

Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración

Ricardo Tapia*

I. Introducción

Recepción: 1110197 aceptación: 24110197

La destrucción celular es un proceso habitualmente considerado como terminal, ligado a la enfermedad y a la muerte del organismo, y descrito generalmente como muerte por necrosis. Sin embargo, desde hace más de 20 años se conoce que durante el período del desarrollo ontogénico muchas células mueren en beneficio del propio desarrollo del organismo, y que las características morfológicas y bioquímicas de este proceso difieren de las de la necrosis. Este diferente mecanismo de muerte "altruista" está determinado genéticamente, y se le conoce como muerte celular programada o apoptosis (del griego, "el caer de las hojas de un árbol"). En el cuadro I se señalan algunas de las características de la muerte celular por necrosis y por apoptosis, así como sus causas y mecanismos, algunos de los cuales son tema de este simposio.

A raíz de la descripción de la muerte celular por apoptosis, en los últimos años se ha generado una amplia discusión sobre la posibilidad de que en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente aquellas de origen desconocido, la destrucción neuronal que se observa ocurra mediante mecanismos apoptóticos más que necróticos. Esta discusión está lejos de concluir, pues son muchos los trabajos con resultados contradictorios, tanto en el análisis de tejido cerebral humano como en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Como se indica en el cuadro I, la muerte necrótica es probablemente la responsable de la neurodegeneración que ocurre en las infecciones, en los accidentes vasculares cerebrales (isquemia que genera hipoxia e hipoglicemia tisular), en el daño causado por neurotoxinas y en la epilepsia. Entre los mecanismos celulares de estas alteraciones, parecen participar importantemente el edema celular (que se analiza en el apartado dos de este simposio), la hiperexcitación neuronal que causa un exceso en la transmisión sináptica excitadora mediada por glutamato (excitotoxicidad, como se describe en las partes III, IV y V del simposio), y las alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial que generan los radicales libres y la disminución en la síntesis de adenosintrifosfato (ATP) (el llamado estrés oxidativo que también se revisa en las secciones IV y V).

Es necesario tener en mente que los dos procesos de muerte neuronal, el necrótico y el apoptótico, no son excluyentes, y que la neurodegeneración es probablemente en la mayor parte de los casos multifactorial, con participación de la excitotoxicidad y del estrés oxidativo. Por ejemplo, mientras que en la isquemia cerebral las neuronas que mueren en los primeros minutos lo hacen por necrosis, otras neuronas mueren hasta 24 o 48 h después, probablemente mediante apoptosis. Y más todavía, en algunos modelos experimentales se ha observado que la misma neurona puede

*Académico titular.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Ricardo Tapia, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 70-253, 04510, México, D.F.

morir por una combinación, con diferente temporalidad, de mecanismos necróticos y apoptóticos.¹

En el cuadro II se enumeran algunas de las enfermedades neurodegenerativas crónicas que tienen la peculiaridad de que no producen destrucción neuronal generalizada, sino que cada una de ellas es selectiva para ciertas poblaciones neuronales, si bien esta selectividad no es absoluta. Así, en la enfermedad de Alzheimer las neuronas preferentemente degeneradas son las de las cortezas frontal y parietal el hipocampo y la amígdala; en la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra; en la esclerosis lateral amiotrófica las motoneuronas alfa la médula espinal y del tallo cerebral; y en la corea de Huntington las neuronas GABAérgicas estriadonigrales. Esta selectividad relativa constituye uno de los retos

Cuadro I. Causas y mecanismos de la neurodegeneración
A. Muerte neuronal programada: apoptosis (condensación perinuclear de la cromatina, fragmentación celular, preservación de membranas)
"Suicidio" celular genéticamente determinado, por ejemplo durante el desarrollo ontogénico
Apoptosis en organismos maduros
Modificaciones de la expresión genética Activación de receptores Deficiencia de factores tróficos 'Muerte por envejecimiento? 'Enfermedades neurodegenerativas?
B. Neurodegeneración patológica: necrosis (condensación general de la cromatina, destrucción de membranas, vacuolización y lisis)
Infección (priones) Edema intracelular Hipoxia, hipoglucemia Toxinas Excitotoxicidad y/o estrés oxidativo Isquemia por accidente vascular cerebral (centro y zona de penumbra) Epilepsia

más formidables para diseñar modelos experimentales apropiados que permitan entender las causas y mecanismos de estos devastadores padecimientos. En el cuadro II se indica también la existencia de factores genéticos, ya que en los últimos cinco años se han encontrado alteraciones en algunos genes, en los casos de las enfermedades familiares. Sin embargo, debe recordarse que, con excepción de la corea de Huntington, que es definitiva y exclusivamente de origen genético, para las otras enfermedades mencionadas en el cuadro más del 80-85% de los casos son esporádicos o no familiares. Es decir, no hay un factor genético reconocible.

Cuadro II. Enfermedades neurodegenerativas crónicas: muerte neuronal selectiva
Alzheimer Parkinson Esclerosis lateral amiotrófica Esclerosis múltiple Huntington
'Muerte por necrosis y/o por apoptosis? Factores genéticos Factores no genéticos Excitotoxicidad, estrés oxidativo, alteraciones del citoesqueleto y autoinmunidad

En este simposio se revisan algunos de los fenómenos señalados, que parecen desempeñar un papel determinante en la destrucción neuronal. Ya el título del simposio describe que su objetivo no es revisar los padecimientos neurodegenerativos propiamente dichos, sino analizar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la muerte neuronal, y discutir hasta qué punto podrían explicar la pérdida de las neuronas en dichos padecimientos.

Referencias

1. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:667-672.

II. Edema y muerte neuronal

Herminia Pasantes*

El edema cerebral tiene dos componentes bien establecidos, el edema vasogénico y el edema celular. El edema vasogénico es la consecuencia del daño en el endotelio vascular que forma la barrera hematoencefálica, que permite el paso de agua y de solutos. Quizás se deba a una lesión mecánica de la barrera que perturba la función de las uniones ocluseras o puede ser la consecuencia de una alteración de los transportadores, en particular de los de los iones, a nivel del endotelio capilar. El edema celular o citotóxico, en el que hay un aumento en el volumen de las células nerviosas, puede ocurrir como secuela del edema vasogénico, o bien, ser ocasionado por el transporte de solutos del espacio extracelular al citoplasma, debido a causas diversas, sin que la permeabilidad vascular parezca afectada. En el edema celular las células gliales son las que preferentemente experimentan los cambios en volumen mientras que las neuronas parecen estar más protegidas.¹ Existen numerosas situaciones clínicas en las que ocurren cambios, -incremento o disminución-, en el volumen de las células nerviosas. En ambas situaciones las consecuencias pueden ser graves. En el primer caso, es decir, cuando hay edema celular, ya que la dilatación del cerebro está restringida por el cráneo, una consecuencia inmediata es el aumento en la presión intracraneal con el consiguiente riesgo de accidentes vasculares. En casos extremos hay herniación del tejido cerebral a través del foramen magno y la presión sobre los núcleos respiratorios y cardíacos del tallo cerebral puede tener consecuencias fatales. Evidentemente, esto también ocurre de forma subsecuente al edema vasogénico. En el caso de disminución en el volumen cerebral, puede afectarse la citoarquitectura del tejido nervioso, con la alteración de la comunicación interneuronal. Entre las condiciones que generan los cambios en el volumen celular se cuentan las anisomóticas, es decir, aquellas en las que la

osmolaridad del espacio extracelular se modifica, generalmente como respuesta a una alteración similar en el plasma (hiponatremia, hipernatremia), y las isomóticas, es decir, aquellas en las que el volumen celular cambia como consecuencia del movimiento de solutos osmóticamente activos, pero sin que se altere la osmolaridad del medio extracelular. Entre las enfermedades que cambian en el volumen celular en el cerebro en estas condiciones, están el traumatismo craneoencefálico, la diabetes, la insuficiencia hepática aguda y otras alteraciones hepáticas y a nivel local, causando edema en áreas o elementos celulares específico, en las epilepsias, la isquemia, la intoxicación por etanol, en hemorragias o los tumores y en las enfermedades desmielinizantes.^{2,3}

La respuesta adaptativa del cerebro a los cambios en el volumen celular en condiciones anisomóticas se ha estudiado con detalle.⁴⁻⁶ El conocimiento derivado de estas investigaciones ha permitido un mejor manejo de los pacientes sobre todo en situaciones crónicas de hipernatremia y posiblemente también en la diabetes. Cuando una célula cerebral (neuronas o células gliales) se expone a un medio hiposmótico, se comporta inicialmente como un osmómetro perfecto e incrementa su volumen debido a la entrada de agua, pero casi inmediatamente entra en funciones un mecanismo activo de regulación, que mediante la expulsión de osmolitos, permite a la célula recuperar su volumen.^{7,8} Los osmolitos que participan en este mecanismo regulador son los iones potasio y cloro y moléculas orgánicas como los aminoácidos, los polialcoholes, y algunas aminas. La movilización de estos osmolitos tiene lugar a través de los canales iónicos y de vías difusionales todavía no muy bien caracterizadas. Con base en la sensibilidad farmacológica de los flujos de osmolitos orgánicos, se ha sugerido que pueden ocurrir a través de un poro que permite también el paso de aniones.⁹

* Departamento de Biofísica, Instituto de *Fisiología* Celular, Universidad Nacional *Autónoma* de México.

Correspondencia y solicitud de cobertiros: Dra. Herminia Pasantes. Instituto de Fisiología Celular, Apartado Postal 70-253, 04510 México, D.F.

Los mecanismos de activación de estas vías no están tampoco bien definidos aunque se investiga activamente en este sentido.

Los mecanismos de corrección de la hipernatremia en las células cerebrales se conocen mejor. En este caso los osmolitos, sodio, cloro, y moléculas orgánicas, se acumulan por la acción de transportadores dependientes de energía, cuyo número se incrementa cuando las células están expuestas a un medio hiperosmótico.^{5,6,9} La corrección rápida del encogimiento celular en la hipernatremia aguda, se lleva a cabo por la movilización de los iones pero si la condición se vuelve crónica, la célula debe recuperar su equilibrio iónico y son los osmolitos orgánicos los que entonces tienen a su cargo el mantenimiento del volumen celular.⁹ Como consecuencia, la poza intracelular de osmolitos cambia notablemente para mantener la osmolaridad de la célula acorde con la externa. En estas condiciones, si la corrección clínica de la situación de hipernatremia se hace en forma muy rápida, el medio extracelular se vuelve hiposmótico con respecto al intracelular y la consecuencia es la aparición de un cuadro de edema celular cerebral, con los riesgos antes mencionados. Lo mismo parece ocurrir en la diabetes, con la complicación adicional en este caso, de que la respuesta adaptativa del cerebro a la concentración elevada de glucosa es la inducción de una enzima, la aldosa reductasa, que convierte la glucosa en sorbitol. La acumulación del sorbitol vuelve hiperosmótico el interior celular y además inhibe el transporte del mioinositol. Si la corrección de glicemia se hace en forma muy rápida, se presenta el edema cerebral, pero además, la salida del mioinositol como un osmolito, pone a la célula en un déficit marcado de este componente, lo cual se ha sugerido que produce daño membranar que podría conducir a las neuropatías que ocurren relacionadas con la diabetes.²

Mientras que los mecanismos de cambio y regulación del volumen en medios anisomóticos están muy estudiados, poco se conoce acerca de los relacionados con el edema cerebral en condiciones isomóticas. En estos casos, el agua se acumula en la célula como resultado de la entrada de solutos que son distintos en las diferentes enfermedades. En las epilepsias, por ejemplo, el edema celular se debe a la acumulación de potasio como consecuencia de la hiperactividad de las

neuronas, junto con el cloro como ion acompañante.¹ En la insuficiencia hepática aguda y en otras alteraciones hepáticas, el amonio parece ser el osmolito responsable,¹⁰ mientras que en la isquemia, la baja en la actividad energética de la célula hace menos eficientes los mecanismos activos de expulsión de sodio, con lo que éste se acumula, y es seguido por cloro y agua.¹¹ En otras situaciones como en las hemorragias, tumores y enfermedades desmielinizantes, el edema podría ser la consecuencia de una permeabilidad excesiva de los iones debida a la lipoperoxidación de las membranas, con la acumulación consiguiente de agua para restablecer el equilibrio osmótico. Aunque en algunos casos se conocen los mecanismos de entrada de los solutos, no se sabe si en esas condiciones se activan los mecanismos de regulación del volumen celular o si, aún cuando se activen, son sobrepasados por el influjo de osmolitos. Es ésta un área de investigación que requiere la atención urgente de los especialistas, ya que cada vez más se advierten los riesgos que conlleva el edema celular en el cerebro. Recientemente se publicó un trabajo que prueba experimentalmente la importancia del decremento en el espacio extracelular en la hipersincronía de las descargas neuronales durante la epilepsia.¹² Los autores sugieren que al reducirse el espacio extracelular, se hace posible la transmisión efáptica en un número grande de neuronas, lo que permite la propagación del estado hiperexcitable característico del padecimiento. Otra consecuencia grave del edema celular cerebral puede ser la liberación de los aminoácidos excitadores, que tiene lugar cuando las células aumentan su volumen¹³ y que, una vez en contacto con sus receptores, producen cuadros agudos de excitotoxicidad y la consecuente muerte neuronal. Este efecto excitotóxico resultante del edema, puede estar asociado a la isquemia, y a cualquier cuadro en el que produzca un incremento en el volumen debido a la lipoperoxidación de las membranas.

Taurina, edema y muerte neuronal. La taurina es un aminoácido azufrado que no forma parte de las proteínas y, con excepción de la síntesis del ácido taurocólico en el hígado, no participa en ninguna función en el organismo.¹⁴ Sin embargo, la taurina está presente en todos los tejidos animales y en algunos, particularmente en los tejidos excitables alcanza concentraciones muy altas. Así, la

retina contiene niveles de taurina superiores a 40 mM y el corazón y el músculo estriado tienen cantidades del orden de 10–40 mM.¹⁵ Estas características de la taurina, que durante mucho tiempo no tenían ninguna lógica, se explican ampliamente cuando se piensa en una función como osmolito.

De hecho, la taurina puede considerarse como el osmolito ideal, ya que debido a su inercia metabólica, puede moverse dentro y fuera de la célula modificando el contenido de agua sin afectar el metabolismo celular.¹⁵ Se ha sugerido que la taurina podría estar actuando como osmolito no sólo a nivel celular sino en el mantenimiento del volumen de espacios intracelulares, tales como los del retículo sarcoplásmico en el músculo, los canalículos secretorios en las glándulas y los espacios discales en los fotorreceptores. La alteración de estos espacios por un cambio incontrolado en su volumen podría tener consecuencias funcionales muy graves.

Otro aspecto interesante en relación a la función como osmolito de este aminoácido es la vinculación de esta función con otros efectos de la taurina descritos a nivel membranar. En numerosas condiciones de daño membranar se ha demostrado que la taurina ejerce un efecto protector, evitando la entrada excesiva de iones, en particular sodio, cloro y calcio, a través de las membranas dañadas. Este efecto se ha descrito en numerosos tejidos y en una variedad de condiciones tales como en la isquemia-reperusión en el corazón, en cardiopatías asociadas con la diabetes, en los órganos mantenidos en frío para los trasplantes y en el daño causado por la iluminación excesiva en los fotorreceptores.¹⁴ En todas estas condiciones, la presencia de taurina en el medio extracelular tiene un efecto protector muy definido. La crítica que se hacía a estas investigaciones es que la concentración de taurina requerida para ejercer sus efectos protectores es del orden de 10–25 mM, mientras que sus niveles en el plasma o en el espacio extracelular son cien veces menores. Sin embargo, en todas las situaciones en las que la taurina ejerce un efecto protector, se presenta edema celular, precisamente debido a la sobrecarga iónica a través de las membranas dañadas. En esas condiciones, la poza intracelular de taurina, que es muy alta, se moviliza hacia el espacio extracelular, en el que puede alcanzar concentraciones muy altas, que exceden ampliamente las que se requie-

ren para que el aminoácido ejerza sus acciones protectoras. La función de la taurina como osmolito, adquiere entonces una importancia mayor y justifica el interés por investigar las posibilidades de utilizar este aminoácido en acciones preventivas de muerte celular.

Agradecimientos

La parte experimental de este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de los donativos 346-5-2262PN de CONACYT y IN202093 de la DGAPA. UNAM.

Referencias

- 1 Kimelberg HK, Ransom BR. Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: Fedoroff S, Vernadakis A, editors. *Astrocytes* (Vol. 3). New York, Academic Press; 1986, pp 129–166.
- 2 McManus ML, Churchwell KB. Clinical significance of cellular osmoregulation. In: Strange K, editors. *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994, pp 63–74.
- 3 Tratchman H. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolar disturbances. *Pediatric Nephrol* 1992;6:104–112.
- 4 Gullans SR, Verbals JG. Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions. *Annu Rev Med* 1993;44:289–301.
- 5 Pasantes-Morales, H. Cell volume regulation in brain cells: Cellular and molecular mechanisms. *Brain Met Disease* 1996; 11:187–204.
- 6 Cserr HF, DePasquale M, Patlak CS. Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolality in rats. *Am J Physiol* 1987;253:F522–F529.
- 7 Pasantes-Morales H, Murray RA, Lijla L, Morán J. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes 1. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol* 1994;C165–C171.
- 8 Pasantes-Morales H, Alavéz S, Sánchez-Olea R, Moran J. Contribution of organic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res* 1993;18:445–452.
- 9 Hellig WC, Stromski ME, Blumenfeld J D, Lee J P, Gullans SR. Characterization of the major brain osmolytes that accumulate in salt loaded rats. *Am. J. Physiol.* 1989;257: F 1108–F 1116.
- 10 Norenberg MD, Baker L, Norenberg LOB, Blicharska Jm Bruce-Gregorios JHs Neary JT. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res* 1991; 16:833–836.
- 11 Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the central nervous system: a review. *Neuron* 1988;1:623.

12. Hochman DW, Baraban SC, Owens JWM, Schwarzkroin PA. Dissociation of synchronization and excitability infurosemideblockadeofepileptiformactivity. *Science* 1995;270:99-102.
13. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewsky RA. Swellinginduced release of glutamate, aspartate, and taurinefrom astrocytecultures. *J Neurosci* 1990;10:1583-1591.
14. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72:101-163.
15. Pasantes-Morales H, Schousboe A. Role of taurine in osmoregulation: mechanismsandfunctionalimplications. *Amino Acids* 1997;12:281-292.

III. Isquemia y excitotoxicidad

Lourdes Massieu*

La isquemiacerebral vinculada con los accidentes cerebrovasculares tiene un gran impacto debido a la severidad de sus secuelas. Los trastornos vasculares cerebrales se ubican entre las tres primeras causas de muerte en Norteamérica y en Europa Occidental, y son la causa principal de incapacidad permanente en los adultos, principalmente por el traumatismo cerebral y la hipoxia perinatal. Independientemente de la causa, la reducción del flujo sanguíneo cerebral tiene como consecuencia el daño neuronal irreversible en el foco isquémico, es decir, en la zona en donde se interrumpe por completo el flujo sanguíneo. Sin embargo, en la zona que rodea al foco isquémico, denominada zona de penumbra o zona perifocal, el daño neuronal se desarrolla lentamente y puede prevenirse con ciertos tratamientos.

Un avance muy importante en el campo de la neurodegeneración fue el descubrimiento de las similitudes entre la muerte neuronal isquémica y la neurodegeneración producida por la exposición de las neuronas al glutamato.¹⁻³ El glutamato es un aminoácido que en el sistema nervioso además de participar en el metabolismo celular funciona como neurotransmisor excitador. Este neurotransmisor excita a las neuronas activando tres tipos diferentes de receptores. Los denominados receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), los tipo no-NMDA (que incluye a los receptores AMPA (α -amino-3-

hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato) y kainato, y los receptores metabotrópicos. Los receptores reciben su nombre de acuerdo a la molécula que los activa más potentemente, pero todos ellos son activados por el glutamato que es el ligando natural. Los dos primeros subtipos de receptores están acoplados a canales iónicos permeables a sodio, potasio y calcio, siendo el receptor NMDA el más permeable a calcio, mientras que los receptores metabotrópicos están acoplados ya sea a proteínas G o a la adenilato ciclasa. Desde el punto de vista clínico, el descubrimiento de la similitud entre la neurodegeneración isquémica y la producida por glutamato tuvo mucha relevancia, ya que dio lugar a que muchos grupos de investigación estudiaran los posibles efectos neuroprotectores de bloqueadores de los receptores glutamatérgicos, contra el daño isquémico.²⁻⁶ Casi al mismo tiempo se descubrió que durante un episodio isquémico los niveles extracelulares de glutamato y aspartato se elevan de una manera importante en las regiones cerebrales en donde se presentará posteriormente la neurodegeneración.⁷

Algunos años más tarde se encontró que la interrupción de la innervación glutamatérgica a la región isquémica, evita el daño neuronal.⁸ Desde entonces numerosos estudios se han enfocado a investigar el papel del glutamato en el daño neuronal isquémico, los mecanismos a través de los

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Lourdes Massieu, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, AP 70-253, 04510. México, DF.

cuales produce neurodegeneración, y cómo es que este aminoácido se acumula en el espacio extracelular durante la isquemia.

El estudio de los mecanismos por medio de los cuales el glutamato produce muerte neuronal también contribuye al entendimiento del deterioro neuronal asociado a la epilepsia y a algunas enfermedades neurodegenerativas, principalmente la Corea de Huntington. La neurodegeneración que se relaciona con estos trastornos presenta también similitudes con la producida por glutamato.⁹⁻¹²

Los efectos neurotóxicos del glutamato se conocen desde hace 40 años. En 1957 Lucas y Newhouse³ observaron que la inyección intraperitoneal de glutamato en ratas inmaduras producía degeneración de las células de la retina. Posteriormente numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la exposición de las células nerviosas a glutamato y a agonistas de sus receptores producen degeneración de las células nerviosas. Dada la correlación entre la capacidad del glutamato y sus análogos para despolarizar, y su potencialidad neurotóxica, Olney en 1978 denominó como excitotóxica a la degeneración producida por la estimulación de los receptores glutamatergicos.¹⁸ Este término sugiere que la muerte neuronal se debe al agotamiento de las reservas energéticas debido a una excitación prolongada. Sin embargo, en 1987 los trabajos de Choi demuestran que la entrada de calcio a las neuronas es un factor determinante para la muerte excitotóxica y propone la hipótesis del calcio. De acuerdo a ésta, la entrada de este catión da lugar a la activación de una serie de enzimas y vías metabólicas (como la activación de proteasas, endonucleasas, fosfolipasas y xantina oxidasa) que dan lugar, entre otras cosas, a la desintegración de proteínas y fosfolípidos de la membrana y a la generación de radicales libres, contribuyendo así al deterioro y muerte neuronal.¹⁴ Recientemente se ha retomado la hipótesis excitotóxica inicialmente propuesta por Olney y se sugiere que si bien la entrada de calcio es una señal importante, y muy probablemente la que inicie la muerte excitotóxica, la deficiencia mitocondrial es el factor determinante del daño neuronal irreversible.¹⁹ Este es un tema que en la actualidad está en gran discusión.

Normalmente la concentración extracelular de glutamato es mucho baja (del orden de 1 μ M) que

su concentración en el tejido (10 mM), lo que indica que es ávidamente removido del medio extracelular después de ejercer su acción como neurotransmisor. La remoción del glutamato del espacio extracelular se lleva a cabo a través de acarreadores de alta afinidad dependientes de Na⁺ situados tanto en las neuronas como en las células gliales.²⁰

La regulación precisa de la concentración extracelular de glutamato es muy importante puesto que como se mencionó arriba la activación prolongada de sus receptores provoca la muerte de las neuronas. Sin embargo, la administración *in vivo* de glutamato produce neurodegeneración sólo a concentraciones muy altas (del orden molar). Esto se ha atribuido a que la rápida eliminación del glutamato por sus transportadores mantiene una concentración extracelular baja de este aminoácido después de su administración.

Aunque no se conoce el mecanismo responsable de la elevación de los niveles de glutamato durante la isquemia cerebral, se ha propuesto que se debe a una deficiencia en el funcionamiento de sus transportadores. Los acarreadores de alta afinidad de glutamato utilizan la energía derivada del gradiente de sodio de la membrana plasmática de las neuronas, para incorporar glutamato al interior celular.²⁰ Si el gradiente iónico se colapsa, el transportador deja de funcionar y por lo tanto el glutamato se acumula en el medio extracelular. En condiciones de hipoxia, isquemia y de hipoglucemia los niveles de ATP se reducen y se sugiere que el transporte de glutamato funcione de manera deficiente o incluso de manera inversa.²¹ La elevación de la concentración extracelular de Na⁺ y la disminución de la de K⁺ durante la isquemia apoyan esta posibilidad.^{22,23}

Hemos estudiado en ratas intactas si la inhibición prolongada de los acarreadores de glutamato puede producir una elevación importante de este aminoácido en el espacio extracelular, y si ésta es suficiente para dañar a las neuronas. Nuestros resultados indican que la administración de 25 mM del 2,4- transpirrolidindicarboxilato (PDC), que es un potente y selectivo inhibidor de los transportadores a glutamato, a través de una cánula de microdiálisis, produce una importante elevación de la concentración extracelular de este aminoácido (de aproximadamente 15 veces con respecto a su concentración basal) en el estriado y en el

hipocampo de la rata^{24,25} (Cuadro I). Sin embargo no se produce degeneración alguna más allá de la generada por la acción mecánica de la inserción de la membrana de microdiálisis en el tejido^{24,25} (Cuadro I). Este resultado nos ha llevado a sugerir que *in vivo* y en condiciones normales las células nerviosas son capaces de tolerar concentraciones altas de glutamato extracelular.

Algunos estudios sugieren que las ratas envejecidas son más susceptibles al daño neuronal producido por algunas toxinas que inhiben el metabolismo energético, como son la 3-acetilpiridina, que inhibe la glicólisis, y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) que inhibe tanto el ciclo de Krebs como el transporte de electrones.²⁶⁻²⁸ Además, es interesante mencionar que ambos tipos de lesiones dan lugar de manera secundaria a un tipo de degeneración excitotóxica.^{28,29} Basándonos en estos resultados decidimos estudiar si en los animales viejos las células nerviosas podrían ser más vulnerables a la elevación de los niveles de glutamato extracelular por la inhibición prolongada de sus transportadores. Administramos entonces el transpirrolidín dicarboxilato en ratas envejecidas de 22 a 24 meses de edad y encontramos que a pesar de que los niveles de glutamato extracelular

se elevan de manera muy importante, e incluso alcanzan concentraciones superiores a las logradas en los animales jóvenes con el mismo tratamiento, no se presenta daño neuronal ni en el estriado ni en el hipocampo²⁵ (Cuadro I). Estos estudios nos llevan a concluir que al igual que los jóvenes, los animales viejos son altamente tolerantes a la concentración elevada de glutamato.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que *in vivo* cuando las neuronas se encuentran intactas no son susceptibles a los efectos tóxicos del glutamato, y que posiblemente son necesarios factores adicionales para producir la muerte. Uno de estos factores podría ser el agotamiento de las reservas energéticas resultante de la disminución del aporte sanguíneo cerebral, característico de una condición isquémica. En estas condiciones las células podrían hacerse más vulnerables a la inhibición de sus transportadores, y a la consecuente elevación de los niveles de glutamato extracelular.

De acuerdo a lo anterior decidimos estudiar si el aumento de la concentración endógena de glutamato extracelular por inhibición de su sistema de recaptura, acoplado al "estrés" metabólico de las células, da lugar a la degeneración de las neuronas. Con este fin se montó un modelo crónico de

Cuadro I. Área lesionada y concentración de glutamato en animales jóvenes y viejos tratados con pirrolidindicarboxilato (PDC), o Ringer Krebs en el estriado y el hipocampo de la rata

	Area lesionada (mm ²)	Niveles de glutamato Extracelular (μM)	
		Estriado	Basal Pico máximo
Inyección por microdiálisis			
Jóvenes PDC (100 mM)	0.56 ± 0.032 (313)	0.64 ± 0.13	16.6 ± 1.9(9)
Viejas PDC (100 mM)	0.56 ± 0.056 (414)	1.99 ± 0.33	31.2 ± 3.0 (7)
Ringer	0.40 ± 0.047(3/3)	ND	ND
Hipocampo/C			
Inyección por microdiálisis			
Jóvenes PDC (25 mM)	0.030 ± 0.003 (414)	1.10 ± 0.13	17.1 ± 1.9 (5)
Viejas PDC (25 mM)	0.025 ± 0.009 (515)	1.62 ± 0.23	26.4 ± 1.9 (6)
Ringer	0.015 ± 0.004 (313)	ND	ND

Para la medición del área los datos representan la media ± el error estándar por corte de tejido de un total de 12-15 cortes analizados. El número entre paréntesis representa el número de animales que mostraron daño, relativo al total de animales analizados histológicamente. La concentración de glutamato se midió por HPLC en fracciones colectadas a través de una membrana de microdiálisis insertada ya sea en el hipocampo o en el estriado de la rata. El número entre paréntesis indica el número total de ratas tratadas. Los resultados son adaptados de las referencias 24 y 25. ND = no determinado

daño cerebral derivado de la inhibición de la actividad mitocondrial. Este modelo consiste en administrar intraperitonealmente en forma crónica el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa, y por tanto del ciclo de Krebs y del complejo II del transporte de electrones mitocondrial. Este modelo se ha descrito detalladamente^{29,30} y dada la similitud del daño neuronal producido por el 3-nitropropiónico con la neurodegeneración asociada con la Corea de Huntington, se ha propuesto como un modelo de esta enfermedad.³⁰ El paradigma experimental consiste en administrar intraperitonealmente en forma crónica el 3-NP, lo cual produce lesiones cerebrales selectivas en aproximadamente 30% de las ratas. Después de cuatro administraciones (una cada día) se observó degeneración en el estriado, el hipocampo y el tálamo. Es posible identificara los animales dañados, pues pierden su motricidad quedando postrados al tercer o cuarto día de tratamiento. Los animales que no presentan esta incapacidad locomotora después de 1 h de la última administración de 3-NP, se inyectan con PDC (500 nmol/ μ l) ya sea en el estriado o en el hipocampo de la rata, 1 h después de la cuarta administración de 3-NP. Los resultados indican que cuando se inhibe el ciclo de Krebs y el transporte de electrones con el 3-NP, la inhibición del transporte de glutamato con PDC sí produce neurodegeneración mientras que, como se mencionó arriba, la administración de PDC en las ratas intactas no tiene efectos tóxicos (Sánchez-Carbente y Massieu, en preparación). Estos resultados apoyan la hipótesis de que las células se hacen vulnerables a la elevación de los niveles de glutamato endógeno si presentan un déficit energético. A su vez, este modelo podría mimetizar una condición isquémica ya que produce un incremento de la concentración de glutamato y una disminución de los niveles de ATP.

Conclusiones

La degeneración vinculada con la isquemia cerebral tiene lugar probablemente gracias a un mecanismo excitotóxico. Este mecanismo se genera debido a la acumulación de glutamato en el espacio extracelular, y a la consecuente activación prolon-

gada de los receptores glutamatérgicos. La acumulación de glutamato se debe posiblemente a la inhibición o al cambio de dirección de los transportadores de glutamato que normalmente se encargan de removerlo del medio, ya que su actividad depende de la generación de ATP. Nuestros resultados experimentales indican que la inhibición del transporte de glutamato *in vivo* en las ratas intactas, no da lugar a la muerte neuronal a pesar de producir elevaciones muy importantes de la concentración extracelular de glutamato. Sin embargo, cuando el metabolismo energético se desacopla inhibiendo en forma crónica el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, las células nerviosas se tornan vulnerables a la inhibición de los acarreadores de glutamato.

Agradecimientos

Trabajo apoyado por la DGAPA, UNAM (205095)

Referencias

1. Brown AW, Briery JB. Anoxic ischemic cell change in rat brain: light microscopic and fine structural observations. *J Neurol Sci* 1972;16:59-84.
2. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 1984;226:850-852.
3. Van Reempts J. The hypoxic brain: histological and ultrastructural aspects. *Brain Res* 1984;14:99-108.
4. Meldrum BS, Evans MC, Swan JH, Simon RP. Protection against hypoxic/ischaemic brain damage with excitatory amino acid antagonists. *Medical Biology* 1987;65:153-157.
5. McCulloch J, Bullock R, Teasdale GM. Excitatory amino acid antagonists: opportunities for the treatment of ischaemic brain damage in man. In: Meldrum BS (editors) *Excitatory Amino Acid Antagonists*. Blackwell Scientific Publications Oxford, UK; 1991. pp. 287-326.
6. Sauer D, Allegrini PR, Cosenti A, Pataki A, Amacker H, Fagg GE. Characterization of the cerebroprotective efficacy of the competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 in a rat model of focal cerebral ischemia: an in vivo magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:595-602.
7. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-1374.
8. Benveniste H, Jorgensen MB, Sanberg M, Christensen B, Hagberg H, Diemer NH. Ischemic damage in

- hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:629-693.
9. **Beal M**, Kowall NW, **Ellison DW**, Mazurek MF, **Swartz KJ**, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986;321:168-171.
 10. **Coyle JT**, Schwarcz R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 1976;263:244-246.
 11. **McGeer EG**, **McGeer PL**. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 1976;263:517-518.
 12. **Meidrum BS**. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991;10:55-61.
 13. **Lucas DR**, **Newhouse JP**. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957;58:193-201.
 14. **Choi DW**, **Maulucci-Gedde MA**, **Kriegstein AR**. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987;7:357-368.
 15. **Massieu L**, **Thedinga KH**, **McVey M**, **Fagg GE**. A comparative analysis of the neuroprotective properties of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in vivo: implications for the process of excitotoxic degeneration and its therapy. *Neuroscience* 1993;55:883-892.
 16. **Massieu L**, **Tapia R**. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (9)quinoxaline (NBQX) protects against both AMPA and kainate-induced lesions in rat striatum in vivo. *Neuroscience* 1994;59:931-938.
 17. **Sauer D**, **Allegrini PR**, **Thedinga KH**, **Massieu L**, **Amacker H**. Evaluation of quinolinic acid induced excitotoxic neurodegeneration in rat striatum by quantitative magnetic resonance imaging in vivo. *J Neurosci Meth* 1992;42:69-74.
 18. **Olney JW**. Neurotoxicity of excitatory amino acids I: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. **McGeer EG**, **McGeer PL**, **Olney JW**, Editors. New York: Raven Press; 1978:95-121.
 19. **Schinder AF**, **Olson EC**, **Spitzer NC**, **Montal M**. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neuroscience* 1996;16:6125-6133.
 20. **Kanner BL**. Bioenergetics of neurotransmitter transport. *Biochem Biophys Acta* 1983;726:293-316.
 21. **Atwell D**, **Barbour B**, **Szatkowski M**. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 1993;11:401-407.
 22. **Hansen AJ**. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 1985;65:101-148.
 23. **Siesjö BK**. Calcium, excitotoxins, and brain damage. *News Physiol Sci* 1990;5:120-125.
 24. **Massieu L**, **Morales-Villagrán A**, **Tapia R**. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 1995;64:2262-2272.
 25. **Massieu L**, **Tapia R**. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem* 1997;69:1151-1160.
 26. **Bossi SR**, **Simpson JR**, **Isacson O**. Age dependence of striatal neuronal death caused by mitochondrial dysfunction. *Neuro Report* 1993;4:73-76.
 27. **Brouillet E**, **Jenkins BG**, **Hyman BT**, **Ferrante RJ**, **Kowall NW**, **Srivastava R**, **Roy DS**, **Rosen BR**, **Beal MF**. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 1993;60:356-359.
 28. **Schulz JB**, **Henshaw DR**, **Jenkins BG**, **Ferrante RJ**, **Kowall NW**, **Rosen BR**, **Beal MF**. 3-Acetylpyridine produces age-dependent excitotoxic lesions in rat striatum. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1994;14:1024-1029.
 29. **Beal MF**, **Brouillet E**, **Jenkins BG**, **Ferrante RJ**, **Kowall NW**, **Miller JM**, **Storey E**, **Srivastava R**, **Rosen BR**, **Hyman, BT**. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181-4192.
 30. **Hamilton BF**, **Gould DH**. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol* 1987;1972:286-297.

IV. Algunos mecanismos bioquímicos implicados en la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer

Clorinda Arias,* Ricardo Tapia*

Para la neurociencia básica y clínica, uno de los temas de mayor interés es el estudio de la pérdida neuronal selectiva que ocurre en algunos padecimientos neurodegenerativos crónicos como en la enfermedad de Alzheimer (EA). Esta enfermedad es la forma más común de demencia en individuos mayores de 60 años, y ciertamente es uno de los padecimientos del SNC más devastadores. Con el avance de la medicina moderna la expectativa de vida de los seres humanos ha ido en aumento, y por esa razón el problema de la EA se hace cada vez más importante, ya que el principal factor de riesgo, reconocido hasta el momento, es el envejecimiento.¹

Desde el punto de vista histopatológico, en la EA existe una marcada pérdida neuronal que frecuentemente es precedida por la aparición de depósitos intracelulares que constituyen las llamadas marañas neurofibrilares. Estas lesiones consisten bioquímicamente en agregados de proteína insoluble provenientes de elementos del citoesqueleto que se denominan filamentos apareados helicoidales. Otras lesiones encontradas en los cerebros de sujetos demenciados son las llamadas placas seniles, que consisten en grupos de neuritas dystóricas y procesos celulares gliales que rodean un núcleo de proteína β -amiloide (β AP), de localización extracelular. Ambos tipos de lesiones se localizan predominantemente en áreas de la neocorteza, el hipocampo y la amígdala. Aunque estas lesiones han sido estudiadas por décadas, se sabe muy poco de los mecanismos bioquímicos que las producen.

Fosforilación de proteínas del citoesqueleto

Los estudios sobre la composición bioquímica de los filamentos apareados helicoidales sugieren que la proteína relacionada con microtúbulos, llama-

da tau, forma parte importante de su estructura.² Asimismo, se han podido secuenciar fragmentos de otras proteínas relacionadas con microtúbulos, como la MAP2 y otras no relacionadas con el citoesqueleto, como es el caso de la proteasa ubiquitina, la cual forma parte de un mecanismo de degradación de proteínas dañadas.³

El equilibrio en la incorporación de fosfatos a proteínas depende del equilibrio entre las actividades de proteína cinasas y de proteína fosfatasa. Cualquier factor que incida sobre las actividades de estas enzimas dará como resultado un desequilibrio de las reacciones de fosforilación/desfosforilación. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo la tasa de fosforilación y/o desfosforilación de proteínas en el SNC puede relacionarse con funciones neuronales normales o alteradas, y cómo cambios en el grado de fosforilación pueden ser causa de muerte neuronal. Este tópico es relevante para entender algunos aspectos de la neurodegeneración que ocurre en la EA, ya que la fosforilación alterada de proteínas, especialmente de la tau, se ha propuesto como uno de los mecanismos probablemente involucrados en la formación de las marañas neurofibrilares.

No se conoce con exactitud qué proteína cinasas o fosfatasas pueden estar alteradas en cuanto a su actividad catalítica en las neuronas afectadas en la EA. Por un lado, la proteína tau puede ser fosforilada *in vitro* por diferentes cinasas y, por otro, la actividad de la proteína fosfatasa de serina/treonina 2A (PP2A) se encuentra disminuida en preparaciones cerebrales y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA, lo cual puede dar como resultado una disminución en los procesos de desfosforilación.

Nosotros hemos demostrado, utilizando el ácido okadaico (OKA), una droga específica y selectiva para inhibir la actividad de PP1/2A, en cultivos

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Clorinda Arias, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510-México, D.F.

de neuronas corticales, que las proteínas relacionadas con microtúbulos, tau y MAP2, se fosforilan previamente a la muerte neuronal.⁴ Más aún, el OKA indujo la aparición de un epítipo fosforilado en la proteína tau que sólo ocurre en la tau de pacientes con EA.⁴ En virtud de que el grado de fosforilación de MAP2 y tau determina su afinidad por los microtúbulos y ésta a su vez afecta la estabilidad de las estructuras del citoesqueleto, al aumentar la incorporación de fosfatos a estas proteínas se producen desarreglos en la organización intracelular que pueden resultar en la destrucción neuronal.

Experimentos recientes de nuestro laboratorio demuestran que la microinyección de OKA en el hipocampo de la rata *in vivo* induce neurodegeneración preferente de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Además, la administración de OKA induce la expresión temprana y de larga duración de la llamada proteína de choque térmico 70 (HSP70). La inducción de esta proteína en un modelo de neurodegeneración como el que hemos desarrollado, puede indicar la participación de factores que inducen estrés metabólico.

Las evidencias anteriores señalan que es posible desarrollar modelos de muerte neuronal *in vivo* alterando la tasa de fosforilación/desfosforilación de proteínas. Es posible que el aumento en la fosforilación que se ha encontrado en proteínas del citoesqueleto represente un proceso general de alteración metabólica involucrado en los mecanismos de la neurodegeneración.

Excitotoxicidad

Numerosos estudios sugieren que la neurotransmisión química que normalmente participa en la emisión o recepción de señales en el sistema nervioso central puede alterarse y ser parcial o totalmente responsable de ciertos tipos de muerte neuronal, entre ellas la que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas crónicas.⁶ Entre las hipótesis de esta naturaleza que ce han relacionado con la EA, es digna de mencionar a la que considera el papel de la neurotransmisión glutamatérgica como factor asociado a la muerte neuronal. En efecto, se ha descrito pérdida de terminales glutamatérgicas en la neocorteza y en el hipocampo,"

niveles reducidos de glutamato en algunas áreas corticales y subcorticales⁷ y deficiencias en los transportadores de este aminoácido en la corteza frontal.⁸ Por otro lado, en cultivo de neuronas hipocámpicas el glutamato induce la aparición de marcadores antigénicos propios de las células afectadas en la EA, como son las formas fosforiladas de proteína tau y de ubiquitina.⁹

Estos datos sugieren la posibilidad de que exista una relación entre las alteraciones en la neurotransmisión excitadora y la formación de marañas neurofibrilares. Con este enfoque, decidimos explorar el efecto de neurotransmisores excitadores sobre la estabilidad del citoesqueleto y de la proteína MAP2, para lo cual desarrollamos un modelo experimental consistente en la inyección de un inhibidor de la recaptura de glutamato en el hipocampo de la rata *in vivo*, para incrementar sus niveles endógenos extracelulares e inducir así sobreexcitación neuronal. Encontramos que el antagonista de la recaptura de glutamato, el dihidro-kainato, indujo cambios tempranos en la proteína MAP2, consistentes en su redistribución intracelular: de las dendritas, en donde la MAP2 se encuentra localizada normalmente, hacia el soma; esta redistribución fue seguida por la destrucción neuronal. Estos resultados apoyan la noción de que las proteínas del citoesqueleto son un blanco temprano y muy sensible en el proceso de muerte neuronal por excitotoxicidad.¹⁰

Proteína β -amiloide

Como ya ha sido mencionado, otra de las lesiones comunes de la EA es la presencia de depósitos insolubles extracelulares de proteína β -amiloide (β AP). Existen muchos trabajos enfocados a buscar la posible vinculación entre la presencia de depósitos de β AP y la neurodegeneración. La β AP posee efectos neurotóxicos y neurotróficos cuando se administra *in vitro* en cultivos de neuronas corticales.¹¹ Los depósitos insolubles de β AP inducen estrés oxidativo¹² y pueden alterar la homeostasis de Ca^{2+} .¹³

En un trabajo reciente hemos demostrado que el péptido de la β AP 25-35, con actividad biológica, potencia la liberación de glutamato dependiente de despolarización en el hipocampo de ratas jóvenes

y viejas.¹⁴ Más aún, encontramos que en las ratas viejas existe una liberación basal de glutamato significativamente mayor que en las ratas jóvenes. Estos resultados son particularmente interesantes, pues apoyan la hipótesis de la participación de alteraciones en los mecanismos relacionados con la neurotransmisión excitadora durante el envejecimiento y en presencia de la β AP. Los depósitos de β AP acumulados en las placas seniles pueden potenciar crónicamente la liberación de neurotransmisores excitadores que ocurre de manera normal durante el funcionamiento de las sinapsis excitadoras, el cual puede encontrarse de por sí incrementado en el cerebro envejecido, y colaborar así en la neurodegeneración.¹⁴

Marcadores genéticos de la EA

Aunque el origen genético de la EA se ha descrito en menos del 20% del total de pacientes, es muy interesante el encontrar familias en las cuales se han podido realizar análisis de ligación genética y encontrar mutaciones en genes localizados en diferentes cromosomas. En el cromosoma 21, que contiene el gen relacionado con la proteína precursora del β -amiloide, se han documentado 6 mutaciones. También se han encontrado mutaciones en el cromosoma 14, cuya alteración parece ser responsable del 70-80% del Alzheimer familiar y del 5-10% de todos los casos de EA y cuyo producto proteico es la llamada proteína S182, recientemente denominada presenilina 1,¹⁵ y en el cromosoma 1, cuyo producto es la proteína STM2 o presenilina 2.¹⁶

Por último, se ha descrito en el Alzheimer de iniciotardío una relación con las alteraciones genéticas en el cromosoma 19, donde se localiza un gen de la apolipoproteína E4.¹⁷

Conclusiones

Se están realizando importantes progresos en los estudios sobre los mecanismos moleculares que desencadenan la muerte neuronal en la EA. Sin embargo, aún no existe un modelo adecuado que represente la relación bioquímica entre los mecanismos que inducen la muerte neuronal y las

manifestaciones conductuales de este padecimiento. Quedan por desarrollar otros enfoques de muerte neuronal probablemente relacionados con las particularidades funcionales del cerebro humano y su longevidad, sin descartar por supuesto un probable origen multicausal en este tipo de demencia.

Agradecimientos

El trabajo original citado se realizó con el apoyo de la DGAPA, UNAM (proyecto 205095)

Referencias

1. Aronson MK, Ool WL, Geva DL, Masur D, Blau A, Frishman W. Dementia. Age-dependent incidence, prevalence and mortality in the old old. *Arch Intern Med* 1991;151:989-992.
2. Delacourte A, Defossez A. Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurosci* 1986;6:173-176.
3. Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 1987;235:1641-1643.
4. Arias C, Sharma N, Davies P, Shafiq Zagardo B. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 1993;61:673-682.
5. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med* 1994;330:613-622.
6. Procter AW, Palmer AM, Francis PT, et al. Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1988;50:790-801.
7. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol* 1987;22:37-40.
8. Masliah E, Afford BA, DeTeresa BS, Mallory BS, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996;40:759-766.
9. Mattson MP. Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and calcium influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 1990;4:105-117.
10. Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transporter inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res* 1997;116:467-476.
11. Regland B, Gottfries CG. The role of amyloid beta-protein in Alzheimer's disease. *Lancet* 1992;340:467-469.

12. **Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedl RA, Camey JM.** Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 1995;131:193-202.
13. **Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Ryder RE.** β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992;12:376-389.
14. **Arias C, Arrieta I, Tapia R.** β -amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 1995;41:561-566.
15. **Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, et al.** Cloning of a gene bearing missense mutation in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375:754-760.
16. **Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingel W, Yu-Chen, et al.** Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-976.
17. **Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MS, Walker AP, et al.** Linkage studies in familial Alzheimer's disease-evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Genet* 1991;48:1034-1050.

V. Enfermedades neurodegenerativas: ¿Mecanismos comunes de muerte celular?

Ricardo Tapia*

Los datos presentados en las ponencias de este simposio, conjuntamente con múltiples evidencias experimentales que se han acumulado en los últimos años, permiten postular que existen algunos procesos celulares que pueden explicar, si no las causas, si los mecanismos de la muerte neuronal durante los padecimientos neurodegenerativos agudos y crónicos. Estos mecanismos parecen ocurrir de manera similar independientemente de la entidad patológica de que se trate, e involucran varios factores que están estrechamente relacionados entre sí, de modo que se establecen cascadas, en que un proceso lleva a otro o lo potencia, y el segundo a su vez modifica a un tercero o al primero, y así sucesivamente.

Como se muestra en la figura 1, el daño mitocondrial genera un exceso de radicales libres, que son especies moleculares reactivas que contienen un átomo de oxígeno con un electrón no compartido, como el superóxido o el radical hidroxilo (Figura 2), lo que las hace altamente oxidantes y por lo tanto muy tóxicas. Este poder oxidativo se manifiesta, entre otras formas, en una peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, lo cual causa su desorganización y rompimiento, agravando así las deficiencias en la función mitocondrial. En estas condiciones las mitocondrias ya no

pueden producir ATP, la concentración de éste disminuye y por lo tanto decrece la actividad de la bomba de sodio membranaral, que es una ATPasa (Na-ATPasa). El resultado es que disminuye la extrusión de Na^+ , se alteran los gradientes de concentración de este catión y consecuentemente la membrana neuronal se despolariza, generándose así un aumento en la excitación celular. Esta despolarización facilita la apertura tanto de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje como del canal de Ca^{2+} del receptor al glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (Figura 3), por lo que se incrementa la concentración citoplásmica de este catión. Si bien el Ca^{2+} libre intracelular juega un papel esencial en la fisiología celular, cuando aumenta arriba de cierto nivel (normalmente su concentraciones de 0.1 micromolar, o sea 10,000 veces menos que en el líquido extracelular) se activan enzimas líticas que dañan tanto el núcleo como estructuras membranales, potenciándose así la destrucción provocada por los radicales libres. Entre las enzimas que el Ca^{2+} activa está la sintasa del óxido nítrico (NOS), y un exceso en la producción de NO también genera radicales libres, de modo que se establecen círculos de potenciación entre los diferentes factores intracelulares, cuyo resultado final es la muerte celular por necrosis (Figuras 1 y 3).

*Académico titular

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Ricardo Tapia, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 70-253, 04510, México, D.F.

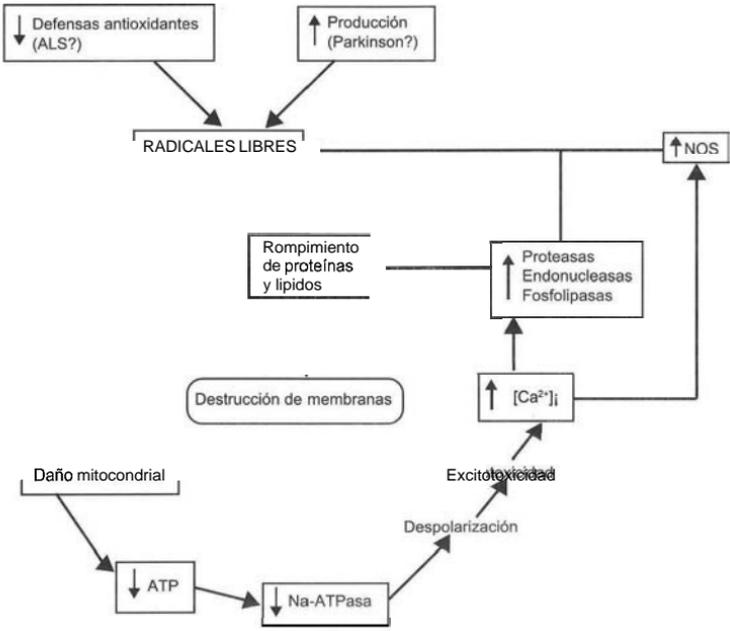


Figura 1. Relaciones entre el daño mitocondrial, los radicales libres, la excitotoxicidad y la necrosis neuronal. Los radicales libres (Figura 2) se forman en exceso cuando las mitocondrias se dañan; por modificaciones en el metabolismo de la dopamina (enfermedad de Parkinson); por disminución de las defensas antioxidantes, debido a alteraciones en enzimas como la superóxido dismutasa (ALS familiar); o por incremento en la síntesis de óxido nítrico (NO) debido a la activación de la NO sintasa (NOS). Los radicales libres oxidan a los componentes lipídicos de las membranas plasmática y mitocondrial, lo cual ocasiona lisis. La deficiencia en el funcionamiento energético resulta en una disminución en la síntesis de ATP y en la actividad de la bomba de sodio. La resultante alteración en el gradiente de concentración de sodio causa despolarización y por lo tanto se facilita la excitotoxicidad por aumento de la neurotransmisión excitadora (Figura 3). Esta genera un incremento en la concentración intracelular de calcio iónico, que resulta en la activación de varias enzimas líticas y de la NOS, potenciándose la destrucción celular.

Además, existe el factor de muerte apoptótica, mencionado en la Introducción de este simposio. En efecto, además de sus efectos directos sobre la estructura membranal y la actividad enzimática, tanto el Ca^{2+} como los radicales libres juegan un papel importante en el dispare de los mecanismos

de la apoptosis, por lo que el incremento en estos dos factores la facilita. Esto quiere decir que la necrosis y la apoptosis no son formas de muerte celular excluyentes, sino que pueden coincidir en determinados momentos y condiciones de la vida celular o, mejor dicho, del proceso degenerativo de las neuronas.

- 1) $Q + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$ (radical superóxido)
- 2) $\cdot O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (superóxido dismutasa)
- 3) $dopamina + O_2 \rightarrow 3,4\text{-dihidroxifenilacetaldehido} + NH_3 + H_2O_2$
- 4) $H_2O_2 + e^- \rightarrow \cdot OH$ (radical hidroxilo) + OH^-
- 5) $H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2H_2O$ (catalasa)
- 6) $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ (glutatión reductasa)

Figura 2. Principales reacciones de síntesis de radicales libres y de su eliminación. El radical superóxido se forma por adición de un electrón al oxígeno molecular¹ y es destruido por la acción de la superóxido dismutasa en una reacción² que genera H_2O_2 (agua oxigenada). El agua oxigenada también se puede formar por oxidación de la dopamina, en las neuronas que utilizan este neurotransmisor,³ y es a su vez reducida para formar otro radical libre muy tóxico, el hidroxilo.⁴ Por esta razón las dos enzimas capaces de reducir el H_2O_2 a H_2O , la catalasa⁵ y la glutatión reductasa,⁶ son importantes en la eliminación de radicales libres. Sin embargo, estas enzimas no son muy abundantes en el sistema nervioso central, por lo que éste es particularmente sensible a un aumento en la producción de radicales libres.

Las enfermedades neurodegenerativas en el marco de los mecanismos de destrucción celular

Aunque obviamente no de una manera global ni excluyente de otras alternativas, en muchos aspectos es ciertamente posible encuadrar los padecimientos neurodegenerativos en la visión mecanística de las figuras 1-3, como se discutirá a continuación. En esta breve revisión se pondrá más énfasis en algunos padecimientos, como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, que en la isquemia o la demencia de Alzheimer, dado que éstas han sido ya tratadas específicamente en otras ponencias del simposio.

Parkinson. Como se muestra en la figura 2, la oxidación de la dopamina puede generar, mediante la formación previa de H_2O_2 , el radical libre hidroxilo, que como se ha señalado es muy tóxico. La dopamina es el neurotransmisor fisiológico de la vía nigroestriatal, y son las neuronas dopaminérgicas de esta vía, cuyo soma se encuentra en la sustancia nigra compacta del mesencéfalo, las que se destruyen en la enfermedad de Parkinson. Es claro entonces que una posible explicación de la

muerte de estas neuronas sería un exceso en la producción de radicales libres, lo que a su vez causarían daño mitocondrial y desencadenaría en la secuencia que se ha descrito arriba. Esto implicaría a la deficiencia en la función mitocondrial como el mecanismo primario en el proceso de la neurodegeneración dopaminérgica. Esta hipótesis se sustenta también, de manera importante, en el hecho de que el MPTP (1-metil,4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), un compuesto tóxico que en humanos y en otros primates produce síntomas y signos neuropatológicos prácticamente indistinguible de la enfermedad de Parkinson, actúa inhibiendo la función mitocondrial después de ser capturado por las neuronas dopaminérgicas (el compuesto inhibidor es en realidad el catión 1-metil, 4-fenil-piridinio, derivado oxidado del MPTP que se forma intracelularmente por la acción de una monoaminoxidasa). Aunque existen datos que indican que la toxicidad del MPTP no es tan selectiva para las neuronas dopaminérgicas como al principio se pensó,⁷ es claro que la hipótesis de alteraciones oxidativas en la neurodegeneración característica de la enfermedad de Parkinson es sostenible.

Esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En el caso de la ALS, la selectividad de la neurodegeneración es quizá más sorprendente, pues son las neuronas motoras de la médula espinal y de la parte baja del tallo cerebral las que primordialmente se afectan, lo que da lugar a una parálisis progresiva. De entre los mecanismos que se han propuesto para explicar, si no la selectividad de la neurodegeneración, destacan la participación de un exceso de radicales libres, debidos probablemente a una alteración funcional de la superóxido dismutasa (Figura 2), que da lugar a un mayor daño oxidativo. La evidencia más importante que se apoya esta hipótesis es el descubrimiento de un defecto genético en casos de ALS familiar, que resulta en alteraciones en la estructura de la superóxido dismutasa, con la consecuente modificación de su actividad enzimática.² Es necesario recordar, sin embargo, que la ALS familiar constituye apenas aproximadamente 10% de los casos, y 90% restante es de tipo esporádico. Aunque esto no quiere decir que los radicales libres no estén involucrados en la ALS esporádica, no hay evidencias directas de que esto ocurra.

Otro mecanismo que se ha postulado para explicar la neurodegeneración en la ALS es la excitotoxicidad por exceso de glutamato extracelular, el cual se debería a un funcionamiento deficiente del transportador de glutamato, proteína membranar responsable de recapturar al aminoácido que se libera normalmente durante la transmisión excitadora en estas sinapsis. En efecto, se ha encontrado una disminución en la función del transportador de glutamato (Figura 3) en la médula espinal de algunos pacientes con ALS,³ y además se ha reproducido parcialmente los síntomas de la enfermedad en ratas en que se ha impedido la síntesis del transportador localizado en la glía mediante la inhibición de la traducción del mensaje genético correspondiente (el RNA mensajero).⁴ Otras hipótesis consideran que puede haber un problema de autoinmunidad, generándose anticuerpos contra los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, de modo que los canales se harían más permeables al catión y por lo tanto aumentaría su concentración citoplásmica, con las consecuencias fatales descritas arriba.

Modelos experimentales de neurodegeneración

En la figura 3 se resumen de manera esquemática los mecanismos celulares de muerte neuronal que parecen estar involucrados en la neurodegeneración por necrosis (y quizá también por apoptosis), en diversos padecimientos neurodegenerativos. Estos mecanismos se pueden enumerar como sigue:

- El estrés oxidativo causado por deficiencias en la función energética mitocondrial.
- La excitotoxicidad por sobreactivación de los receptores glutamatérgicos.
- La oxidación destructiva de los lípidos membranales y de proteínas, por los radicales libres.
- El incremento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular, debido a: a) su mayor penetración a través del canal de los receptores tipo NMDA y de los canales sensibles al voltaje; b) su liberación de fuentes intracelulares como el sistema retículo endoplásmico; y c) su deficiente amortiguamiento por las mitocondrias.
- La sobreactivación de enzimas liticas por el exceso de Ca^{2+} citoplásmico.

Se incluye también en la figura 3 la incorporación de la proteína β -amiloide, característica de las placas seniles de la enfermedad de Alzheimer, a la membrana neuronal, así como el posible efecto facilitador que esta incorporación puede ejercer sobre la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} . Si esto ocurre en las terminales sinápticas glutamatérgicas, la mayor entrada de Ca^{2+} aumentaría la liberación del glutamato, con la consecuente potenciación de la excitotoxicidad.⁵

Además de las observaciones hechas en el tejido nervioso de pacientes que fallecieron con enfermedades neurodegenerativas, algunas de las cuales se han mencionado a lo largo de las ponencias, un gran número de estudios experimentales en animales, *in vitro* e *in vivo*, han permitido establecer los mecanismos descritos. Recíprocamente, el conocimiento de tales mecanismos proporciona la oportunidad para diseñar nuevos modelos experimentales de las enfermedades neurodegenera-

rativas, mediante procedimientos que induzcan o faciliten algunos de ellos en poblaciones restringidas de neuronas. Con esta idea en mente, en nuestro laboratorio hemos demostrado que una droga epileptogénica, la 4-aminopiridina, estimula notablemente la liberación de glutamato desde terminales sinápticas cuando se administra en regiones discretas del cerebro de la rata, ** que la hiperexcitabilidad neuronal que se observa en estas condiciones es parcialmente antagonizada por bloqueadores de los receptores al glutamato tipo NMDA.⁷ Además, recientemente hemos observado que esta liberación de glutamato estimulada por 4-aminopiridina, en el hipocampo, induce neurodegeneración (F. Peña y R. Tapia, en preparación).

En otro modelo experimental hemos observado que cuando un colorante catiónico llamado rojo de rutenio se administra en el hipocampo de la rata, se induce hiperexcitabilidad neuronal, y el colorante es incorporado selectivamente al interior de los somas neuronales y los destruye.⁸ En la actualidad estamos estudiando si la microinyección del rojo de rutenio y de la 4-aminopiridina en otras regiones del sistema nervioso central puede producir alteraciones conductuales y electroencefalográficas, así como destrucción neuronal, similares a las que se observan en enfermedades como la ALS o la enfermedad de Alzheimer. Creemos que estos enfoques experimentales pueden aportar datos relevantes en cuanto a los mecanismos involucrados en la muerte, y por ende, permitir el diseño de

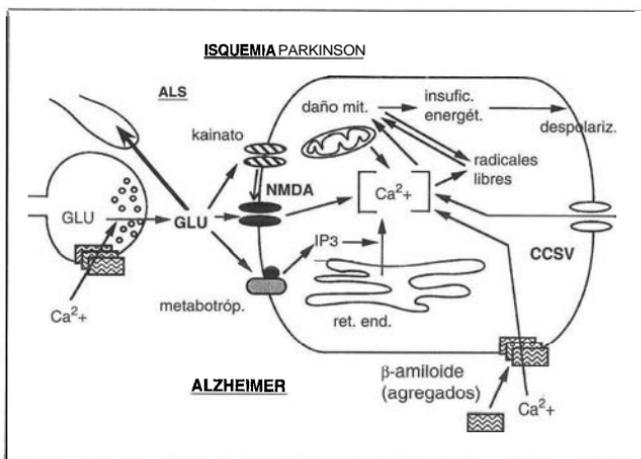


Figura 3. Algunos factores involucrados en la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Un aumento en la concentración de glutamato extracelular, por su excesiva liberación desde la terminal presináptica (dependiente de Ca²⁺) o desde los somas neuronales (por ejemplo la que ocurre por lisis en la zona isquémica central en una embolia cerebral), o bien por disminución en su recaptura a las células gliales (flecha gruesa), como quizá ocurra en la ALS, causa una sobreactivación de los tres principales tipos de receptor glutamatérgico: el NMDA (N-metil-D-aspartato), cuyo canal es permeable al Ca²⁺, el kainato, que indirectamente (por despolarización) activa al NMDA, y el metabotrópico, que mediante el segundo mensajero inositol-trifosfato (IP₃) libera Ca²⁺ desde el sistema retículo endoplásmico. El Ca²⁺ también puede penetrar a la neurona por apertura de los canales sensibles a voltaje (CCSV) y, en el caso del Alzheimer, posiblemente también por una difusión facilitada por agregados de la proteína β-amiloide que se incorporan a la membrana. Como se describe en la figura 1, al daño causado por el incremento en el Ca²⁺ intracelular se agrega la oxidación de las membranas producido por los radicales libres, y la deficiencia en la función mitocondrial produce una mayor despolarización membranal que a su vez potencia la excitotoxicidad.

posibles estrategias terapéuticas para detener, inhibiendo alguno de los pasos críticos de estos mecanismos, la cascada de procesos que finalmente matan a las neuronas.

Agadecimientos

Las investigaciones originales citadas se realizaron con el apoyo de la DGAPA, UNAM (proyecto 205095).

Referencias

1. Jasso **López D**, Tapia R. Neurotoxic effect of intranigral injection of 1-methyl-4-phenylpyridinium on GABA-containing neurons and its relation to circling behavior. *J Neurochem* 1995;64:794-801.
2. **Rosen DR et al.** Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
3. Rothstein JD, **Martin LJ**, Kuncl RW Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1992;326:1464-1468.
4. Rothstein JD, Dykes-Hobeg M, Pardo CA, **Bristol LA**, Jin L, Kuncl **RW**, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke J, Welty **DF**. Antisense knockout of glutamate transporters reveals a predominant role of astroglial glutamate transport in excitotoxicity and clearance of extracellular glutamate. *Neuron* 1996;16:675-686.
5. Arias C, Arrieta **I**, Tapia R. β -amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 1995;41:561-566.
6. Morales-Villagrán A, Tapia R. Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem Int* 1996;28:35-40.
7. Morales-Villagrán **A**, **Ureña-Guerrero ME**, Tapia R. Protection by NMDA receptor antagonists against seizures induced by nira cerebra administration of 4-aminopyridine. *Eur J Pharmacol* 1996;305:87-93.
8. Tapia R, Velasco **I**. Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways. *Neurochem Int* 1997;30:137-147.