

Participación astrocitaria y del transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la Esclerosis Lateral Amiotrófica



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Daniel Castro

Elke Díaz

Irma Lombardo

Orientadoras:

Patricia Cassina

Laura Martínez Palma

Departamento de Histología y Embriología
Facultad de Medicina
Universidad de la República

Índice:

| | |
|--|----|
| Resumen | 2 |
| Introducción | 3 |
| Objetivo general | 4 |
| Glutamato | 4 |
| Astrocitos | 5 |
| Reactividad glial | 7 |
| Astrocitos y homeostasis del glutamato | 7 |
| Astrocitos y glutamato en la ELA | 8 |
| Astrocitos reactivos y ELA | 10 |
| Conclusiones | 11 |
| Referencias | 13 |

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 y en el transporte axonal, aumento del estrés oxidativo y aumento en la concentración extracelular de glutamato. 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. Alteraciones en este mecanismo se han encontrado en la ELA y han resaltado la participación de la glía en la progresión de la misma. El glutamato actúa sobre dos familias de receptores: NMDA y no NMDA, donde las alteraciones de éstos probaron estar vinculados 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, revisaremos la bibliografía sobre el rol de los astrocitos y el transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la patogenia de la ELA, exponer algunos interrogantes aún no dilucidados y contribuir a que se realicen nuevas investigaciones que puedan mejorar el tratamiento de estos pacientes.

Palabras clave: Neurodegeneración, astrocitos, EAAT2/GLT1, glutamato, excitotoxicidad.

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 ventilatoria y desnutrición¹.

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 seguimiento². En Uruguay la incidencia media anual estimada para la Esclerosis Lateral Amiotrófica ha sido de 1,42, lo cual se asemeja con los datos internacionales³.

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, entre otras, 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 enfermedad¹. 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 9⁴. Más recientemente se ha encontrado la mutación en el gen NEK1 en el 3% de los casos⁵.

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 glutamato⁴. 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 ⁶.

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 Amiotrófica⁷.

Los astrocitos captan el 80% del glutamato liberado en el espacio sináptico, principalmente mediante la actividad del transportador de glutamato EAAT2 (Excitatory aminoacid transporter 2) o su homólogo murino GLT1 y así mantienen la homeostasis de glutamato⁷. Este mecanismo se altera en la ELA ⁷, 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)⁸.

Objetivo general

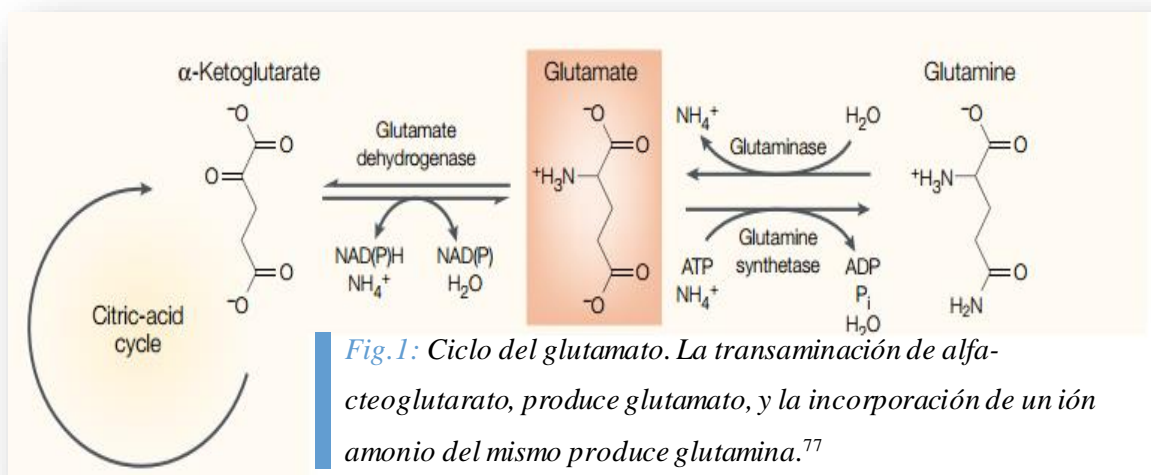
El objetivo de este trabajo es revisar la bibliografía existente sobre el papel que juegan los astrocitos y el transportador de glutamato EAAT2/GLT1 en la patogenia de la ELA con el fin de detectar aspectos no totalmente dilucidados de este mecanismo. Esta información podrá contribuir a diseñar

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 α -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 neuronas⁹ (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 (1-8) de acuerdo a las vías de señalización que activan¹⁰. Estos receptores consisten en proteínas transmembrana acopladas a proteína G, que al ser activados desencadenan una cascada de señalización 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 organismo¹¹. 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 ionotrópicos NMDA o sin afinidad al mismo, llamados por ello no NMDA. Éstos últimos presentan afinidad al kainato, o al α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)⁹.

La liberación de glutamato a la hendidura sináptica depende del influjo de 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 glía¹². 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 astrocitos⁷. 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, e influjo excesivo de iones y calcio y como consecuencia induce el daño y la muerte celular, lo que se conoce como excitotoxicidad⁹. En la figura 2 se observan las interacciones del glutamato con sus receptores y transportadores.

Astrocitos

Los astrocitos son células que pertenecen a la neuroglia 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

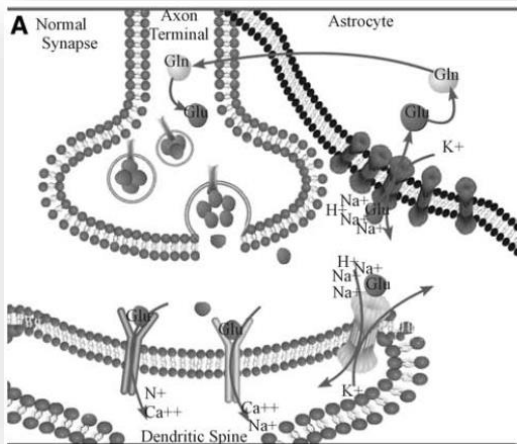


Fig.2: Interacción del glutamato con sus receptores: El glutamato en el espacio sináptico activa los receptores inotrópicos NMDA y no NMDA (AMPA) que resulta en una entrada de Sodio (Na^+) y Calcio (Ca^{2+}) en la neurona post-sináptica generando así una despolarización de la misma, para conformar el potencial de acción ⁹.

elementos neuronales del entorno. Es así que reconocemos astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris (Figura 3) y fibrosos (Figura 4) 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 que las otras prolongaciones rodean las sinapsis (Figura 5). 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 ¹³. Los astrocitos desempeñan múltiples funciones en el SNC,

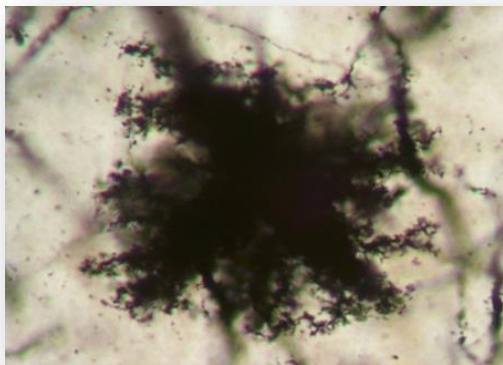


Fig.3: Astrocito protoplasmático. Técnica de Cajal. Se observa el cuerpo celular, sus prolongaciones cortas y romas y pies perivasculariales. Imagen cedida por el departamento de Histología y Embriología UdelaR.

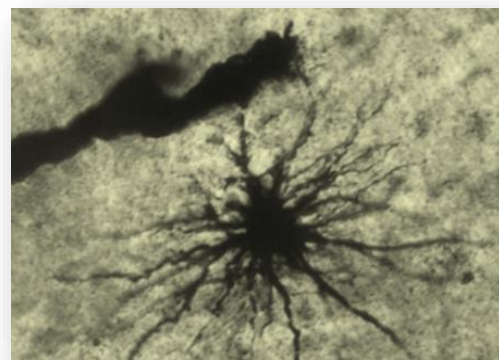
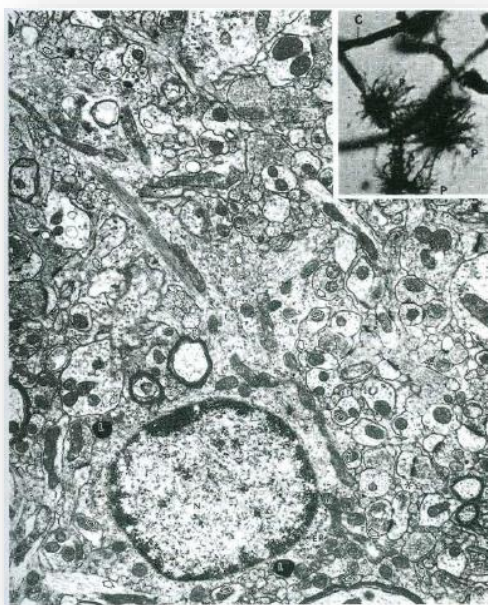


Fig.4: Astrocito fibroso. Técnica de Cajal. Se observa prolongaciones largas y delgadas que parten del cuerpo celular y pies perivasculariales. Imagen cedida por el departamento de Histología y Embriología UdelaR.



*Fig.5: Micrografía electrónica de un astrocito protoplasmático. En cuadrante superior derecho micrografía óptica de tres astrocitos protoplasmático*¹³

para mantener la homeostasis del mismo. Dichas funciones se resumen en el cuadro 1.

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, multietapas, defensiva y conservada evolutivamente¹⁴. Los astrocitos reaccionan manifestando cambios morfológicos y funciones a expensas de alteraciones en la expresión de genes¹⁵.

Estos cambios se ven en diferentes grados; en la astrogliosis reactiva leve a moderada

los astrocitos presentan un cuerpo celular hipertrofico, 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^{16 17}. 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 normal¹⁷.

En la astrogliosis reactiva severa, se forma la cicatriz glial, en donde no solo se ve una hipertrofia de los astrocitos, y un aumento en su proliferación con pérdida de los dominios individuales, sino que también se ven involucradas otras células gliales y células fibromeningeales^{18 19 16 17}. Ante esta alteración estructural del tejido nervioso, no existe posibilidad de reversión hacia un tejido sano²⁰

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 libre en la hendidura sináptica, EAAT1 y EAAT2

Cuadro 1. Funciones de los astrocitos²⁰

*Regulación de los niveles de neurotransmisores, iones y neurohormonas*²¹.

*Acumulación de sustratos energéticos destinados para las neuronas*²²

Determinación de la migración neuronal durante el desarrollo, intervienen en la sinaptogénesis, en la poda sináptica y en la microarquitectura de la materia gris^{23 24 25}

*Formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica*²⁶

Captación de las variaciones sistémicas de CO₂, pH y Na⁺^{27 28 29 30}

Producción y regulación de segundos mensajeros tales como prostaglandina E, ácido araquidónico y óxido nítrico, con lo cual regulan el tono vasomotor^{31 32}

Colaboración en la transmisión sináptica, por vía paracrina^{33 34 35 36 37}

Mantenimiento del normal funcionamiento de la sinapsis glutamatérgicas manteniendo en condiciones fisiológicas los niveles de glutamato (ver texto)^{38 39}

(Excitatory aminoacid transporter, 1 y 2) en humanos, que se corresponden con los tipos murinos GLAST y GLT1 respectivamente. Estos acoplan la entrada de una molécula de glutamato con tres iones Na⁺ y un H⁺, con la consecuente salida de un ion 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 homeostasis del mismo²⁰.

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 2)⁹. Este recibe la denominación del ciclo glutamato-glutamina, ejemplo del sinergismo metabólico entre astrocitos y neuronas.

Astrocytes and glutamate in the ELA

Rothstein y cols⁴⁰. 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^{40 41}. 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-sustrato⁴². 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 constante⁴³. Esto hace que aumente el glutamato extracelular que 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 influjo 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 patogenia de la enfermedad⁴⁴.

Los receptores AMPA están formados por combinaciones de subunidades, GluR1-4,

que forman un canal iónico permeable al sodio⁴⁴. Sin embargo, la subunidad GluR2 hace que este receptor sea impermeable al calcio^{45 46}. En la ELA, el receptor AMPA carece de la subunidad GluR2⁹, volviéndolo permeable al calcio, desencadenando una excesiva estimulación neuronal y desregularización de los receptores de glutamato^{47 48 49}. La exposición prolongada y la alta concentración de glutamato extracelular, pueden dirigir a la expresión de receptores de muerte celular⁵⁰.

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 células están disminuidas. 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 células⁴³.

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 cols⁵¹. 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 anormal⁵¹. La disminución de EAAT2 descrita anteriormente se asemejan 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 GLT1⁵².

Vanoni y cols⁵². 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 β 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 colocalización de GLT1 y β 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 localización 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 transportador⁵². Boston y Cols⁵³ demostraron que la inactivación del transportador es debido a la clivación del dominio citoplasmático C-terminal, producido por la activación de la caspasa-3 en astrocitos⁵³. Esto genera un aumento en la concentración extracelular de glutamato que contribuye a la excitotoxicidad.

Astroцитos reactivos y ELA

En la ELA se produce una fuerte reacción glial alrededor de las motoneuronas superiores e inferiores⁵⁴. Los astrocitos reactivos muestran una inmunoreactividad aumentada para la GFAP y la proteína de unión al calcio S100 β ⁵⁵, expresan marcadores inflamatorios como por ejemplo: ciclooxigenasa 2 (COX2)⁵⁶ e inducen la expresión de enzimas que incluyen la óxido nítrico sintasa, isoformas inducible (iNOS) y neuronal (nNOS)^{57 58}. 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,⁵⁹ mediada por los receptores NMDA⁶¹. La toxicidad producto de la disfunción mitocondrial se ha descrito en astrocitos SOD^{G93A}⁶², donde al reestablecerse la actividad respiratoria mitocondrial mediante antioxidantes mitocondriales o

estimuladores metabólicos, resultó suficiente para revertir la toxicidad^{62 63 64}.

Además, los astrocitos reactivos secretan diversas citoquinas y factores tróficos, entre los cuales se encuentran FasL, TNF α 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^{65 66 67}.

La reactividad predispone a la pérdida de los transportadores de glutamato en los astrocitos, contribuyendo así a la excitotoxicidad. Estudios avalan que las especies reactivas del oxígeno producidas por las motoneuronas dañadas, generan una alteración en la captación del glutamato en los astrocitos cercanos⁶⁸.

Si bien no es suficiente por sí sola la mutación SOD1 para inducir la ELA, los astrocitos que expresan la mutación SOD1, ejercen directa y selectivamente toxicidad sobre las motoneuronas a través de la liberación de factores solubles^{69 70 71}. Esto se ha confirmado en cultivos de astrocitos obtenidos a partir de ratas⁷² o ratones portadores de la SOD^{G93A}⁶⁹ y a partir de células humanas de pacientes con ELA^{69 70 73}. La identificación y aislamiento de una población de células gliales, a partir de la médula espinal de animales portadores de la

mutación SOD1^{G93A} sintomáticos (células AbA)⁷⁴, con gran capacidad tóxica para motoneuronas, fortalece la idea de una toxicidad mediada por astrocitos⁷⁵. 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 neurodegeneración⁷⁴. Sorprendentemente estas células carecen del transportador GLT1 lo cual podría contribuir a su alta toxicidad. Estas células presentan diez veces más capacidad tóxica que los astrocitos neonatales en modelos murinos SOD1^{G93A} para inducir la muerte de las motoneuronas⁷⁴.

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 AbA⁷⁴, lo cual podría contribuir a la progresión de la enfermedad.

Conclusiones

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 alguna de las explicaciones patogénicas de la enfermedad. El hallazgo de que la excitotoxicidad por glutamato está íntimamente relacionada con la neurodegeneración, ha permitido el ensayo de Riluzole como único tratamiento disponible para la enfermedad, pero que ha demostrado escasa efectividad para lograr una completa remisión clínica-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 sería 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 transportadores⁷⁶, 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.

Referencias:

1. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011;377(9769):942-955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7.
2. Logroscino G, Couratier P, Babron M, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis : a meta-analysis. 2016;89:1-18. doi:10.1093/ije/dyw061.
3. Vázquez MC, Ketzoian CLC. Incidence and Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Uruguay : A Population-Based Study. 2008;11600:105-111. doi:10.1159/000120023.
4. Riancho J, Gonzalo I, Berciano J. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2015;(xx):1-11. doi:10.1016/j.nrl.2015.12.001.
5. Wieland T, Weydt P, Bo S, et al. NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. 2016. doi:10.1093/brain/aww033.
6. Matthew P. Frosch, Douglas C. Anthony UDG. Patología estructural y funcional. Robbins y Cotran. In: ; 2015:1251-1318.
7. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2010;63(1-2):189-211. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.004.
8. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane database Syst Rev*. 2012;(3):CD001447. doi:10.1002/14651858.CD001447.pub3.
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):1587-1602. doi:10.1089/ars.2009.2444.
10. Waxham MN. Neurotransmitter receptors. In: *Fundamental Neuroscience*. Tercera. San Diego California; 2009.
11. Housey B. *FISIOLOGIA HOUSSAY Séptima Edición*. séptima.
12. Kandel E, Schwartz J JT. Principios de Neurociencia. In: cuarta edi. ; 2001:253-279.
13. Hiatt J GL. Tratado de Histología.

- In: segunda ed. ; 2002:149-178. doi:10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008.
14. Verkhratsky A BA. General Pathophysiology of Neuroglia. In: *Glial Physiology and Pathophysiology*. Hoboken New Jersey; 2013:431–450.
15. Pekny M, Pekna M. Biochimica et Biophysica Acta Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *BBA - Mol Basis Dis*. 2016;1862(3):483-491. doi:10.1016/j.bbadis.2015.11.014.
16. Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. 2009;(September). doi:10.1016/j.tins.2009.08.002.
17. Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes : biology and pathology. 2010:7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
18. Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 Regulation of Astrocyte-Meningeal Fibroblast Interactions in Response to Spinal Cord Lesions in Adult Rats. 2003;23(21):7789-7800.
19. Herrmann JE, Imura T, Song B, et al. STAT3 is a Critical Regulator of Astrogliosis and Scar Formation after Spinal Cord Injury. 2008;28(28):7231-7243.
20. Verkhratsky A, Sofroniew M V, Messing A, Nihal CI, Rempe D. Neurological diseases as primary gliopathies : a reassessment of neurocentrism. 2012;4(3):131-149. doi:10.1042/AN20120010.
21. Newman EA, Kettenmann H, Ransom B E. Glial cell regulation of extracellular potassium. *Neuroglia*. 1995:717–731.
22. Magistretti P. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*. 2009:2304–2311.
23. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM TA. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:287–293.
24. Nedergaard M, Ransom B GS. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26:523–530.
25. Pfrieger F. Roles of glial cells in synapse development.. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66::2037–2047.
26. Abbott N. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25::5–23.
27. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama

- TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K NM. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. *Neuron*. 2007;54:59–72.
28. Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K KS. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science (80-)*. 2010;329::571–575.
29. Huckstepp RT, id Bihi R, Eason R, Spyer KM, Dicke N, Willecke K, Marina N, Gourine AV DN. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol*. 2010;588::3901–3920.
30. Gourine AV KS. Astrocytes as brain interoceptors. *Exp Physiol*. 2011;96::411–416.
31. Gordon GR, Mulligan SJ MB. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*. 2007;55:1214–1221.
32. Iadecola C NM. Iadecola C, Nedergaard M Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 2007;10:1369–1376.
33. Bourne JN HK. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:47–67.
34. Nedergaard M VA. Artifact versus reality—How astrocytes contribute to synaptic events? *Glia*, doi: 2012;Glia, doi:
35. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P BB. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 2005;120:421–433.
36. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW BB. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131:1164–1178.
37. Barres B. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 2008;60:430–440.
38. Danbolt N. Glutamate uptake. *Progr Neurobiol*. 2001;65:1–105.
39. Sattler R RJ. Regulation and dysregulation of glutamate

- transporters. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;277–303.
40. Rothstein JD, Tsaig G, Kuncl RW et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol.* 1990;28(18):25.
41. Rothstein JD, Kuncl R, Chandhsy V et al. Excitatory amino acid in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol.* 1991;30(224):5.
42. Rothstein JD, Martin LJ KR. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 1992.
43. Rothstein JD, Kammen M Van, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective Loss of Glial Glutamate Transporter GLT-1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 1995.
44. Flores-soto ME, Chaparro-huerta V, Escoto-delgadillo M, Vazquez-valls E. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. 2012;27(5). doi:10.1016/j.nr1.2011.10.014.
45. Isaac JT, Ashby M and MC. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron.* 2007;54:859–871.
46. Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK and SP. 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;42:200-207.
47. Corona R et al. Ca²⁺ permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *J Neuropharmacol.* 52:1219–1228.
48. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H AH, Jeong SY and KI. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem.* 2003;85:680–689.
49. Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E and RW. Ca(2p)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci.* 2000;180:29-34.
50. Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Re.* 1994;100:47-541.
51. Lin CG, Bristol LA, Jin L, et al.

- Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease : the Cause for Absent EAAT2 , a Glutamate Transporter , in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 1998;20:589-602.
52. Vanoni C, Massari S, Losa M, et al. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). 2004;1. doi:10.1242/jcs.01411.
53. Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Trotti D. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14076-14084. doi:10.1074/jbc.M600653200.
54. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. 2004;47:263-274. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.05.003.
55. Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R SD. S 100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis,. *Neurosci.* 1999;261:25-28.
56. Maihofner C, . Probst-Cousin S, Bergmann M NW, Neundorfer B HD. Expression and localization of cyclooxygenase 1 and 2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis,. *Eur J Neurosci.* 2003;18:1527– 1534.
57. Anneser J.M, Cookson M.R, Ince P.G, Shaw P.J BGD. Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter up-regulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis,. *Exp Neurol.* 2001;171:418–421.
58. Sasaki S, Shibata N, Komori T IM. iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis,. *Neurosci.* 2000;291:44– 48.
59. Bolaños J.P., Heales S.J.R, Land J.M CJB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary cultures,. *J Neurochem.* 1995;64:1965-1972.
60. Stewart V.C, Sharpe M.A, Clark J.B HSJR. , Astrocyte derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain,. *J Neurochem.* 2000;75:694-700.
61. Hewett SJ, Csernansky CA CD.

- Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron*. 1994;13:487–494.
62. Cassina P, Cassina A, Pehar M, et al. Mitochondrial Dysfunction in SOD1 G93A -Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration : Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Neurobiol Dis*. 2008;28(16):4115-4122. doi:10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008.
63. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, 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. doi:10.1371/journal.pone.0034776.
64. Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:204-213. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019.
65. Becher B, Barker P.A, Owens T AJP. CD95–CD95L: can the brain learn from the immune system? *Trends Neurosci*. 1998;(21):114-117.
66. Raoul C, Henderson C.E PB. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor,. *J Cell Biol*. 1999;147:1049–1062.
67. Raoul C, Estevez A.G et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS linked SOD1 mutations,. *Neuron*. 2002;35:1067-1083.
68. Rao S.D, Yin H.Z WJH. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons,. *J Neurosci*. 2003;23:2627-2633.
69. Nagai M et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*. 10:615–622.
70. Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S EK. 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;3:637–648.
71. Marchetto MC et al. Non-cell-

- autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3:649–657.
72. 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):687-696. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03742.x.
73. Haidet-Phillips AM et al. - Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. 2011;29:824-828.
74. 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. 2011. doi:10.1073/pnas.1110689108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110689108.
75. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Barbeito L. Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci Lett*. 2016. doi:10.1016/j.neulet.2016.07.052.
76. Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela J a, et al. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 2015;18(2):219-226. doi:10.1038/nn.3901.
77. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. 2002;3(September):748-755.