reacción excitotóxica. Se cree que la mayoría de las neuronas del SNC posee uno o más subtipos de receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatorios en la superficie de las dendritas o del cuerpo celular, lo que las hace vulnerables a la degeneración excitotóxica. En diferentes modelos *in vivo* de muerte neuronal inducida por aminoácidos excitatorios se ha observado que este tipo de muerte se puede manifestar, desde el punto de vista ultraestructural, a través de cambios morfológicos distintos o con un patrón temporal diferente (Olney y Ishimaru, 1999). Dado que sólo alguno de estos cambios se observa en la apoptosis y que el patrón tampoco coincide en su totalidad con la necrosis, se ha sugerido definir este tipo de muerte como muerte por excitotoxicidad. Sin embargo, a partir de experimentos *in vitro* distintos autores describen que con exposiciones breves o a concentraciones bajas de aminoácidos excitatorios se induce muerte neuronal por apoptosis y que con exposiciones prolongadas o a concentraciones altas se produce muerte neuronal por necrosis (Ankarcrona y cols., 1995; Bonfoco y cols., 1995).

Hay evidencias considerables sobre el papel de la excitotoxicidad en diversidad de trastornos neurodegenerativos agudos como el infarto cerebral, la epilepsia, traumas y lesiones de la médula espinal, así como en enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, la de Parkinson, el corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (revisado en Olney y Ishimaru, 1999). En estos procesos neurodegenerativos también se ha descrito muerte neuronal por necrosis y por apoptosis.

En esta tesis se han utilizado dos modelos *in vitro* de muerte neuronal que presentan claras diferencias. Por una parte, se ha inducido la muerte por privación de

potasio a neuronas granulares de cerebelo, un modelo de muerte neuronal por apoptosis ampliamente utilizado en la bibliografía. Por otra parte, este mismo tipo de cultivo ha sido expuesto a concentraciones elevadas de glutamato, induciendo muerte neuronal por excitotoxicidad.