REVISION BIBLIOGRAFICA

MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

N. Pavón, L. Vidal, L. Blanco, P. Alvarez, A. Torres, L. Alvarez y R. Macías.

Centro Internacional de Restauración Neurológica, Avenida 25, No. 15805 entre 158 y 160, Playa, Código Postal 11300, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de febrero de 1997.

RESUMEN. En los últimos años se ha reconocido que la muerte celular puede ser consecuencia no sólo de un daño accidental, sino también, la expresión de un programa de suicidio. A esta forma de muerte se le conoce actualmente como apoptosis, y es un proceso morfológicamente distinto de la muerte celular accidental o necrosis; no ocasiona una respuesta inflamatoria. Su importancia radica en su naturaleza activa y en su potencial para controlar sistemas biológicos. Al parecer, la maquinaria básica para el desarrollo de la apoptosis está presente en casi todas las células de los mamíferos. La decisión de muerte celular puede estar influenciada por gran cantidad de estímulos, tanto intracelulares como extracelulares que desencadenan la activación de un complejo programa genético. Este tipo de muerte está involucrado en el desarrollo y la homeostasis, pero también en enfermedades como el cáncer, las infecciones virales, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas.

ABSTRACT. In the last few years it has been recognized that cell death could be not only the consequence of accidental injury, but the expression of a cell suicide program. This form of cell death is currently called apoptosis, and it is a morphologically distinct process of accidental cell death; it does not induce any inflammatory reaction. The importance of this kind or death arise from its active nature and its potential for controlling biological systems. The basic machinery to carry out apoptosis appears to be present in essentially all mammalian cells. The decision of a cell to die can be influenced by a wide variety of stimuli that could be intracellular or extracellular and induce a complex genetical program. This form of death plays a major role during development, homeostasis, and in many diseases including cancer, viral infections, autoimmune diseases, and neurodegenerative disorders.

INTRODUCCION

La muerte celular fue reconocida por primera vez como una característica regular en el desarrollo de los vertebrados hace aproximadamente 70 años. En las dos últimas décadas se ha enfatizado en el estudio de los mecanismos de degeneración y muerte celular como un punto crucial para comprender los eventos celulares que caracterizan a varias enfermedades y al envejecimiento.[1-6] El Sistema Nervioso (SN), el Sistema Inmunológico (SI) y la piel constituyen los mejores modelos para el estudio de la muerte celular: en el primer caso, por su gran especialización e imposibilidad de recambio celular; y en el segundo, por sus bien conocidos mecanismos de diferenciación y maduración.

Los mecanismos de muerte celular juegan un papel importante durante el desarrollo y la homeostasis, pues constituyen el principal mecanismo regulador del fenotipo y el número de células que conforman los tejidos. Es la vía a través de la cual se restituye el número de linfocitos T después de la activación inmune; sirven como mecanismo de defensa para eliminar células potencialmente dañinas, como los linfocitos autorreactivos, células infectadas por virus y células tumorales.[7-10] La muerte neuronal es un aspecto común durante el desarrollo en el SN y representa una vía de diferenciación alternativa.[11,12] Como en otras vías y mecanismos de diferenciación, esta resulta de eventos intracelulares que probablemente implican la regulación de la expresión de productos de genes específicos.[2,4,13,14] La muerte celular puede ocurrir por dos secuencias de eventos diferentes: necrosis o apoptosis, que operan en todos los tejidos y se conservan aparentemente en todas las especies, lo cual ha facilitado el estudio de sus mecanismos básicos.

La necrosis es una forma patológica de muerte celular, resultante de un daño celular irreversible, la cual se caracteriza por una dilatación del citoplasma, con lisis de la célula y liberación de su material citoplasmático al medio, el cual frecuentemente dispara una respuesta inflamatoria.[7,8,15]

La apoptosis, en cambio, es un proceso morfológico, bioquímico y molecularmente distinto de la necrosis. Ocurre a través de la activación de un complejo programa genético, capaz de desencadenar la muerte celular. Está presente en prácticamente todas las células de los mamíferos y tiene una función complementaria y opuesta a la proliferación celular. Como consecuencia de esto, se considera un proceso fisiológico.[3,7,8,15]

En los últimos años, se ha profundizado mucho en los mecanismos genéticos que operan en este último tipo de muerte; así como en sus características morfológicas. Sin embargo, la extensión de conclusiones de estudios *in vitro* a sistemas *in vivo* ha generado cierto grado de confusión, en parte por el uso indiscriminado del término apoptosis y, en ocasiones, por la carencia de métodos bien establecidos para discriminar la apoptosis de la necrosis. Por otro lado, ambos tipos de muerte celular, aunque diferentes, pueden ser inducidas por un mismo agente en dependencia del tipo de célula y de las condiciones experimentales.[15,16]

Se han reportado muchas señales diferentes, originadas tanto en el interior como en el exterior de las células, capaces de influir en la decisión de muerte.[17-20] Estos diversos estímulos pueden actuar suprimiendo o promoviendo la activación del programa suicida.

La activación inapropiada de los mecanismos apoptóticos puede causar, o contribuira que se procuzca una variedad

de enfermedades, caracterizadas por deplobación neuronal específica y exagerada. El concepto de que los mismos mecanismos que participan en la degeneración provocan finalmente la muerte celular crónica ha representado un gran paso de avance. La deficiencia de factores tróficos, el estrés oxidativo, el incrementoen las concentracionesde Ca^{2+}, el fallo energético mitocondrial y la excitotoxicidad han sido postulados como mecanismos implicados en la muerte celular presente en enfermedades agudas y crónicas del SN.[1,3,12,15,21-23]

Actualmente ha aparecido un número sustancial de evidencias que relacionan la pérdida de poblaciones neuronales que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas con la apoptosis.[1,3,24,25] Estas enfermedades constituyen un grupo de afecciones del SN cuya etiología es aún desconocida. En ellas existen evidencias de un incremento acelerado de depoblación neuronal, provocado por atrofia o muerte de poblaciones neuronales específicas. En estas últimas, es posible identificar lesiones neuropatológicas patognomónicas por acumulación o inclusión de sustancias estructuralmente anormales. Clínicamente se caracterizan por manifestaciones de disfunción específica en uno o varios circuitos neuronales, un curso lento y gradualmente progresivo que puede durar varios años.[26] De lo dicho hasta aquí, se desprende que la muerte celular ocurre comúnmente en el SN tanto en períodos críticos del desarrollo, como de manera secundaria a una lesión, en el curso de enfermedades neurodegenerativas o como manifestación propia del envejecimiento cerebral. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* el efecto del factor de crecimiento de nervio (FCN) y otros factores tróficos (factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía) sobre la supervivencia celular y el balance oxidante-capacidad detoxificante.[12,27,28] Se ha profundizado, además, en los mecanismos por los cuales se produce el daño celular en el SN y el grado de alteración de los mecanismos de transducciónde señales que codifican ese daño. Existen aún dudas sobre si el daño por incremento de radicales libres se debe a un déficit de actividad trófica, a anormalidades en los aminoácidos excitatorios, a un proceso de inactivación receptorial o a un deterioro del metabolismo energético que determina la generación de especies reactivas de oxígeno y hacen a las células más vulnerables. Por ello, la posibilidad de manipular farmacológicamente estos procesos brinda opciones terapéuticas protectoras para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Este abordaje racional de la patogénesis de lesiones neuronales establece una estrategia tendiente a disminuir la velocidad de progresión de las enfermedades, en tanto se logra definir su etiología y establecer su tratamiento causal.

El presente trabajo tuvo como objetivo revisar la información relacionada con los mecanismos de muerte celular inducida o programada que tienen lugar en el sistema nervioso y la relación que tienen éstos con la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas.

Mecanismos de muerte celular

Necrosis

Antes de haber sido descrita la apoptosis como un fenómeno fisiológico, solamente se entendía la muerte celular como resultado de un proceso patológico. Esta muerte, llamada necrosis, ocurre como consecuencia de una amplia gama de condiciones negativas para la célula (hipertermia, hipoxia, isquemia, reacciones inmunológicas, sustancias tóxicas).[15,25,29,30]

Los primeros cambios morfológicos que se observan en una célula bajo necrosis se caracterizan por: edema del citoplasma y sus organelos, especialmente de las mitocondrias, con pocos cambios nucleares.[8] Un daño directo en las membranas o una depresión energética en la célula, lleva a una disminución en la actividad de sus bombas iónicas de intercambio y, por tanto, a la pérdida de la capacidad de las membranas para controlar la presión osmótica. Los iones comienzan a moverse a través de la membrana siguiendosus gradientes de concentración, arrastrando líquidos, lo que provoca el edema celular.[7,8] El aumento en las concentraciones intracitoplasmáticas de Ca^{2+} provoca la activación de fosfolipasas que degradan los fosfolípidos de la membrana, provocando su ruptura[1,23,31] y la liberación de enzimas lisosomales que degradan otras estructuras. El ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear, expuesto por la digestión proteolítica de las histonas, es degradado por desoxirribonucleasas ribosomales en fragmentos de múltiples tamaños.[7,8] La disolución de los organelos y la ruptura de la membrana plasmática, ocasiona la salida del contenido intracelular al espacio exterior, donde se desarrolla una respuesta inflamatoria que afecta generalmente a grupos celulares contiguos.

En resumen, la necrosis se caracteriza morfológicamente por edema y lisis celular, con respuesta inflamatoria acompañante. La cromatolisis es tardía y no hay evidencias iniciales de autodigestión, por lo que conceptualmente define un mecanismo citotóxico e inflamatorio.

Apoptosis

Kerr y colaboradores,[32] fueron los primeros en distinguir la apoptosis como una forma de muerte celular presente de manera fisiológica en los tejidos de los vertebrados. El término apoptosis (del griego antiguo apó: prefijo que significa origen, derivación o declinación y ptosis: caída) significa "deshoje o caída de los pétalos de las flores" [33] y se utiliza para distinguir una forma morfológicamente distinta de muerte celular. Constituye un evento programado, con caracteres morfológicos diversos y mediadores distintos. Los signos que disparan la muerte celular apoptótica (que no es el único, pero sí el principal mecanismo de muerte programada) son diversos, y pueden venir del medio exterior o derivarse de señales internas en dependencia del tipo de célula. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la muerte son los mismos, es decir, existe una vía final común.[1,2,34]

Los primeros cambios ultraestructurales que se observan en las células apoptóticas son la pérdida de uniones celulares y de otras estructuras especializadas de la membrana como las microvellosidades.[7,8] El núcleo se condensa y adquiriere una coloración intensa en presencia de colorantes basófilos; la cromatina converge en una o varias masas de gran tamaño y posteriormente, la célula se encoge por la fuerte condensación citoplasmática producida por la pérdida de iones y líquido intracelular.[2,3,11,15,34] Se piensa que la pérdida de iones ocurre isotónicamente, aunque no se ha explicado de manera satisfactoria.[7] La membrana plasmática adopta una configuración arrugada que le confiere a la célula un aspecto de exceso de membrana.[2,7,8] La célula atraviesa por profundos cambios en su citoesqueleto, pues existen ejemplos en los que la ruptura de este lleva a la apoptosis, mientras que su estabilización la inhibe.[2,34] Finalmente, el núcleo se fragmenta y la célula se divide en varios cuerpos apoptóticos rodeados de membranas que mantienen sus gradientes osmóticos, y que contienen en su interior fragmentos nucleares y organelos citoplasmáticos.[7,9,34] Es posible que las células

apoptóticas refuercen sus membranas contra los riesgos de lisis por activación de enzimas como la transglutaminasa.[7,8] No se han encontrado lesiones específicas en los organelos citoplasmáticos, aunque puede necesitarse una búsqueda más profunda. Los cuerpos apoptóticos, que varían en volumen y cuyo número depende del tamaño de la célula, son fagocitados por células vecinas que generalmente son monocito-macrófago, aunque también pueden ser células epiteliales normales, células endoteliales o tumorales.[2,8,9,34]

Se cree que la membrana de los cuerpos apoptóticos posee potentes estímulos para la fagocitosis, mediados por: el receptor de vitronectina en la célula fagocítica, el receptor de trombospondín (CD36), la fosfatidilserina, varias opsoninas (región constante de las inmunoglobulinas, componentes C3b e iC3b del complemento y productos finales de glicosilación avanzada de proteínas), y lectinas (inhibidas por azúcares simples como la *N*-acetilglucosamina, glucosamina o manosamina sobre neutrófilos).[7,8,35] Como los cuerpos apoptóticos están sellados y son fagocitados, su contenido no se vierte en el líquido extracelular y no se produce inflamación. Una vez ingeridos estos cuerpos apoptóticos son rápidamente degradados.[2,7,8,34]

En síntesis, la apoptosis se caracteriza por cromatolisis, autodigestión y fagocitosis; no hay lisis celular, edema ni inflamación. Conceptualmente implica un mecanismo de autoselección para la eliminación de células.

El estudio de los mecanismos apoptóticos se dificulta debido a la baja proporción de células apoptóticas en los tejidos. La mayor parte de éstos se han realizado en modelos experimentales, fundamentalmente en timocitos inducidos a padecer apoptosis por glucocorticoides.[10,15] Otros trabajos se refieren a líneas linfoides (P1798 de linfosarcoma, WEHI-70 de timoma murino, etc.) que parecen tener características semejantes a la apoptosis linfocitaria.[36]

La relación temporal entre los eventos bioquímicos y los cambios morfológicos no se ha caracterizado bien. En los primeros 15-20mi n se inhibe la incorporación de glucosa como resultado de la disminución de su transporte, con cambios importantes en el balance energético. Aproximadamente a la hora disminuye el transporte de varias sustancias, la síntesis de proteínas y ácido ribonucléico mensajero (ARNm) y comienza la degradación de estos últimos.[7, 8, 28]

El patrón exacto de cambios en la célula apoptótica varía de un tipo celular a otro, pero de manera general la cromatina se condensa, se colapsa en parches que quedan adheridos a la membrana nuclear y finalmente, se separan en una o varias esferas densas. Este cambio está clásicamente acompañado por fragmentación del ADN en una escalera de subunidades irregulares de 180-200 pares de bases aproximadamente (tamaño del ADN envuelto alrededor de los octámeros de histona en los nucleosomas). Esta fragmentación es el resultado de rupturas aparentemente aleatorias en las regiones de unión de los centros nucleosomales. Puede haber cerca de un millón de estas rupturas en cada célula, situación que no puede ser reparada e implica el cese de la transcripción. Este es un mecanismo temprano en el evento apoptótico.[2,4,34,37, 38]

Influencia de la ruptura del ADN y la síntesis de proteínas

Dada la prominencia de los cambios nucleares en la fase temprana de la apoptosis, se ha sugerido que las células mueren debido a la ruptura endonucleolítica de su ADN. La ruptura del ADN se produce varias horas antes de que la viabilidad celular comience a disminuir y puede durar de 1 a 2 h. Se ha demostrado que el Zn^{2+}, inhibidor de endonucleasas endógenas, inhibe tanto la degradación del ADN como la apoptosis.[7,8] Asimismo, varios investigadores han reportado que el ácido aurintricarboxílico, inhibidor de nucleasas, inhibe todos los aspectos de la apoptosis.[2] Sin embargo, esto último no permite concluir que la destrucción del ADN sea el paso crítico, ya que la aurina inhibe muchas otras reacciones metabólicas.

El análisis de los productos de fragmentación en timocitos inducidos a padecer apoptosis por glucocorticoides reveló que la ruptura es llevada a cabo por una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} yM g^{2+}, con actividad de degradación internucleosómica. Esta enzima se encuentra en el citoplasma y en el núcleo, probablemente unida a la cromatina donde posee actividad específica y una vida media corta.[2,23,31] El aumento del Ca^{2+} intracelular, unido a la gran fragmentación del ADN en células apoptóticas, hace pensar que una de las funciones del flujo de Ca^{2+} sea la activación de una nucleasa Ca^{2+} dependiente.

No obstante, existen hallazgos contradictorios relacionados con esta teoría. El proceso de muerte por apoptosis ocurre más rápido que la muerte por el cese de la transcripción; por tanto, a pesar de las evidencias anteriores, en la iniciación de la apoptosis tienen que estar involucrados otros procesos extranucleares.

Las células sin núcleo son fisiológicamente activas por un tiempo considerable y pueden ser inducidas a los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis. Por otra parte, los núcleos aislados pueden exhibir condensación y degradación oligonucleosomal del ADN en un medio libre de células.[2] Estas observaciones implican que muchos factores pueden contribuir a la muerte programada, y que los diferentes compartimentos celulares inician los cambios estructurales de la apoptosis con una autonomía considerable.

Los inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas pueden prevenir la muerte en varias líneas celulares.[2,8] Esta observación sugirió que la muerte es causada por un programa genético que involucra la síntesis de proteínas. Pero esto no es un hallazgo universal, pues existen algunas líneas celulares (leucemina humana HL-060 y linfoma murino S-49) en las que la inhibición de la síntesis de proteínas no sólo no bloquea la inducción de apoptosis, sino que la estimula.[7] Esto último ha hecho pensar que las moléculas que ejecutan la apoptosis, como las endonucleasas endógenas, están presentes constitutivamente en las células y que son inhibidas o controladas por la presencia continua de inhibidores.

Algunos aspectos fundamentales de la apoptosis no requieren de transcripción de nuevos genes. En células cuyos núcleos se han extraído, pueden inducirse los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis, si se privan de factores de crecimiento, o son tratadas con altas concentraciones de estaurosporina (inhibidor de proteína-quinasas).[2]

De estas evidencias es posible inferir que el requerimiento de la síntesis de ARN y proteínas para la inducción de la muerte celular en determinadas situaciones puede ser más un reflejo de la necesidad de sintetizar moléculas reguladoras de un mecanismo existente, que de la síntesis de componentes que llevan a cabo el programa de muerte. Sin embargo, dada las características especializadas y la naturaleza terminal del proceso de apoptosis, lo más probable es que se requiera la síntesis de al menos algunos componentes destinados a este proceso.

Vías de señalización involucradas en la activación del programa apoptótico

Se han identificado algunas alteraciones características relacionadas con los mecanismos bioquímicos de la apoptosis: aumento del Ca^{2+} intracelular, activación de proteína-quinasa A (PKA) e inactivación de la proteína-quinasa C (PKC), activación de proteínas receptoras de señales tróficas y la regulación por ceramidas.

Papel del calcio. Uno de los primeros cambios detectables en una célula bajo apoptosis es un aumento rápido y mantenido de la concentración intracelular de Ca^{2+}. Este aumento alcanza niveles máximos entre los 30-90mi n y se mantiene por 2 h[23,31] Aún cuando se ha descrito en algunas líneas celulares que desarrollan apoptosis (línea linfoide CEM-C7) la presencia de una actividad nucleasa independiente de Ca^{2+}, generalmente el papel de la elevación del Ca^{2+} en la apoptosis consiste, entre otras cosas, en activar directamente a las endonucleasas responsables de la degradación del ADN.[2,7,8,23,31] Sin embargo, por el momento no es posible adjudicarle al Ca^{2+} el papel de regulador universal de la apoptosis, pues se ha descrito que el aumento de Ca^{2+} intracelular inhibe la apoptosis en células de ganglios simpáticos después de la privación de factor de crecimiento de nervio, y en la línea de células pre-B (BAF-3) después de la privación de interleucina 3.[28,39] A pesar de estos hallazgos el Ca^{2+}, como cofactor enzimático universal, pudiera tener un papel protagónico en los eventos determinantes de la apoptosis.

Papel de PKA y PKC. Existen reportes contradictorios acerca de la relación de las PKA y PKC con la apoptosis. Se conoce que el aumento del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intracelular, activador de la PKA, induce la apoptosis.[2,40] Este efecto se obtiene utilizando análogos del AMPc o agentes que favorecen su aumento (prostaglandina E2 y adenosina). Por otro lado la PKC regula negativamente la muerte celular (los ésteres de forbol, activadores de la familia de PKC, protegen a los timocitos de la muerte inducida por glucocorticoides). La fosfolipasa C (FLC) también bloquea el proceso apoptótico; esta escinde al fosfatidilinositol-4,5-difosfato presente en la membrana en 1,4,5-trifosfato de inositol y diacilglicerol (DAG); este último activa a la PKC.[40] No obstante, existen otros autores que reportan que la PKC tiene un efecto contrario; es decir, de regulación positiva sobre la apoptosis.[36] Es posible que el balance de la transmisión mediada por estos transmisores intracelulares, facilite o limite la expresión de los mecanismos apoptóticos.

Fas. El Fas es una proteína de membrana que pertenece a la familia de los receptores para el factor de necrosis tumoral y el FCN, denominada también APO-1. Esta familia incluye dos receptores para el factor de necrosis tumoral (R1 y R2), el receptor de baja afinidad de FCN (p75), así como otras proteínas de membrana.[19] En una célula que exprese Fas, tanto naturalmente como por transfección, el entrecruzamiento de este por anticuerpo, o ligando Fas, induce apoptosis.[2,19] La muerte celular a través de la activación del Fas no requiere de la presencia de núcleo o de fragmentación del ADN. El Fas dispara una vía de muerte que es independiente del Ca^{2+} extracelularyn or equiered el as intesisd e macromoléculas.

La variabilidad de la respuesta ante signos originados por la estimulación de Fas puede depender de la disponibilidad de moléculas intracelulares para unirse a la región intracitoplasmática del Fas, o de otras moléculas como la Bcl-2 y proteínas relacionadas que modulan la muerte celular. La muerte celular inducida por Fas es parcialmente inhibida por sobreexpresión de Bcl-2 y completamente inhibida por coexpresión de Bcl-2 y su proteína de unión BAG-1.[13]

Papel de las ceramidas. Una gran cantidad de investigaciones, particularmente en la última década, han establecido el papel de los glicerolípidos de membrana en la transducción de señales. Los esfingolípidos comprenden un tipo de lípidos que contienen esfingosina o bases esfingoides relacionadas, dentro de la cual se encuentra la esfingomielina. La ceramida es un producto que resulta de la ruptura por esfingomielinasas de la esfingomielina presente en la membrana plasmática y el citoplasma. Es un mensajero intracelular que media efectos de diferenciación, apoptosis y detención del ciclo celular.[20,41]

Las ceramidas pueden ser tóxicas, existen evidencias que sugieren que estas pueden mediar mecanismos apoptóticos inducidos por dexametasona, entrecruzamiento de anticuerpos, ligando Fas y ausencia de suero en el medio de cultivo.[19,41] La adición de ceramida C2 al medio de cultivo de células sintéticamente permeables es capaz de inducir apoptosise nm enos de3h.L aa dición de esfingomielinasao ceramida extracelular trae como consecuencia la inducción de muerte celular con fragmentación del ADN y células con morfología apoptótica. La señalización por ceramida puede tener lugar por medio de una proteína-quinasa (PK) y de una proteína fosfatasa. Sus efectos sobre la muerte celular programada pueden ser inhibidos por Zn^{2+} ys eh as ugeridoq ue involucra endonucleasas Ca^{2+} dependientes.[20, 41]

La ceramida ha sido propuesta como uno de los mediadores que participan en el sistema de señalización activado por el Fas.[18,19] Cuando varias células que portan Fas son incubadas con anticuerpo anti Fas durante 5 min, la actividad de la esfingomielinasa ácida se incrementa, así como la cantidad de ceramida.[18,20,42]

Regulación genética

La supervivencia y muerte de la célula está bajo el control de un programa genético. Algunos genes individuales se han asociado con la apoptosis a través de dos vías diferentes: los que son expresados en células bajo apoptosis, o los que afectan la modulación del proceso.

Muchos de los conocimientos actuales acerca de los genes específicos de muerte celular se derivan de estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* ye nl a mosca *Drosophila melanogaster*.[2,34,42-44] La muerte celular programada en el *C. elegans* puede ser dividida en cuatro pasos diferentes: decisión de la célula de morir, muerte de la célula, incorporación por el fagocito de los fragmentos de la célula muerta y degradación de éstos. Se han aislado mutaciones que afectan cada uno de estos pasos y se han definido 14 genes diferentes que funcionan en la apoptosis en nemátodos. Se ha observado que tres de estos genes afectan la ejecución de la muerte en todas las células somáticas: ced-3, ced-4 y ced-9.[2,44] Dos de estos genes, ced-3 y ced-4, se requieren para que ocurra la muerte en una célula viva y el tercero, ced-9, para la supervivencia de la célula. Este último gen codifica una proteína que es homóloga a la familia Bcl-2 de reguladores de muerte en células humanas.[2,13, 44] La conservación de estos mecanismos a lo largo del desarrollo de las especies permite extrapolar estos resultados obtenidos en nemátodos, a otras especies.

Ambos genes, ced-3 y ced-4, han sido clonados y molecularmente caracterizados. El gen ced-3 codifica una proteína que es similar a la familia de las cisteína proteasas, la cual incluye a la enzima convertidora de interleucina 1ß. La sobrex-

presión tanto de ced-3 como de la enzima convertidora de interleucina 1ß en células de mamíferos causa apoptosis.[44]

El protoncogén c-myc y su producto Myc pueden desempeñar un papel importante en la regulación entre la proliferación y la apoptosis. C-myc es uno de los genes de respuesta rápida, conjuntamente con c-fos y c-jun.[45,46] Estos tres genes son inducidos rápida y transitoriamente por un gran número de factores de crecimiento y éstos, a su vez, pueden inducir la síntesis de neurotrofinas. Myc está comúnmente implicado en mediar la transición de células del reposo a la proliferación, mientras que el c-fos induce muerte neuronal.[17,45] Pudiera ser que el c-myc programe una célula para crecer, y si esto es impedido (por carencia de factores de crecimiento o nutrimentos, presencia o falta de hormonas o la activación de un segundo oncogen) la célula se suicida.[17]

El antioncogén p53 ha sido también asociado con la apoptosis, los productos de este gen detienen la proliferación, y pueden inducir a la célula hacia su diferenciación. El p53 puede causar apoptosis cuando se expresa en células mieloides o epiteliales.[47] Las células progenitoras mieloides que portan p53 mueren continuamente si no está presente una señal apropiada de diferenciación y proliferación.[7,8] Se ha postulado que el verdadero papel de p53 puede ser detener a una célula dañada en la fase G1 de su ciclo celular, mientras el daño es reparado. Si la célula se opone al bloqueo de G1, p53 puede activar el programa de suicidio. Parece que p53 actúa en la apoptosis predominantemente en respuesta a un daño cromosomal previo.[7,8,47]

El oncogén bcl-2 actúa aumentando la supervivencia celular, pues previene a las células de la apoptosis, aunque no lo hace bajo cualquier circunstancia.[13,14,34,42,48-50] La proteína Bcl-2 se ha encontrado de forma integral en membranas mitocondriales,[42] lo que representa una posición interesante dentro de la célula para ejercer su influencia. La sobrexpresión de bcl-2 en los linfomas foliculares ejerce su efecto por la abolición de apoptosis en una población celular que normalmente está destinada a morir.[13,14]

En resumen, el camino hacia la vida o la muerte de una célula está finamente regulado por la expresión de determinados genes. Aún cuando no se conoce la causa desencadenante de la muerte celular presente en enfermedades neurodegenerativas, es posible especular que al menos algunas puedan estar vinculadas con una expresión alterada de los genes que regulan la muerte celular. La expresión exagerada tanto de alguno de los que favorecen los mecanismos apoptóticos, como de los que codifican proteínas estimuladoras de estos últimos, favorece la muerte celular apoptótica de grupos neuronales presente en estas enfermedades. La detección de la sobreexpresión de proteínas codificadas por estos genes puede ayudar en el diagnóstico precoz de estas enfermedades, por constituir verdaderos marcadores biológicos de la activación de mecanismos apoptóticos.

Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas

Numerosos reportes sugieren que la muerte que ocurre de manera fisiológica en el SN es debido a apoptosis en la que se involucra la expresión de un programa genético en la célula que muere, mientras que los mecanismos patológicos evolucionan a través de necrosis. Sin embargo, actualmente se conoce que la apoptosis no sólo puede estar asociada con el desa-rrollo, sino también con algunos estados neuropatológicos clínicamente importantes, tales como accidentes vasculares y enfermedades neurodegenerativas en el SN de adultos, que incluyen Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), entre otras.[1,3,15,25,51-53]

Los mecanismos por los cuales se desencadena la muerte neuronal aún no han sido completamente dilucidados. En enfermedades neurodegenerativas, accidentes vasculares y epilepsia, existe el consenso de que la deficiencia de factores neurotróficos, los mecanismos excitotóxicos, el estrés oxidativo, el aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, el óxido nítrico (NO) y el defecto mitocondrial pueden mediar la activación del programa de muerte celular.

Factores tróficos

Durante el desarrollo del SN en vertebrados, el 50 % o más de las neuronas muere normalmente durante la embriogénesis.[12] Esta muerte celular constituye el proceso que limita el número de neuronas y permite interconexiones óptimas entre neuronas y entre estas y glías.[9,11,12,43,54-56]

La teoría neurotrófica provee de un soporte conceptual para la comprensión de la muerte neuronal masiva que ocurre durante el desarrollo en el SN de mamíferos. Está basada en dos preceptos importantes:

1. En los vertebrados desarrollados, la supervivencia de neuronas depende de factores neurotróficos específicos secretados por las células que ellas inervan.[2,11,12,28]
2. Muchos tipos de neuronas se producen en exceso; por tanto, solamente una proporción de ellas dispondrá de suficiente suplemento neurotrófico, proveniente de sus células blanco, para sobrevivir.[2,12]

Este mecanismo neurotróficoresulta ventajosopara el SN. Asegura que las neuronas que proyectan a un blanco inapropiado sean automáticamente eliminadas (debido a que no reciben el factor neurotrófico que requieren para sobrevivir) y contribuye a que prevalezcan las sinapsis apropiadas. Hace que todas las células blanco sean inervadas y por último, ayuda a que exista una correspondencia proporcional entre el número de neuronas y las células blanco que ellas inervan.[2,11,12]

Las mayores evidencias que soportan esta teoría neurotrófica provienen de neuronas sensoriales y simpáticas dependientes de FCN para su desarrollo, durante el cual la mitad de ellas normalmente muere.[2,28,37,57]

Las neuronas en desarrollo no dependen exclusivamente de signos provenientes de sus blancos para sobrevivir. Sobre ellas también influyen conexiones aferentes, hormonas y factores gliales. La oligodendroglía depende, para su supervivencia, de factores provenientes tanto de astrocitos como de neuronas.[12,34] Por tanto, el control de la supervivencia celular es un fenómeno mucho más complejo que lo que se esboza en la teoría neurotrófica.

La potente acción de los factores neurotróficos sobre la supervivencia celular durante el desarrollo ha sugerido la posibilidad de que éstos mejoren algunas enfermedades neurodegenerativas. Aunque no se ha demostrado, es posible que el déficit de estos factores pueda contribuir con la etiopatogenia de estas enfermedades.[3,6,12,57-59]

Un aspecto muy importante, aún no resuelto, es el mecanismo de acción a través del cual los factores neurotróficos estimulan la supervivencia neuronal. Se han postulado varias hipótesis, entre ellas, la posibilidad de que los factores neurotróficos induzcan la síntesis de enzimas secuestradoras de radicales libres (glutatión reductasa, superóxido dismutasa) y de un inhibidor de proteasas. Se conoce que la neurotrofina 3, y en menor grado el factor neurotrófico derivado del cerebro,

causan un marcado incremento en el ARNm para calbindín (una proteína que se une al Ca^{2+}); por tanto, puede ser que su efecto esté mediado en parte por un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares.[6]

A pesar de que no es posible asociar hasta el momento el déficit de factores tróficos con la etiológica de ninguna de las enfermedades neurodegenerativas, su función inhibitoria de la muerte celular permite postular su uso como terapia protectora, dirigida a conservar las poblaciones celulares aún no degeneradas en estas enfermedades.

Excitotoxicidad

Las crecientes evidencias experimentales y clínicas concernientes a la posible toxicidad de los aminoácidos excitatorios (AAE) han dado lugar a la teoría excitotóxica. Esta teoría postula la posibilidad de que niveles excesivos de glutamato endógeno, o una hipersensibilidad de sus receptores puedan mediar varios de los hallazgos que caracterizan a la degeneración neuronal.

Los AAE son aminoácidos, que además de realizar las funciones metabólicas y estructurales comunes, se utilizan también como comunicadores en el SN. Su potencial excitador ha sido ampliamente reconocido y actualmente se consideran como los neurotransmisores excitatorios más importantes.

Los AAE, entre los cuales se encuentran el L-aspartato y el glutamato, interactúan con diferentes receptores que pueden estar ligados a canales iónicos (ionotrópicos) como los de NMDA (*N*-metil-D-aspartato), los de kainato y de AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico), o ligados a proteínas G (metabotrópicos) como el de L-AP4 (ácido L-2-amino-4-fosforopropiónico) y de ACPD (ácido aminociclopentildicarboxílico).[60-62] Aunque todos pueden mediar la muerte celular, tanto apoptótica como necrótica, desencadenada por mecanismos excitotóxicos, son los NMDA los que tienen una acción más relevante y los que se encuentran más ampliamente distribuidos en el cerebro.[1,15,63-67]

Los receptores ligados a canales iónicos permiten el flujo de Ca^{2+}, Na^{+} y K^{+}. Después que estos iones atraviesan el canal, ocurre un conjunto de efectos que incluye cambios en los potenciales de membrana mediados por iones, activación de la cascada del inositol trifosfato, fosforilación de proteínas y otros.[1,60-62]

Las primeras evidencias de excitotoxidad fueron aportadas por Lucas y Newhouse en 1957, quienes mostraron que la administración de glutamato en ratones producía degeneración retineal. Más tarde, Olney y colaboradores demostraron la correlación existente entre los efectos neurotóxicos y la potencialidad neuroexcitatoria de algunos aminoácidos administrados en el hipotálamo. Estas lesiones fueron selectivas para las neuronas cuyos cuerpos se encontraban en regiones de alta densidad de receptores para glutamato. Olney le llamó excitotoxinas a este grupo de AAE que parecían destruir neuronas por su acción despolarizante.

Aunque la activación de los receptores glutamatérgicos es un paso clave en la secuencia de eventos que conducen a la degeneración neuronal, no es lo único que se necesita. Existen varias observaciones que avalan la afirmación anterior:[1,15,62-65]

- La densidad de receptores glutamatérgicos se correlaciona poco con la sensibilidad neuronal a la excitotoxicidad.
- A pesar de la presencia de receptores glutamatérgicos sobre axones y terminales sinápticas, estas estructuras se conservan después de una respuesta degenerativa directa.
- La deaferentación de regiones cerebrales, especialmente las que tienen inervación glutamatérgica, disminuye marcadamente la acción neurotóxica de los agonistas de los receptores NMDA y kainato.
- La degeneración neuronal ocurre horas después de una breve activación de los receptores.

Estas investigaciones han motivado un marcado interés en el estudio de los mecanismos activados por receptores glutamatérgicos que inducen muerte neuronal.

Estudios en cultivo de tejidos indican que la muerte neuronal mediada por receptores glutamatérgicos, puede seguir dos vías diferentes: una forma aguda y una retardada.[65,66] La neurotoxicidad aguda se caracteriza por una dilatación de la célula en presencia de agonistas glutamatérgicos, que trae como consecuencia la lisis osmótica de la neurona (necrosis). Los dos iones responsables de la entrada masiva de agua en este caso son el Na^{+} y e IC I^{-}. La segunda forma de degeneración neuronal es mediada por mecanismos dependientes de Ca^{2+}. Este último puede mediar la muerte celular por varios mecanismos que incluyen activación de proteína-quinasas, fosfolipasas A_2, óxido nítrico sintetasa, proteasas, generación de radicales libres, daño mitocondrial e inhibición de la síntesis de proteínas.[1,2,15,24,64-70]

Estrés oxidativo

El daño oxidativo proviene de la tendencia incontrolada de las especies reactivas de oxígeno a causar reacciones en cadena con una gran cantidad de moléculas, predominantemente lipídicas, lo que impide frecuentemente las funciones de estas y genera nuevos compuestos inestables que se comportan como donantes de electrones.[1,30] Se conoce que muchas formas de daño tisular pueden ser generadas por una sobreproducción de estas especies.

Las especies reactivas de oxígeno son átomos o grupos de átomos que tienen generalmente corta vida y que poseen un electrón no pareado que puede formar enlaces covalentes. Este electrón excedente hace al átomo muy reactivo.[1,30] Normalmente las especies reactivas de oxígeno son generadas en las células como parte de la fosforilación oxidativa durante la reducción del oxígeno, pero existen mecanismos de protección para prevenir el daño que estas pueden provocar.

El oxígeno se convierte en radical superóxido ($^{\bullet}O_2^{-}$), y luego en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), antes de ser convertido en agua. Como el $^{\bullet}O_2^{-}$,ya ún más el radical $^{\bullet}OH$, pueden ser altamente tóxicos, están normalmente unidos a las enzimas de la fosforilación oxidativa.[1,15,21,30] Además, existen enzimas que inactivan los radicales si estos salen de la cadena del citocromo o son generados patológicamente. La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa son las enzimas responsables de la degradación del $^{\bullet}O_2^{-}$ ye IH $_2O_2$.[1,21,30] Existen tres formas distintas de SOD, codificadas por tres genes diferentes en las células eucariotas. La SOD-CuZn que se encuentra en el citoplasma de las células, otra forma de SOD-CuZn extracelular que se encuentra en concentraciones muy bajas en los fluidos extracelulares y plasma y la SOD-Mn. La catalasa es escasa en el cerebro, en comparación con la glutatión peroxidasa intraneuronal.[1] Por último, existe una variedad de antioxidantes, como el glutatión reducido, el ácido ascórbico (vitamina C) y el α-tocoferol (vitamina E) que pueden secuestrar radicales libres e inactivarlos.[27,29,71,72]

El cerebro consume una cantidad desproporcionada del oxígeno del cuerpo, pues la energía que utiliza proviene casi exclusivamente del metabolismo oxidativo que tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial. La mitocondria se encuentra en los cuerpos, las dendritas, los axones y los botones sinápticos de las células neurales, donde la ATPasa mantiene el gradiente iónico a través de la membrana neuronal. La fosforilación oxidativa neuronal varía en proporción a la descarga de la neurona. El escape de electrones de la cadena de transporte electrónico causa la formación de $^{\bullet}O_2^-$ y H_2O_2.[1,21,30,53]

Se ha sugerido que la apoptosis puede ser causada por acumulación de especies reactivas de oxígeno o por los radicales libres que generan.[1,21,22,30,69,73,74] El cerebro contiene grandes cantidades de ácidos grasos polinsaturados, los cuales son particularmente vulnerables al ataque por radicales libres. La acumulación de especies reactivas de oxígeno en la célula es capaz de producir:

- Por activación de fosfolipasa A2 Ca^{2+}- dependiente, la hidrólisis enzimática de los lípidos que conforman la membrana y la consiguiente liberación de ácido araquidónico (AA) y H_2O_2.[1,15,21,63,70] A través de la activación del metabolismo del AA, tanto por la ciclooxigenasa como por la lipoxigenasa, se generan eucosanoides.
- Peroxidación lipídica.[73,75-79]
- Estimulación de la liberación de glutamato e inhibición de su captación por interferencia con los mecanismos de transporte en neuronas y glías.[68]
- Aumento del ácido láctico, que genera condiciones ácidas en el medio y favorece la liberación de hierro, el cual promueve la reacción de Fenton y se producen radicales hidroxilosa partir de peróxido de hidrógeno.[1]
- La estimulación de la actividad de la enzima oxido nítrico sintetasa (ONS) y el aumento de la formación de peroxinitritos.

De esta manera, la producción de anión superóxido y radicales hidroxilos puede iniciar una cadena de reacciones que genera numerosos reactivos tóxicos capaces de dañar a las proteínas, al ADN y a la membrana lipídica, lo que interfiere con la capacidad funcional y la integridad de la membrana.

En la génesis de la muerte celular presente en enfermedades neurodegenerativas, resulta muy difícil separar las señales de activación mediadas por excitotoxicidad, de las mediadas por el estrés oxidativo. Ambos mecanismos se imbrican y complementan en la activación de numerosos procesos que median el daño celular (Fig. 1). La susceptibilidad de una neurona a ser dañada por estos eventos está directamente relacionada con su actividad metabólica. Por otra parte, secundario a la muerte de poblaciones neuronales en el SN central, se produce un desbalance entre las diferentes sinapsis que influyen sobre las neuronas denervadas, lo cual predispone a estas últimas a mecanismos excitotóxicos y de estrés oxidativo, lo que contribuye a la atrofia producida por la degeneración axonal retrógrada, que se observa en algunas de estas enfermedades (Ej. enfermedad de Parkinson).

Calcio

Un gran número de evidencias sugiere que bajo condiciones patológicas de sobrexcitación de los receptores NMDA, el aumento de las concentraciones de Ca^{2+} en el interior de la célula inicia una cascada de mecanismos autodestructivos Ca^{2+} dependientes.[1,15,64-66,70] El Ca^{2+} es capaz de disminuir el metabolismo celular al unirse a la membrana mitocondrial, interfiriendo con el transporte de electrones y con la producción de ATP.[23,31] Consecuentemente, las actividades dependientes de ATP en la célula se ven afectadas, se acumula ácido láctico y hay una incompleta reducción de los residuos de oxígeno, de modo que se generan radicales libres.

Varias familias de enzimas degradativas son activadas por el Ca^{2+}. La activación de proteasas neutras provoca la degradación de neurofilamentos, mielina, microtúbulos y otras estructuras proteicas. El Ca^{2+} también activa a las fosfolipasas, las cuales rompen los lípidos de membrana y liberan fosfatos inorgánicos y AA. Este último es enzimáticamente convertido en prostaglandinas y leucotrienos, los cuales generan radicales libres adicionales. La estimulación de la ornitina descarboxilasa, lleva a la formación de poliamidas, las cuales son tóxicas y también amplifican la respuesta de los receptores NMDA, a través de la activación de un sitio para ellas localizado sobre este receptor. Por último, el Ca^{2+} es capaz de activar a la ONS, aumentando la formación de NO.[1,21,63,68,70]

En algunas enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado una reducción de la densidad de canales para la evacuación del Ca^{2+} intracelular (Ej: EA, ELA). Esto permite sugerir que el incremento del Ca^{2+} intracelular en estas enfermedades podría deberse no sólo a un exceso en la liberación desde sus depósitos intracelulares; o en la entrada de este a la célula, sino también a una disminución en su excreción.

Oxido nítrico

El ON —el cual es sintetizado a partir de la L-arginina por las ONS— ha sido recientemente identificado como un nuevo neurotrasmisor en el cerebro.[80,81,82,83] Se conoce que existen varias isoformas de esta enzima[80,82] y es comúnmente aceptado que la isoforma neuronal ONSc está constitutivamente expresada y es activada a través de una vía dependiente de Ca^{2+}. Una vez formado, el ON difunde dentro de las células adyacentes, donde activa a la guanilato ciclasa soluble, dando lugar a la formación de GMPc, el cual participa en una gran variedad de efectos biológicos.[80] Sin embargo, el papel fisiológico de la vía de transducción del ON-GMPc en el cerebro es en gran medida desconocido. Al parecer, en dependencia del equilibrio redox, el ON puede tener función tanto neuroprotectiva como neurodestructiva.

Ha sido reportado que el ON no solamente exhibe propiedades tóxicas sobre cultivos neuronales, sino que también puede ser un importante mediador en varias enfermedades neurodegenerativas en relación con los mecanismos de excitotoxicidad.[1,80,84] Altas concentraciones de ON tienen efectos citostáticos y citotóxicos. Además, el ON reacciona rápidamente con el $^{\bullet}O_2^-$ para formar peroxinitrito, la ruptura homolítica del peroxinitrito da lugar a la formación de radicales hidroxilo altamente tóxicos, los cuales inician la peroxidación de las membranas lipídicas.[1,79,80]

Muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas

Como es posible ver, existen eventos patofisiológicos comunes a una gran variedad de agresiones al SN. El estrés oxidativo, el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, la hiperproducción de ON y la excitotoxicidad son mecanismos que convergen y representan procesos secuenciales que interactúan potenciándose entre sí y desembocan en una vía final común de lesión.

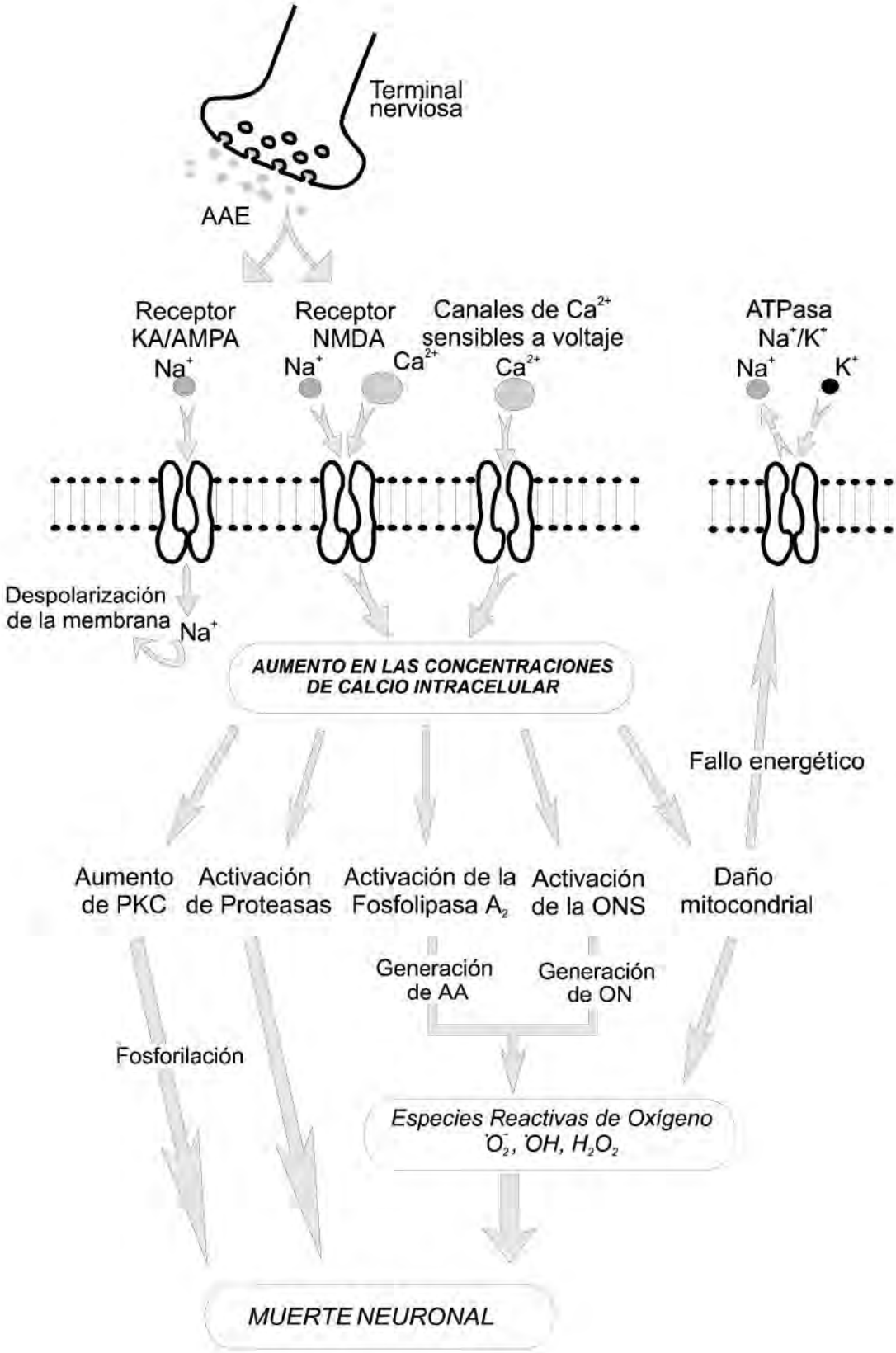


Fig. 1. Representación esquemática de la relación entre los mecanismos excitotóxicos y el estrés oxidativo dentro de una célula nerviosa.

En los últimos años se han acumulado considerables evidencias que implican la estimulación excesiva de los canales catiónicos disparados por glutamato, en el desencadenamiento de degeneración neuronal en modelos experimentales de EP, enfermedad de Huntington (EH) y esclerosis lateral amiotrófica, así como en epilepsia, accidentes vasculares e hipoglicemia.[1,3,15,64]

La atrofia olivopontocerebelar es un tipo de degeneración neuronal primaria, cuyas lesiones fundamentales están ubicadas en el cerebelo y en los núcleos pontinos, olivares inferiores, arcuatos y pontobulbares.[26] La pérdida sistemática de neuronas en estos núcleos y en el cerebelo conduce a la desmielinización, gliosis fibrilaria de materia blanca cereberal y formación de fibras olivo-cerebelares, arcuadas externas y ponto-cerebelares. En esta enfermedad se han encontrado deficiencias en la actividad de la glutamato deshidrogenasa, que producen elevadas concentraciones de glutamato por deficiencias en su catabolismo.[1,85]

Actualmente se piensa que en la patogenia de la EH estén involucradas cantidades excesivas de AAE. Se ha observado una pérdida preferente de las neuronas portadoras de receptores a AAE, tanto en los casos presintomáticos como en los sintomáticos. Además, las lesiones estriatales y corticales inducidas por AAE reproducen las características neuropatológicas y neuroquímicas de esta enfermedad, incluída la pérdida de receptores dopaminérgicos D_2.[1,65,66,86-90]

En la EP se han demostrado fallos oxidativos por deficiencias en el complejo I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, e hipersensibilidad de receptores NMDA en la *substancia nigra pars compacta*.[1,24,27] Por otra parte, la autoxidación de la dopamina en presencia de hierro puede ser tóxica para las células estriatales. Recientemente se ha demostrado que las células fetales dopaminérgicas implantadas en el estriado mueren por estrés oxidativo y que la morfología de las células nigrales muertas se corresponde con la apariencia apoptótica.[91]

Resultados recientes sugieren que los efectos tóxicos de la droga generadora de parkinsonismo MPTP y su metabolito el MPP+ pueden ser bloqueados tanto por antagonistas competitivos como no competitivos de receptores NMDA. Posteriormente, hay una serie de resultados que son consistentes con que el MPP+ causa una degeneración neuronal excitotóxica secundaria, como consecuencia de la depleción de energía.[2,53,92,93]

Se han detectado concentraciones elevadas de AAE en plasma de pacientes aquejados de esclerosis lateral amiotrófica y evidencias de acúmulo de malonildialdehído intraneuronal en motoneuronas. Ambos hallazgos señalan la presencia de la autoxidación, proceso que se encuentra involucrado en el mecanismo degenerativo. Una forma hereditaria de esclerosis lateral amiotrófica resulta a partir de una mutación en el gen que codifica la SOD-CuZn. Esta mutación trae como consecuencia la disminución de la capacidad de las células para detoxificar radicales libres. Se ha demostrado que el daño celular causado por radicales libres induce apoptosis *in vitro*. La muerte inducida por $^{\bullet}O_2^-$ puede ser específicamente inhibida por tratamiento con factor neurotrófico derivado de la glía y agentes antioxidantes.[94]

La degeneración retineana asociada con la retinosis pigmentaria ocurre como resultado de una mutación en uno de los tres genes específicos que codifican para fotorreceptores: rodopsín, la subunidad ß del guanosilmonofosfatofosfodiesterasa y periferín. Cualquiera de las tres mutaciones tiene como consecuencia la apoptosis de fotorreceptores.[13] La apoptosis puede ser iniciada en respuesta a la acumulación de proteínas mutantes o como resultado de una alteración en las propiedades funcionales de estas.

Sobre el papel de la excitoxicidad en la enfermedad de Alzheimer todavía no hay conclusiones. Se han encontrado mutaciones en la proteína precursora amiloide en casos familiares de esta enfermedad. Esto ha permitido argumentar que la excitoxicidad puede jugar un papel primario, pues la producción de la proteína anormal expone sitios ricos en glutamato y aspartato hacia el dominio extracelular que, al degradarse, hace que se acumulen estos aminoácidos alrededor de sus receptores de membrana. La distribución de hallazgos patológicos en la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, no muestra el depósito de ß-amiloide. Por tanto, es posible que la excitoxicidad pueda representar un papel secundario. En cultivo, el pèptido ß amiloide estimula la neurotoxicidad por glutamato. También recientemente se ha mostrado que el daño en el metabolismo energético inducido por privación de glucosa *in vitro* estimula marcadamente la susceptibilidad de las neuronas corticales cultivadas para la neurotoxicidad ß-amiloide.[3,95] Por otra parte, se ha demostrado un déficit de síntesis de canales excretores de Ca^{2+} en esta enfermedad, lo cual puede contribuir con el aumento de las concentraciones intracelulares de estos iones.

En general, se han podido reunir evidencias de que estos mecanismos están involucrados en el proceso neurodegenerativo y que la depoblación neuronal depende de una muerte neuronal acelerada por necrosis crónica, inducida por estrés oxidativo, excitotoxidad, exceso de Ca^{2+} uN O que elimina neuronas o las predispone a una muerte apoptótica, al facilitar su inducción. Existen evidencias histopatológicas de apoptosis y las inclusiones citoplasmáticas contienen restos de AAE y malonildialdehído.

Estos mecanismos son susceptibles, al menos teóricamente, de modificarse por diferentes agentes terapéuticos que incluyen factores tróficos, inhibidores de AAE, agentes anticálcicos, nitritos y antioxidantes. La estrategia de su utilización, sin embargo, está por definir. A pesar de los limitados conocimientos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a estos agentes, así como sobre sus concentraciones terapeúticas, constituyen la única opción estratégica de protección neuronal en la actualidad, al desconocerse el real origen de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

A pesar de los múltiples estudios que se han realizado sobre la muerte celular y el esclarecimiento de muchos de los eventos que tienen lugar durante la necrosis y la apoptosis, resulta muy difícil unificar toda la información acumulada y de una manera coherente agrupar opiniones y hallazgos contradictorios.

La muerte celular en el SN puede seguir dos secuencias de eventos diferentes: necrosis o apoptosis. Ocurre comúnmente, tanto en períodos críticos del desarrollo, como de manera secundaria a una lesión; en el curso de enfermedades neurodegenerativas, o como manifestación propia del envejecimiento cerebral. Ambos tipos de muerte, aunque diferentes, pueden ser inducidas por un mismo agente en dependencia del tipo de célula. Múltiples señales inductoras (fisiológicas y no fisiológicas), convergen en algún punto para compartir pasos que conducen a la progresión del programa apoptótico o a la necrosis. La deficiencia de factores tróficos, el aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, el daño mitocondrial y la excitotoxicidad, son mecanismos impli-

cados en la muerte celular presentes en enfermedades agudas y crónicas del SN.

Sería incorrecto concluir que en la muerte celular presente en enfermedades neurodegenerativas opera un sólo mecanismo inductor. Sin dudas, la comprensión de la relación que existe entre los posibles factores desencadenantes de muerte celular en estas enfermedades y de la secuencia de eventos a través de la cual esta tiene lugar, ofrece las bases para el diseño de nuevas estrategias farmacológicas para su tratamiento, a través del bloqueo de señales involucradas en la degeneración celular, sin interferir con la neurotrasmisión excitatoria. Probablemente, al estado actual de los conocimientos, ninguna medida aislada puede prevenir la cascada de acontecimientos que dan lugar a la muerte celular en estas entidades y sólo la combinación racional de terapeúticas permita rescatar neuronas y disminuir el ritmo de progresión de estas enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

1. Coyle J.T., Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science, 262,** 689, 1993.
2. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science, 267**, 1445, 1995.
3. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science, 267,** 1456, 1995.
4. Lockshin R.A., Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis. In: Tomei L.D. and Cope F.O., eds. Apoptosis: The molecular basis of cell death. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 47-60, 1991
5. Charriatut-Marlangue C., Aggoun-Zouaoui D., Represa A., Ben-Ari Y. Apoptotic feature of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity. **TINS, 19**, 109, 1996.
6. Lipton P., Kalil R. Neurotrophic factors - Their role in development, trauma and disease. **Neural. Notes, 1**, 3, 1995.
7. Cohen J.J. Apoptosis. **Immunol. Today, 14**, 126, 1993.
8. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol., 146, 3, 1995.
9. Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R. Mechanisms and functions of cell death. **Annu. Rev. Cell Biol., 7**, 663, 1991.
10. Akbar A., Salmon M., Savill J., Janossy G. A possible role for bel-2 in regulatin T-cell memory - a "balancing act" between cell death and survival. **Immunol. Today, 14**, 526, 1993.
11. Gordon N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. **Brain Dev., 17**, 73, 1995.
12. Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S., Ishizaki Y., Jacobson M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. **Science, 262**, 695, 1993.
13. Núñez G., Merino R., Grillot D., González M. Bcl-2 and BcL-X: regulatory switches for lymphoid death and survival. **Immunol. Today, 15**, 582, 1994.
14. Korsmeyer S.J. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. Immunol Today, 13, 448, 1992.
15. Sapolsky R.M. Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death. 1a ed. A Bradford Book. The MIT Press Cambridge, Massachusetts, London, England, 117-258, 1992.
16. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. **J. Cell Biochem., 58**, 181, 1995.
17. Evan G.I., Littlewood T.D. The role of c-myc in cell growth. **Curr. Opin. Gene Dev., 3**, 44, 1993.
18. Lee S., Christakos S., Small M.B. Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. **Curr. Opin. Cell Biol., 5**, 286, 1993.
19. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. **Science, 267**, 1449, 1995.
20. Pushkareva M., Obeid L.M., Hannun Y.A. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. **Immunol. Today, 16**, 294, 1995.
21. Douglas K.A., Craig E.T. Mechanisms and role of oxygen free radicals in CNS pathology. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 119-124, 1994.
22. Siesjo B.K., Agardth C.D., Bengtsson F. Free radicals and brain damage. **Cerebrovasc. Brain Metab. Rev., 1**, 165, 1989.
23. Young W. Role of Calcium in central nervous system injuries. **J Neurotrauma, 9**, S9, 1992.
24. Mitchell I.J., Lawson S., Moser B., Laidlaw S.M., Cooper A.J., Walkinshaw G. and Waters C.M. Glutamate-induced apoptosis result in a loss of striatal neurons in the parkinsonian rat. **Neurosci., 63**, 1, 1994.
25. Barr P.J., Tomei L.D. Apoptosis and its role in human disease. **Biotechnology NY, 12**, 487, 1994.
26. Adams R.D., Víctor M. Principios de Neurología. Ed. Revolucionaria, Editorial Científico-Técnica, Cuba, 895, 1984.
27. Biasi F., Chiarpotto E., Poli G. Molecular basis of antioxidant therapy. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 138, 1994.
28. Deckwerth T.L. and Johnson E.M. Temporal analysis of event associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor (NGF). **J Cell Biol., 123**, 1207, 1993.
29. Hall E.D. Antioxidant therapy and neuroprotection. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int .Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 144, 1994.
30. Sies H. Oxidative stress: Introduction. In Sies H, ed. Oxidative stress. Oxidative and Antioxidants. London, Academic Press, XV-XVII, 1991.
31. Orrenius S., Nicotera P. The calcium ion and the cell death. **J. Neural. Transm.., 43**, (Suppl), 1, 1994.
32. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer, 26**, 239, 1972.
33. Gennaro A.R., Nora A.H., Nora J.J., Stander R.W., Weiss L., eds. Blakiston's Gould Medical Dictionary. Fourth Edition McGraw-Hill Publishing Company, Editorial Board, 1984.
34. Rubin L.L., Gatchalian C.L., Rimon G., Broks S.F. The molecular mechanisms of neuronal apoptosis. **Curr. Opin. Neurobiol., 4**, 696, 1994.
35. Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature, 343**, 170, 1990.
36. Schwartzman R.A., Cidlowski J.A.. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular biology of Programmed Cell Death. **Endoc. Rev., 14**, 13, 1993.
37. Martin D.P., Ito A., Horigote K, Lampe P.A., Johnson E.M. Biochemical characterization of programmed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. **J. Neurobiol, 23**, 1205, 1992.
38. Migheli A., Cavalla P., Marino S., Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. **J. Neuropathol. Exp. Neurol., 53**, 606, 1994.
39. Franklin J.L., Johnson E.M. Block of neural apoptosis by a sustained of steady-state free Ca^{2+} concentration. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 345,** 251, 1994.
40. Ojeda F., Guarda M.I., Maldonado C., Folch H. Modulation of Tymocyte apoptosis by isoproterenol and PgF2. **Cell Immunol., 134**, 232, 1991.
41. Obeid L.M., Hannun Y.A. Ceramide: A stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. **J. Cell Biochem., 58**, 191, 1995.
42. Freeman R.S., Estus S., Horigone K., Johnson E.M. Cell death genes in invertebrates and (maybe) vertebrates. **Curr. Opin. Neurobiol., 3,** 25, 1993.
43. Server A.C., Mobley W.C. Neuronal cell death and the role of apoptosis. In: Tomei L.D. and Cope F.O., eds. Apoptosis: The molecular basis of cell death. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 263, 1991.
44. Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N.G., Jenkins N.A. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, with encodes protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death

gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. **Genes Dev., 8**, 1613, 1994.
45. Morgan J.I., Curran T. The immediate-early gene response and neuronal death and regeneration. **The Neuroscientist , 68** , 1995.
46. Estus S., Zaks W.J., Freeman R.S., Gruda M., Bravo R., Johnson E.M. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. **J. Cell Biol., 127**, 1717, 1994.
47. Eizenberg O., Faber-Elman A., Gottlieb E., Oren M., Rotter V., Schwartz M. Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. **The EMBO Journal, 14**, 1136, 1995.
48. Farlie P.G., Dringen R., Rees S.M., Kannourakis G., Bernard O. Bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92**, 4397, 1995.
49. Migheli A., Cavalla P., Piva R., Giordana M.T., Schiffer D. Bcl-2 protein expression in aged brain and neurodegenerative diseases. **Neuroreport, 5**, 1906, 1994.
50. Mizuguchi M., Ikeda K., Asada M., Mizutani S., Kamoshita S. Expression of Bcl-2 protein in murine neural cells in culture. **Brain Res., 64**, 197, 1994.
51. Ucker D.S. Death by suicide: one way to go in mammalian development. **New Biol., 3**, 103, 1991.
52. Fabbretti E., Edomi P., Brancolini C., Schneider C. Apoptotic phenotype induced by over-expression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. **Genes Dev., 9**, 1846, 1995.
53. Brouillet E.P., Jenkins B.G., Hyman B.T., Ferrante R.J., Kowall N.W., Srivastava R., Samanta Roy D., Rosen B.R., Beal M.F. Age-dependent vulnerability of striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. **J. Neurochem., 60**, 356, 1993.
54. Freeman R.S., Estus S., Johnson E.M. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. **Neuron., 12**, 343, 1994.
55. Bowen I.D. Apoptosis or programmed cell death?. **Cell Biol. Int., 17**, 365, 1993.
56. Ross M.E. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. **TINS, 19**, 62, 1996.
57. Edwards S.N., Buckmaster A.E. and Tolkovsky A.M. The death programmed in cultured sympathetic neurons can be suppressed at the post-translational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. **J. Neurochem., 57**, 2140, 1991.
58. Schumacher J.M., Short M.P., Hyman B.T., Breakefield X.O., Isacson O. Intracerebral implantation of nerve growth factor producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. **Neuroscience, 45**, 561, 1991.
59. Nozaki K., Finklestein B.P., Beal M.F. Basic fibroblast growth factor protects against hypoxia-ischemia and NMDA neurotoxicity in neonatal rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab., 13**, 221, 1993.
60. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science, 258**, 597, 1992.
61. Schoepp D.D., Conn P.J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **Trens. Pharmacol. Sci., 14**, 13, 1993.
62. Farooqui A.A., Horrocks L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. **Brain Res. Rev., 16**, 171, 1991.
63. Giffard R.G., Bruno V.M.G., Amagasu S.M., Choi D.W., Dugan L.L. NMDA receptors activation results in hydroxyl radical production in primary murino cortical cultures. **Soc. Neurosci. Abstr., 18**, 6461, 1992.
64. Meldrum B., Garthwainte J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegeneration disease. **Trens. Pharmacol. Sci., 11**, 379, 1990.
65. Beal M.F. Molecular mechanisms of excitotoxicity. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 102, 1994.
66. Beal M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurological diseases. **FASEB J., 6**, 3338, 1992.
67. Scatton B. disorders. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 157, 1994.
68. Voltera A., Trotti D., Gambino G., Racagni G. Convergent inhibition of glutamate uptake by arachidonic acid and oxygen free radicals: molecular mechanisms and relevance to neurodegenerative pathologies. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z., eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 129, 1994.
69. Boisvert D.P. Interrelation of excitotoxic and free radical mechanisms. In: Krieglstein J., Oberpichler-Schwenk H., eds. Pharmacology of cerebral ischemia. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 311, 1992.
70. Lazarewicz J.W., Wroblewsky J.T., Costa E. N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. **J. Neurochem., 55**, 1875, 1990.
71. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **Am. J. Clin. Nutr., 54**, 1119S, 1991.
72. Hall E.D., Yonkers P.A. Preservation of motor nerve function during early degeneration by the 21-aminosteroid anti-oxidant U-74006F. **Brain Res., 513**, 224, 1990.
73. Ratan R.R., Barbaran J.M. Apoptotic death in an *in vitro* model of neuronal oxidative stress. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 22**, 309, 1995.
74. Wood K.A., Youle R.J. Apotosis and free radicals. **Ann. NY, Acad. Sci., 738**, 400, 1994.
75. Danni O., Chiarpotto E., Aragno M., Biasi F., Comoglio A., Belliardo F., Dianzani M.U., Poli G. Lipid peroxidation and irreversible cell damage: synergism between carbon tetrachloride and 1,2-dibro-moethane in isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol., 110**, 216, 1992.
76. Biasi F., Albano E., Chiarpotto E., Corongiu F. P., Pronzato M. A., Marinari U. M., Parola M., Dianzani M. U., Poli G. *I n vivo* and *in vitro* evidence concerning the role of lipic peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to the carbon tetrachloride. **Cell Biochem. Funct., 9**, 111, 1991.
77. Carini R., Comoglio A., Albano E., Poli G. Lipic peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. **Biochem. Pharmacol., 43**, 2111,1992.
78. Braughler J.M. and Hall E.D. Involvement of lipic peroxidation in CNS injury. **J. of Neurotrauma, 9**, S1, 1992.
79. Hall E.D., Andrus P.K., Althaus K.S., Von Voigtlander P.F. Hydroxyl radical production and lipic peroxidation parallels selective post-ischemic vulnerability in gerbil brain. **J. Neurosci. Res., 34**, 107, 1993.
80. Knowles R.G. Brain nitric oxide synthesis and neurodegeneration. In: Racagni G., Brunello N., Langer S.Z, eds. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. **Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel, Karger, 7**, 112, 1994.
81. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitic oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev., 43**, 109, 1991.
82. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86**, 5159, 1989.
83. Vicent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the brain rat . **Neuroscience, 46**, 755, 1992.
84. Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Bredt D.S., Snydder S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88**, 6368, 1992
85. Rothstein J.D., Martin L.J., Kuncl R.W. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. **N. Engl. J. Med., 326**, 1464, 1992.
86. Thomas L.B., Gates D.J., Richfield E.K., O'Brien T.F., Schweitzer J.B., Steindler D.A. DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's Disease and other neuropathological conditions. **Exp. Neurol., 133**, 265, 1995.
87. Portera C., Hedreen J.C., Price D.L., Koliatsos V.E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington's Disease and excitotoxic animal models. **J. Neurosci., 15**, 3775, 1995.
88. Beal M.F., Hyman B.T., Koroshetz W. Do defects in energy metabolism underline the pathology of neurodegenerative disease?. **TINS, 16**, 125, 1993.

89. Beal M.F., Swartz K.J., Hyman B.T., Storey E., Finn S.F., Koroshetz W. Amino-oxyacetic acid results in excitotoxin lesions by a novel indirect mechanism. **J. Neurochem., 57**, 1068, 1991.
90. Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P.B., Storey E., Beal M.F. Excitotoxic lesions in primates as a model for Huntington's Disease: Histopathologic and neurochemical characterization. **Exp. Neurol., 119**, 46, 1993.
91. Nakao N., Frodl E.M., Duan W.M., Widner H., Brundin P. Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.,. USA, 91**, 12408, 1994.
92. Storey E., Hyman B.T., Miller J.M., Beal M.F. MPP+ produces excitotoxic lesions in rats. **Soc. Neurosci. Abstr., 17**, 716, 1991.
93. Turskin L., Bressler K., Rettig K.J., Loeschmann P.A., Wachtel H. Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. **Nature, 349**, 414, 1991.
94. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X., *et al.* Mutations in Cn/Zn superoxido dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature, 362**, 59, 1993.
95. Koh J.Y., Yang L.L., Cotman C.W. ß-Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. **Brain Res., 533**, 315, 1990.