

# Participación de los astrocitos y del transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

## Role of astrocytes and glutamate transporter EAAT2 / GLT1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Daniel Castro<sup>1</sup>, Elke Díaz<sup>1</sup>, Irma Lombardo<sup>1</sup>,  
Patricia Cassina<sup>2\*</sup>, Laura Martínez-Palma<sup>2</sup>

### Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal, progresiva que afecta las motoneuronas superiores e inferiores del sistema nervioso central y se acompaña de reactividad glial. La patogenia de esta enfermedad no está del todo clara. Se han postulado diferentes mecanismos dentro de los cuales se destacan las alteraciones en el procesamiento del ARN, en el metabolismo proteico, en el transporte axonal y en la función mitocondrial, aumento del estrés oxidativo y excitotoxicidad. Los astrocitos presentan prolongaciones que rodean la sinapsis, donde se localizan los transportadores de glutamato que captan el exceso del neurotransmisor durante la actividad sináptica. En la ELA se han encontrado alteraciones en este mecanismo lo cual ha resaltado la participación de la glía en la progresión de la enfermedad. El glutamato actúa sobre dos familias de receptores: NMDA y no NMDA, cuyas alteraciones se vinculan con la patogenia de la enfermedad. Además, se ha probado que existe una alteración en la función y disponibilidad del transportador de glutamato EAAT2/GLT1, que contribuye al aumento de la concentración de glutamato extracelular. En este trabajo, el objetivo fue revisar la bibliografía sobre el rol de los astrocitos y el transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la patogenia de la ELA, con el fin de identificar algunos interrogantes aún no dilucidados para dirigir nuevas investigaciones que puedan mejorar el tratamiento de estos pacientes.

---

<sup>1</sup>Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. La contribución en la realización del trabajo fue equivalente a la de los demás estudiantes.

<sup>2</sup>Docente supervisor. Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

\*Contacto: Patricia Cassina. Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Avda. Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay. Tel. (5982) 924 2703. Email: pcassina@fmed.edu.uy

## Palabras clave

Neurodegeneración, astrocitos, transportador de glutamato, EAAT2/GLT1, glutamato, excitotoxicidad, Esclerosis Lateral Amiotrófica, ELA

## Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal, progressive neurodegenerative disease affecting upper and lower motor neurons of the central nervous system that is associated to glial reactivity. The pathogenesis of this disease is not entirely clear. Different mechanisms have been postulated, including alterations in RNA processing, protein metabolism, axonal transport and mitochondrial function, increased oxidative stress and excitotoxicity. Astrocytes exhibit processes surrounding the synapse, where glutamate transporters are located to uptake the excess of neurotransmitter during synaptic activity. Alterations in this mechanism have been found in ALS and have highlighted the role of glia in the progression of ALS. Glutamate acts on two receptor families: NMDA and non-NMDA. There is evidence that links glutamate transporters dysfunction to the pathogenesis of the disease. In addition, it has been proven that alteration in the function and availability of the glutamate transporter EAAT2 / GLT1 contributes to the increase of extracellular glutamate concentration. In this work, we aim to review the literature on the role of astrocytes and the glutamate transporter EAAT2 / GLT1 in the pathogenesis of ALS, to identify unsolved questions that may guide further research to improve the treatment of these patients.

## Key words

Neurodegeneration, Astrocytes, Glutamate Transporter, EAAT2 / GLT1, Glutamate, Excitotoxicity, Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS

## Introducción

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal, que afecta las neuronas motoras localizadas en la corteza cerebral (superiores), en el tronco encefálico y en la médula espinal (inferiores). Esta enfermedad produce parálisis muscular esquelética progresiva culminando con la muerte, generalmente entre tres y cinco años posterior al diagnóstico. En la mayoría de los casos, la muerte es debida a insuficiencia ventilatorio-respiratoria y desnutrición<sup>(1)</sup>.

A nivel mundial la incidencia cruda de esta patología es de 1.75 IC95 (1.55; 1.96) por cada

100.000 personas por año de seguimiento, siendo de mayor incidencia en el género masculino (2.03) que en el género femenino (1.45). En América del Sur la incidencia se encuentra en un rango que va desde 1.37 a 3.17 cada 100.000 personas por año de seguimiento<sup>(2)</sup>. En Uruguay la incidencia media anual estimada para la Esclerosis Lateral Amiotrófica ha sido de 1.42, lo cual se asemeja con los datos internacionales<sup>(3)</sup>. La mayor parte de los casos de ELA son esporádicos, mientras que un 5% son de tipo familiar hereditario. Las formas familiares se han relacionado con mutaciones en diferentes genes entre los que se encuentran: SOD1, TARDBP, FUS, ANG, y OPTN, que

codifican para la superóxido dismutasa 1; proteína TAR de unión al ADN; proteína de fusión en el sarcoma; angiogenina, ribonucleasa y la familia A de la ARNasa 5 y optineurin respectivamente. En los casos de la ELA esporádica no se conoce hasta el momento una causa clara relacionada con el desarrollo de la enfermedad<sup>(1)</sup>. Sin embargo, recientemente se han asociado factores genéticos tanto en la forma esporádica como en la familiar, la mutación más frecuente en ambas formas ocurre en el gen C9ORF72 del cromosoma 9<sup>(4)</sup>. Más recientemente se ha encontrado la mutación en el gen NEK1 en el 3% de los casos<sup>(5)</sup>. Los mecanismos involucrados en la patogenia de esta enfermedad no están del todo claros. Entre los que se han propuesto hasta el momento se incluyen: alteraciones en el procesamiento del ARN, en el metabolismo proteico y en el transporte axonal, aumento del estrés oxidativo y aumento en la concentración extracelular de glutamato<sup>(4)</sup>. En los últimos años se ha propuesto la participación de las células gliales, astrocitos y microglía, en el desarrollo de la enfermedad.

Los astrocitos son células del Sistema Nervioso Central (SNC), denominadas así debido a su morfología estrellada. Las mismas presentan múltiples prolongaciones citoplasmáticas, que contienen la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) en sus filamentos intermedios. Estas células cumplen funciones de homeostasis y soporte trófico en el SNC<sup>(6)</sup>.

Los astrocitos y la microglía reaccionan frente al daño, sufriendo una serie de modificaciones, que en conjunto se denominan gliosis reactiva. Esto está presente en muchas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la Esclerosis Lateral Amiotrófica<sup>(7)</sup>. Los astrocitos captan el 80% del glutamato liberado en el espacio sináptico, principalmente mediante la actividad del transporta-

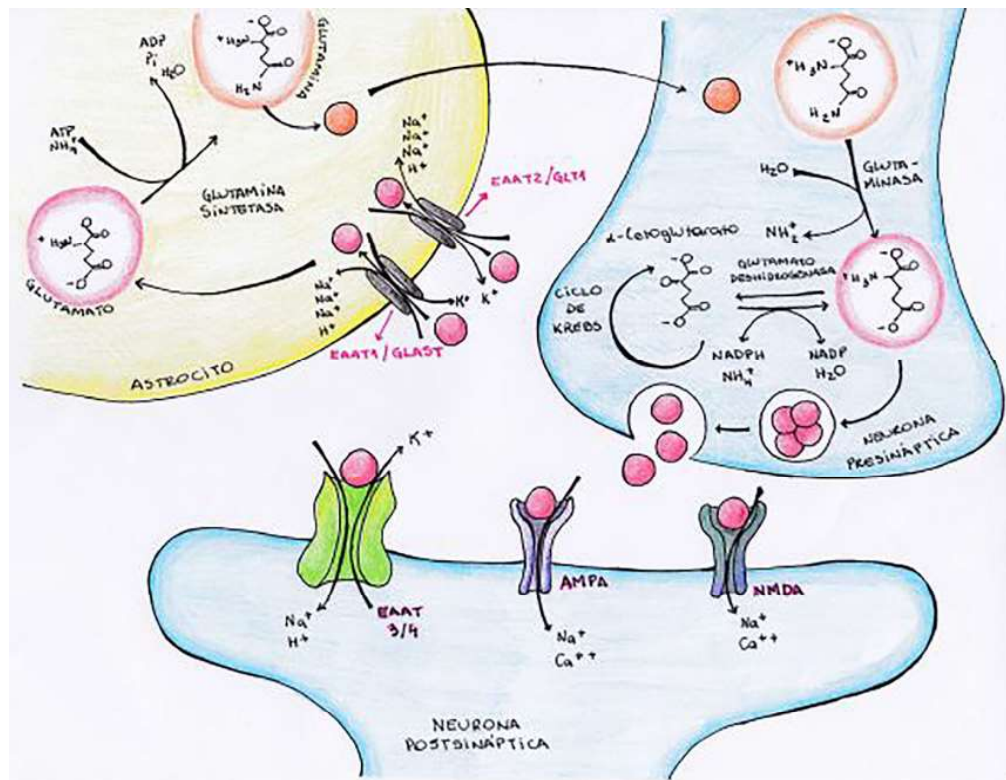
dor de glutamato EAAT2 (Excitatory aminoacid transporter<sup>(2)</sup>) o su homólogo murino GLT1 y así mantienen la homeostasis de glutamato<sup>(7)</sup>. Este mecanismo se altera en la ELA<sup>(7)</sup>, lo cual ha aportado la evidencia para el uso del antagonista glutamatérgico, riluzole, como única terapia disponible para la patología aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>(8)</sup>.

El objetivo de este trabajo es revisar la bibliografía existente sobre el papel que juegan los astrocitos y el transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la patogenia de la ELA con el fin de detectar aspectos no totalmente dilucidados de este mecanismo. Esta información podrá contribuir a diseñar estrategias de investigación para continuar en el estudio de esos aspectos.

## Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC. Se encuentra en grandes cantidades en los mamíferos en el orden de los 5-10 mmol/Kg de tejido. Es producido a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato, un metabolito intermediario en el ciclo de Krebs, en una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa, o por deaminación de la glutamina por acción de la enzima glutaminasa, que es una proteína mitocondrial específica de las neuronas<sup>(9)</sup> (Figura 1).

El glutamato actúa sobre dos familias de receptores específicos: metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos que se pueden encontrar en las membranas de las neuronas pre y post sináptica y también en los astrocitos que rodean las sinapsis. Se han descrito diferentes tipos de mGluR<sup>(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)</sup> de acuerdo a las vías de señalización que activan<sup>(10)</sup>. Estos receptores consisten en proteínas transmembrana acopladas a proteína G, que al ser activados desencadenan una cascada de señaliza-



**Figura 1.** Metabolismo del glutamato en la sinapsis glutamatérgica en condiciones fisiológicas.

ción intracelular mediada por segundos mensajeros. La activación de estas múltiples proteínas da lugar a diferentes cambios, que dependen del tipo de receptor activado por el glutamato que a su vez depende de las necesidades o demandas del organismo<sup>(11)</sup>. Los receptores ionotrópicos, frente a la unión del glutamato permiten la entrada de cationes, fundamentalmente sodio y en muchos casos calcio, determinando el cambio del potencial de membrana en la neurona postsináptica. Estos receptores se han clasificado según su afinidad a sustancias exógenas en: receptores con afinidad al N-metil-D- aspartato (NMDA) denominados receptores inotrópicos NMDA o sin afinidad al mismo, llamados por ello no NMDA. Éstos últimos presentan afinidad al kainato, o al  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)<sup>(9)</sup>.

La liberación de glutamato a la hendidura sináptica depende del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona

presináptica durante su actividad. Los niveles de glutamato extracelular son mantenidos fundamentalmente por la recaptación a través de transportadores de glutamato presentes en la neurona y la glía<sup>(12)</sup>. Del total del glutamato liberado al espacio sináptico, solamente el 20% se une a sus receptores post sinápticos y el 80% remanente es reciclado, en su mayor parte por el transportador de glutamato presente en los astrocitos<sup>(7)</sup>. El mantenimiento de la concentración de glutamato es muy importante, ya que su aumento por encima de los niveles fisiológicos produce sobreactivación de los receptores ionotrópicos, influjo excesivo de iones y calcio y como consecuencia se induce daño y la muerte celular, lo cual se conoce como excitotoxicidad<sup>(9)</sup>. En la figura 1 se observan las interacciones del glutamato con sus receptores y transportadores.



**Figura 2A.** Astrocito protoplasmático: presenta el cuerpo celular oculto por las abundantes prolongaciones gruesas, cortas y romas. Las prolongaciones más distales forman perfiles irregulares (flechas) que en muchos casos contactan con sinapsis (no visibles en esta imagen).

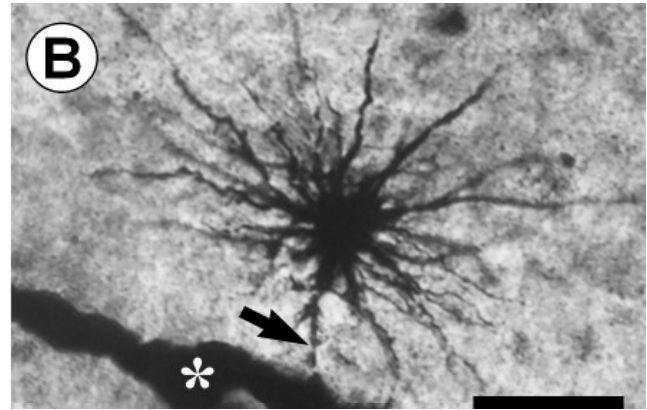
**Fuente:** Imagen cedida por el Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

### Astroцитos

Los astrocitos son células que pertenecen a la neuroglía y son el tipo celular más abundante de este grupo y del SNC. Son células estrelladas que tienen abundante citoplasma y un núcleo de gran tamaño. Su morfología se adapta a la distribución de los elementos neuronales del entorno. Es así que reconocemos astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris (Figura 2A) y

y fibrosos (Figura 2B) en la sustancia blanca, glía de Müller en la retina y glía de Bergman en el cerebelo, entre otros.

Estas células están polarizadas debido a que algunas de sus prolongaciones están en contacto con la vasculatura, originalmente descritos como “pies terminales” mientras



**Figura 2B.** Astrocito fibroso: el cuerpo celular es más visible y sus prolongaciones son más largas y delgadas. Algunas prolongaciones contactan con vasos sanguíneos (asterisco) formando los pies terminales perivasculariales, como señala la flecha. Cerebro de rata; técnica de impregnación argéntica de Golgi. Escala: 20  $\mu$ m.

**Fuente:** Imagen cedida por el Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República

que las otras prolongaciones rodean las sinapsis. Por otro lado, aquellos localizados cerca de la superficie de los órganos del SNC, emiten prolongaciones que contactan con la piamadre estableciendo la membrana limitante glial<sup>(13)</sup>. Los astrocitos desempeñan múltiples funciones en el SNC, para mantener la homeostasis del mismo. Dichas funciones se resumen en la (tabla 1).

**Tabla 1.** Funciones de los astrocitos

Regulación de los niveles de neurotransmisores, iones y neurohormonas (58).
Acumulación de sustratos energéticos destinados para las neuronas (59)
Determinación de la migración neuronal durante el desarrollo, intervienen en la sinaptogénesis, en la poda sináptica y en la microarquitectura de la materia gris (60–62)
Formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (63)
Captación de las variaciones sistémicas de CO <sub>2</sub> , pH y Na <sup>+</sup> (64–67)
Producción y regulación de segundos mensajeros tales como prostanglandina E, ácido araquidónico y óxido nítrico, con lo cual regulan el tono vasomotor(68,69)
Colaboración en la transmisión sináptica, por vía paracrina (70–74)
Mantención del normal funcionamiento de la sinapsis glutamatérgicas manteniendo en condiciones fisiológicas los niveles de glutamato (ver texto) (75,76)

## Reactividad glial

La reactividad glial o gliosis reactiva es la respuesta de astrocitos y microglía frente al daño del SNC de diversa etiología. Es una respuesta constitutiva, graduada, multi-etapas, defensiva y conservada evolutivamente<sup>(14)</sup>. Los astrocitos reaccionan manifestando cambios morfológicos y funcionales a expensas de alteraciones en la expresión de genes<sup>(15)</sup>.

Estos cambios se ven en diferentes grados; en la astrogliosis reactiva leve a moderada los astrocitos presentan un cuerpo celular hipertrófico, no hay pérdida de los dominios individuales de los astrocitos y no existe o es escasa la proliferación de los mismos. Si desaparece la lesión desencadenante, los astrocitos tienen la posibilidad de retomar su forma y función habitual<sup>(16)(17)</sup>. En la astrogliosis reactiva severa, existe una pronunciada hipertrofia del cuerpo celular y sus prolongaciones, existiendo además proliferación de los astrocitos y pérdida de los dominios individuales de los mismos. Estos cambios generan alteración de la arquitectura tisular. En este caso se ve reducida la capacidad de retorno hacia un tejido normal<sup>(17)</sup>.

En la astrogliosis reactiva severa, se forma una cicatriz glial, donde además de la hipertrofia de los astrocitos, y el aumento en su proliferación con pérdida de los dominios individuales, también se agregan otras células gliales y células fibromeníngeas<sup>(16)(17)(18)(19)</sup>. Ante esta alteración estructural del tejido nervioso, no existe posibilidad de reversión hacia un tejido sano<sup>(20)</sup>.

## Astrocitos y homeostasis del glutamato

Para mantener el normal funcionamiento de las sinapsis glutamatérgicas, los astrocitos presentan

dos tipos de transportadores que se encargan de reciclar el glutamato liberado en la hendidura sináptica, EAAT1 y EAAT2 (Excitatory aminoacid transporter, 1 y 2) en humanos, que se corresponden con los tipos murinos GLAST y GLT1 respectivamente. Estos acoplan la entrada a la célula de una molécula de glutamato con tres iones  $\text{Na}^+$  y un  $\text{H}^+$ , con la consecuente salida de un ion  $\text{K}^+$ . Dentro de estos transportadores el EAAT2 es el que tiene mayor afinidad por el glutamato.

El aumento de la concentración de glutamato por encima de los valores normales descritos anteriormente, causa la muerte neuronal por excitotoxicidad, por lo cual es imperativo mantener la concentración constante para la homeostasis del sistema nervioso<sup>(20)</sup>.

Una vez que el glutamato ingresa al astrocito interactúa con la enzima citosólica glutamina sintasa y como producto se obtiene glutamina, la cual difunde a la neurona presináptica para ser transformada en glutamato, por acción de la glutaminasa mitocondrial. Luego se empaqueta en vesículas sinápticas para ser liberado en la sinapsis (Figura 1)<sup>(9)</sup>. Este mecanismo recibe la denominación de ciclo glutamato- glutamina, ejemplo de sinergismo metabólico entre astrocitos y neuronas.

## Astrocitos y glutamato en la ELA

Rothstein y cols<sup>(21)</sup>, determinaron que la concentración de glutamato y aspartato están aumentadas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecían la enfermedad, en comparación con controles sanos<sup>(21)(22)</sup>. Esto es un indicio de que existe una anomalía en el metabolismo de este aminoácido, producto de una disminución en la velocidad máxima del transporte de glutamato por los transportadores de alta afinidad. Por otro

lado se mantiene conservada la afinidad transportador-sustrato<sup>(23)</sup>. En base a esto, se plantea que hay una disminución en el número de transportadores.

Mediante la clonación de los transportadores de glutamato: GLTI, GLAST y EAAT3, se pudo identificar que los modelos murinos de ELA mostraron una marcada disminución de GLT1, del 71% en la corteza motora y en la médula espinal, en comparación con los controles sanos, mientras que GLAST solo mostró una diferencia del 20% en la corteza motora y EAAT3 permaneció constante<sup>(24)</sup>. Esto hace que aumente la concentración de glutamato extracelular lo cual a su vez produce una estimulación prolongada de sus receptores específicos: NMDA, AMPA y Kainato. En condiciones normales, el receptor NMDA es permeable al calcio, mientras AMPA y Kainato no lo son. La estimulación prolongada de NMDA genera un aumento del influxo de calcio, que como segundo mensajero activa diferentes vías de señalización que conducen a la muerte neuronal por excitotoxicidad, lo cual a su vez contribuye a la patogénesis de la enfermedad<sup>(25)</sup>.

Los receptores AMPA están formados por combinaciones de subunidades, GluR1-4, que forman un canal iónico permeable al sodio<sup>(25)</sup>. Sin embargo, la subunidad GluR2 hace que este receptor sea impermeable al calcio<sup>(26)(27)</sup>. En la ELA, el receptor AMPA carece de la subunidad GluR2<sup>(9)</sup>, volviéndolo permeable al calcio, desencadenando una excesiva estimulación neuronal y disregulación de los receptores de glutamato<sup>(28)(29)(30)</sup>. La exposición prolongada y la alta concentración de glutamato extracelular, pueden dirigir a la expresión de receptores de muerte celular<sup>(31)</sup>.

Como GLT1 y GLAST están disminuidos en la ELA y éstos están presentes en los astrocitos, se podría pensar que la cantidad total de estas célu-

las está disminuida. Mediante inmunohistoquímica se comprobó que esto no ocurría en modelos de ELA. Se marcaron los astrocitos con anticuerpos anti proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los resultados demostraron que no hay diferencias entre poblaciones astrocitarias de modelos de ELA y controles en cuanto al número de células<sup>(24)</sup>.

Por otro lado, se podría pensar que existe una anomalía en la vida media del receptor, ya sea por un alto recambio o una falla en el mecanismo transcripcional del mismo.

Glenn Lin y cols<sup>(32)</sup> determinaron que el tamaño y la cantidad de ARNm de EAAT2, era normal en los pacientes con ELA, pero se constató que había un codón de stop en el ADNc después de la unión entre el exón 7 y el intrón 7. Esto hacía que el producto de la traducción se encuentre truncado en el codón 364, generando un transportador anormal<sup>(32)</sup>.

La disminución de EAAT2 descrita anteriormente se asemeja a estudios hechos con modelos murinos de ELA, donde no solo se constató la alteración en su transcripción, sino que también se vio la internalización y posterior degradación del transportador GLT1<sup>(33)</sup>.

Vanoni y cols<sup>(33)</sup> demostraron la internalización del transportador en células portadoras de la SOD1 mutada utilizadas como modelo de ELA. Mediante la inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra GLT1 y  $\beta$  catenina para localizar el transportador y la membrana plasmática respectivamente, el GLT1 se localizó en el interior celular. El mismo procedimiento hecho en presencia de sacarosa, que inhibe la endocitosis, demostró la co-localización de GLT1 y  $\beta$  catenina en la superficie celular, lo cual indica que el transportador había sido incorporado por endocitosis. Cuando se realizó inmunofluorescencia para GLT1, junto con marcadores para los endosomas tempranos,

los compartimentos de reciclaje lento y los lisosomas, se mostró que GLT1 se encontraba en los lisosomas. Datos previos han demostrado que la cola citosólica de GLT1, es responsable de la inhibición de la actividad del transportador en oocitos de xenopus transfectados con SOD1 con mutaciones ligadas a ELA familiar y que además este dominio también se encuentra involucrado en la degradación del transportador<sup>(33)</sup>. Boston y cols<sup>(34)</sup> demostraron que la inactivación del transportador es debido al clivaje del dominio citoplasmático C-terminal, producido por la activación de la caspasa-3 en astrocitos<sup>(34)</sup>. Esto genera un aumento en la concentración extracelular de glutamato que contribuye a la excitotoxicidad.

### *Astrocitos reactivos y ELA*

En la ELA se produce una fuerte reacción glial alrededor de las motoneuronas superiores e inferiores<sup>(35)</sup>. Los astrocitos reactivos muestran una inmunorreactividad aumentada para la GFAP y la proteína de unión al calcio S100 $\beta$ <sup>(36)</sup>, expresan marcadores inflamatorios como por ejemplo: ciclooxigenasa 2 (COX2)<sup>(37)</sup> e inducen la expresión de varias enzimas que incluyen la óxido nítrico sintasa, isoformas inducible (iNOS) y neuronal (nNOS)<sup>(38)(39)</sup>. Se ha postulado que la producción de óxido nítrico por la iNOS, genera peroxinitrito e inhibe la función mitocondrial, potenciando así la neurotoxicidad en cultivos celulares<sup>(40)(41)</sup> mediada por los receptores NMDA<sup>(42)</sup>. En astrocitos portadores de la SOD<sup>G93A</sup> se ha descrito disfunción mitocondrial asociada a toxicidad hacia las motoneuronas<sup>(43)</sup>, dado que el restablecimiento de la actividad respiratoria mitocondrial mediante antioxidantes mitocondriales o estimuladores metabólicos, resultó suficiente para revertir la toxicidad<sup>(43)(44)(45)</sup>.

Además, los astrocitos reactivos secretan diversas citoquinas y factores tróficos, entre los cuales se encuentran FasL, TNF $\alpha$  y NGF, que se han reportado como inductores de la muerte apoptótica de motoneuronas. Existe evidencia de que la apoptosis mediada por receptores para estas moléculas, contribuye a la pérdida de las motoneuronas en la ELA<sup>(46)(47)(48)</sup>.

La reactividad glial predispone a la pérdida de los transportadores de glutamato en los astrocitos, contribuyendo así a la excitotoxicidad. Existen estudios que avalan que las especies reactivas del oxígeno producidas por las motoneuronas dañadas, generan una alteración en la captación del glutamato en los astrocitos cercanos<sup>(49)</sup>.

Si bien no es suficiente la presencia de la SOD mutada en astrocitos para inducir la ELA, los astrocitos que expresan la misma, ejercen directa y selectivamente toxicidad sobre las motoneuronas a través de la liberación de factores solubles<sup>(50)</sup><sup>(51)(52)</sup>. Esto se ha confirmado en cultivos de astrocitos obtenidos a partir de ratas<sup>(53)</sup> o ratones portadores de la SOD<sup>G93A</sup><sup>(50)</sup> y a partir de células humanas de pacientes con ELA<sup>(50)(51)(54)</sup>. La identificación y aislamiento de una población de células gliales, a partir de la médula espinal de animales portadores de la mutación SOD1<sup>G93A</sup> sintomáticos (células AbA)<sup>(55)</sup>, con gran capacidad tóxica para motoneuronas, fortalece la idea de una toxicidad mediada por astrocitos<sup>(56)</sup>. Estas células se han estudiado, resultando ser abundantes alrededor de las motoneuronas en la fase sintomática de la enfermedad, sugiriendo una relación entre la aparición de estas células y la rápida progresión de la neurodegeneración<sup>(55)</sup>. Sorprendentemente estas células carecen del transportador GLT1, lo cual podría contribuir a explicar su alta toxicidad. Estas células presentan diez veces mayor capacidad tóxica que los astrocitos neonatales en modelos



murinos SOD1<sup>G93A</sup> para inducir la muerte de las motoneuronas<sup>(55)</sup>.

Las células AbA son producto de un ambiente proinflamatorio, y podrían promover la transición, reclutamiento y cambios fenotípicos de células gliales o precursores que conducen a la generación de más células AbA<sup>(55)</sup>, generando un mecanismo que podría contribuir a la progresión de la enfermedad.

## Discusión

Desde la descripción de la Esclerosis Lateral Amiotrófica por Charcot en 1861, se han realizado un gran número de investigaciones tratando de explicar los mecanismos patogénicos involucrados en la ELA.

El estrés oxidativo producto de la disfunción mitocondrial y la excitotoxicidad por glutamato debido a la alteración de su transportador, principalmente EAAT2 son algunos de los mecanismos identificados en la patogenia de la enfermedad. El hallazgo de que la excitotoxicidad por glutamato está íntimamente relacionado con la neurodegeneración, constituye la evidencia para el uso de Riluzole como único tratamiento disponible para la enfermedad, aunque ha demostrado escasa efectividad para lograr una completa remisión clínico-patológica.

Esto sugiere que la excitotoxicidad mediada por glutamato, no es el único mecanismo involucrado en la patogenia de la ELA. Más estudios son necesarios para dilucidar nuevos mecanismos patogénicos, o profundizar sobre los ya conocidos para permitir el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, que puedan mejorar la supervivencia o la calidad de vida de los pacientes que padecen la enfermedad.

Pese a todos los intentos aún persisten incógnitas por responder.

Dado que los astrocitos presentan receptores para glutamato como NMDA, AMPA y Kainato y puesto que estas células no degeneran, sino que proliferan y adquieren un fenotipo aberrante, que produce degeneración neuronal, una de las preguntas a responder consiste en identificar si los estímulos de los receptores podrían contribuir a la conversión de este fenotipo.

Además, se ha demostrado que la movilidad de los transportadores de glutamato en la membrana de las prolongaciones de los astrocitos que rodean la hendidura sináptica, varía en diversas situaciones afectando la disponibilidad de los mismos<sup>(57)</sup>. Sin embargo, aún no existen datos de si esto ocurre en la sinapsis de las motoneuronas en la médula espinal en la ELA. Si esto es comprobado aportaría nuevos mecanismos para modular la excitotoxicidad mediada por glutamato y buscar nuevos fármacos que aumenten la disponibilidad del transportador.

Estas son algunas incógnitas posibles a resolver, que pueden identificar nuevos blancos de acción terapéutica, para una patología de la que carecemos de herramientas para detener su avance y mucho menos su curación.

## Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Carlos Ketzoian por brindar artículos que apoyaron esta revisión, al Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República por aportarnos recursos que enriquecieron este trabajo. Al Instituto Pasteur, Instituto Clemente Estable IIBCE, Comisión sectorial de investigación Científica (CSIC) y a PEDECIBA por habernos invitado al Simposio Internacional

de “Neuron-glia interactions in health and disease” el 21 de octubre, Colonia, Uruguay.

## Referencias

1. Kiernan M, Vucic S, Cheah B, Turner M, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011;377(9769):942–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61156-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61156-7)
2. Marin B, Boumédiène F, Logroscino G, Couratier P, Babron M, Leutenegger A, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017;46(1):57-74. doi: 10.1093/ije/dyw061.
3. Vázquez M, Ketzoián C, Legnani C, Rega I, Sánchez N, Perna A, et al. Incidence and Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Uruguay: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*. 2008;30(2):105-11. doi: 10.1159/000120023
4. Riancho J, Gonzalo I, Ruiz Soto M, Berciano J. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2015;1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.12.001>
5. Brenner D, Müller K, Wieland T, Weydt P, Böhm S, Lulé D, et al. NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Rev*. 2016(pt. 5);139:28.
6. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 9th ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2015. Frosch M, Douglas A, De Girolami U. Sistema nervioso central. Capítulo 28. p. 1251–318.
7. Heneka M, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2010 May;63(1-2):189-211.
8. Miller R, Mitchell J, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane database Syst Rev*. 2012;CD001447.
9. Foran E, Trotti D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(7):1587–602.
10. Waxham M. Neurotransmitter receptors. En: Squire LR, Bloom FE, Spitzer NC, du Lac S, Ghosh A, Berg D. *Fundamental Neuroscience*. 3rd ed. San Diego California; 2009. Cap. 2 pt.9.
11. Lopez Costa JJ, Pecci Saavedra J. Sinapsis, neurotransmisión y generación del impulso nervioso. En: Cingolani HE. *Fisiología de Houssay*. 7ma. ed. El Ateneo; 2000. Cap. 9.
12. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. Liberación de neurotransmisores. En: *Principios de Neurociencia*. 4ta ed. McGraw-Hill; 2001. Cap. 11. p. 253–79.
13. Gartner L, Hiatt J. Tejido nervioso. En: *Tratado de Histología*. 2da ed. 2002. Cap 9. p. 178-211.
14. Verkhratsky A, Butt A. General Pathophysiology of Neuroglia. En: *Glial Physiology and Pathophysiology*. Hoboken New Jersey; 2013. p. 431–450.
15. Pekny M, Pekna M. Biochimica et Biophysica Acta. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *BBA - Mol Basis Dis*. 2016;1862(3):483–91.
16. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32(12):638–47.
17. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7–35.
18. Bundesen L, Scheel T, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of Astrocyte-Meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neuroscience*. 2003;23(21):7789–800.
19. Herrmann J, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen T, et al. STAT3 is a Critical Regulator of Astrogliosis and Scar Formation after Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 2008;28(28):7231–43.

20. Verkhratsky A, Sofroniew M, Messing A, de Lanerolle Nihal C, Remppe D, et al. Neurological diseases as primary gliopathies : a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro*. 2012;4(3):131– 49.
21. Rothstein J, Tsai G, Kuncl R, Clawson L, Cornblath D, Drachman D, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 1990;28(1):18–25.
22. Rothstein J, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath D, Coyle J, et al. Excitatory amino acid in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 1991;30(2):224-25.
23. Rothstein JD, Martin LJ, Kungl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 1992;326(22):1464–8.
24. Rothstein J, Van Kammen M, Levey A, Martin L, Kuncl R. Selective Loss of Glial Glutamate Transporter GLT-1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 1995;38(1):73–84.
25. Flores-Soto M, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*. 2012;27(5):301– 10.
26. Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54(6):859–871.
27. Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1997;42(2):200–7.
28. Corona JC, Tapia R. Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacol*. 2007;52(5):1219–1228.
29. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, et al. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*. 2003;85(3):680–689.
30. Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. Ca(2p)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci*. 2000;180(1- 2):29–34.
31. Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res*. 1994;100:47–541.
32. Lin C, Bristol L, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, et al. Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease : the Cause for Absent EAAT2 , a Glutamate Transporter , in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron*. 1998;20(3):589–602.
33. Vanoni C, Massari S, Losa M, Carrega P, Perego C, Conforti L, et al. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis ( ALS ). *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 22):5417–26.
34. Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH Jr, Trotti D. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem*. 2006;281(20):14076–84.
35. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. 2004;47(1-3):263–74.
36. Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R, Schiffer D. S 100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci*. 1999;261(1-2):25–8.
37. Maihöfner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundörfer B, Heuss D. Expression and localization of cyclooxygenase 1 and 2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J*

- Neurosci. 2003;18(6):1527–1534.
38. Anneser JM, Borasio GD, Cookson MR, Shaw PJ, Ince PG. Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter up-regulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2001;171(2):418–421.
  39. Sasaki S, Shibata N, Komori T, Iwata M. iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2000;291(1):44–48.
  40. Bolaños JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1995;64(5):1965–72.
  41. Stewart VC, Sharpe MA, Clark JB, Heales SJ. Astrocyte derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem.* 2000;75(2):694–700.
  42. Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron.* 1994;13(2):487–494.
  43. Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, De León A, et al. Mitochondrial Dysfunction in SOD1 G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *J Neurosci.* 2008;28(16):4115–22.
  44. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Bolatto C, Trías E, Gandelman M, et al. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2012;7(4):1–9.
  45. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Souza J, Bolatto C, Rodríguez-Bottero S, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:204–13.
  46. Becher B, Barker P, Owens T, Antel J. CD95–CD95L: can the brain learn from the immune system? *Trends Neurosci.* 1998;21(3):114–7.
  47. Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol.* 1999;147(5):1049–1062.
  48. Raoul C, Estévez A, Nishimune H, Cleveland D, DeLapeyrière O, Henderson C, et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS linked SOD1 mutations. *Neuron.* 2002;35(6):1067–83.
  49. Rao S, Yin HZ, Weiss JH. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *Neuroscience.* 2003;23(7):2627–33.
  50. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazontis A, Jessell TM, Wichterle H, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2007;10(5):615–622.
  51. Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan K. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell.* 2008;3(6):637–648.
  52. Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;3(6):649–657.
  53. Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L. Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem.* 2006;97(3):687–96.
  54. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, et al.

- Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol.* 2011;29(9):824–8.
55. Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(44):18126–31.
  56. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Barbeito L. Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci Lett.* 2016;636:27–31.
  57. Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, et al. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 2015;18(2):219–26.
  58. Newman E, Kettenmann H, Ransom B. Glial cell regulation of extracellular potassium. *Neuroglia.* 1995;7:717–731.
  59. Magistretti P. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol.* 2011;96(4):407–10.
  60. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo J, Tramontin A. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(4):287–293.
  61. Nedergaard M, Ransom B, Goldman S. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):523–530.
  62. Pfrieger F. Roles of glial cells in synapse development. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(13):2037–2047.
  63. Abbott N. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):5–23.
  64. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama T, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, et al. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing. *Neuron.* 2007;54(1):59–72.
  65. Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science.* 2010;329(5991):571–575.
  66. Huckstepp R, IdBihi R, Eason R, Dale N, Dicke N, Willecke K, et al. Connexin hemichannel-mediated CO<sub>2</sub>-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol.* 2010;588(Pt 20):3901–3920.
  67. Gourine AV, Kasparov S. Astrocytes as brain interoceptors. *Exp Physiol.* 2011;96(4):411–416.
  68. Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* 2007;55(12):1214–1221.
  69. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1369–1376.
  70. Bourne J, Harria K. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:47–67.
  71. Nedergaard M, Verkhratsky A. Artifact versus reality—How astrocytes contribute to synaptic events? *Glia.* 2012;60(7):1013–23.
  72. Christopherson K, Ullian E, Stokes C, Mallowney C, Hell J, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* 2005;120(3):421–433.
  73. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007;131(6):1164–1178.
  74. Barres B. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008;60(3):430–440.
  75. Danbolt N. Glutamate uptake. *Progr Neurobiol.* 2001;65(1):1–105.
  76. Sattler R, Rothstein J. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;175:277–303.