

# Progresividad de los efectos del glutamato en el sistema nervioso central: Aspectos experimentales y clínicos

Manuel José Rodríguez Allué

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Tesis doctoral

**PROGRESIVIDAD DE LOS EFECTOS DEL GLUTAMATO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: ASPECTOS  
EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS**

**Manuel José Rodríguez Allué**

Barcelona, Mayo de 2000

Tesis doctoral

PROGRESIVIDAD DE LOS EFECTOS DEL GLUTAMATO EN EL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL: ASPECTOS EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS

Trabajo realizado por Manuel José Rodríguez Allué en la *Unitat de Bioquímica* del *Departament de Ciències Fisiològiques I* de la *Facultat de Medicina* (IDIBAPS) de la *Universitat de Barcelona*, bajo la dirección de la Dra. Nicole Mahy, para optar al título de Doctor en Biología.

El Autor:

La directora:

Manuel J. Rodríguez

Nicole Mahy

No basta examinar, hay que contemplar: impregnemos de emoción y simpatía las cosas observadas; hagámoslas nuestras, tanto por el corazón como por la inteligencia. Sólo así nos entregarán su secreto. Porque el entusiasmo acrecienta y afina nuestra capacidad perceptiva.

*Santiago Ramón y Cajal*  
(Los tónicos de la voluntad)



*Quino*  
(Mafalda)

Cuando su padre le comunicó su alarma por haber olvidado hasta los hechos más impresionantes de su niñez, Aureliano le explicó su método, y José Arcadio Buendía lo puso en práctica en toda la casa y más tarde lo impuso a todo el pueblo. Con un hisopo entintado marcó cada cosa con su nombre: *mesa, silla, reloj, puerta, pared, cama, cacerola*. Fue al corral y marcó los animales y las plantas: *vaca, chivo, puerco, gallina, yuca, malanga, guineo*. Poco a poco, estudiando las infinitas posibilidades del olvido, se dio cuenta de que podía llegar un día en que se reconocieran las cosas por sus inscripciones, pero no se recordara su utilidad. Entonces fue más explícito. El letrero que colgó en la cerviz de la vaca era una muestra ejemplar de la forma en que los habitantes de Macondo estaban dispuestos a luchar contra el olvido: *Esta es la vaca, hay que ordeñarla todas las mañanas para que produzca leche y a la leche hay que hervirla para mezclarla con el café y hacer café con leche*. Así continuaron viviendo en una realidad escurridiza, momentáneamente capturada por las palabras, pero que había de fugarse sin remedio cuando olvidaran los valores de la letra escrita.

*Gabriel García Marquez*  
(Cien años de soledad)

No hay dolor

A Yolanda

## AGRADECIMIENTOS

Seguro que la discusión no será tan difícil de escribir y tendrá menos borradores y versiones previas que esta página, y es que intento estar a la altura de las circunstancias. Ante todo pretendo ser sincero y no abrazar farolas, pero también hacer justicia a la gente que me ha ayudado estos cinco años y no quisiera olvidarme de nadie.

En primer lugar está la Dra. Mahy pues a su lado he aprendido muchas cosas. A veces ha sido la jefa dura que sabe ser, pero he de agradecerle que también ha sabido ser simplemente Nicole cuando la situación lo requería.

A Jou, sólo estuve con él un año pero a su lado aprendí a caminar. Con la bata puesta o frente al MEDLINE teclado en ristre tengo vicios que son sólo míos, pero la mayoría de las virtudes que pueda tener las copié de él.

A las neuroquímicas, claro. Consideradas a veces bioquímicas, a veces Mahys o Nicoletas, según convenga. ¿Verdad Jose (sin acento) y Fabián que ha sido grato trabajar con tal cantidad de mujeres tan diferentes?. Yolanda, Noemí, Rosa, Carmen, Mónica (espero que no me odies en secreto), Lluïsa, Gloria, Valerie, Karin y Patricia. Pero más grato ha sido descubrir alguna nueva amiga con la que sabes puedes contar, eso no lo esperaba.

A Pau con el que compartí alumnos ERASMUS y montañas de burocracia.

A todos los bioquímicos con Rosario como estandarte. Olga, Clara, Gisela, Núria, Joan Parra, Joan Cadefau, Jordi, Màrius, José Antonio, Eva, Maica, Toni, Matí, Claudio, y Ada. Y Carmen García, que no me olvide. Con todos ellos ha habido muy buenos ratos, al igual que con los del piso de abajo: Xavi, Artur, Bárbara y Jose (también sin acento).

Ya saliendo del Departamento, hay gente muy maja con la que me ha encantado trabajar. Cristina del Servicio de Radisótopos y Soledad y Adrián del Estabulario, son tres buenos ejemplos. También Lidia de conserjería, Merce de la Cooperativa *Sant Jordi*, Julia de Estadística y la chica de fotocopias (que vergüenza hace casi tres años que la conozco y aún no sé como se llama).

Al Dr. Alberto Prats del *Departament d'Anatomia*, a su cordialidad, su caballerosidad y su buen hacer en el fascinante mundo de la reconstrucción tridimensional.

A los biólogos de la primera época en Pedralbes con Oriol a la cabeza y en especial a Albert, Montse, Josep Maria (*Quants eren; nou, deu o onze, els gols que os varem fotre en aquell partit de fútbol sala?*) Marta y Ana Bosch. A las paellas en la playa con partido de voley incluido y a las fiestas en ca l'Oriol.

También quiero agradecer a la promoción de 1995-96 de la Facultad de Medicina el haberme metido en el cuerpo el gusanillo docente. Un bicho que cada año se alimenta con un puñado de alumnos nuevos que me hacen adorar esta profesión.

A mis padres por hacer de mí "un hombre de provecho", a mis hermanas y mi sobrino. A Yolanda, sin reparar en formas tales que pongan freno a lo que siento ahora a raudales. A mi abuelo y a Tomás Barcones quienes no acabarán de irse mientras me quede memoria.

Y por último a Isabel Allende, Pedro Almodovar, Alfredo Bryce Echenique y Lucía Echevarría por hacer de mi vida algo realmente emocionante.



## PUBLICACIONES

El trabajo que aquí se presenta está basado en las siguientes publicaciones internacionales:

- ☞ Rodríguez MJ, Bernal F, Andrés N, Malpesa Y, Mahy N. Excitatory amino acids and neurodegeneration: a hypothetical role of calcium precipitation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000 (18): 299-307.
- ☞ Rodríguez MJ, Ursu G, Bernal F, Cusí V, Mahy N. Perinatal human hypoxia-ischemia vulnerability correlates with brain calcification. *Neurobiol. Dis.* (en prensa).
- ☞ Andrés N, Rodríguez MJ, Andrade C, Rowe W, Quirion R, Mahy N. Increase in AMPA receptors in aged memory-impaired rats is associated with gliopthic changes. *Neuroscience.* (sometida)
- ☞ Rodríguez MJ, Andrés N, Malpesa Y, Prats A, Mahy N. Dose-effects and evolution of the excitotoxic lesion in the rat medial septum. (en preparación).
- ☞ Rodríguez MJ, Martínez M, Andrade C, Mahy N. Long-term excitotoxic medial septum lesion results in adaptative changes in glutamate metabolism and GABAergic activity in the hippocampus of rats. (en preparación).
- ☞ Robledo P, Rodríguez MJ, Andrade C, Mahy N. Medial septum long-term excitotoxic lesion induces changes in adenosine and  $\gamma$ -aminobutyric acid modulatory control over excitatory amino acid transmission in the hippocampus of freely moving rats. (en preparación)

Y ha estado financiado por:

- ☞ FISs 94/1461
- ☞ CIRIT PIC 96-98
- ☞ CIRIT SGR 97-00128
- ☞ FIS 00/0232



# SUMARIO

## 1. OBJETIVOS

Consideraciones previas. ....	Pág. 3
Objetivos. ....	Pág. 4

## 2. INTRODUCCIÓN

El glutamato como neurotransmisor. ....	Pág. 9
Los aminoácidos neurotransmisores. ....	Pág. 9
La sinapsis glutamatérgica. ....	Pág. 9
Síntesis del glutamato. ....	Pág. 9
Liberación al espacio sináptico. ....	Pág. 12
Los receptores del glutamato. ....	Pág. 12
Aspectos funcionales de los receptores de glutamato. ....	Pág. 17
Eliminación del glutamato sináptico. ....	Pág. 18
La glia en la sinapsis glutamatérgica. ....	Pág. 20
Aspectos energéticos. ....	Pág. 20
Modulación de la actividad sináptica. ....	Pág. 22
La excitotoxicidad del glutamato. ....	Pág. 23
Mecanismos de toxicidad del calcio. ....	Pág. 24
La precipitación del calcio. ....	Pág. 29
La excitotoxicidad y los desórdenes neurológicos. ....	Pág. 29
La hipoxia-isquemia. ....	Pág. 30
La esclerosis lateral amiotrófica. ....	Pág. 32
La epilepsia. ....	Pág. 32
La corea de Huntington. ....	Pág. 33
Mecanismos de protección. ....	Pág. 33
El tamponamiento del calcio intracelular. ....	Pág. 33
Mecanismos antioxidantes. ....	Pág. 36
Los factores tróficos. ....	Pág. 36
Otros neurotransmisores. ....	Pág. 37
La reacción astrogliar. ....	Pág. 39
La reacción microglial. ....	Pág. 40
Estrategias terapéuticas. ....	Pág. 41
La vía septohipocampal. ....	Pág. 42
Los sistemas colinérgicos. ....	Pág. 42
La vía septohipocampal. ....	Pág. 44
Organización anatómica. ....	Pág. 45
Distribución de los neurotransmisores. ....	Pág. 46
Receptores en el hipocampo. ....	Pág. 47
Aspectos fisiológicos. ....	Pág. 49
Proyecciones al área septal. ....	Pág. 50
La vía en el envejecimiento y las enfermedades. ....	Pág. 50
Función de la vía en el aprendizaje y la memoria. ....	Pág. 53

### 3. MATERIALES Y METODOLOGÍA GENERAL

Materiales. ....	Pág. 57
Animales. ....	Pág. 57
Tejidos humanos. ....	Pág. 57
Fármacos específicos. ....	Pág. 57
Anticuerpos. ....	Pág. 58
Radioligandos. ....	Pág. 58
<i>Software</i> específico. ....	Pág. 59
Otros compuestos. ....	Pág. 59
Metodología general. ....	Pág. 60
Anestesia de animales. ....	Pág. 60
Lesión estereotáxica. ....	Pág. 60
Lesión del septo medio. ....	Pág. 62
Microdiálisis intracerebral <i>in vivo</i> . ....	Pág. 62
Fundamento de la técnica. ....	Pág. 62
Implante de la fibra. ....	Pág. 64
Microdiálisis intracerebral. ....	Pág. 65
Cromatografía líquida de alta presión. ....	Pág. 68
Fundamento de la técnica. ....	Pág. 68
Detección de aminoácidos en sistema de gradiente. ....	Pág. 69
Detección de purinas. ....	Pág. 71
Disección y tratamiento del tejido cerebral. ....	Pág. 73
Fijación. ....	Pág. 73
Perfusión transcardíaca. ....	Pág. 74
Obtención de cortes por microtomía. ....	Pág. 75
Tinciones histológicas. ....	Pág. 76
Histoquímica enzimática. ....	Pág. 78
Histoquímica de lectinas. ....	Pág. 79
Localización inmunohistoquímica. ....	Pág. 80
Fundamento de la técnica. ....	Pág. 80
Método de la Avidina-Biotina. ....	Pág. 81
Doble localización inmunohistoquímica. ....	Pág. 82
Tinción inmunohistoquímica. ....	Pág. 82
Autorradiografía <i>in vitro</i> . ....	Pág. 86
Fundamento de la técnica. ....	Pág. 86
Autorradiografía <i>in vitro</i> . ....	Pág. 86
Cuantificación. ....	Pág. 87
Análisis cuantitativos. ....	Pág. 91
Cálculos morfométricos. ....	Pág. 91
Área de calcificación. ....	Pág. 91
Autorradiografía <i>in vitro</i> . ....	Pág. 91
Recuento neuronal. ....	Pág. 92
Análisis estadístico. ....	Pág. 93

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1: Comparación de la respuesta a la dosis de AMPA con la evolución de la lesión excitotóxica en el septo medio. ....	Pág. 99
Introducción. ....	Pág. 99
Metodología utilizada. ....	Pág. 101
Análisis de respuesta a la dosis. ....	Pág. 101
Análisis de evolución de la lesión. ....	Pág. 101
Análisis histológico. ....	Pág. 101
Análisis cuantitativo. ....	Pág. 102
Análisis estadístico. ....	Pág. 103
Resultados. ....	Pág. 103
Estudio de efecto de la dosis. ....	Pág. 103
Evolución de la lesión. ....	Pág. 108
Correlaciones. ....	Pág. 113
Discusión. ....	Pág. 114
4.2: Relación entre calcificación cerebral y vulnerabilidad a la hipoxia-isquemia en el periodo perinatal humano. ....	Pág. 121
Introducción. ....	Pág. 121
Metodología utilizada. ....	Pág. 122
Análisis estadístico. ....	Pág. 122
Resultados. ....	Pág. 124
Estudio histopatológico. ....	Pág. 124
Depósitos de calcio. ....	Pág. 124
Respuesta glial. ....	Pág. 128
Discusión. ....	Pág. 130
4.3: Cambios histológicos y neuroquímicos provocados por la lesión del septo medio con AMPA. ....	Pág. 137
Introducción. ....	Pág. 137
Metodología utilizada. ....	Pág. 139
Análisis tisular. ....	Pág. 139
Análisis cuantitativo. ....	Pág. 139
Análisis estadístico. ....	Pág. 140
Resultados. ....	Pág. 140
Estimación de la lesión. ....	Pág. 140
Efectos en el hipocampo. ....	Pág. 141
Autorradiografía <i>in vitro</i> . ....	Pág. 143
Discusión. ....	Pág. 147
4.4: Efecto de la lesión septal en el control de la adenosina sobre los niveles extracelulares de aminoácidos en el hipocampo. ....	Pág. 153
Introducción. ....	Pág. 153
Metodología utilizada. ....	Pág. 155
Microdiálisis intracerebral <i>in vivo</i> . ....	Pág. 155

Análisis histológico. ....	Pág. 156
Análisis estadístico. ....	Pág. 156
Resultados. ....	Pág. 157
Estimación de la lesión. ....	Pág. 157
Niveles extracelulares de aminoácidos en el hipocampo	Pág. 157
Niveles extracelulares de purinas en el hipocampo. ....	Pág. 164
Discusión. ....	Pág. 165
Niveles basales. ....	Pág. 165
Efecto de la lesión septal. ....	Pág. 167
Efecto del DPCPX. ....	Pág. 170
4.5: El incremento de receptores AMPA en el hipocampo de ratas viejas con problemas de memoria están asociados a una gliosis atípica . ....	Pág. 175
Introducción. ....	Pág. 175
Metodología utilizada. ....	Pág. 176
Análisis cognoscitivo. ....	Pág. 176
Análisis bioquímico. ....	Pág. 176
Análisis estadístico. ....	Pág. 177
Resultados. ....	Pág. 177
Discusión. ....	Pág. 179
5. DISCUSIÓN GENERAL. ....	Pág. 185
6. CONCLUSIONES. ....	Pág. 195
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	Pág. 201



## ÍNDICE DE CUADROS Y PROTOCOLOS

### Cuadros de texto:

2.1: Aspectos moleculares de los receptores AMPA. ....	Pág. 14
2.2: Anatomía del hipocampo. ....	Pág. 18
2.3: El precio de la memoria. ....	Pág. 27
2.4: El laberinto de agua de Morris. ....	Pág. 52

### Protocolos:

3.1: Detección de aminoácidos por HPLC en sistema de gradiente. ....	Pág. 71
3.2: Detección de purinas por HPLC. ....	Pág. 72
3.3: Fijación con PFA de secciones de cerebro congelado. ..	Pág. 75
3.4: Gelatinización de portaobjetos. ....	Pág. 76
3.5: Tinción de Nissl. ....	Pág. 76
3.6: Tinción contrastada de rojo de alizarina. ....	Pág. 77
3.7: Tinción con hematoxilina. ....	Pág. 77
3.8: Localización histoquímica de la actividad AChE. ....	Pág. 78
3.9: Tinción histoquímica de la isolectina B <sub>4</sub> . ....	Pág. 79
3.10: Tinción inmunohistoquímica de la GFAP. ....	Pág. 83
3.11: Tinción inmunohistoquímica de la ChAT. ....	Pág. 84
3.12: Tinción inmunohistoquímica de la parvalbúmina. ....	Pág. 84
3.13: Tinción inmunohistoquímica de la $\gamma\gamma$ -enolasa. ....	Pág. 85
3.14: Fijación <i>in vitro</i> de [ <sup>3</sup> H]PK-11195 a secciones de tejido para el marcaje del PBR. ....	Pág. 89
3.15: Fijación <i>in vitro</i> de [ <sup>3</sup> H]QNB a secciones de tejido para el marcaje de los receptores muscarínicos. ....	Pág. 89
3.16: Fijación <i>in vitro</i> de [ <sup>3</sup> H]muscimol a secciones de tejido para el marcaje del receptor GABA <sub>A</sub> . ....	Pág. 89
3.17: Fijación <i>in vitro</i> de [ <sup>3</sup> H]MK-801 a secciones de tejido para el marcaje del receptor NMDA. ....	Pág. 90
3.18: Fijación <i>in vitro</i> de [ <sup>3</sup> H]lazabemide a secciones de tejido para el marcaje de la MAO B. ....	Pág. 90

## ABREVIATURAS

En ésta lista no se incluyen las abreviaturas utilizadas sólo en las figuras o recuadros de texto. La explicación de esas abreviaturas se encuentra en el correspondiente pie de figura.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Viejas con problemas de memoria
AMPA	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Viejas sin problemas de memoria
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración intracelular del ion calcio
CA1	Cuerno de Ammón 1
CA2	Cuerno de Ammón 2
CA3	Cuerno de Ammón 3
ChAT	Colina acetiltransferasa
DAB	3,3-Diaminobencidina
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
EAA	Aminoácidos excitadores
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores
EEN	Enolasa específica de neuronas
EPSC	Corriente excitadora postsináptica
GABA	Acido $\gamma$ -aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GLUT	Transportador de glucosa
Gly	Glicina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
QNB	Quinuclidinil bencilato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAO	Monoaminoxidasa
mGluR	Receptor metabotrópico del glutamato
MK-801	Dizocilpine maleato
MS-DBB	Septo medio-banda diagonal de Broca
NGS	Suero normal de cabra
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	O-ftaldialdehido
PBR	Receptor periférico de las benzodiazepinas
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehido
SEM	Error estándar de la media

Ser  
SH  
Tau  
VOCC

Serina  
Septohipocampal  
Taurina  
Canales de calcio dependientes de voltaje



## 1. Objetivos



## CONSIDERACIONES PREVIAS

Una de las consecuencias de los espectaculares avances científicos y tecnológicos del último siglo es el aumento de esperanza de vida en las sociedades modernas lo que, en términos demográficos, se traduce en un incremento en la media de edad de la población. Sin embargo, este envejecimiento progresivo comporta una mayor incidencia en la sociedad de enfermedades que se manifiestan a edades avanzadas, destacando las que afectan al sistema nervioso central como la enfermedad de Alzheimer o la de Parkinson. El dramático incremento en la incidencia de este tipo de enfermedades se ha traducido en una sensibilización social frente a ellas, así como en un creciente interés en el estudio de los procesos neurodegenerativos asociados a la edad y en su posible tratamiento.

La etiología de la muerte neuronal en los procesos de neurodegeneración continúa siendo un enigma por descifrar pero cada vez se sabe más acerca de las causas y trastornos que la envuelven. Un factor que parece estar implicado directamente en estos procesos es el glutamato, el neurotransmisor excitador mayoritario del sistema nervioso central. La paradoja de ésta molécula estriba en que a pesar de estar implicada en procesos fisiológicos normales como el aprendizaje, la memoria o la construcción de conexiones sinápticas durante el desarrollo, también puede ser tóxica para las neuronas. El glutamato juega un papel central en muchos procesos neurodegenerativos y está implicado en patologías tan diversas como la corea de Huntington, la epilepsia, el daño cerebral isquémico o la enfermedad de Alzheimer. El modo mediante el que el glutamato ejerce su función tóxica consiste en la sobreactivación de sus receptores sinápticos, provocando una serie de fenómenos patológicos que llevan a la muerte de la neurona y que son conocidos con el nombre de excitotoxicidad. El mecanismo por el que todo esto sucede es todavía objeto de estudio.

Una de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación se centra en el desarrollo de modelos *in vivo* de neurodegeneración mediante la

caracterización de la lesión excitotóxica en el cerebro de la rata y en el estudio de los procesos moleculares que desencadena en diferentes regiones cerebrales. La finalidad es consolidar un modelo de estudio de los mecanismos moleculares presentes en las patologías neurológicas humanas en las que los aminoácidos excitadores se encuentran directamente involucrados. En este caso concreto, nos planteamos el estudio de la evolución del proceso neurodegenerativo provocado por la inyección de una excitotoxina en el septo medio de la rata, un núcleo cerebral implicado en la función cognoscitiva. También investigamos los posibles paralelismos que pudiera presentar dicha lesión con los desórdenes neurológicos humanos presentes durante la hipoxia-isquemia y la progresividad, tanto de esta lesión excitotóxica, como de sus efectos sobre otros sistemas de neurotransmisión.

## OBJETIVOS

Dentro de este marco, los objetivos principales sobre los que se fundamenta el trabajo aquí expuesto eran:

- ☞ Caracterizar en términos histológicos, bioquímicos y funcionales la lesión excitotóxica de la rata creada en la vía septohipocampal por la microinyección en el septo medio de un agonista de los receptores del glutamato (el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico, o AMPA) y comparar los efectos provocados en función de la dosis administrada con los que aparecen en función del tiempo postlesión transcurrido.
- ☞ Bajo las condiciones de neurodegeneración seleccionadas, estudiar *in vivo* las respuestas adaptativas de los sistemas de activación e inhibición hipocampales controlados por los núcleos de la región septal para así establecer la relevancia de cada sistema en este modelo animal.
- ☞ De forma paralela y en otro modelo animal de aprendizaje y memoria en el que previamente se habían caracterizado variaciones de los receptores

hipocampales del glutamato, nos propusimos estudiar el origen celular del aumento de receptores AMPA asociados al deterioro cognoscitivo provocado por el envejecimiento.

☞ Investigar la posible relación entre la vulnerabilidad humana a la hipoxia-isquemia durante el periodo perinatal, la calcificación cerebral en el mismo periodo y su evolución, con el fin de establecer posibles paralelismos con la lesión excitotóxica inducida en nuestro modelo en diferentes condiciones de dosis y tiempo.

☞ Analizar los mecanismos moleculares que puedan estar interrelacionados para dar lugar tanto a la formación de precipitados intracelulares de calcio como a la progresividad del proceso neurodegenerativo.



## 2. Introducción



## EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR

### LOS AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES

Hasta el momento se han encontrado cinco aminoácidos con función neurotransmisora en el sistema nervioso central (SNC). De ellos, el glutamato (Glu) y el Aspartato (Asp) tienen una función excitadora, mientras que el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), la glicina (Gly) y la taurina (Tau) actúan como transmisores inhibidores. Las características que diferencian a los aminoácidos del resto de los neurotransmisores del SNC son su ubicuidad y su relevancia en multitud de procesos bioquímicos y metabólicos (Bradford 1988), así como su alto contenido en el tejido cerebral.

Los aminoácidos excitadores (EAA) están a cargo de la mayor parte de la actividad sináptica excitadora en el SNC, se estima que son secretados en un 40% de todas las sinapsis (Fonnum 1984) y son especialmente abundantes en la corteza cerebral y el hipocampo. En esta última estructura tanto la vía aferente, procedente de la corteza entorrinal, como la eferente utilizan el Glu como neurotransmisor. Debido a esa presencia generalizada en el SNC las sinapsis glutamatérgicas, que son las que aquí nos ocupan, están implicadas en procesos tan diversos como la epilepsia, el daño cerebral isquémico, el aprendizaje y la memoria o el desarrollo normal de las conexiones en el cerebro (Dingledine *et al.* 1994). Por eso no es extraño el interés que viene suscitando en los últimos años el papel del Glu en los múltiples procesos químicos y fisiológicos del SNC donde interviene.

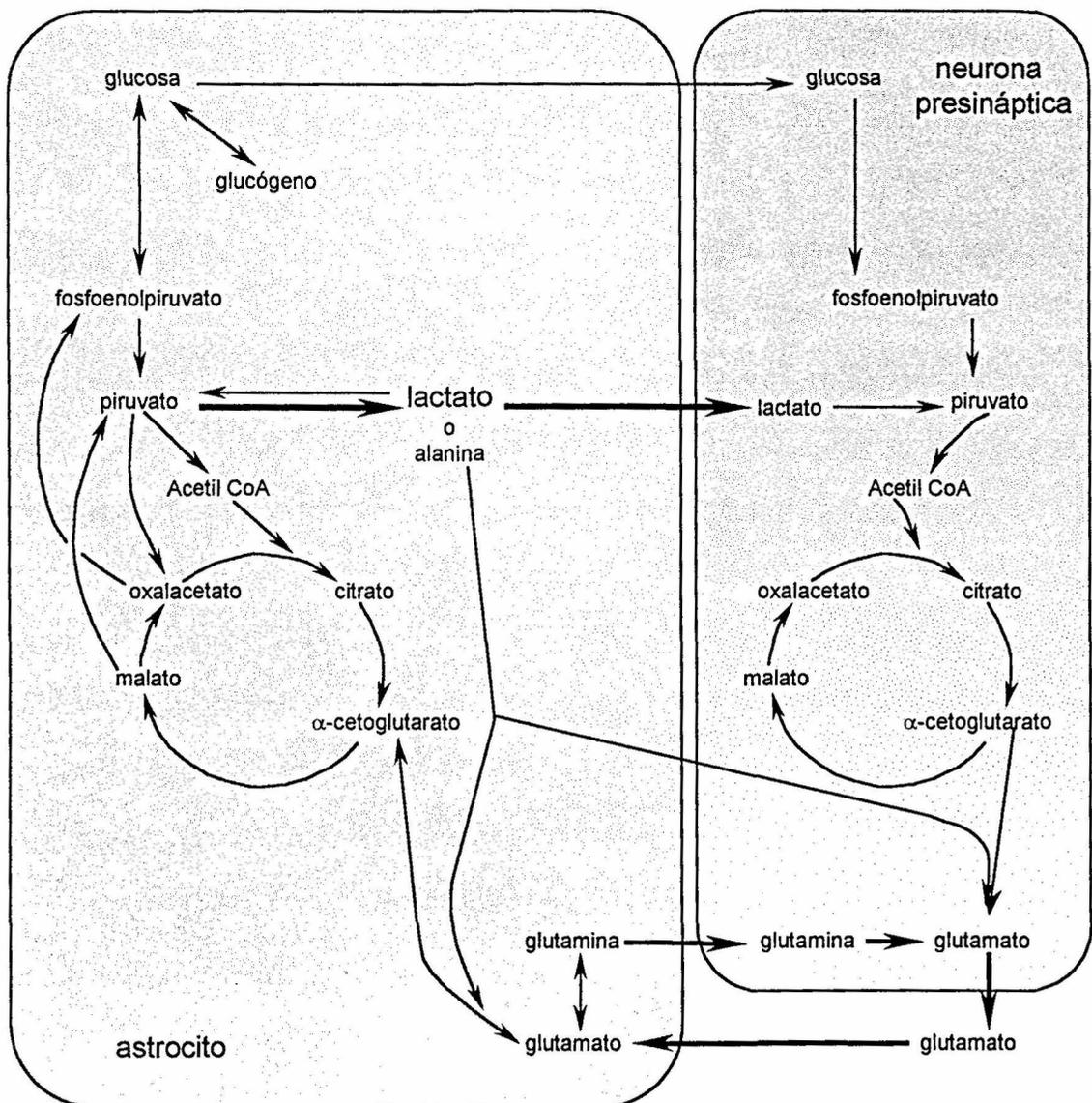
### LA SINAPSI GLUTAMATÉRGICA

#### La síntesis del glutamato

El Glu es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica y que, por ende, no es suministrado al cerebro por la circulación sanguínea y ha de ser sintetizado en las células nerviosas (Hawkins *et al.* 1995). El glutamato neuronal tiene orígenes múltiples. Puede ser sintetizado, por ejemplo, por transaminación a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato proveniente del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos. Este cetoácido puede participar en la producción de Glu a través de varias reacciones ya que es sustrato de diferentes enzimas (figura 2.1). Dado que el  $\alpha$ -cetoglutarato cerebral es originado principalmente en el ciclo de Krebs se podría concluir que es la glucosa el principal donador del esqueleto carboxílico para la síntesis del Glu.

Sin embargo, el glutamato neuronal tiene otros orígenes como la glutamina (Gln) (figura 2.1), la cual se convierte fácilmente en Glu por acción de la glutaminasa (EC 3.5.1.2), un enzima mitocondrial. La Gln es sintetizada principalmente en las células gliales por medio de la glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) la cual utiliza Glu como sustrato. Este Glu puede provenir tanto de la recaptación desde el espacio sináptico como del catabolismo de la glucosa.



Así pues, la síntesis de glutamato depende en gran medida de las interacciones entre la neurona y el astrocito (Dingledine *et al.* 1994) por dos motivos. En primer lugar porque algunas enzimas clave en la producción del neurotransmisor -la piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) y el enzima málico citosólico (EC 1.1.1.37)- están localizados mayoritariamente en la célula astrocitaria. Parece ser que las neuronas son incapaces de asegurar la producción de glutamato sináptico sin captar continuamente  $\alpha$ -cetoglutarato y malato de los astrocitos (Hertz *et al.* 1999, Pfrieger *et al.* 1996). Y en segundo lugar porque, en su proceso sináptico, existe un reciclaje del glutamato (figura 2.1). Así, el Glu es secretado a la fenedura sináptica y posteriormente recaptado y transformado en glutamina por el astrocito. Esta Gln ahora es reciclada al terminal presináptico donde participará en el restablecimiento del acervo del neurotransmisor.

En resumen, las moléculas precursoras del glutamato neuronal son principalmente la glucosa y la Gln, aunque hay otras (Hertz *et al.* 1999). Sin embargo es todavía muy complicado aventurar la contribución relativa de cada una

---

←

Figura 2.1: Interacciones metabólicas entre astrocitos y neuronas en la síntesis del glutamato sináptico. La figura incluye la compartimentalización de la síntesis *de novo* del glutamato, su eliminación a través del metabolismo oxidativo y su vuelta a la neurona a través del “ciclo glutamato-glutamina”. Astrocitos y neuronas obtienen energía degradando la glucosa hasta CO<sub>2</sub> y agua mediante la glucólisis hasta piruvato y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT). Para simplificar el esquema, no aparecen todos los intermediarios. Bajo ciertas condiciones puede haber un intercambio de piruvato o algún metabolito suyo desde los astrocitos hasta la neurona. Además, dado que el  $\alpha$ -cetoglutarato se utiliza como precursor del glutamato y que en la oxidación de la glucosa no hay una producción neta de intermediarios del CAT, debe haber un restablecimiento de los intermediarios del ciclo. Por ello, los astrocitos son capaces de crear oxalacetato a través de la actividad piruvato carboxilasa. El oxalacetato generado y a través del CAT se transformará en  $\alpha$ -cetoglutarato quien, mediante la acción de las transaminasas, puede reaccionar con alanina proveniente de piruvato para generar el glutamato. Las neuronas carecen de piruvato carboxilasa por lo que los astrocitos han de suplir la carencia de intermediarios del CAT en las neuronas y parece que puede haber una transferencia de  $\alpha$ -cetoglutarato (no se muestra). Además no está claro si la transaminación final ocurre en neuronas o en astrocitos. Si como parece fuera en los astrocitos, el glutamato sería aminado por acción de la glutamina sintetasa hasta glutamina, la cual se liberaría al espacio extracelular pudiendo ser captada y degradada hasta glutamato por la neurona. Dado que la producción de glutamato es alta, hacen falta mecanismos eficientes de eliminación y de nuevo el  $\alpha$ -cetoglutarato astrocitario contribuye a ello. Su producción mediante transaminaciones constituye la activación del CAT, la producción de oxalacetato, la activación de las rutas anapleróticas y la producción de piruvato y fosfoenolpiruvato. Estas moléculas pueden ser oxidadas para rendir energía o, en el caso del fosfoenolpiruvato constituirse en sustrato gluconeogénico para la síntesis de glucosa y glucógeno. Adaptado de Hertz *et al.* (1999).

de ellas e incluso, en el caso de la glucosa, la vía a través de la cual hace su aporte al acervo del Glu sináptico.

### **Liberación al espacio sináptico**

El glutamato sintetizado en el terminal sináptico es acumulado de forma activa en las vesículas sinápticas mediante un sistema dependiente de magnesio y adenosina trifosfato (ATP). Se ha visto que este mecanismo de captación es inhibido por sustancias que destruyen el gradiente electroquímico (Dingledine *et al.* 1994) La concentración de Glu en esas vesículas alcanza valores superiores a 20 mM, siendo la captación altamente selectiva e insensible a moléculas estructuralmente similares como el Asp (Naito *et al.* 1983).

La liberación del glutamato al espacio sináptico sigue los patrones generales de todos los neurotransmisores puesto que es dependiente de una despolarización de la membrana presináptica. El mecanismo más aceptado por el cual se produce esa liberación es la exocitosis activada por una entrada a la célula de iones  $Ca^{2+}$  (Fonnum 1984). Sin embargo, se ha sugerido otro mecanismo por el cual el Glu sería liberado al espacio sináptico. Según esa propuesta el Glu saldría de la neurona presináptica por inversión de los procesos de captación de éste aminoácido. Esta inversión sería debida a una despolarización crónica de las terminaciones nerviosas o de las células gliales, reflejando una alteración de los gradientes iónicos de la membrana citoplasmática (McMahon *et al.* 1989, Szatkowski *et al.* 1990) o quizá un déficit energético. Este mecanismo, poco verosímil en condiciones fisiológicas, podría contribuir a la liberación del glutamato hasta niveles tóxicos en ciertas condiciones fisiopatológicas como las que se presentan en los casos de hipoxia e isquemia (Takahashi *et al.* 1997).

### **Los receptores del glutamato**

El glutamato en la fenedura sináptica ejerce su función por interacción con diferentes tipos de receptores los cuales han sido tradicionalmente clasificados en ionotrópicos y metabotrópicos; los primeros por ser canales iónicos y los segundos por estar acoplados a una proteína G. Los espectaculares avances en técnicas de biología molecular de las dos últimas décadas han permitido el clonaje e identificación de numerosas subunidades que pueden formar parte de dichos

receptores. Actualmente se conocen 28 genes que codifican para proteínas receptoras de Glu (Hollmann *et al.* 1994). A este amplio abanico hay que añadir las diferentes variantes de empalme (*splicing*) y edición postranscripcional que pueden sufrir los productos de expresión de estos genes lo que origina una enorme complejidad tanto estructural como funcional en los receptores del glutamato.

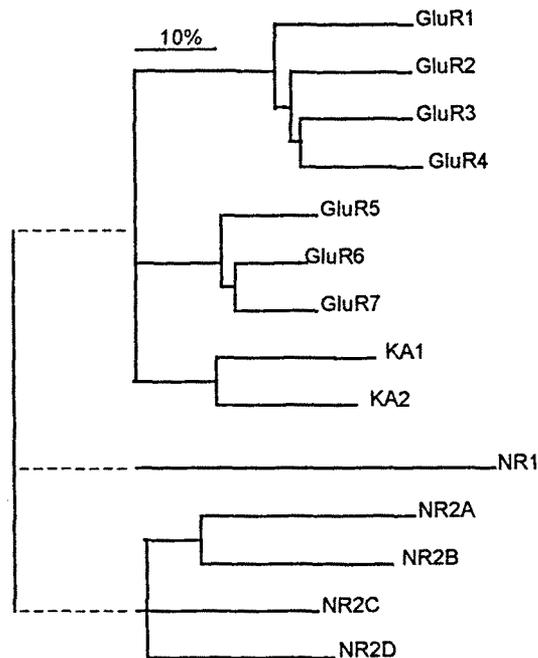
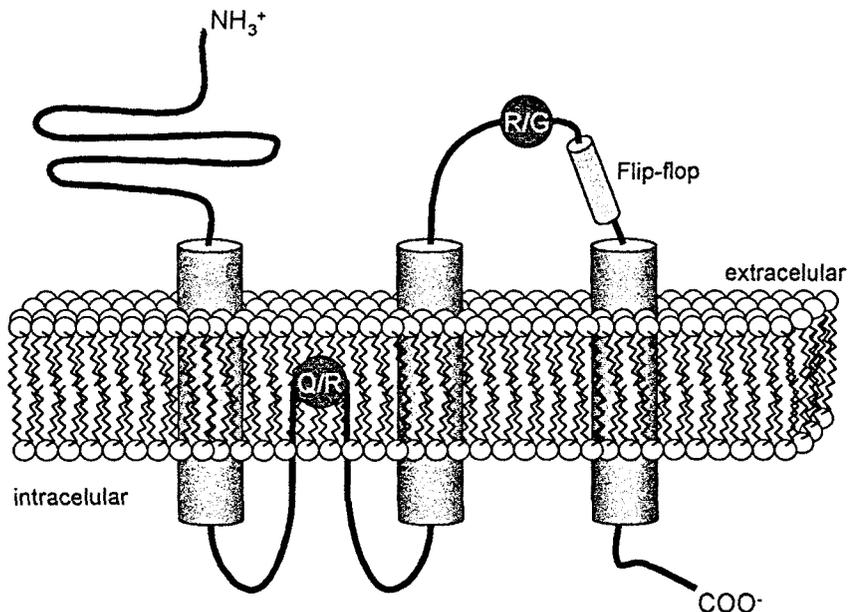


Figura 2.2: Dendrograma de las principales familias de receptores ionotrópicos de glutamato clonados. Cada subunidad está codificada por un gen diferente y una familia está compuesta por subunidades altamente homologas. El valor 100% menos la suma de las longitudes de las líneas horizontales continuas indica el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos. (Modificado de Ozawa *et al.* 1998).

Los receptores ionotrópicos, por más estudiados, son los mejor conocidos. Se han clasificado bajo criterios farmacológicos y electrofisiológicos en tres grupos: receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA), receptores kainato y receptores N.-metil-D-aspartato (NMDA). La activación de éstos receptores implica la apertura de canales selectivos para ciertos iones. Así, los receptores NMDA son permeables al calcio, el sodio y el potasio, mientras que los AMPA y los kainato lo son principalmente al sodio y al potasio (Conti *et al.* 1999). Los mencionados estudios de biología molecular han permitido identificar diferentes subunidades proteicas (figura 2.2) que al asociarse, tanto de

**Cuadro 1.1: Aspectos moleculares de los receptores AMPA**

Fueron previamente denominados receptores quisquálico, cayendo este nombre en desuso al descubrirse que esa molécula también activaba a un grupo de receptores metabotrópicos. Los receptores AMPA presentan relativamente poca afinidad por el glutamato ( $EC_{50} = 3 - 30 \text{ mM}$ ) y se abren de forma rápida pero breve siendo selectivamente permeables al  $\text{Na}^+$ . Cada receptor AMPA es un polímero de cuatro o cinco subunidades constituido por combinaciones de cuatro proteínas diferentes y homólogas denominadas GluR1 a GluR4. Cada proteína tiene dos variantes diferentes, la “flip” y la “flop”, que se originan por empalme (*splicing*) alternativo. Existen pues, ocho sobunidades diferentes todas ellas con topología similar (figura). Tomando como base la secuencia de aminoácidos se ha estimado la masa molecular de cada subunidad en 100 kDa, pero además, el extremo amino terminal es susceptible de ser glicosilado por lo que se ha de añadir una masa de 10 kDa.



Esta variabilidad estructural proporciona al receptor AMPA un amplio abanico de posibilidades funcionales. Cada subunidad comporta una afinidad diferente del canal por el ligando. Por ejemplo, el receptor homomérico GluR2 se desactiva y desensibiliza mucho más lentamente que el GluR1 o el GluR4, esto implica que las propiedades de los receptores heteroméricos deben ser deducidas a partir de sus componentes.

La especificidad del canal también está condicionada por sus subunidades. Se sabe que la baja permeabilidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  típica del receptor AMPA viene dada por la sustitución postranscripcional de una glutamina por una arginina en GluR2 (el lugar Q/R de la figura). Dado que casi todas las subunidades GluR2 del cerebro adulto están editadas en este punto, los receptores que contengan al menos una subunidad GluR2 en su estructura mostrarán una baja conductividad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , y dado que la mayoría de los receptores AMPA en el SNC contienen esta subunidad, la casi totalidad de los receptores AMPA son impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Una excepción importante a esta regla son los receptores homoméricos GluR1, éstos son particularmente permeables al ion calcio y se encuentran en una subpoblación de interneuronas que producen GABA, concretamente en aquellas que expresan parvabúmina, una proteína fijadora de calcio. GluR1 también constituye una excepción a la norma en cuanto a la activación del canal. Excepto para esta subunidad, las formas “flop” se desactivan más fácilmente que las “flip”. Además, GluR2, GluR3 y GluR4 pueden sufrir una modificación postranscripcional de una arginina por una glicina en un lugar adyacente al “flip - flop” (el lugar R/G en la figura); esta modificación lleva a una más rápida resensibilización del receptor.

forma homo como heteromérica, configurarían estos receptores (Michaelis *et al.* 1998, Ozawa *et al.* 1998). Es de remarcar el hecho de que los agrupamientos estructurales de dichas subunidades concuerdan con los agrupamientos funcionales.

Hay clonados cuatro genes que codifican para sendas proteínas constituyentes de los receptores AMPA (GluR1 a GluR4). Respecto al receptor kainato, se conocen cinco proteínas más, las GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2. Ambos receptores median la transmisión sináptica excitadora rápida y son difíciles de segregar funcionalmente puesto que comparten numerosas características. Sin embargo es posible establecer cierta distinción farmacológica (además de la molecular) pues el ácido domoico y el kainato son agonistas del receptor kainato mientras que el AMPA y el ácido quisquálico lo son principalmente del receptor AMPA (Ozawa *et al.* 1998).

Hasta hoy se han clonado cinco genes que codifican para proteínas que son subunidades del receptor NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) y parece ser que la presencia de la subunidad NR1 en el canal es esencial para que el receptor sea funcional. Los receptores NMDA exhiben una mayor afinidad por el glutamato que los receptores AMPA, tardan más en abrirse y lo están por mas tiempo (Conti *et al.* 1999). Además presentan una mayor complejidad funcional, en primer lugar el canal está normalmente bloqueado por  $Mg^{2+}$  en condiciones de potencial de membrana en reposo y solamente muestra su permeabilidad al calcio cuando la membrana está previamente despolarizada. Por ello y debido a que, para ser funcional, podría necesitar de una actividad sináptica del receptor AMPA en las proximidades, se ha propuesto que el receptor NMDA pueda actuar como un canal suplementario en el procesamiento neuronal (Hollmann *et al.* 1994, Conti *et al.* 1999). Finalmente el receptor de NMDA presenta múltiples lugares de unión alostérica. Normalmente necesita concentraciones micromolares de glicina para funcionar plenamente, aunque ésta puede ser substituida por otros efectores como la D-serina. Este lugar de unión a la Gly del receptor NMDA es diferente al receptor de glicina originariamente descrito en la médula espinal pues es insensible a la acción de la estriquina (Johnson *et al.* 1987) También existe un lugar de unión para poliaminas, y los protones, el  $Zn^{2+}$  y algunos péptidos opioides tienen una función moduladora de la actividad del receptor (Conti *et al.* 1999, Ozawa *et al.* 1998).

No fue hasta 1985 que, al demostrarse que el glutamato y sus análogos eran capaces de provocar la hidrólisis de los fosfoinosítidos en cultivos de neuronas estriatales, se descubrió la existencia de los receptores metabotrópicos del Glu (Sladeczek *et al.* 1985). Hoy se han identificado ocho genes que codifican para esta función y se agrupan en tres categorías (figura 2.3). El grupo I comprende a los receptores mGluR1 y mGluR5 y, al unirse al Glu, moviliza una proteína  $G_s$  que activa a la fosfolipasa C, la cual es capaz de producir inositol-1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol como segundos mensajeros (Ozawa *et al.* 1998). El grupo II, por su parte, está constituido por los receptores mGluR2 y mGluR3 y su activación provocaría la movilización de una proteína G inhibidora de la actividad adenilato ciclasa y una minoración de los niveles celulares de adenosina monofosfato cíclico. Esta misma función es ejercida por el tercer grupo de receptores metabotrópicos constituido por mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Sin embargo el grupo III es insensible al 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato, un agonista de los receptores tipo I y II; teniendo, por el contrario, al L-2-amino-4-fosfonobutirato como agonista específico (Michaelis *et al.* 1998, Ozawa *et al.* 1998).

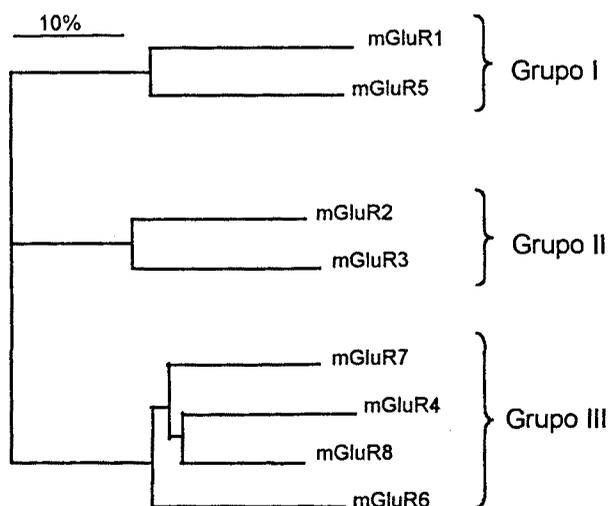


Figura 2.3: Dendrograma de la familia de receptores metabotrópicos de glutamato clonados. Cada subunidad está codificada por un gen diferente. El valor 100% menos la suma de las longitudes de las líneas horizontales indica el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos. (Modificado de Ozawa *et al.* 1998).

### Aspectos funcionales de los receptores de glutamato

En la mayor parte de las sinapsis glutamatérgicas se pueden encontrar receptores AMPA y NMDA, los cuales son activados a la vez. Por ello encontramos dos componentes de la corriente excitadora postsináptica (EPSC): uno rápido, mediado por el receptor AMPA y el segundo, que ocurre más lentamente y se extiende por más tiempo, mediado por el receptor NMDA (Ozawa *et al.* 1998). Estas dos corrientes vienen condicionadas por las diferentes características funcionales de ambos canales.

Pero además de esta respuesta eléctrica, la transmisión mediada por Glu tiene otras muchas implicaciones en la función de la célula postsináptica, la mayoría de ellas provocada por la elevación de la concentración intracelular del ion calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Este aumento viene mediado tanto por la activación directa de los receptores NMDA como por la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC) o por la producción de  $IP_3$  mediada por los mGluR I. En cualquier caso, el incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  puede llevar a la activación de una gran variedad de enzimas dependientes de  $Ca^{2+}$  como la proteína quinasa C, la fosfolipasa  $A_2$ , la proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina, la óxido nítrico sintasa y algunas endonucleasas (Dingledine *et al.* 1994). Finalmente, también puede provocar el inicio de la transcripción de genes de respuesta inmediata.

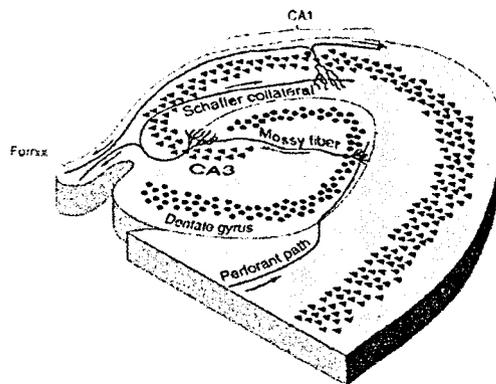
De esta forma, el Glu se ve implicado en numerosos procesos de plasticidad neuronal. Así, se ha descrito un papel de la sinapsis glutamatérgica en el crecimiento y diferenciación de algunas neuronas y en la modulación del crecimiento de las dendritas durante la ontogénesis (Holmes *et al.* 1998, McDonald *et al.* 1990). El más estudiado de estos mecanismos de plasticidad es la potenciación a largo plazo (LTP), la cual es una manera de mantener la activación sináptica durante varias semanas y que ha sido relacionada con algunas formas de aprendizaje y memoria. Se sabe que en las sinapsis entre el Cuerno de Ammón 1 (CA1) y el 3 (CA3) del hipocampo, la LTP tiene un requerimiento absoluto y exclusivo de la activación de los receptores NMDA.

Para acabar, cabe mencionar el papel modulador que tienen los mGluR en la actividad glutamatérgica. Esta acción viene mediada no sólo por la actividad postsináptica de los mGluR I descrita en numerosas áreas cerebrales (Nakanishi

1994) sino también por la acción de los mGluR II y III. Estos subtipos de receptores pueden suprimir la transmisión excitadora a través de mecanismos presinápticos (Nakanishi 1994) por lo se les ha denominado autorreceptores. Posiblemente esta actividad reguladora venga mediada por la inhibición de los VOCC presinápticos, cuya apertura conduce a la liberación del Glu almacenado en las vesículas.

### Cuadro 1.2: Anatomía del hipocampo

El hipocampo consiste en dos finas capas de neuronas encajadas una en la otra (figura), la Circunvolución Dentada y el Cuerno de Ammón (CA). El CA tiene cuatro subdivisiones (CA1 a 4). Uno de los principales núcleos que controlan el hipocampo es la corteza entorrinal, la cual envía información al hipocampo por medio de un haz de axones llamado vía perforante. Esta vía perforante descarga glutamato en la circunvolución dentada cuyas neuronas hacen sinapsis con la CA3 a través de las denominadas fibras musgosas (*mossy fibers*). Del CA3 a su vez, parten axones glutamatérgicos que se ramifican (figura). Una de las ramas sale fuera del hipocampo por el fórnix, yendo entre otros hasta los núcleos del septo. La otra rama de las fibras que parten del CA3 es conocida como las fibras colaterales de *Schaffer* y hacen sinapsis con las neuronas del CA1.



El hipocampo es una de las principales estructuras para estudiar la transmisión sináptica en el cerebro de los mamíferos, debido a su sencilla arquitectura y organización. Hacia el final los años 60 se descubrió que el hipocampo podía ser extraído del cerebro de los animales de experimentación, cortado en rodajas como un chorizo y las secciones resultantes sobrevivir *in vitro* durante algunas horas. Las fibras nerviosas de estos cortes cerebrales pueden ser estimuladas eléctricamente y registrarse su actividad sináptica. Además, como las células de las secciones son fácilmente observables, tanto el electrodo de estimulación como el de registro pueden ser colocados con la precisión que anteriormente sólo permitían las preparaciones de muestras de invertebrados.

### Eliminación del glutamato sináptico

No se ha descrito ningún enzima en el espacio extracelular que degrade o neutralice el Glu liberado durante la despolarización de la membrana presináptica.

El único sistema de eliminación activa de este neurotransmisor viene mediado por la actuación de las neuronas y las células gliales. La eliminación del glutamato se lleva a cabo mediante dos procesos diferentes, uno de baja y otro de alta afinidad (Logan *et al.* 1972, Stallcup *et al.* 1979). El primero, mal caracterizado todavía, se encargaría de eliminar el Glu a altas concentraciones, mientras que el segundo sería el encargado de mantener la concentración del Glu extracelular a niveles próximos a 1  $\mu\text{M}$  (Danbolt 1994). Este sistema de alta afinidad es dependiente de  $\text{Na}^+$  y no es específico del glutamato pues también puede transportar aspartato.

En humanos y hasta el momento se han descrito cinco diferentes proteínas transportadoras de EAA (EAAT1 a EAAT5) (Arriza *et al.* 1997, Gegelashvili *et al.* 1997); mientras que en la rata se han encontrado solamente dos de ellas denominadas GLT1 (homóloga a la EAAT2 humana) y GLAST (equivalente a la EAAT1 humana) (Pines *et al.* 1992, Storck *et al.* 1992). Atendiendo a su localización celular, GLAST y GLT1 se pueden encontrar en los astrocitos mientras que EAAT3 y EAAT4 lo hacen la membrana de las neuronas postsinápticas (Gegelashvili *et al.* 1998). No se ha encontrado ninguno de estos transportadores en la neurona presináptica, sin embargo el hecho de que exista una recaptación del Glu en estas células sugiere la existencia de otros EAAT aun por descubrir. En cuanto a su distribución, la mayor parte del transporte del Glu se ha atribuido a los astrocitos (Gegelashvili *et al.* 1998).

Estos transportadores se encuentran en todas las estructuras cerebrales, aunque no de forma homogénea, así el GLT1 es la forma más abundante en el hipocampo, la corteza cerebral y el núcleo estriado mientras que el GLAST lo es en el cerebelo (Lehre *et al.* 1995, Torp *et al.* 1994). Por lo que respecta a la estequiometría del transporte está todavía por confirmar pero parece ser que por cada molécula de Glu que entra en la célula se cotransportan tres iones  $\text{Na}^+$  (o dos iones  $\text{Na}^+$  y un protón), mientras que es expulsado un ion  $\text{K}^+$  (Gegelashvili *et al.* 1998).

Por otro lado, en el hipocampo y la corteza cerebelar, a pesar del eficaz sistema de eliminación arriba descrito, el Glu secretado puede difundir fuera de la fenedura sináptica (Bergles *et al.* 1999). Se cree que esta fuga de neurotransmisor puede llegar a constituir un mecanismo de activación de receptores localizados lejos de la sinapsis. Parece ser que los receptores más susceptibles de este tipo de

activación serían los metabotrópicos (Scanziani *et al.* 1997), pero también los receptores AMPA de la glia (Bergles *et al.* 1997a). Además esta difusión podría ser suficiente para provocar la activación de los receptores de glutamato en los botones sinápticos cercanos. La extensión de este fenómeno dependería del volumen de la fuga, de la distancia de las sinapsis vecinas y de la localización y abundancia de los EAAT.

## LA GLIA EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICA

Al haberse explicado anteriormente, en este apartado no abundaremos en la dependencia neuronal del aporte astrocitario de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la producción del glutamato sináptico. Nos centraremos en dos puntos: en primer lugar, en el aporte energético de la glia a la sinapsis glutamatérgica y después, en la función moduladora de la actividad sináptica que se ha sugerido pueden tener los astrocitos al ser estimulados por el Glu.

### Aspectos energéticos

El desarrollo de técnicas como la tomografía de emisión de positrones y la formación de imágenes por resonancia magnética funcional ha posibilitado establecer relaciones entre los procesos neuroquímicos y las funciones cerebrales a través del estudio *in vivo* de la actividad metabólica del cerebro humano. De esta forma, y junto con otros datos obtenidos *in vitro*, se ha podido identificar el acoplamiento estequiométrico de la actividad glutamatérgica neuronal dependiente de energía y el metabolismo energético (Magistretti *et al.* 1999).

Como ya se ha mencionado en las secciones previas, el glutamato es eliminado del espacio sináptico por los astrocitos a través de un sistema de recaptación específica que usa el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  como fuerza motriz, resultando en un ajuste entre la captación de Glu y la de  $\text{Na}^+$  *et al.* Bergles1997b). El astrocito, ahora, tiene dos tareas: por un lado ha de restablecer el gradiente de  $\text{Na}^+$  y por el otro ha de reciclar el glutamato. El gradiente se mantiene mediante la activación de la bomba de sodio y potasio que hidroliza ATP y el glutamato es convertido a Gln por medio de una reacción catalizada por la glutamina sintetasa, como una forma de reciclaje del neurotransmisor. En el astrocito tanto la síntesis de glutamina como la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  requieren

energía y no se ha descrito ningún mecanismo de intercambio de ATP entre astrocitos y neuronas, así cada célula ha de abastecerse de su propia energía.

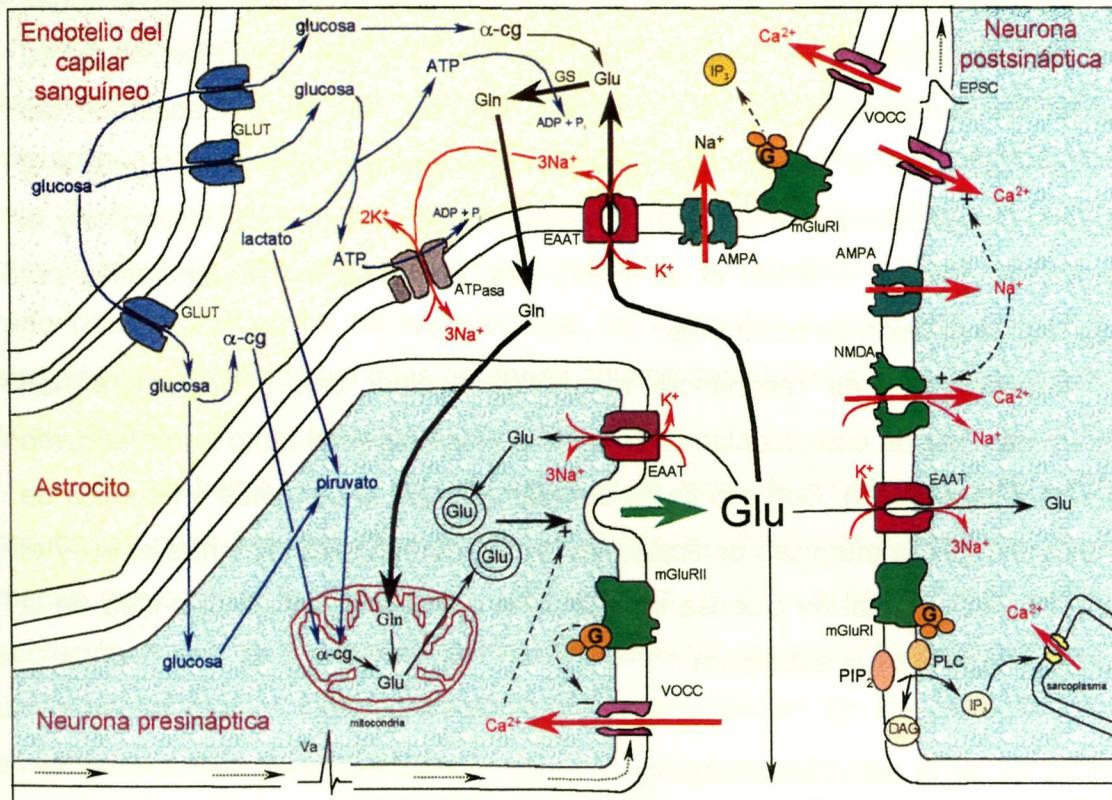


Figura 2.4: Esquema general de la sinapsis glutamatergica. La llegada de un potencial de acción a la neurona presináptica provoca la apertura de los VOCC y la liberación de glutamato al espacio sináptico, este Glu interacciona con los receptores de la neurona postsináptica y de los astrocitos activando la producción de segundos mensajeros y provocando un potencial de membrana postsináptico. Los astrocitos son los principales mediadores de la eliminación del Glu de la fenedura sináptica, proceso dependiente de energía, como lo es el reciclaje mediante la producción de glutamina. El esquema incluye la esterquiometría de estos dos procesos y las interacciones neurona-glia en el metabolismo energético.  $\alpha$ -cg,  $\alpha$ -cetoglutarato; ADP, adenosina difosfato; EPSC corriente excitadora postsináptica; GS, glutamina sintetasa;  $\text{PIP}_2$ ; fosfatidil-inositol bisfosfato; PLC fosfolipasa C, Va, potencial de acción.

Los astrocitos emiten prolongaciones que literalmente tapizan los capilares sanguíneos, siendo estas prolongaciones muy ricas en transportadores de glucosa (GLUT). La conexión funcional que acopla la captación de glucosa cerebral con la actividad sináptica glutamatergica reside en la estrecha relación citológica entre el sistema sanguíneo y la célula glial (Magistretti *et al.* 1999). Este acoplamiento se ha descrito en cultivos puros de astrocitos (Pellerin *et al.* 1994, Takahashi *et al.* 1995). En estas células, la activación del transportador de Glu estimula la captación de glucosa astrocitaria, la cual ingresa en la glucólisis rindiendo lactato, quien a su vez

es liberado como sustrato energético de la neurona. (Larrabee 1995, Larrabee 1996). Una glucosa oxidada hasta lactato produce dos moléculas de ATP. Una de ellas es utilizada por la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para la expulsión de tres iones de sodio, el otro ATP se usará para la síntesis de Gln a partir de glutamato. El lactato por su parte puede ser oxidado por el astrocito o liberado para su oxidación en las neuronas (Schurr *et al.* 1999). Esta cascada de sucesos moleculares (figura 2.4) constituye un mecanismo de conexión directa entre la sinapsis glutamatérgica y el consumo de glucosa (Pellerin *et al.* 1994), una de las señales detectables por tomografía de emisión de positrones.

Experimentos de resonancia magnética nuclear con  $^{13}\text{C}$ -glucosa han aportado pruebas de este acoplamiento en la corteza cerebral tanto humana como de la rata (Sibson 1998). Con ello se ha demostrado que la demanda energética de las neuronas glutamatérgicas corticales es brutal, comprendiendo entre el 80 y el 90% del consumo total de glucosa en esa área cerebral y nos da una idea de la actividad sináptica de la estructura.

### **Modulación de la actividad sináptica**

Aunque es aun especulativa, existe la idea de que la glia podría modular la eficacia sináptica (Smith 1992, Attwell 1994). En principio parece que no hay necesidad de tal modulación pero se han encontrado evidencias de que la actividad neuronal puede provocar un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células gliales (Deitmer *et al.* 1998, Pasti *et al.* 1997, Steinhäuser *et al.* 1996) y, por ende, provocar una respuesta. Si nos centramos en la sinapsis glutamatérgica, los astrocitos tienen en sus membranas receptores AMPA y mGluR I. Ambos receptores son capaces aumentar indirectamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en estas células (figura 2.4), el primero por activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC) y el segundo por la producción de  $\text{IP}_3$ , molécula que activa un canal de calcio en la membrana del retículo endoplasmático. El  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma del astrocito puede ahora actuar como segundo mensajero llegando incluso a iniciar la transcripción de los genes de respuesta inmediata (Steinhäuser *et al.* 1996). Así, la liberación de Glu al espacio sináptico puede provocar una respuesta en las células gliales.

¿Pero cómo puede la glia devolver la información a las neuronas? Se ha sugerido que los astrocitos liberen sustancias neuromoduladoras. Por ejemplo, los

astrocitos que envuelven la sinapsis contienen el enzima que sintetiza ácido quinolínico, un potente agonista del receptor NMDA *et al.* Roberts1995). Además en el citoplasma de los astrocitos se ha encontrado una gran cantidad de D-serina, un agonista alostérico del mismo receptor (Schell *et al.* 1995). Substancia que es secretada por estas células en cultivo al ser estimuladas con Glu, ocurriendo lo mismo con la Gly (Barres 1991). Estos estudios apuntan hacia la posibilidad de que, durante la transmisión glutamatérgica, las células gliales proporcionen factores que faciliten la activación del receptor NMDA postsináptico. Para acabar de redondear la historia se ha sugerido que los astrocitos pueden ser inducidos a secretar Glu, excitando así a las neuronas adyacentes (Jeftinija *et al.* 1996, Parpura *et al.* 1994).

Sin embargo se ha de ser cauto a la hora de interpretar todos estos resultados pues los astrocitos en cultivo llegan a almacenar cantidades de Glu mucho mayores de las fisiológicas. De hecho, no hay ninguna evidencia sobre la secreción *in vivo* de Glu o cualquier neuromodulador por parte de los astrocitos. El único hecho que sí está contrastado es la sensibilidad de los astrocitos a la actividad sináptica glutamatérgica.

## LA EXCITOTOXICIDAD DEL GLUTAMATO

Que el glutamato puede ejercer un efecto tóxico en el SNC es un hecho que se conoce desde la década de los 50, cuando Lucas *et al.*(1957) mostraron que esta molécula puede dañar las neuronas de la retina. Pero fue Olney quien acuñó el término de excitotoxicidad para definir el proceso neuropatológico desencadenado por la sobreestimulación de los receptores del Glu debida a altas concentraciones de EAA o agonistas suyos. (Olney *et al.* 1971). Este tipo de excitotoxicidad exógena ha sido claramente demostrada *in vitro* e *in vivo*, incluyendo en personas que han consumido setas contaminadas con ácido domoico, un análogo del kainato. Posteriormente se descubrió que el bloqueo de los receptores del Glu puede tener efectos beneficiosos en modelos de desórdenes neurológicos como la epilepsia o la isquemia (Meldrum *et al.* 1994, Bradford 1995). Por ello se redefinió el concepto de excitotoxicidad, que pasó a incluir a la neurotoxicidad endógena mediada por glutamato. Es decir, la potencial excitotoxicidad del Glu al acumularse en el espacio extracelular (Obrenovitch *et al.*

2000). Esta nueva noción se ha constituido en un foco de gran interés ya que posibilita el planteamiento de nuevas estrategias en neuroprotección farmacológica.

El proceso excitotóxico en las neuronas surge de la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a través de los receptores ionotrópicos (Choi 1988), posiblemente suplementada por la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático, fruto de la excitación de los receptores metabotrópicos. Todo ello lleva a un excesivo incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Choi 1988), el cual es potencialmente tóxico ya que puede sobreestimar a los enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o de calcio-calmodulina como fosfatasas, proteasas, y endonucleasas (revisado por Mattson *et al.* 1996 y Obrenovitch *et al.* 1997) Atendiendo a la cantidad y complejidad de mecanismos que constituyen la transmisión glutamatérgica, cualquier anomalía tanto presináptica, como postsináptica, o glial (o incluso combinaciones entre cualquiera de ellas) podría precipitar la excitotoxicidad (Obrenovitch *et al.* 2000). Sin embargo, la alta concentración extracelular de glutamato (figura 2.5) es la causa mayoritariamente aceptada, y el mayor debate se centra en si la excitotoxicidad es una causa o una consecuencia de los desórdenes neurológicos.

### **Mecanismos de toxicidad del calcio**

Los mecanismos por los que el incremento incontrolado de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lleva a la muerte neuronal están representados en la figura 2.5 y se resumen brevemente a continuación.

☞ *Formación de radicales libres.* Los radicales libres son moléculas, átomos o grupos de átomos con un electrón desemparejado en su orbital más externo, lo que les confiere una alta reactividad. Son producidos en pequeñas cantidades durante los procesos del metabolismo normal de la célula, como el transporte electrónico mitocondrial y pueden desempeñar funciones fisiológicas como la regulación de la excitabilidad neuronal (Yermolaieva *et al.* 2000) o la modulación de algún receptor de membrana, entre ellos el de NMDA (Aizenman *et al.* 1990).

Una fuente de radicales libres es la cascada del metabolismo de los fosfolípidos controlada por el ácido araquidónico. Esta molécula es un segundo mensajero que puede ser producido a partir de la fosfolipasa  $A_2$  dependiente de

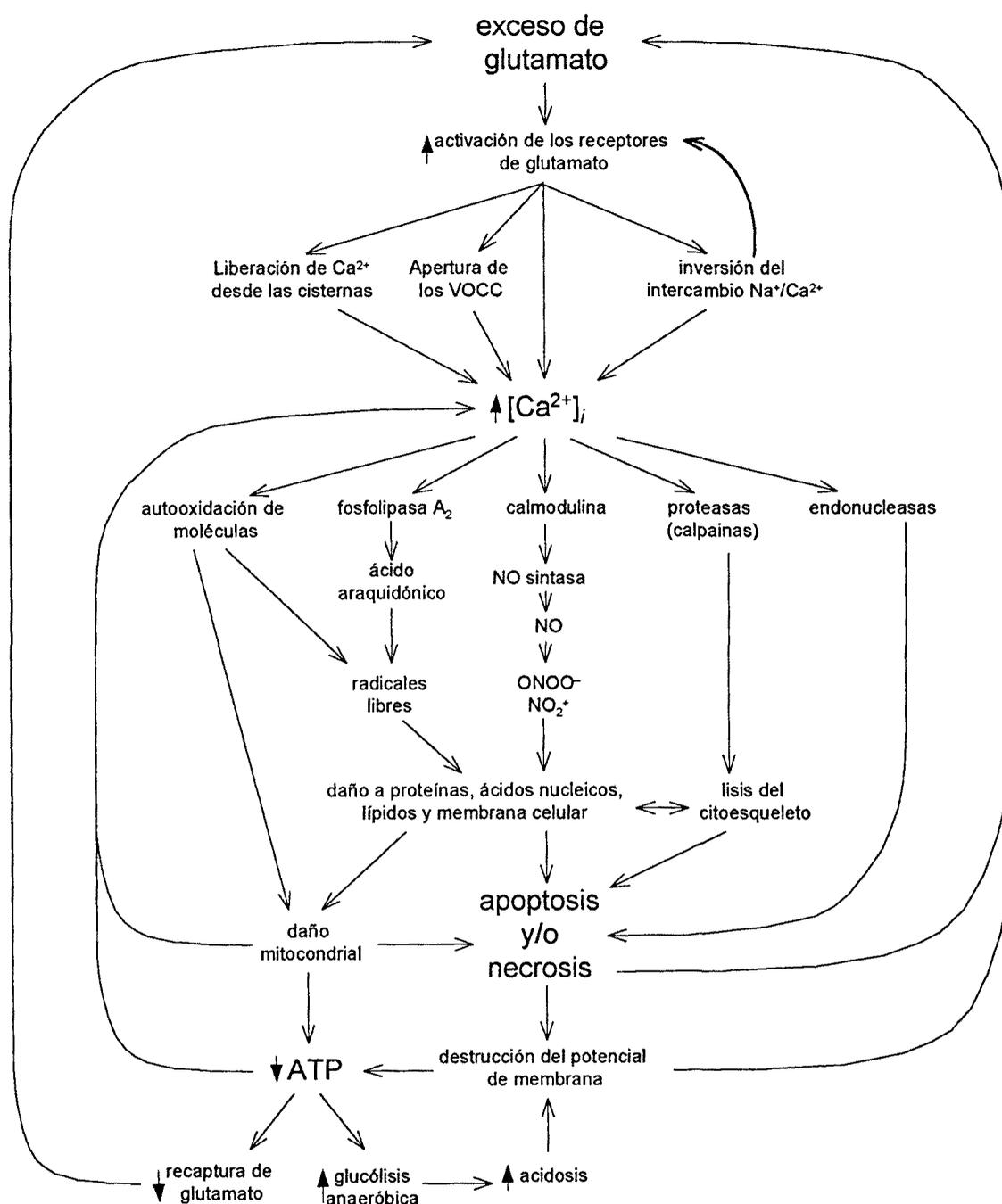


Figura 2.5: Diagrama de las alteraciones estructurales y bioquímicas inducidas en la célula al sufrir una lesión excitotóxica. El incremento incontrolado de la  $[Ca^{2+}]_i$  provoca la muerte neuronal por apoptosis o necrosis, durante el proceso se libera más glutamato que alimenta la lesión (Adaptado de Tymianski *et al* 1996).

calcio. Se sabe que la estimulación del receptor de NMDA activa este enzima provocando la acumulación de ácido araquidónico en las neuronas (Coyle *et al.* 1993, Sanfeliu *et al.* 1990). Pero además, el secuestro masivo de calcio durante el proceso excitotóxico por parte de la mitocondria lleva a este orgánulo a graves

disfunciones (Schinder *et al.* 1996) y a la producción de radicales libres (Reynolds *et al.* 1995). Finalmente, otras lipasas y fosfolipasas son activadas por el calcio y pueden contribuir a la formación de estas especies reactivas. (Coyle *et al.* 1993).

Los radicales libres interaccionan con todo tipo de moléculas como los lípidos de membrana, las proteínas, los ácidos nucleicos o los glucosaminoglicanos, pero los aminoácidos que contienen grupos sulfuro y los ácidos grasos insaturados son especialmente vulnerables a su acción (Coyle *et al.* 1993).

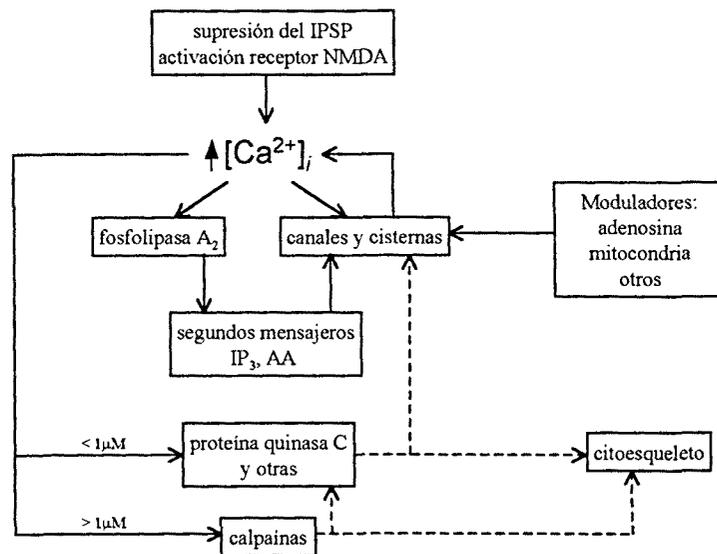
☞ *Formación de óxido nítrico.* En las neuronas, se ha relacionado al NO con la modulación de una gran variedad de funciones relacionadas con la plasticidad sináptica (Yermolaieva *et al.* 2000), incluyendo la función del receptor de NMDA y la LTP (Lei *et al.* 1992). El NO es producido por la óxido nítrico sintasa, cuya actividad está regulada por la calmodulina, proteína dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y activada por el receptor de NMDA (Tymiansky *et al.* 1996). El NO en sí no es tóxico pero, al combinarse con radicales libres, puede llevar a la producción de moléculas que sí lo son. Así, el radical superóxido en combinación con el NO produce peroxinitrilo una especie muy reactiva que oxida grupos sulfidrilos, lípidos, ADN y proteínas. Pese a todo y dependiendo de la influencia de agentes moduladores (Lipton 1993), el NO también puede ser neuroprotector.

☞ *Alteraciones del metabolismo energético.* La excitotoxicidad lleva asociada una pérdida de la capacidad energética de la neurona lo que se constituye tanto en una consecuencia como en un refuerzo de la lesión. Tras la entrada masiva de calcio en el citoplasma de la célula, se activan los mecanismos de tamponamiento y extrusión de este ion (Tymiansky *et al.* 1996, Verkhratsky *et al.* 1998) los cuales implican un gasto de energía colosal, a la vez que la mitocondria pierde su capacidad de generar ATP (Schinder *et al.* 1996). Este empobrecimiento energético hace a la neurona incapaz de mantener el gradiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y, por ende, su potencial de membrana (Greene *et al.* 1996), produciéndose un desbloqueo del receptor de NMDA por liberación del  $\text{Mg}^{2+}$  que lo inhibe constitutivamente, este receptor ahora será capaz de activarse y precipitar la lesión

excitotóxica a concentraciones fisiológicas de glutamato (Greene *et al.* 1996). Si la situación continúa, se produce una alimentación del proceso excitotóxico mediante la entrada masiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua, al interior de la célula y una salida de  $\text{K}^+$  de la misma (Katayama *et al.* 1995).

**Recuadro 1.3: El precio de la memoria.**

Algunas regiones cerebrales con responsabilidades en los procesos de la memoria son especialmente vulnerables al daño cerebral, por lo que los efectos de la LTP se han usado para explorar la idea de que la maquinaria que codifica la memoria pueda ser patogénica. La fisiología de la LTP no está del todo clara pero se sabe que implica la activación del receptor NMDA y el incremento del calcio intracelular en la neurona postsináptica. Dependiendo de la concentración alcanzada, el calcio puede activar una gran variedad de enzimas (figura) lo que puede resultar en una modificación a corto plazo vía quinasas, o irreversible vía calpaínas, de los canales iónicos y las proteínas del citoesqueleto. El incremento de calcio se puede mantener por la activación de segundos mensajeros mediante un proceso de retroalimentación positiva, el cual es modulable por otros factores (figura).



El efecto de las calpaínas sobre el citoesqueleto es drástico e irreversible. Estas proteínas parecen estar implicadas en los procesos de atrofia y degeneración en determinadas condiciones patológicas y además, está provado que su inhibición es protectora frente al daño cerebral. Así, un primer precio de la memoria podría ser la utilización de un mecanismo con efectos cualitativamente patogénicos. Pero por añadidura, está la pregunta de por qué el cerebro no es capaz de reparar el daño que surge en esos procesos patológicos. Quizá la respuesta sea la necesidad que tiene la memoria de mantener las condiciones creadas. Esta dependencia de una estabilidad podría acarrear un coste adicional: la inactivación de los mecanismos químicos celulares que permiten el reemplazamiento de los componentes cerebrales dañados.

☞ *Activación de proteasas y endonucleasas.* La activación de los receptores de EAA y el consecuente incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa a una familia de proteasas dependientes de calcio, las calpaínas (Siman *et al.* 1988, Siman *et al.*

1989). En condiciones normales, estas proteínas participan en el remodelado del citoesqueleto, el anclaje de los receptores a la membrana y la modulación de la división celular durante la mitosis. Sin embargo, la calpaína I está presente en las neuronas y se muestra activa durante la excitotoxicidad (Tymiansky *et al.* 1996), por lo que se le ha otorgado el dudoso honor de ser la mediadora del desorden y lisis del citoesqueleto observados durante la neurodegeneración provocada por los EAA (Siman *et al.* 1988, Siman *et al.* 1989)

☞ *Acidosis.* La excitotoxicidad provoca acidosis, tanto en el tejido como en el interior celular (Hartley *et al.* 1993). Existen numerosos mecanismos que provocan la bajada de pH durante el daño neuronal. En primer lugar, el proceso excitotóxico provoca rápidamente un daño mitocondrial (Schinder *et al.* 1996) que obliga a la célula a un cambio del metabolismo aeróbico al anaeróbico, cuyo resultado es la producción de lactato y la liberación de dos protones por cada dos moléculas de ATP formadas. Pero también aparecen  $H^+$  durante otras muchas reacciones, como por ejemplo en la hidrólisis de fosfolípidos (Tymiansky *et al.* 1996). El influjo de calcio causa una rápida acidificación intracelular (Hartley *et al.* 1993, Werth *et al.* 1994) a través de una serie de mecanismos que incluyen la actividad de las bombas de intercambio iónico (concretamente la de  $Ca^{2+}/2H^+$  en la membrana plasmática y los orgánulos y la del intercambio  $Na^+/H^+$  que restaura el gradiente de sodio), el desplazamiento de los protones unidos a aniones intracelulares por parte del  $Ca^{2+}$  y la liberación mitocondrial de protones durante el tamponamiento del calcio como una consecuencia del antiporte  $Ca^{2+}/2H^+$  (Tymiansky *et al.* 1996).

Los mecanismos por los que la acidosis provoca un daño neuronal son todavía inciertos. Algunas hipótesis apuntan a que un incremento de la concentración intracelular de  $H^+$  provoca una reducción de la conductancia del  $K^+$  y la facilitación de los potenciales de acción (Madshus 1988), pero también puede aumentar la producción de radicales libres o acelerar la degradación del DNA (Tymiansky *et al.* 1996). Como contrapartida, hay indicios de un posible papel neuroprotector de la bajada de pH mediante el bloqueo de los receptores de NMDA y, en consecuencia, la reducción de la entrada de calcio a la célula (Giffard *et al.* 1990, Kaku *et al.* 1993)

### **La precipitación del calcio**

El estudio de la excitotoxicidad en modelos animales ha mostrado que durante el proceso se puede producir la precipitación de cristales de fosfato cálcico en el interior de las neuronas y los astrocitos (Korf *et al.* 1984, Mahy *et al.* 1995, Mahy *et al.* 1999, Muir *et al.* 1994, Nitsch *et al.* 1990, Stewart *et al.* 1995). Estos cristales tienen la estructura de los hidroxapatitos (Herrman *et al.* 1998, Kim 1995), una composición similar a la de otros cristales biológicos (Bloss 1971) y su inicio dentro de la célula se ha descrito situado tanto en el citoplasma (Mahy *et al.* 1999] como en las mitocondrias (Nitsch *et al.* 1992).

En el cerebro de rata, se ha encontrado calcificación mediada por la lesión excitotóxica en la base del cerebro anterior, la sustancia negra, el hipocampo, el globo pálido y la corteza prefrontal (Bernal *et al.* 2000b, Herrmann *et al.* 1998, Korf *et al.* 1984, Nitsch *et al.* 1990, Nitsch *et al.* 1992, Petegnief *et al.* 1999, Robledo *et al.* 1999) pero nunca en el área septal (Mahy *et al.* 1995, Saura *et al.* 1995). No obstante, la inyección de agonistas de Glu no siempre provoca la aparición de estos depósitos de calcio, de hecho es un proceso que parece depender tanto del área lesionada como de la excitotoxina empleada. Cabe señalar además que la inhibición específica del sistema de recaptación del Glu en el núcleo estriado también presenta calcificación asociada al daño excitotóxico (Liévens *et al.* 2000).

Pese a ser un fenómeno descrito en una gran variedad de situaciones patológicas humanas (Ver revisiones de Harrington *et al.* 1981 y Ellie *et al.* 1989) algunas de ellas relacionadas con la excitotoxicidad (Ansari *et al.* 1990), la identidad y características de las células que producen los depósitos de calcio son desconocidas, como también lo son los mecanismos que la provocan, el sentido fisiológico e incluso si es una causa o una consecuencia de la muerte neuronal.

### **LA EXCITOTOXICIDAD Y LOS DESÓRDENES NEUROLÓGICOS**

La excitotoxicidad aparece como un factor común en una gran variedad de desórdenes neurológicos incluyendo el daño cerebral isquémico, la epilepsia, el daño cerebral traumático, algunas enfermedades neurodegenerativas y la exposición a toxinas ambientales (Meldrum *et al.* 1990, Obrenovitch *et al.* 1997).

Vamos ahora a entrar en detalle en aquellos en las que parece tener un papel más significativo.

### La hipoxia-isquemia

La hipoxia cerebral consiste en un aporte inadecuado de oxígeno a este órgano mientras que la isquemia está originada por la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel suficiente que interfiera en la función normal del SNC. Dado que, *in vivo*, ambos fenómenos ocurren a menudo simultáneamente, aquí hablaremos del daño hipóxico-isquémico. Este suceso es uno de los más comunes factores patológicos que provocan un daño neuronal, con la consiguiente neurodegeneración y muerte celular (Nyakas *et al.* 1996).

La minoración de los niveles celulares de energía y el colapso de las vías metabólicas es el desencadenante de los eventos fisiopatológicos que llevan a la muerte celular por hipoxia-isquemia (figura 2.6). Así, el decremento del aporte de oxígeno a las neuronas se traduce en un cambio hacia el metabolismo anaeróbico, lo que lleva a la acumulación de lactato, y a una disminución de los niveles de ATP celular (Longo 1997). Estos sucesos provocan una acidosis que puede llevar el pH a valores cercanos a 6,00. Esta acidosis junto con la disminución de los niveles energéticos celulares tienen multitud de efectos indeseables en la célula, entre los que destaca la inhibición de la bomba de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , destruyendo el potencial de la membrana celular y causando el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . También inhiben la recaptura de neurotransmisores, provocan la aparición de radicales libres y evitan la activación de los mecanismos de reparación celular (Farooqui *et al.* 1994).

Otros efectos importantes del daño hipóxico-isquémico son la formación de un edema tisular, el cual parece estar relacionado con el grado de acidosis (Siesjö *et al.* 1984); el desorden en la homeostasis intracelular del calcio (figura 2.6) y la liberación excesiva de EAA al exterior celular con la subsiguiente aparición de un proceso excitotóxico (Longo 1997, Obrenovitch *et al.* 1997). El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es el factor fundamental en los procesos que conducen al daño celular irreversible (Tymianski *et al.* 1996). En el interior de las neuronas, el  $\text{Ca}^{2+}$  activa enzimas líticas, promueve la producción de ácido nítrico y la expresión de algunos genes de respuesta inmediata (Castillo 2000, Tymianski *et al.* 1996).

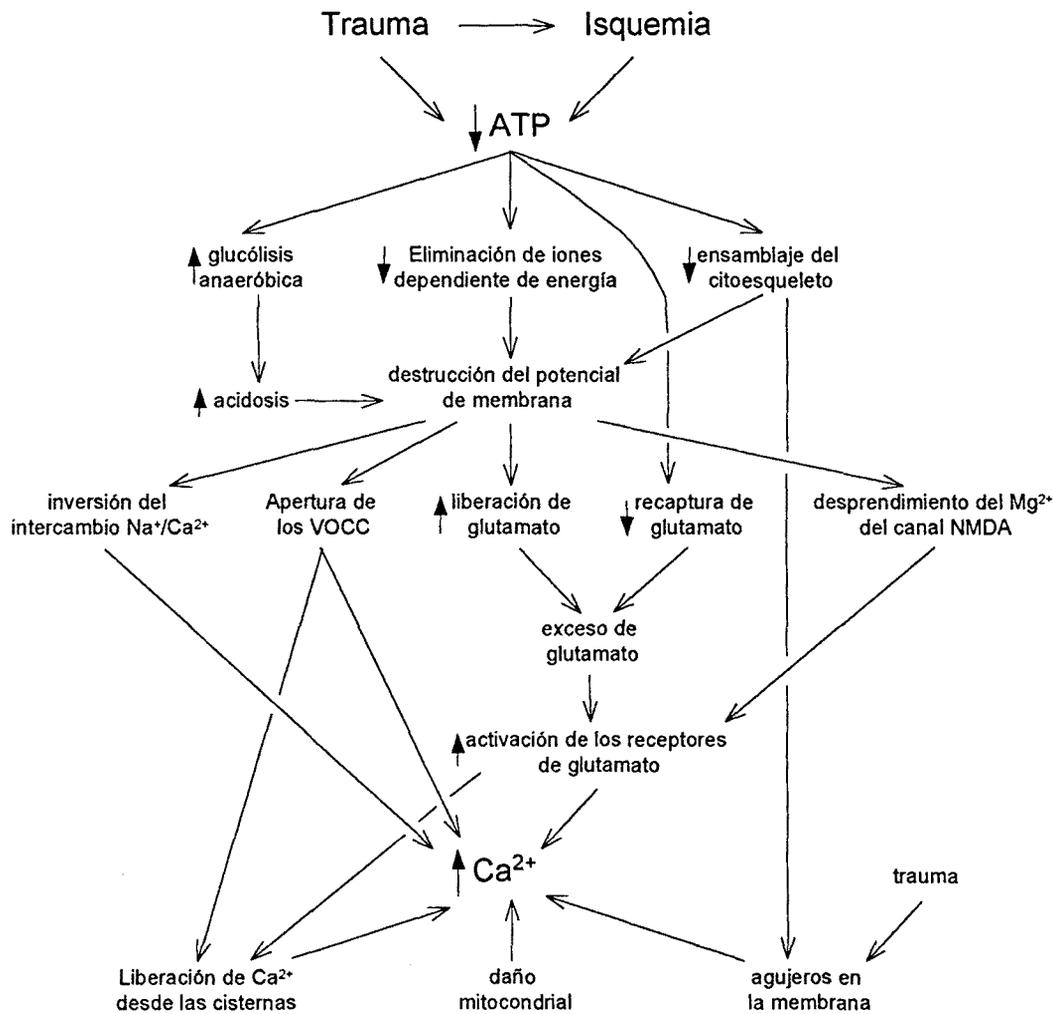


Figura 2.6: Mecanismos por los que la isquemia y los traumatismos producen un incremento tóxico del calcio intracelular. Este calcio es potencialmente tóxico al desencadenar los mecanismos de excitotoxicidad (ver figura 2.5) (Adaptado de Tymiansky *et al.* 1996).

El incremento hasta niveles excitotóxicos de la concentración extracelular de EAA durante el daño isquémico parece ser también debido a la pérdida del potencial de membrana de las neuronas (Tymiansky *et al.* 1996). Pero además y desde el momento en que es dependiente del gradiente electroquímico del Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup>, el sistema de recaptación de los EAA también se ve afectado (Obrenovitch *et al.* 1997) y puede contribuir a este aumento tóxico, incluso mediante una inversión del sistema de transporte (Takahashi *et al.* 1997). Por otro lado, además de incrementar hasta niveles tóxicos la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Choi 1988), la excitotoxicidad asociada al daño hipóxico-isquémico puede causar una hinchazón (*swelling*) aguda en las

células, fruto del influjo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua, y a la salida de  $\text{K}^+$  (Katayama *et al.* 1995). Finalmente, el uso de modelos animales de hipoxia-isquemia ha sugerido un posible potencial neuroprotector de los antagonistas de los receptores del Glu. Así, el bloqueo de los receptores NMDA puede reducir el volumen de infarto y los déficits neurológicos en modelos de isquemia focal cerebral permanente y también después de la reperfusión (Revisado por Obrenovitch *et al.* 1997).

### **La esclerosis lateral amiotrófica**

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa letal caracterizada por la progresiva pérdida de las neuronas motoras del SNC. No hay explicación para esta neurodegeneración selectiva pero existen indicios sobre la implicación de diversos factores como el estrés oxidativo (Beal 1995) y los defectos en la transmisión glutamatérgica. Concretamente, los receptores AMPA son quienes se apuntan como mediadores de este daño neuronal selectivo (Rothstein *et al.* 1995b, Williams *et al.* 1997); aunque parece ser que la actividad de los receptores NMDA también se ve modificada. Además algunos pacientes han mostrado una reducción de la cantidad total de EAAT2 sin que haya cambios en la densidad astrocitaria, lo que implica una deficiencia específica del transportador en las regiones afectadas por la enfermedad (Rothstein 1995).

### **La epilepsia**

Los ataques epilépticos consisten en alteraciones motoras o sensoriales fruto de una sincronización y amplificación de las descargas neuronales. Desde hace tiempo se relaciona a esta enfermedad con los EAA y, últimamente, se asocia a la epilepsia con un agotamiento energético de las neuronas estimuladas, lo que las haría más sensibles a la excitotoxicidad. También existe la hipótesis de que los ataques sean fruto de un desequilibrio entre los sistemas de inhibición y de excitación a raíz del incremento de la función glutamatérgica o del decremento de la actividad GABAérgica (Bradford 1995). Se sabe que los agonistas de los receptores del Glu, ácidos domoico y kaínico, inducen ataques epilépticos (Revisado por Sperk 1994), y que algunos antagonistas de estos receptores pueden inhibirlos. Además en la epilepsia se han encontrado indicios

de un aumento de liberación de Glu, o un posible defecto de su recaptura (Obrenovitch *et al.* 1997).

### **La corea de Huntington**

Es esta una enfermedad neurodegenerativa hereditaria causada por la repetición del codón CAG en un gen del cromosoma 4 con función desconocida (Tabrizi *et al.* 1998). Se han descrito importantes anomalías en el metabolismo energético del cerebro en los individuos que presentan esta enfermedad, con una deficiencia del 55% en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, siendo el estriado el núcleo que sufre esta anomalía (Browne *et al.* 1997). Este déficit obliga al cerebro a trabajar en condiciones anaeróbicas, con el consiguiente aumento de lactato (Koroshetz *et al.* 1997) y una disminución de los niveles de ATP cerebral. Ello comporta una parcial despolarización de la membrana, la liberación del  $Mg^{2+}$  que bloquea el canal del receptor NMDA, su activación por medio del Glu del ambiente, la entrada del  $Ca^{2+}$  al interior celular y el inicio del proceso excitotóxico mediado por la acción de los radicales libres (Tabrizi *et al.* 1998).

### **MECANISMOS DE PROTECCIÓN**

En vista de la importancia de los EAA y sus efectos en el SNC no es de extrañar que el cerebro disponga de una serie de dispositivos de prevención y compensación de la lesión excitotóxica. Estos sistemas de compensación engloban tanto a los mecanismos moleculares que combaten la acumulación tóxica de calcio en el interior celular y el estrés oxidativo, como a la interacción con otros neurotransmisores, la actividad neuromoduladora de algunas moléculas o los mecanismos celulares de soporte y reparadores del tejido controlados por la glia.

### **El tamponamiento del calcio intracelular**

Debido a su función como segundo mensajero en multitud de procesos fisiológicos, la homeostasis celular del calcio ha de estar muy controlada (figura 2.7). En condiciones fisiológicas normales los incrementos de la  $[Ca^{2+}]_i$  tienen un carácter transitorio y el ion vuelve rápidamente a concentraciones basales

(alrededor de  $0,1 \mu\text{M}$ ). Los mecanismos celulares de extrusión y secuestro del calcio encargados de ello se encuentran activados en los procesos de excitotoxicidad e incluyen una familia de proteínas fijadoras de calcio y tres compartimentos: el espacio extracelular, el retículo endoplasmático y la mitocondria (Verkhratsky *et al.* 1998).

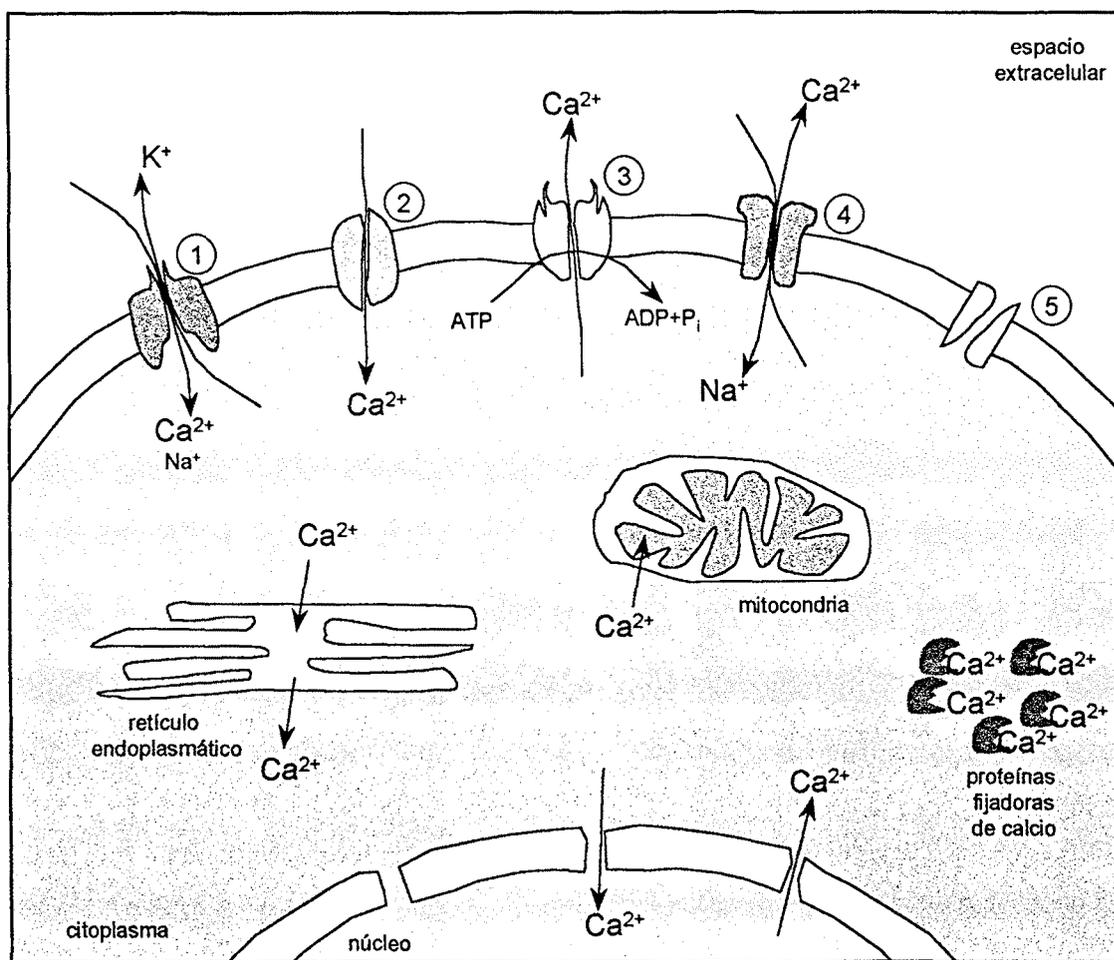


Figura 2.7: Representación esquemática de las principales vías de control de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas. La entrada desde el exterior se produce mediante (1) el antiporte con  $\text{K}^{+}$  o la entrada junto al  $\text{Na}^{+}$  mediadas por receptores de neurotransmisores como los del glutamato, y (2) por la apertura de canales dependientes de voltaje. Este calcio sale al exterior mediante las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de energía (3) o por acción del intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+}$ . Otros canales iónicos (5) pueden contribuir a la repolarización de la membrana y la homeostasis del calcio. En el interior de la neurona, además, el calcio puede ser secuestrado en la mitocondria, quelado por proteínas fijadoras de calcio, o almacenado en el ergastoplasma, un orgánulo que también puede liberar calcio por acción de segundos mensajeros. Finalmente, el calcio experimenta flujos a través de la membrana nuclear y puede tener efectos en la transcripción del DNA. (Adaptado de Tymiansky *et al.* 1996 y Verkhratsky *et al.* 1998).

Además de la calmodulina, destacan tres proteínas con capacidad de fijar calcio con alta afinidad, la parvalbúmina, la calbindina D<sub>28K</sub> y la calretinina. Son proteínas con una amplia distribución en el SNC que suelen presentarse en poblaciones neuronales muy diferenciadas, aunque pueden llegar a colocalizar (Andressen *et al.* 1993). Su concentración, movilidad y alta afinidad por el calcio las convierte en el mecanismo más rápido para tamponar el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones normales (Tymiansky *et al.* 1996). Pero en el caso de mantenerse la estimulación postsináptica, estas proteínas acaban saturándose y se hace necesaria la participación de otros sistemas con mayor capacidad.

Las principales cisternas celulares del calcio son el retículo endoplasmático y la mitocondria. El primero internaliza el ion mediante la acción de unas  $Ca^{2+}$ -ATPasas que actúan de un modo muy eficiente. Existen tres proteínas diferentes con esta actividad de las cuales la más abundante en el cerebro es la denominada SERCA2b (Verkhratsky *et al.* 1998). Una vez en el sarcoplasma, el calcio es quelado por unas proteínas fijadoras de calcio propias del orgánulo. La mitocondria, por su parte, recibe la entrada de calcio a favor de gradiente electroquímico, debido a que su interior es básico y al potencial de membrana negativo fruto del flujo de protones creado por la cadena respiratoria (Simpson *et al.* 1998). La entrada de calcio a la mitocondria ocurre a través de un sistema de uniporte dependiente del potencial de membrana (Verkhratsky *et al.* 1998). Este sistema se puede inhibir por iones competitivos como el  $Sr^{2+}$  o el  $Ba^{2+}$ , a la vez que es modulado positivamente por la  $[Ca^{2+}]_i$  y por poliaminas.

Todo el calcio que entra a la célula, incluyendo el inicialmente secuestrado por las proteínas fijadoras de calcio y el almacenado en el sarcoplasma o la mitocondria, vuelve a ser expulsado al exterior. Para ello en la célula existen dos sistemas de transporte activo: las  $Ca^{2+}$ -ATPasas de membrana plasmática y los intercambiadores de  $Na^+/Ca^{2+}$  (Tymiansky *et al.* 1996, Verkhratsky *et al.* 1998). Las primeras tienen una alta afinidad por el ion pero una baja capacidad y parecen las encargadas de mantener el gradiente en situación de reposo; mientras que los segundos, con una menor afinidad, tienen una gran capacidad de expulsión del  $Ca^{2+}$  y aprovechan el gradiente de  $Na^+$  que genera la ATPasa de  $Na^+/K^+$  para intercambiar tres  $Na^+$  por un  $Ca^{2+}$  creando un gradiente eléctrico.

### **Mecanismos antioxidantes**

Las células tienen mecanismos para protegerse de los radicales libres procedentes del exterior o producidos durante el metabolismo celular. Los sistemas de defensa incluyen enzimas antioxidantes, y moléculas limpiadoras (*scavengers*) de radicales libres (Halliwell 1987). Entre los enzimas encontramos la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1.) que cataliza la transformación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno; la catalasa (EC 1.11.1.7), que reduce este peróxido hasta agua y oxígeno; y la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) que cataliza la reducción de los hidroperóxidos por el glutatión. Numerosos estudios muestran que los factores neurotróficos (ver abajo) estimulan a las neuronas a activar estas enzimas (revisado por Mattson *et al.* 1996). Finalmente, entre las moléculas "limpiadoras" encontramos el glutatión, el  $\alpha$ -tocoferol, el  $\beta$ -caroteno y el ácido úrico.

### **Los factores tróficos**

En general los factores neurotróficos estimulan mecanismos necesarios para la supervivencia neuronal, el crecimiento de las neuritas y las funciones relacionadas con la síntesis y liberación de neurotransmisores. Por tanto, tienen un papel en los procesos de plasticidad y regeneración neuronales.

Hay muchos trabajos *in vivo* e *in vitro* que muestran que los factores neurotróficos constituyen una clase importante de moduladores de la excitotoxicidad (Mattson *et al.* 1996). Por ejemplo, se ha observado el aumento de expresión de algunos de estas moléculas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en el hipocampo y la corteza cerebral tras una lesión excitotóxica en la base del cerebro anterior (Ballarín *et al.* 1991a, Boatell *et al.* 1992, Mahy *et al.* 1996) interpretándose como un intento de prevenir la muerte neuronal.

La cascada de transducción de señales neuroprotectora activada por los factores neurotróficos implica la fosforilación del receptor con actividad tirosina-quinasa y la consiguiente activación de la cascada de quinasas y factores de transcripción (Schlessinger *et al.* 1992), incluyendo las proteínas quinasas activadoras de la mitosis (Boulton *et al.* 1991)

## Otros neurotransmisores

Además de los factores neurotróficos, las neuronas con receptores del glutamato también reciben señales de otros neurotransmisores, citoquinas y muchos neuromoduladores. Se ha observado como gran parte de esas moléculas tienen una influencia en el devenir del daño excitotóxico.

☞ *La adenosina.* En el cerebro, la adenosina es una molécula liberada por las neuronas y las células gliales o generada por hidrólisis extracelular de ATP (White et al 1991). Este neuromodulador ejerce su función mediante la activación de tres tipos de receptores, los A<sub>1</sub> que son presinápticos, postsinápticos y gliales y los A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> ambos localizados en la neurona postsináptica y la glia (Porter et al. 1995, Rudolphi et al. 1992). Los receptores A<sub>1</sub> median el incremento en la concentración citosólica del nucleótido adenosina monofosfato 3',5'-cíclico, mientras que los A<sub>2</sub> y los A<sub>3</sub> parecen disminuir esta concentración intracelular (Dunwiddie et al. 1997b, van Galen et al. 1992). Anatómicamente, los receptores A<sub>1</sub> presentan una gran densidad en las áreas dendríticas del hipocampo, especialmente en el CA1, una estructura particularmente vulnerable a la hipoxia y muy rica en receptores de NMDA. Los A<sub>2</sub>, por su parte, abundan en el núcleo estriado y otras áreas ricas en dopamina. Entre los múltiples mecanismos mediante los que la adenosina ejerce su acción en el SNC se cuentan la inhibición de la liberación de neurotransmisores y la hiperpolarización de la membrana postsináptica (Dunwiddie et al 1985). Estos efectos inhibidores son especialmente importantes en el hipocampo donde puede llegar a inhibir la liberación de Glu en un 95 % (Dunwiddie et al 1980, Lupica et al 1992), a la vez que también se inhibe la excitabilidad postsináptica (Greene et al 1985). No obstante, a través de los receptores A<sub>2</sub> también potencia la liberación de Glu provocada en secciones hipocámpales (Caciagli et al 1995) e incrementa la excitabilidad neuronal en esta estructura. Así pues, la adenosina puede modular en el hipocampo la excitotoxicidad y los procesos de memoria a través de sus efectos sobre los niveles de Glu y/o acetilcolina.

Se ha observado como, en los procesos de isquemia e hipoxia, se liberan grandes cantidades de adenosina (Hagberg et al. 1987, Canhao et al. 1994), la cual muestra una acción neuroprotectora, posiblemente mediante la inhibición de la liberación de EAA (Rudolphi et al. 1992). A ello apuntan estudios *in vivo* los cuales

demuestran que, en el hipocampo de rata, el antagonista selectivo del receptor  $A_2$  de adenosina 8-(3-clorostiril)-cafeína aumenta la pérdida neuronal inducida por NMDA mientras que disminuye la calcificación (Robledo *et al.* 1999). No obstante, existen estudios que contradicen esta hipótesis. Se ha encontrado que la adenosina no afecta a la liberación de EAA inducida por isquemia (Phillis *et al.* 1991), ni bloquea la liberación de EAA tras un daño en la médula espinal (McAdoo *et al.* 2000). Incluso se ha llegado a proponer que la adenosina potencie el proceso excitotóxico (Hirai *et al.* 1994).

☞ *El ácido  $\gamma$ -aminobutírico.* El GABA es el más abundante neurotransmisor inhibitorio del SNC. Paradójicamente, durante la ontogenia en los mamíferos este aminoácido promueve y dirige la migración neuronal mediante la activación de sus receptores GABA<sub>A</sub> con actividad excitadora. (Marczynski 1998) Estos receptores están acoplados a un canal de  $Cl^-$  y en la edad adulta su actividad es inhibitoria. Debido a su presencia generalizada, el GABA está implicado en un montón de procesos y se le ha implicado en algunos procesos patológicos humanos como la corea de Huntington y la epilepsia (ver arriba). La manipulación farmacológica de la transmisión GABAérgica se ha mostrado como un efectivo tratamiento contra los estados de ansiedad.

Los cambios homeostáticos encaminados a contrarrestar a los procesos neurotóxicos inducidos por el Glu incluyen la liberación de GABA (Pedata *et al.* 1993, Phillis *et al.* 1994, Saransaari *et al.* 1997) por lo que se le ha supuesto un papel neuroprotector. Como refuerzo de esta hipótesis, estudios *In vitro* muestran que el uso de agonistas de los receptores de GABA tiene una función protectora frente a la toxicidad del glutamato, particularmente a la mediada por el receptor AMPA (Monyer *et al.* 1990). Sin embargo nuestro laboratorio ha demostrado que la inyección de bicuculina en el hipocampo de la rata (un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>) no tiene ningún efecto sobre la excitotoxicidad inducida por NMDA (Robledo *et al.* 1999).

Por otro lado se ha sugerido una función excitotóxica para el GABA. Algunos sistemas neuronales, como la retina de pollo, han mostrado un proceso excitotóxico independiente del  $Ca^{2+}$  y muy dependiente del  $Cl^-$  que entra en la célula a través de los receptores de GABA (Chen *et al.* 1998, Chen *et al.* 1999).

Este mecanismo, poco estudiado y aparentemente minoritario, también se ha observado en las células granulosas del cerebelo de mamíferos. A este respecto quedan, empero, muchas cosas por caracterizar y determinar, entre ellas los tipos neuronales susceptibles a esta forma de neurodegeneración.

### **La reacción astrogial**

Los astrocitos participan en múltiples tareas de mantenimiento neuronal entre las que destaca su participación en la formación de la barrera hematoencefálica (Raine 1994) y la contribución al metabolismo energético de las neuronas, función esta última muy importante en procesos de hipoxia e hipoglucemia (Magistretti *et al.* 1999). La astroglia juega un papel crucial en los mecanismos de transmisión glutamatérgica (ya comentado en las secciones pertinentes) y se ha mostrado especialmente participativa en los procesos excitotóxicos.

La existencia de marcadores específicos en el SNC de este tipo celular ha facilitado mucho el estudio de los astrocitos y de su comportamiento en los procesos neurodegenerativos. Tienen proteínas filamentosas, de forma constitutiva expresan la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) y la expresión de vimentina diferencia a los que presentan un comportamiento reactivo. También se pueden identificar por la expresión de otras proteínas como la monoamino oxidasa B (MAO B; EC 1.4.3.4), la cual en el cerebro está presente de forma específica en los astrocitos (Ekblom *et al.* 1994) y constituye una herramienta útil para el estudio del comportamiento astrocitario en los procesos excitotóxicos (Bernal *et al.* 2000b, Petegnief *et al.* 1999, Saura *et al.* 1995).

Tras la activación del daño mediado por glutamato los astrocitos tardan un tiempo en reaccionar, pero al cabo de una semana el área gliosis, o reacción glial, sobrepasa a la del daño neuronal (Bernal *et al.* 2000a). Morfológicamente un astrocito reactivo se caracteriza por unas hipertrofia e hiperplasia celulares debidas al hinchamiento de su citoplasma. Este hinchamiento es fruto de la acumulación en la célula de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , glutamato, lactato y la consecuente entrada de agua para controlar la osmolaridad. Además acumula grandes cantidades de GFAP y vimentina. Todo ello indicaría que la célula está intentando eliminar compuestos tóxicos del espacio extracelular (Landis 1994). Los mecanismos por los que los

astrocitos protegen a las neuronas del daño excitotóxico incluyen la capacidad de secretar factores neurotróficos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor  $\beta$  de crecimiento transformante (Revisado por Mattson *et al.* 1996 y Tacconi 1998), y también eliminar el glutamato del espacio sináptico (Gegelashvili *et al.* 1998). Por otro lado, los astrocitos disponen de receptores de glutamato, factores neurotróficos y otros muchos neurotransmisores (Deitmer *et al.* 1998, Steinhäuser *et al.* 1996, Tacconi 1998), hecho que desencadena una serie de respuestas intracelulares mediadas por calcio.

No obstante y precisamente debido a la expresión de receptores de Glu, los astrocitos también son susceptibles de sufrir un daño excitotóxico. Las adaptaciones metabólicas y cambios bioquímicos que experimentan al reaccionar frente a la lesión pueden ser potenciados por la sobreexcitación de sus receptores de Glu, lo que estimularía al astrocito a la producción de moléculas tóxicas (Dugan *et al.* 1995), llevando a la postre a este tipo celular a la muerte por excitotoxicidad (Volterra *et al.* 1994). Además la muerte astrocitaria no sólo privaría al tejido de uno de los mecanismos de compensación de la lesión sino que también suplemetaría el contenido extracelular de elementos tóxicos por lo que podría exacerbar el daño excitotóxico neuronal (Tacconi 1998).

### **La reacción microglial**

Los microcitos, como macrófagos residentes del SNC que son, cumplen la función inmunitaria de limpieza del espacio extracelular. En el cerebro adulto y en condiciones de reposo, su morfología quiescente es ramificada y filiforme y se encuentran distribuidos de forma homogénea por todo el SNC. Al activarse pasan a tener una forma ameboide, aumentan su movilidad y se multiplican y concentran en las áreas de lesión (Barron 1995, Streit *et al.* 1999).

La reacción microglial durante la lesión excitotóxica ha sido también caracterizada mediante la utilización de marcadores específicos como el receptor del complemento CR (reconocido por el anticuerpo OX-42), el receptor periférico de benzodiazepinas o PBR (Bernal *et al.* 2000b, Petegnief *et al.* 1999, Saura *et al.* 1995), también presente en el epitelio de los ventrículos, o por tinción de diversas lectinas vegetales (Castellano *et al.* 1991, Acarín *et al.* 1994).

Normalmente la respuesta microglial es anterior a la astroglial y consiste en una actividad fagocítica de eliminación de los restos celulares. Pero la microglia reactiva también libera moléculas, como la interleuquina 1 y el factor  $\beta$  de necrosis tumoral. Estas citoquinas tienen una función proinflamatoria que puede cursar mediante la producción de NO microglial (Streit *et al.* 1999), movilizándolo más microcitos y favoreciendo su actividad fagocítica.

## ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

Los antagonistas de los diferentes receptores ionotrópicos del Glu se han mostrado *in vitro* como agentes neuroprotectores muy efectivos frente a la excitotoxicidad, por lo que se consideró la posibilidad de su uso en el tratamiento de los desórdenes neurológicos en los que participa el Glu, especialmente en los procesos de hipoxia-isquemia. Pero en esos casos, el uso de bloqueantes de receptores de NMDA se rechazó pronto por sus efectos secundarios indeseables, mientras que los antagonistas de los receptores AMPA y kainato se han mostrado poco eficientes al igual que los bloqueadores de los canales de  $Ca^{2+}$  (De Keiser *et al.* 1999). Por ello se han propuesto tratamientos que utilicen la combinación de varios fármacos neuroprotectores a la vez (Calabresi *et al.* 2000). Se cree que combinaciones de antagonistas del glutamato con el factor de crecimiento fibroblástico, nimodipino, o agonistas de los receptores de GABA (Lyden *et al.* 1994) entre otros, podrían presentar mayores efectos terapéuticos.

Pero también cabe contemplar otras posibilidades y muchos agonistas de los receptores mGluR del grupo II y III sí que parecen tener funciones neuroprotectoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Bond 1999). Debido a su carácter modulador, estos receptores tienen un pequeño impacto en la transmisión excitadora rápida pero pueden influir en la progresión del proceso neurodegenerativo, lo que les confiere una ventaja en el tratamiento crónico (Nicoletti *et al.* 1996). Además es de esperar que estos fármacos tengan pocos efectos en los tejidos periféricos ya que los mGluR no están presentes en los órganos controlados por el sistema nervioso autónomo, cosa que no ocurre con otros receptores como los muscarínicos, adrenérgicos, serotoninérgicos y los receptores de neuropéptidos.

## LA VÍA SEPTOHIPOCAMPAL

### LOS SISTEMAS COLINÉRGICOS

La acetilcolina fue el primer neurotransmisor químico aislado y caracterizado tanto estructural como funcionalmente. En consecuencia, muchas de las características básicas de los sistemas de neurotransmisión fueron estudiadas por primera vez utilizando los sistemas colinérgicos, siendo las uniones neuromusculares de los vertebrados la estrella de éstas investigaciones, ya que constituían las mas conocidas y difundidas sinapsis del sistema colinérgico.

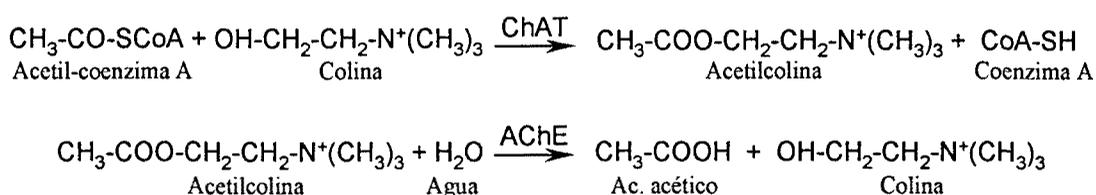


Figura 2.8: Síntesis y degradación de la acetilcolina

La síntesis de acetilcolina requiere un enzima específico, la colina acetiltransferasa (ChAT, EC 2.3.1.6). Solamente las neuronas colinérgicas contienen este enzima lo que convierte a la ChAT en un excelente marcador específico de la transmisión colinérgica (Bradford 1988). La acetilcolina es sintetizada por la ChAT (figura 2.8) en el citosol del terminal sináptico y un transportador específico la almacena en las vesículas sinápticas. Las neuronas colinérgicas también sintetizan el enzima que degrada a la acetilcolina, la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7). Este enzima es secretado al espacio sináptico y se asocia a las membranas del axón colinérgico. Sin embargo, la AChE también es liberada por otros tipos neuronales por lo que no constituye una herramienta para marcar las sinapsis colinérgicas tan útil como lo puede ser la ChAT.

Los receptores de acetilcolina se han dividido tradicionalmente en dos grupos, bien sean activados por la nicotina o por la muscarina (Bradford 1988, Taylor 1994). Los primeros, llamados nicotínicos, son canales iónicos permeables al  $\text{Na}^+$  son típicos del músculo esquelético e inhibidos por el curare. Los muscarínicos, por su parte, están acoplados a proteínas G, son propios de las vísceras y presentan a la atropina como principal antagonista natural. En el sistema nervioso central (SNC) se encuentran ambos tipos de receptores siendo mucho más abundantes los muscarínicos.

Además de ser sintetizada por todas las neuronas motoras de la médula espinal y ser el neurotransmisor de las uniones neuromusculares, las sinapsis autónomas y las parasimpáticas postganglionares, la acetilcolina también se encuentra en el encéfalo, por ejemplo en algunas interneuronas del núcleo estriado o la corteza cerebral (Bear *et al.* 1996). En el cerebro, por añadidura, existen dos grandes sistemas colinérgicos difusos con función moduladora.

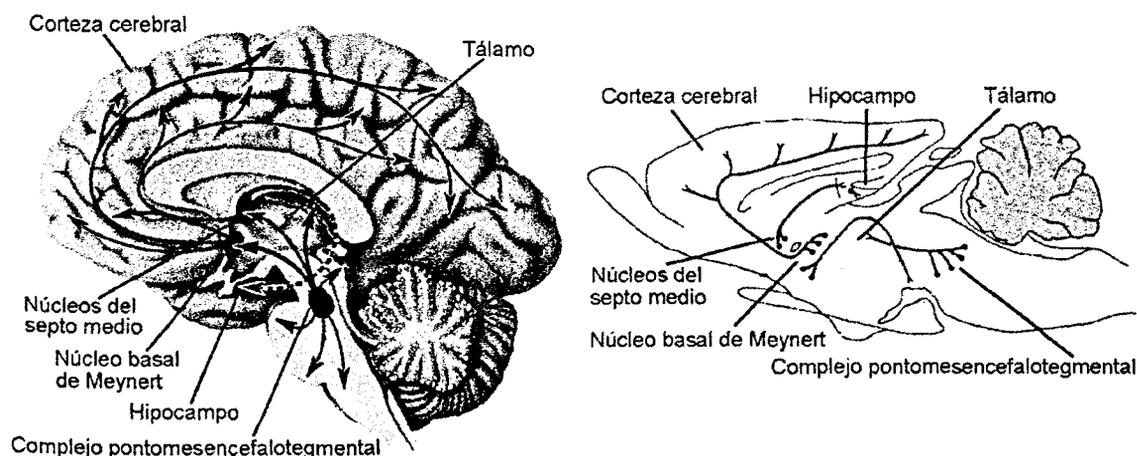


Figura 2.9: Representación gráfica de las vías colinérgicas del cerebro basal anterior en el cerebro humano y de la rata. Obsérvese cómo los núcleos del septo medio proyectan mayoritariamente sobre el hipocampo, formando la denominada vía septohipocampal. (Modificado de Bear *et al.* 1996 y Bradford 1988)

Uno de ellos es el llamado complejo de la base del cerebro anterior (figura 2.9). Se le llama *complejo* porque las neuronas colinérgicas se encuentran salpicadas en numerosos núcleos del telencéfalo. Los mejor conocidos son los núcleos del septo medio (MS), los cuales proporcionan la mayor parte de la

inervación colinérgica al hipocampo constituyendo la vía septohipocampal (SH), y el núcleo basal de Meynert que lo hace a la corteza cerebral.

La función de las células colinérgicas en la base del cerebro anterior está todavía por definir totalmente y, al descubrirse que son las primeras neuronas en morir durante la enfermedad de Alzheimer (caracterizada por una pérdida progresiva y profunda de las funciones cognitivas), se incentivó el interés en esta región. También se ha implicado al sistema colinérgico en la regulación de la excitabilidad cerebral durante el despertamiento y el estado de consciencia, así como en el control involuntario de los movimientos y la postura (*Bear et al.* 1996, *Bradford* 1988). Abundando en esto último, cabe decir que los agonistas colinérgicos activos en el SNC como el carbacol, provocan temblores similares al Parkinson, otros movimientos disquinéticos, cataslepsia y movimientos circulares.

El segundo sistema colinérgico difuso tiene un nombre largo: el complejo pontomesencefalotegmental (figura 2.9). Este sistema actúa principalmente en el tálamo dorsal donde, junto a los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico, regula la excitabilidad de los núcleos de la transmisión sensorial.

## LA VÍA SEPTOHIPOCAMPAL

Aunque el interés en la vía SH se remonta a los años 60 (*Petsche et al.* 1962), existen muchos motivos para que todavía continúe siendo objeto de estudio. En primer lugar, la vía SH probablemente es la mejor caracterizada, tanto en términos anatómicos como fisiológicos, de las vías colinérgicas del SNC. Además, las células colinérgicas localizadas en el MS y en el núcleo de la banda diagonal de Broca (DBB) proporcionan la mayor parte de la inervación colinérgica del hipocampo, controlan el ritmo *theta* y están involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria (*Dutar et al.* 1995, *Mizumori et al.* 1990, *Vanderwolf et al.* 1994). Como razón adicional a este interés, aparece el hecho de que el sistema SH contiene neuronas dependientes de factores tróficos para sobrevivir (o al menos para su crecimiento). La acción del NGF sobre las neuronas colinérgicas SH está bien documentada y constituye un buen modelo para estudiar los efectos de los factores tróficos en el SNC (*Dutar et al.* 1995). Finalmente, el sistema SH se muestra sensible a varios tipos de agresiones, siendo remarcables tanto la

vulnerabilidad de las neuronas del MS en animales experimentales de edad avanzada, como la ya comentada vulnerabilidad de los sistemas colinérgicos, incluido el SH, en enfermedades neurodegenerativas como la de Parkinson o la de Alzheimer.

### Organización anatómica

Las neuronas del complejo MS-DBB representan un continuo de células que, debido a la ausencia de claras fronteras histológicas, es difícil de subdividir y que inervan la formación hipocampal, la corteza cingulada, el bulbo olfatorio principal y, ya de forma más minoritaria, otras estructuras como el hipotálamo y algunas estructuras corticales (figura 2.10). La topografía del sistema SH ha sido estudiada mediante lesiones septales, hipocampales, o de la fimbria y el fórnix, y mediante métodos de trazado axonal; llegando a la conclusión de que las neuronas septales que proyectan al hipocampo están localizadas en el MS y la parte vertical de la DBB (ver referencias en Dutar et al. 1995). Dicha inervación se lleva a cabo por tres rutas principales: la fimbria, el fórnix dorsal y la estría supracallosa. Además, esta proyección lo es principalmente sobre las neuronas ipsilaterales de la estructura hipocampal, aunque se ha descrito una pequeña vía cruzada (Peterson 1989). La vía SH está organizada topográficamente a lo largo de los ejes rostrocaudal y mediolateral. De esta forma, las neuronas más laterales del septo son las que proyectan de forma más ventral en el hipocampo y las más rostrales en el septo proyectan a las más rostrales del hipocampo.

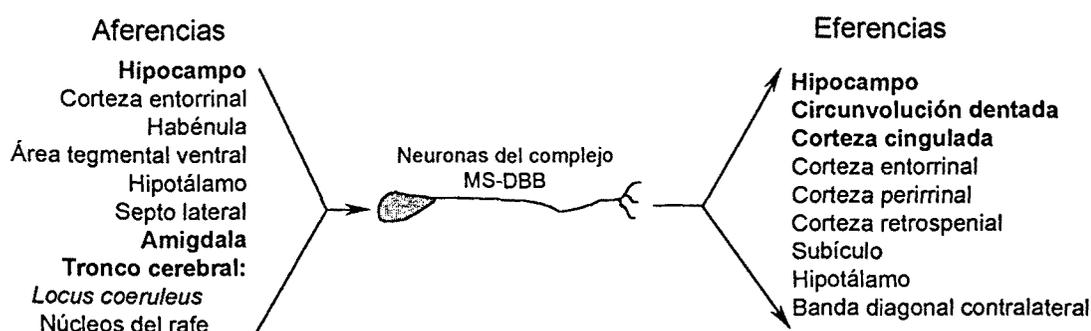


Figura 2.10: Resumen de las estructuras que proyectan sobre el complejo septo medio-banda diagonal de Broca (aferencias) y de las áreas que reciben sus terminaciones (eferencias). Las proyecciones principales están resaltadas con trazo más obscuro

Dentro de la formación hipocampal, las fibras septales acaban en un patrón laminar tanto en el hipocampo como en la circunvolución dentada. Así en el hipocampo dorsal, las células de las capas piramidal del CA1 y granular de la circunvolución dentada reciben las aferencias desde la parte vertical de la DBB, mientras que tanto el MS como la DBB inervan las células de la formación hipocampal ventral (Nyakas *et al.* 1987). Finalmente, existen pocas evidencias de ramificaciones de los axones de proyección septales hacia diferentes estructuras. Las neuronas del MS no proyectan simultáneamente hacia el hipocampo y el bulbo olfatorio, la amígdala o la corteza cingulada (Koliatsos *et al.* 1991), ni tampoco hacia la corteza y el tronco cerebral.

### **Distribución de los neurotransmisores**

Las primeras indicaciones de los tipos de neurotransmisores que se pueden encontrar en la vía SH se remontan de nuevo a los años 60 (Lewis *et al.* 1967). Sin embargo, no ha sido hasta la reciente disponibilidad de anticuerpos específicos de diferentes enzimas y péptidos y el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas lo suficientemente sensibles que se han presentado evidencias sobre la complejidad neuroquímica de esta región (Kiss *et al.* 1990a, Kiss *et al.* 1990b). En el complejo MS-DBB, entre un 60 y un 70% de las neuronas son colinérgicas -ChAT positivas-, hasta un 30% utilizan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor -son glutamato descarboxilasa (GAD, EC 4.1.1.15) positivas- y el resto contiene neuropéptidos como la encefalina, la calcitonina, la hormona liberadora de la hormona luteinizante, el péptido intestinal vasoactivo, la sustancia P, la colecistoquinina, el neuropéptido Y, la somatostatina y la neurotensina (Kiss *et al.* 1990b). La lista no acaba aquí y se han demostrado colocalizaciones: así una proporción importante de las células colinérgicas contiene además galanina (Patel *et al.* 1992).

Como otras colocalizaciones, encontramos que todas las neuronas colinérgicas septales contienen el receptor del NGF, mientras que las neuronas GABAérgicas del complejo MS-DBB contienen, como marcador específico en esta estructura, la proteína fijadora de calcio parvalbúmina (Freund 1989).

Aunque es un sistema complejo, se observa una regularidad en la organización topográfica de las neuronas septales (Kiss *et al.* 1990a). Cuando

consideramos las divisiones mediolaterales del MS-DBB encontramos que, en la línea central un 30% de las neuronas son GABAérgicas y un 70% lo son colinérgicas, en la parte medial la distribución es de un 65 y un 35% respectivamente, mientras que en la parte más lateral encontramos que sólo el 2% de neuronas son GABAérgicas y hasta el 98% lo son colinérgicas (Patel *et al.* 1992). De esta manera, las neuronas GABAérgicas se encuentran principalmente en la parte central del SM y la DBB mientras que las neuronas colinérgicas serán más abundantes en la periferia de la estructura.

### Receptores en el hipocampo

Aquí nos centraremos exclusivamente en los receptores de los neurotransmisores de la vía SH. Es decir, acetilcolina, GABA y péptidos como el neuropéptido Y y la galanina. En la formación hipocampal se encuentran ambos tipos de receptores colinérgicos, los nicotínicos y los muscarínicos, pero éstos últimos son, de largo, los más abundantes. De los 5 genes diferentes que codifican para los diferentes subtipos de receptores muscarínicos conocidos ( $M_1$  a  $M_5$ ), todos ellos se expresan en el hipocampo (Buckley *et al.* 1988, Vilaro *et al.* 1994). Los más abundantes, los  $M_1$ , se encuentran en todo el hipocampo, los  $M_3$  se encuentran más bien en la circunvolución dentada y el CA1, mientras que los lugares de unión  $M_2$  se encuentran asociados principalmente a los terminales colinérgicos (Cortés *et al.* 1986, Quirion *et al.* 1989). La distribución de los receptores nicotínicos es más limitada (Hunt *et al.* 1978) pues está restringida al estrato *oriens* y el *hilus*.

Se han identificado tres tipos de receptores GABAérgicos en el hipocampo (Bowery *et al.* 1987, Freund *et al.* 1996). Mediante estudios de electrofisiología se ha demostrado que las respuestas  $GABA_A$  se encuentran tanto en el soma como en las dendritas de las neuronas hipocampales, mientras que las respuestas  $GABA_B$  y  $GABA_C$  están en las dendritas (Dutar *et al.* 1988). También se encuentran receptores de neuropéptido Y y galanina. La topografía de los receptores de éste último neuropéptido está bien descrita en ratas y primates (ver revisión de Dutar *et al.* 1995). En la rata, la densidad de los receptores de galanina es mayor en el hipocampo ventral que el dorsal, se encuentran en el estrato *oriens* del CA1 y en menor medida, en los cuernos de Ammón (CA) 2 y 3.

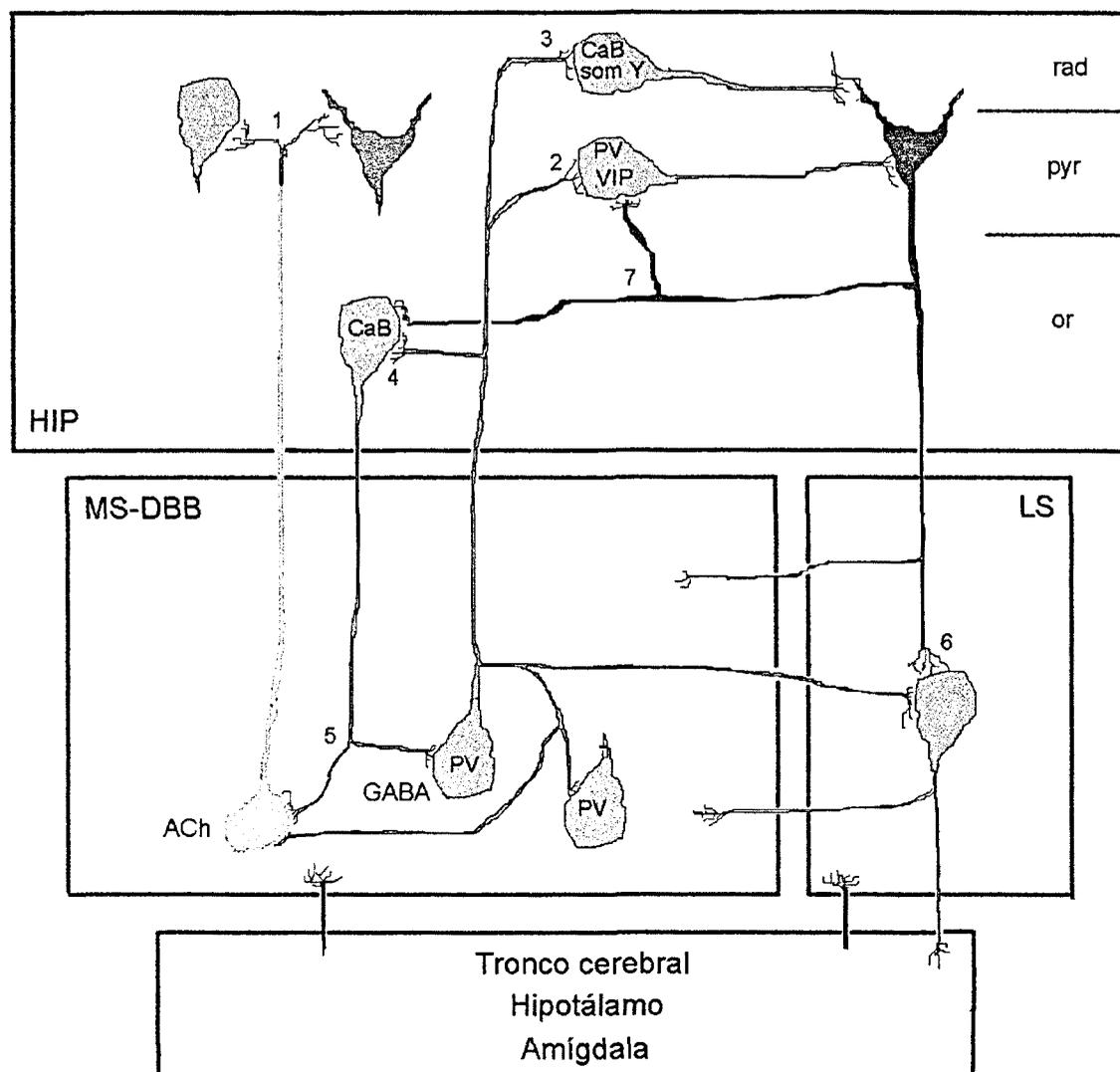


Figura 2.11: Representación esquemática de las principales conexiones entre el complejo septal y el hipocampo (limitado en el esquema al CA1). Las neuronas colinérgicas SH (ACh) proyectan sobre el soma y dendritas proximales de las neuronas piramidales (triangulares) del hipocampo (HIP), pero también en neuronas GABAérgicas no piramidales, precipitando la respuesta colinérgica (1). Las células GABAérgicas SH contienen parvalbúmina (PV) y proyectan sobre diferentes poblaciones de neuronas del GABA no piramidales en el hipocampo. Una subpoblación de ellas envía terminales a las neuronas piramidales (2). Algunas de ellas, además contienen el péptido intestinal vasoactivo (VIP) colecistoquinina y PV. Otra subpoblación de interneuronas GABAérgicas proyecta sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales (3) y algunas contienen el neuropéptido Y (Y) somatostatina (som) y calbindina (CaB). Las proyecciones GABAérgicas SH también proyectan sobre neuronas que contienen CaB del estrato *oriens* (4), las cuales, a su vez, inervan principalmente neuronas del complejo SM-DBB que contienen PV (5). Las neuronas piramidales del hipocampo (triangulares) proyectan sobre neuronas GABAérgicas del septo lateral (LS) (6) las cuales envían alguna aferencia de poca cuantía al SM. Las neuronas piramidales también envían proyecciones colaterales excitadoras a varias neuronas GABAérgicas (7). Finalmente el septo medio y el lateral tienen entradas desde otros núcleos. Rad, estrato radiado; pyr, estrato piramidal; or, estrato *oriens*. (Adaptado de Dutar *et al.* 1995)

## Aspectos fisiológicos

La función fisiológica de las neuronas colinérgicas del sistema SH está todavía por esclarecer. Se ha propuesto una influencia moduladora de la acetilcolina en el hipocampo (Krnjevic *et al.* 1988) mediante una combinación de la depresión postsináptica de corrientes de potasio y la reducción de la liberación de GABA por parte de las interneuronas hipocampales. Por el contrario, se ha sugerido que las neuronas colinérgicas septales más que activar inhibirían a las neuronas piramidales del hipocampo (Buzsaki 1984). Este efecto vendría mediado por la excitación directa de las células GABAérgicas hipocampales. También se ha sugerido (Buzsaki 1984, Stewart *et al.* 1987) que la excitación periódica de muchas neuronas piramidales por parte de los axones colinérgicos septales podría ser la responsable de la actividad del ritmo *theta* en el hipocampo.

Lo que sí está claro es que las neuronas colinérgicas del complejo MS-DBB emiten eferencias tanto al estrato piramidal como al *oriens* de las capas CA1-CA3 del hipocampo, y la granular de la circunvolución dentada (Dutar *et al.* 1995). En la capa *oriens* las neuronas inervadas serían una subpoblación rica en parvalbúmina de neuronas GABAérgicas, cuya función principal es contactar con el soma de las neuronas piramidales. Así, las neuronas colinérgicas del sistema SH pueden influenciar, vía esas células, en un gran número de neuronas piramidales.

La rica inervación colinérgica a neuronas GABAérgicas hipocampales se antoja paradójica para una vía pensada para contribuir a facilitar las respuestas en el hipocampo (Krnjevic *et al.* 1988), por lo que se requiere seguir profundizando en el estudio de la secreción de acetilcolina sobre las neuronas inhibitoras y sus efectos en la función hipocampal.

El GABA en el hipocampo actúa como un neurotransmisor inhibitor tanto en la neurona presináptica, a través de sus receptores GABA<sub>A</sub>, como en la postsináptica a través de sus receptores GABA<sub>B</sub>. Los efectos fisiológicos del GABA liberado por las interneuronas del hipocampo sobre las neuronas piramidales están, a su vez, bien documentados (Nicoll *et al.* 1990, Freund *et al.* 1996). Sin embargo, el papel del GABA liberado por las neuronas procedentes del complejo MS-DBB es probablemente diferente ya que las proyecciones

GABAérgicas de la vía SH inervan principalmente interneuronas y no células piramidales (Freund *et al.* 1988). Se ha propuesto que estas aferencias GABAérgicas sean responsables de la contribución septal (que es resistente a la atropina) a la LTP de las células granulares hipocampales. De igual forma, la vía SH GABAérgica podría participar en el control de un amplio rango de circuitos inhibidores de retroalimentación positiva (y negativa) dentro de la formación hipocampal (Gulyás *et al.* 1990, Kiss *et al.* 1990b)

### **Proyecciones al área septal**

En términos de neurotransmisores, el MS recibe aferencias colinérgicas del complejo pontomesencefalotegmental, entradas aminérgicas desde el tronco cerebral, terminaciones dopaminérgicas desde el área tegmental medial y proyecciones GABAérgicas desde el hipocampo y el septo lateral (Alonso *et al.* 1982, Dutar *et al.* 1995). El circuito SH se ilustra en la figura 2.11 y comprende dos rutas: a) neuronas glutamatérgicas piramidales que proyectan en el septo lateral con algunas ramificaciones colaterales al MS-DBB (Toth *et al.* 1993), y b) proyecciones desde neuronas GABAérgicas no piramidales –la mayor parte de ellas inmunopositivas para la calbindina principalmente hasta neuronas SH GABAérgicas, aunque también llegan a algunas colinérgicas (Alonso *et al.* 1982, Toth *et al.* 1993).

Los receptores más abundantes en el complejo MS-DBB son los lugares de unión al glutamato, (Zilles *et al.* 1991) y los receptores muscarínicos de acetilcolina, siendo el subtipo M<sub>2</sub> de los muscarínicos el más abundante en el SM (Zilles *et al.* 1991). Se ha demostrado que la mayoría de las neuronas ChAT positivas expresa mRNA de los receptores M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (Vilaro *et al.* 1994), aunque también las neuronas GABAérgicas expresan el receptor muscarínico. También se ha demostrado una alta densidad de receptores de GABA (Bowery *et al.* 1987, Zilles *et al.* 1991) y, en menor medida, de 5-hidroxitriptamina, de dopamina (los D<sub>1</sub> y los D<sub>2</sub>) y de noradrenalina (Boyson *et al.* 1986, Zilles *et al.* 1991).

### **La vía en el envejecimiento y las enfermedades**

A pesar de la controversia sobre las alteraciones del SNC asociadas al envejecimiento, existe un consenso en que el sistema SH es vulnerable a la edad.

Se da por cierto que, en la rata, el número y tamaño de las neuronas positivas en AChE decrece con la edad (Altavista *et al.* 1990, de Bilbao *et al.* 1991, Fischer *et al.* 1989) aunque no cambie la densidad sináptica en el MS. Resalta el hecho de que la disminución en tamaño correlaciona con un déficit comportamental (Fischer *et al.* 1989). Se han observado cambios similares en el hombre, aunque hay poca información disponible sobre la vía en humanos ya que el interés se ha centrado en el núcleo basal de Meynert. También se sabe que tanto las neuronas del septo medio que contienen galanina como las que contienen parvalbúmina (de Bilbao *et al.* 1991, Miettinen *et al.* 1993) decrecen en número con la edad.

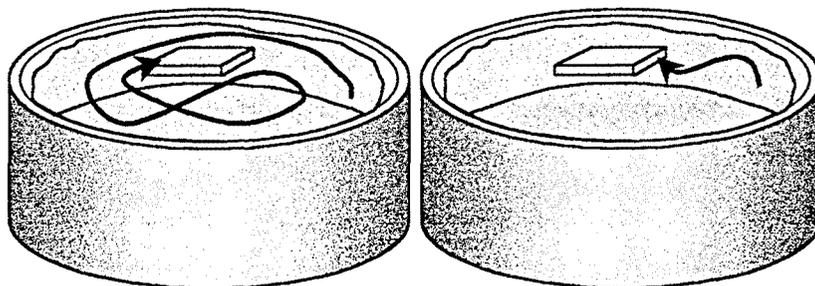
En animales de experimentación, existen numerosos datos sobre cambios en marcadores colinérgicos asociados con la edad, datos que son, empero, controvertidos. Mientras que la actividad ChAT decrece en el MS, especialmente en ratas con deficiencias en el comportamiento (Markram *et al.* 1990), en el hipocampo es difícil de saber puesto que se ha descrito tanto el incremento, como la disminución e incluso ninguna variación de la mencionada actividad. Parece que la recaptación de acetilcolina también está disminuida (Sherman *et al.* 1990) mientras que sólo algunos autores describen el decremento de la liberación del neurotransmisor (Fischer *et al.* 1991b, Gilad *et al.* 1987). Estas incongruencias también se encuentran en los receptores. Algunos estudios hablan de una disminución en la densidad de lugares de unión muscarínicos en el hipocampo, pero la mayoría no encuentra cambios (Potier *et al.* 1992).

En ratas viejas, la densidad de los receptores de NGF está disminuida en la DBB (Markram *et al.* 1990) y los niveles de NGF disminuyen hasta el 40% en el hipocampo (Lärkfors *et al.* 1987). Sin embargo, Alberch *et al.* (1991) no encontraron cambios en los niveles de NGF en la corteza cerebral ni el hipocampo de ratas envejecidas pero sí en el septo y el estriado. Abundando en el factor de crecimiento nervioso, alguno de los cambios asociados a la edad desaparecen en su presencia. La administración intraventricular de NGF revierte en parte la atrofia de los cuerpos neuronales colinérgicos en el septo y mejora el comportamiento en el laberinto de agua de Morris (Fischer *et al.* 1987). También aumenta la actividad ChAT, así como la liberación y la recaptación de acetilcolina (Williams *et al.* 1990, Williams *et al.* 1991).

A pesar de ser el basal de Meiner el núcleo colinérgico sobre el que se centra la mayor parte de los estudios, la enfermedad de Alzheimer también atañe a la vía SH. En individuos afectados por esta enfermedad, la actividad ChAT está disminuida en el complejo MS-DBB entre un 55 y un 65% (Henke *et al.* 1983), mientras que la pérdida neuronal en el núcleo alcanza el 70% (Arendt *et al.* 1985) aunque no está del todo claro que esta pérdida sea totalmente colinérgica. Además, se observan otros cambios neurodegenerativos como una atrofia del área septal (Allen *et al.* 1988). Para concluir cabe remarcar que el otro sistema colinérgico del SNC, el complejo pontomesencefalotegmental, se ve libre de daño durante la enfermedad de Alzheimer (Woolf *et al.* 1989).

**Recuadro 1.3: El laberinto de agua de Morris.**

Este método es una valoración de la memoria espacial de las ratas y se usa muy habitualmente en experimentación ya que la buena realización de esta tarea depende directamente del hipocampo. En esta prueba, se introduce al animal en una piscina llena de agua lechosa. La piscina contiene justo bajo la superficie del agua una plataforma que, de alcanzarla, permitiría escapar al animal. Una rata que realiza la experiencia por vez primera nadará por toda la piscina hasta que se tope con la plataforma (figura), momento en el que subirá a ella. No es necesario repetir la experiencia muchas veces para que una rata normal aprenda la localización espacial de la plataforma y la encuentre rápidamente (figura). Sin embargo, las ratas que sufren algún daño bilateral en el hipocampo parece que nunca recuerdan la localización de la plataforma.



Antes de aprender

Después de aprender

Esta prueba fue inventada por Richard Morris, un psicólogo de la Universidad de Edinburgo, para estudiar el posible papel de la LTP hipocampal en el aprendizaje de la localización espacial. Morris inyectó un antagonista del receptor NMDA en el hipocampo de unas ratas que luego fueron entrenadas en el laberinto de agua. A diferencia de los animales control, esas ratas nunca recordaban la localización de la plataforma. Demostrando de este modo que los métodos que bloquean la LTP afectan también a la memoria y el aprendizaje.

### **Función de la vía en el aprendizaje y la memoria**

Hace ya tiempo que se considera un hecho la participación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria (ver referencias en Jaffard *et al.* 1993). De igual manera, también se ha demostrado que el complejo MS-DBB tiene un papel importante en estos procesos, al menos por lo que respecta a sus proyecciones hacia la formación hipocampal (Barnes 1988, Squire 1992). Estudios de lesiones electrolíticas experimentales enfatizan el papel del sistema SH (y del hipocampo por sí mismo) en la orientación y la memoria espaciales. Así, existen evidencias de deterioro de la memoria inmediata tras una lesión septal (Poucet *et al.* 1990). Sin embargo, este tipo de lesión carece de especificidad, pues destruye tanto las neuronas septales como las fibras de paso hacia el hipocampo, tales como las de noradrenalina o de 5-hidroxitriptamina.

Los fármacos constituyen una herramienta más eficaz para probar las funciones del sistema SH. Experimentos de administración directa de inactivadores reversibles del septo medio como son la tetracaína y la lidocaína confirman el papel de este sistema en la adquisición de la memoria espacial a corto plazo (Givens *et al.* 1990, Poucet *et al.* 1991). Otras neurotoxinas como la fenoxibencilamina (un  $\alpha$ -antagonista) o la bicuculina (un GABA<sub>A</sub> antagonista) también lleva a un deterioro de la memoria inmediata (Chrobak *et al.* 1992). Por el contrario, la administración de 6-hidroxidopamina en el septo lateral facilita la realización de varias tareas (Galey *et al.* 1989). Todo ello indica que la función del sistema SH en la memoria y el aprendizaje está controlada, al menos parcialmente, por mecanismos monoaminérgicos y GABAérgicos.

Otros experimentos, empero, confirman la función de las proyecciones colinérgicas de la vía SH en la memoria inmediata. Tanto la administración sistémica como la local de escopolamina, u otros antagonistas colinérgicos, deterioran diversos tipos de tareas cognitivas de memoria en animales experimentales y en humanos (Levi *et al.* 1991). Además, los agonistas colinérgicos y los fármacos que incrementan el contenido en acetilcolina del hipocampo mejoran el funcionamiento cognitivo, al menos bajo ciertas condiciones experimentales (Levi *et al.* 1991). Sin embargo la contribución de las sinapsis colinérgicas hipocampales en este funcionamiento es difícil de valorar, ni siquiera

está claro si los efectos de los fármacos colinérgicos son debidos a su actuación sobre el SNC o el periférico (Rush *et al.* 1992).

Todos estos déficits funcionales observados tras lesiones del sistema SH son, hasta cierto punto, reversibles. Las neuronas colinérgicas septales pueden incrementar su capacidad de sintetizar y almacenar acetilcolina tras lesiones electrolíticas. Bajo estas condiciones, los niveles *in vivo* de colina y acetilcolina endógenas, así como el contenido de la acetilcolina sintetizada *de novo* en el hipocampo, son similares a los de animales control (Lapchak *et al.* 1991). Se desconocen los mecanismos para esta compensación, aunque se sabe que la recuperación es potenciada por varios factores neurotróficos, especialmente el NGF.

Finalmente, el hecho de involucrar a varios sistemas de neurotransmisión constituye una de las principales limitaciones a la hora de estudiar la vía SH, pues implica una falta de neurotoxinas específicas. Pero existe una serie de moléculas análogas al Glu y el Asp que pueden causar muerte neuronal al ser inyectadas en determinadas áreas cerebrales y que, por ello, son denominadas excitotoxinas. Estas excitotoxinas incluyen el kainato, el NMDA, el ácido iboténico el ácido quinolínico y el AMPA. Las lesiones excitotóxicas del septo llevan a consecuencias comportamentales similares a los problemas de aprendizaje relacionados con la edad, pero no alteran la función hipocampal tan profundamente como la lesión electrolítica o la inactivación septal. Igualmente, como ocurre con la edad avanzada, la actividad *theta* y la neurotransmisión colinérgica se encuentran parcialmente preservadas tras la lesión excitotóxica (Leung *et al.* 1994, Mizumori *et al.* 1990, Stewart *et al.* 1987). Así pues, las lesiones con análogos de los EAA en el área septal tienen una relevancia mayor que la lesión electrolítica o la inactivación del MS en el estudio de la contribución de la vía SH a los deterioros de memoria que acaecen con la edad.