

# *1. Introducción*

## **1.1 ANTECEDENTES**

### **1.1.1 Nociones básicas sobre la organización del Sistema Nervioso**

Dentro de los sistemas orgánicos el Sistema nervioso es el sistema de control e integración por excelencia. En los humanos, desde un punto de vista morfológico, podemos dividirlo en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC está integrado por el encéfalo y la médula espinal, mientras que el SNP está formado por los nervios que unen dicho SNC con las diferentes partes del organismo. Este SNP consta de doce pares de nervios craneales y 31 pares de nervios raquídeos o espinales. Como resultado de la evolución, el sistema nervioso está diseñado para responder ante ciertos fenómenos físicos y químicos, permitiendo de esta manera controlar y regular la actividad de los seres vivos, tanto en su relación con el medio externo como con el propio cuerpo. Las nociones que siguen respecto de la organización general del sistema nervioso, de las neuronas y sus tipos y

del desarrollo del SNC están tomadas de los reconocidos tratados de Kandel y col (2001) y Purves y col. (2007).

En una aproximación funcional el Sistema Nervioso se divide en Sistema Nervioso Somático (SNS) o de la vida de relación, y Sistema Nervioso Vegetativo o Autónomo (SNA). El SNS se comporta como el principal sistema que controla la relación del individuo con el medio externo, lo que le permite integrar la información aferente (de entrada) y elaborar respuestas motoras (eferentes) mediante los músculos esqueléticos. Presenta para ello una serie de estructuras que se conocen como receptores, que están especializados en captar los cambios que se suceden en el exterior (estímulos), y cadenas neuronales que conducen estos estímulos a los centros superiores donde se produce la percepción, que consiste en la modulación e interpretación del fenómeno permitiendo producir una respuesta adecuada. De igual manera este SNS controla y regula la actividad biológica del individuo, haciendo que cada uno de los demás sistemas, órganos y células que componen el organismo tengan una actividad apropiada y participen adecuadamente en todos los eventos de la vida. Es así como el sistema nervioso controla la actividad somática (voluntaria, consciente) del ser humano y le permite relacionarse con el medio y con sus congéneres.

El SNA está integrado por las estructuras nerviosas responsables de (1) captar, transmitir y procesar la información sensitiva procedente de los órganos viscerales (por ejemplo de los sistemas digestivo y cardiovascular) y (2) emitir las órdenes que controlan la musculatura lisa (involuntaria) y cardíaca, y la función de las glándulas viscerales.

Aunque su nombre parece indicar que su función es independiente del sistema nervioso somático, la actividad del SNA puede ser

modificada (aumentada o disminuida) por el sistema nervioso central, en particular por la corteza cerebral y el cerebro emocional. Anatómicamente las regiones viscerales y somáticas del SN están íntimamente relacionadas.

#### **1.1.1.1 Desarrollo embrionario**

La complejísima arquitectura del cerebro de los mamíferos es el resultado del desarrollo embrionario, pero también de las modificaciones que sufre a lo largo de la vida como consecuencia de la relación con el ambiente (estímulos, aprendizaje). En el desarrollo tiene una importancia primordial la expresión de las instrucciones genéticas, que establecen inicialmente las diferentes regiones, producen las distintas células y dirigen la migración desde los lugares de generación hasta sus destinos finales. Estos fenómenos son previos y necesarios para la ulterior producción de las innumerables conexiones que harán funcionar la maquinaria más compleja que ha creado la naturaleza.

El sistema nervioso proviene básicamente de la capa ectodérmica del disco embrionario trilaminar. En el proceso de neurulación, el ectodermo suprayacente a la notocorda se diferenciará en placa neural, que en pocos días se pliega, se hunde y se transforma en un tubo, el tubo neural, esbozo del SNC. De dicha placa neural se han de diferenciar todos los tipos neuronales así como mayoría de las células de la glía, es decir, los astrocitos y oligodendrocitos. Por el contrario las células de la microglia derivan del mesodermo.

En el caso del cerebro humano, en el plazo de unos meses, y a partir de una pequeña población de precursores, se van a formar unos 100.000 millones de neuronas y muchas más células gliales. En función del

momento y el lugar, así las influencias y los genes expresados, para dar lugar a tan enorme diversidad de tipos celulares, disposición en el espacio, morfologías, neurotransmisores, sinapsis, canales iónicos etc.

El sistema nervioso es un sistema bioeléctrico dinámico y complejo, cuyas células presentan el más alto grado de diferenciación y especialización celular, que poseen caracteres como la excitabilidad y conductividad, rasgos que le permiten captar los estímulos físicos y químicos que se suceden tanto en el medio externo como en el medio interno, convertirlos en potenciales eléctricos y conducirlos por vías nerviosas hacia los centros donde se analizan, integran y elaboran las respuestas.

#### **1.1.1.2. Características Histológicas. Las neuronas**

Tejido: El sistema nervioso esta conformado por un tejido rico en células y pobre en sustancia intercelular, lo que permite denominarlo como un tejido celular, las células que lo componen se diferencian en dos líneas: la neuronal y la neuroglial.

Neuronas: Corresponden a las células que conducen el estímulo nervioso, procesan la información y elaboran una respuesta.

Las neuronas presentan en su constitución cuatro zonas a saber:

- Zona receptora: que corresponde a las prolongaciones dendríticas y al cuerpo o soma neuronal y es donde se capta el estímulo nervioso.
- Zona generadora: que corresponde al cono axónico y es donde se genera el impulso nervioso.
- Zona conductora: que corresponde al axón neuronal y por medio del cual se conduce el impulso nervioso.

- Zona de transmisión: que corresponde al telodendron donde se produce el paso del estímulo de una neurona a otra o de una neurona a un órgano efector.

### Clasificación de las neuronas

Según el número de prolongaciones citoplasmáticas que poseen se clasifican en: (1) Neuronas Monopolares, que poseen una sola prolongación citoplasmática, se encuentran principalmente en el tejido embrionario y en reductos embrionarios del adulto. (2) Neuronas Pseudomonopolares, dotadas de una sola prolongación citoplasmática que se bifurca a su salida de la neurona. Se ubican principalmente en los ganglios de los nervios craneales y espinales del SNP. (3) Neuronas Bipolares, las que poseen dos polos de los cuales emergen sendas prolongaciones citoplasmáticas. Se localizan principalmente en algunos órganos de los sentidos como las células bipolares de la mucosa olfatoria, las células bipolares del órgano de Corti y las células bipolares de la retina. (4) Neuronas Multipolares, que poseen numerosas prolongaciones citoplasmáticas, son las más abundantes y se encuentran conformando los principales órganos del SNC, principalmente la sustancia gris de la corteza cerebral y cerebelosa, los núcleos basales del cerebro y los núcleos cerebelosos, las astas de la médula espinal y los ganglios paravertebrales y prevertebrales del SNA. Estas células multipolares se dividen, a su vez, en varios tipos dependiendo de la forma del cuerpo neuronal (soma) o de las características del axón.

Según la forma del soma distinguimos: (1) Células estrelladas: Células multipolares cuya forma semeja una estrella. Se pueden diferenciar en este tipo de célula dos variaciones: las células estrelladas de axón largo (Golgi tipo I) y las células estrelladas de axón corto (Golgi tipo II). (2) Células

Piramidales: Son células cuyo cuerpo tiene forma de pirámide entre las que se pueden diferenciar células pequeñas, medianas, grandes y gigantes (de Betz). (3) Células fusiformes: como lo indica su nombre son células cuyo cuerpo presenta forma de huso. (4) Células piriformes: Conocidas con el nombre de células de Purkinje, se encuentran localizadas en la capa media de la corteza cerebelosa.

También hay clasificaciones que se fijan en la forma o las características del axón, pero no creemos necesario extendernos en estas precisiones. Para más información, véanse los tratados de Neurociencia.

### Fibras Nerviosas

Una fibra nerviosa esta constituida por un axón más su vaina de mielina (cuando esta existe). Las fibras nerviosas se clasifican en función de su diámetro, lo que tiene una relación directa con la velocidad de conducción. Así, según la clasificación de Erlanger y Gasser existen fibras tipo A, B y C, siendo las primeras las más gruesas y rápidas (las de los tipos A y B son miélicas) y las C las más delgadas y lentas.

En cuanto a su disposición o recorrido en el SNC, podemos distinguir entre:

- Fibras Comisurales: interconectan áreas corticales de los dos hemisferios pasando la línea media, como ejemplo la comisura blanca anterior y el cuerpo calloso.
- Fibras de Asociación: estas fibras relacionan áreas corticales del mismo hemisferio, por ejemplo la cápsula externa y cápsula extrema.

-Fibras de Proyección: Son fibras que conectan áreas corticales con otros centros como son los núcleos del tronco cerebral o de la médula espinal.

-Fibras Musgosas y Trepadoras: Son fibras aferentes al cerebelo que provienen de núcleos del tronco cerebral o astas del cordón espinal.

### 1.1.1.3 Las células gliales

Después de la generación de las neuronas, el neuroepitelio da lugar a las células gliales, en número mayor que el de las neuronas (este punto es discutido en la actualidad: véase Hilgetag y Barbas, 2009; Azevedo y col., 2009). Aunque todavía tratamos de precisar cuántas hay en el cerebro humano, si sabemos que la proporción entre células gliales y neuronas aumenta conforme se incrementa la complejidad de los seres vivos, siendo mayor en los mamíferos, entre ellos los primates (Allen y Barres, 2009). Este dato da idea de la importancia funcional de la glía; por ello, y por ser objeto central de nuestro trabajo, nos extenderemos algo más en considerar las características de estas células.

Desde que en 1846 Virchow describiera por primera vez la glía, asignándole un papel de "cemento neuronal" (nerve glue) han sido numerosos los trabajos que nos van permitiendo conocer tanto los aspectos morfológicos como funcionales de las células gliales, aunque quedan todavía muchas incógnitas por resolver.

En las primeras décadas de este siglo fueron fundamentales los trabajos que desarrollaron primero Cajal (1913, 1916) y posteriormente Rio Hortega (1919, 1921) acerca de la morfología de las células gliales, que permitieron realizar la primera clasificación en macroglia y microglia. La

macroglia es de origen ectodérmico (Penfield, 1932), originándose del neuroepitelio primitivo que tapiza la cavidad del tubo neural, mientras que la microglia, como ya hemos señalado, se forma a partir del mesodermo pial (Kershman, 1949). En el sistema nervioso central hay un tercer grupo de células gliales que son los endoteliales, que recubren la superficie ventricular y el conducto endotelial; el conjunto de todos ellos constituye el endotelio. Finalmente, en el sistema nervioso periférico se encuentran las células de Schwann, responsables de la formación de la vaina de mielina en los nervios periféricos.

Hasta hace pocos años a la glía, en sus diferentes tipos, se le asignaba un papel más o menos relevante en las siguientes funciones (Kandel y col., 2001; Shao y McCarthy, 1994):

- Elementos de sostén que proporcionan al cerebro consistencia. Asimismo separan y, ocasionalmente, aíslan los diferentes grupos de neuronas.
- Formación de mielina, la vaina aislante que recubre gran parte de los grandes axones.
- Eliminación de residuos después de lesión o muerte neuronal. Participan también en la respuesta inmune del cerebro.
- Captación y eliminación de transmisores liberados por neuronas durante la transmisión sináptica. Además regulan los niveles extracelulares de iones de manera que las neuronas puedan mantener su excitabilidad.
- Algunas de las células gliales sirven de guía a la emigración neuronal durante el desarrollo y dirigen el crecimiento axonal proporcionando factores tróficos.
- Inducen la formación de complejos de unión impermeables (tight junctions) en las células endoteliales que delimitan los

capilares y venas cerebrales, contribuyendo a la formación de la barrera hematoencefálica.

- Algunas parecen contribuir a la nutrición de las células nerviosas almacenando glucógeno como reserva energética.

Dentro de la macroglía del SNC, basándonos en criterios morfológicos y funcionales, podemos distinguir dos grandes grupos celulares, los astrocitos (astroglía) y los oligodendrocitos u oligodendroglía.

#### **1.1.1.3.1 Astroglía**

Los astrocitos tienen un aspecto estrellado siendo las células gliales más grandes y abundantes del organismo. Poseen gran cantidad de prolongaciones, algunas de las cuales se ensanchan y se convierten en pies terminales o "chupadores" alrededor de los capilares (Maynard y col., 1957; De Robertis y Gerschenfeld, 1961; Brightman y Reese, 1967); estos pies terminales son claves en el paso de sustancias desde la sangre hacia el tejido nervioso (Snell, 2007; Gartner, 2008).

Una de las características más llamativas de los astrocitos es la presencia en su citoplasma de microtúbulos y microfilamentos; estas gliofibrillas se disponen en haces y están constituidas fundamentalmente por la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), lo que permite su identificación por métodos inmunohistoquímicos (Dahl y Bignami, 1973a, b; Juanes, 1990; McQueen y col., 1992). Los astrocitos se localizan tanto en el tejido nervioso como en su superficie; en esta última forman parte de una capa marginal de revestimiento, o capa limitante glial externa.

Dentro de los astrocitos se distinguen clásicamente dos tipos, los astrocitos protoplasmáticos, que se localizan alrededor de los somas neuronales, es decir en la sustancia gris; y los astrocitos fibrosos que se

encuentran en la sustancia blanca. En la actualidad se pone en duda la distinción entre unos y otros, puesto que ambos tipos presentan caracteres ultraestructurales similares, comparten algunos determinantes antigénicos, las mismas especializaciones de membrana y reaccionan de igual manera ante las agresiones (véase Privat y Rataboul, 1986).

Aunque se cuestione la división de los astrocitos, lo cierto es que son un conjunto de células que presentan cierta heterogeneidad, por lo que su definición es objeto de debate (Walz, 2000). Por el momento tampoco tenemos elementos de juicio para entrar en el debate acerca de si los astrocitos son un tipo celular con particularidades regionales o si se trata de varios tipos o subtipos de células especializadas morfológica y funcionalmente. En el hipocampo del ratón, según sus características electrofisiológicas, se diferencian astrocitos “complejos” y “pasivos” según muestren una corriente de K<sup>+</sup> hacia fuera o hacia adentro (Steinhauser et al., 1994). Mediante esta clasificación se encuentra un patrón de caracteres que apoya la existencia de, al menos, dos subtipos de astrocitos en dicho territorio. Estos tipos difieren en morfología y expresión de moléculas que unen (receptores) o transportan glutamato (Matthias y col., 2003).

En los últimos años también se han obtenido datos que indican que los astrocitos presentan fases definidas en su desarrollo en las cuales manifiestan distintos fenotipos electrofisiológicos (Zhou y col., 2006). Nuestro método para reconocer y marcar los astrocitos es la detección de sus filamentos intermedios característicos del adulto, más concretamente la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Debemos, no obstante, recordar que los astrocitos inmaduros se marcan con vimentina (VIM) y nestina, que son los filamentos intermedios que constituyen su citoesqueleto en las primeras etapas. Más tarde, conforme van madurando estos filamentos son reemplazados por los de GFAP. Durante un periodo del desarrollo la expresión de estos filamentos puede solaparse, pero en el animal adulto la

coexpresión sólo se advierte en circunstancias de gliosis reactiva (Eliasson y col., 1999).

#### **1.1.1.3.2 Oligodendroglía**

El término oligodendroglia fue introducido por Río Hortega en 1921 para describir unas células con escasas prolongaciones en preparaciones teñidas con impregnaciones metálicas; estas prolongaciones salen radialmente de un cuerpo celular poligonal o esférico. Los oligodendrocitos se encuentran tanto en la sustancia gris como en la blanca. En la sustancia blanca se encuentran alineados entre las fibras nerviosas, son los oligodendrocitos interfasciculares, mientras que en la sustancia gris se asocian a grupos de fibras nerviosas mielinizadas o bien, mantienen una estrecha asociación con las neuronas, son las llamadas células satélites.

Con el microscopio electrónico se diferencian tres tipos de oligodendrocitos dependiendo de su densidad electrónica: oscuros, claros e intermedios (Mori y Leblond, 1970).

En cuanto a la función de este tipo de neuroglia, se sabe que son las células encargadas de producir las vainas de mielina en el sistema nervioso central. Según algunos autores (Hydén, 1959, 1967; Hydén y Pigon, 1960) existiría una relación simbiótica entre las neuronas y los oligodendrocitos satélites, interviniendo estos últimos en la nutrición de las neuronas. Por último, también se atribuye a los oligodendrocitos una función fagocitaria (Ferraro y Davidoff, 1928).

#### **1.1.1.3.3 Microglia**

La microglia es el sistema macrofágico del SNC, distribuyéndose por toda su extensión (Imamoto, 1981; Thomas, 1992). La microglia

constituye, al parecer, un 20% de la población de células gliales y su función consiste en eliminar por fagocitosis los detritus celulares y las células nerviosas muertas que desaparecen a lo largo del desarrollo (apoptosis) o bien los virus, bacterias o materiales extraños (Gartner, 2008). Asimismo participan en los procesos inflamatorios o infecciones del SNC, por lo que su papel es relevante en muchas enfermedades neurodegenerativas e infecciosas, tal como demuestran las investigaciones realizadas en los últimos años.

La microglia puede también liberar sustancias citotóxicas. En cultivo secretan cantidades notables de  $H_2O_2$  y NO, que pueden producir muerte neuronal. Las proteasas secretadas por la microglia también causan daño celular, al tiempo que las citoquinas (tipo IL-1) producen desmielinización de axones. Finalmente la microglia puede lesionar neuronas liberando glutamato y aspartato (via receptores NMDA), de manera que la acción de estas células es responsable de daños colaterales importantes (Gehrmann y col., 1995).

Las células microgliales son tremendamente plásticas, y son capaces de reaccionar, según su función y localización, mediante una serie de cambios estructurales que son conocidos. Tal plasticidad se requiere para cumplir adecuadamente la gran variedad de funciones inmunitarias que estas células llevan a cabo y que tienen por objeto mantener la homeostasis en el medio cerebral.

#### **1.1.1.3.4 Una nueva visión sobre el papel de la glía.**

Las células gliales son el grupo celular más abundante en el cerebro y, como hemos señalado, conocemos bien su función como células subalternas al servicio del normal funcionamiento de las neuronas. No obstante, en las dos últimas décadas se han realizado numerosas

observaciones que están cambiando esta visión clásica del papel de las células gliales. Así se ha sabido que los dos tipos de células macrogliales (astrocitos y oligodendrocitos) expresan canales iónicos y receptores acoplados a proteínas G, propiedades que antes se creían exclusivas de las neuronas. Estas células pueden, por tanto, recibir señales de las neuronas en función del tipo celular, estadio de desarrollo y área cerebral donde se localizen, participando más activamente de lo que se pensaba en la función cerebral (Gallo y Russell, 1995).

Es más, en los últimos años, se ha planteado que la glía desempeña un papel activo en el control de la actividad neuronal así como de la neurotransmisión sináptica (Araque y col., 1999; Carmignoto, 2000; Gallo y Ghiani, 2000; Ullian y col., 2001; Bezzi y Volterra, 2001; Allen y Barres, 2009; Halassa y Haydón, 2010; Giaume y col., 2010; Navarrete y col., 2012). El panorama actual nos presenta a la glía, en especial los astrocitos, como células capaces de recibir, elaborar y transmitir información (además de cumplir con las funciones señaladas antes). Los datos en que se basan los autores citados pueden resumirse como sigue:

- I. La mayoría de los neurotransmisores (glutamato, dopamina, noradrenalina, GABA, acetilcolina o adenosina y otros) liberados desde las terminaciones nerviosas, además de su acción sobre la neurona postsináptica, son capaces de activar receptores presentes los en astrocitos vecinos y, de este modo, inducir cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  de estas células. Estos cambios determinan que los astrocitos liberen, a su vez, sustancias neuroactivas (glutamato, ATP, prostaglandinas, D-serina, óxido nítrico) las cuales van a modular la actividad neuronal (lo que se conoce como gliotransmisión). De lo expuesto se deduce la existencia de una

red de interacciones entre neuronas y células gliales, con mensajes químicos moduladores en ambos sentidos.

- II. El repertorio de interacciones entre neuronas y células gliales se completa con la demostración reciente, por métodos electrofisiológicos y ultraestructurales, de sinapsis químicas entre neuronas y células precursoras de oligodendrocitos en el hipocampo (Bergles y col., 2000). Este hecho, sin embargo, no es tan novedoso si tenemos en cuenta que desde hace más de tres décadas se sabe que los tanicitos, células gliales especializadas que se encuentran en el hipotálamo, están ricamente inervados (Kobayashi y Matsui, 1969; véase Peruzzo, 2001). Además, neuronas y células gliales pueden acoplarse eléctricamente a través de gap junctions, lo que ha sido demostrado tanto en cultivo como in situ en el locus ceruleus (véase Bezzi y Volterra, 2001).
- III. Ya se conoce que, en la glía, el glutamato se almacena en vesículas y se libera por exocitosis (Montana y col., 2004, 2006); de manera que el proceso es similar al que tiene lugar en los terminales sinápticos de las neuronas; es decir, las neuronas y los astrocitos intercambian señales utilizando el mismo transmisor.
- IV. Entre las nuevas funciones que se atribuyen a la glía estaría la de inducir el establecimiento de sinapsis entre neuronas, así como estabilizar las ya establecidas. El grupo de Barres en la Universidad de Stanford señala que el número de sinapsis que recibe una neurona no es una propiedad determinada de dicha

neurona, sino que puede estar regulada por señales externas. En ausencia de glía las neuronas cultivadas tienen una capacidad muy limitada para formar sinapsis, pero en presencia de astrocitos se incrementa hasta siete veces el número de sinapsis estructuralmente maduras (Ullian y col., 2001; Allen y Barres, 2009).

En el hipotálamo mediobasal las neuronas del núcleo arcuato mantienen abundantes contactos con las prolongaciones de las células gliales. Esta relación sufre variaciones en el estado funcional de las neuronas e influye en el número de contactos sinápticos que reciben dichas neuronas. En el Instituto Cajal, el grupo de García-Segura ha estudiado el grado de contacto glía/neurona en el núcleo arcuato a lo largo del ciclo estral. Sus hallazgos indican que durante la tarde de proestro y la mañana de estro aumenta la superficie de membrana de las neuronas cubierta por las prolongaciones gliales, y que este incremento se acompaña de un descenso en el número de sinapsis que reciben estas neuronas, produciéndose una desconexión entre los somas y los terminales presinápticos (García-Segura y col., 1994).

Otra manera de ver la importancia determinante del papel que juegan los astrocitos en el funcionamiento del sistema nervioso surge cuando se analiza su distribución espacial. En el hipocampo de ratas, los astrocitos (cuyas prolongaciones se llenan con colorante) ocupan territorios separados de unas 70 mil micras cúbicas (lo que equivale a arborizaciones tridimensionales de algo más de 40 micras de lado). El mismo concepto de dominio o zona de influencia, aplicado a los astrocitos protoplasmáticos del córtex humano da resultados semejantes con cierto solapamiento (Kimelberg y Nedergaard, 2010). Esto permite plantear que un astrocito reaccionaría como una entidad con cierta autonomía ante los cambios neuronales en su

territorio, en el que habrá unas 100.000 sinapsis (Bushong et al., 2002) y un cierto número de capilares.

#### **1.1.1.3.5 Otros datos sobre la biología y función de los astrocitos**

Ya hemos señalado que cada astrocito puede contactar con miles de sinapsis. En la sustancia gris las prolongaciones de los astrocitos rodean a las sinapsis y mantienen con ellas una relación muy estrecha; en la sustancia blanca rodean a multitud de axones. Además los astrocitos contactan con los vasos sanguíneos cerebrales mediante extensiones o pies terminales (endfoot) que sirven para recoger sustratos metabólicos (glucosa) o para transmitir mensajes que regulan el diámetro vascular en relación con la actividad de las neuronas (Mulligan y MacVicar, 2004).

Los astrocitos son capaces de informarse de los cambios en el ambiente que los rodea y responder al momento para ajustarlos a las necesidades de las neuronas. Así, regulan la concentración extracelular de iones, influyen en el número, estabilidad y nivel de actividad de las sinapsis a través de la síntesis y reciclado de los neurotransmisores, y se comunican con otros astrocitos y con las neuronas vecinas liberando varios transmisores (Allen y Barres, 2005; Escartin y col., 2006). En suma, el funcionamiento neuronal está atado irrevocablemente al de los astrocitos de manera que las disfunciones astrocitarias tienen un impacto directo sobre la actividad neuronal. Veamos con más detalle algunas de las funciones de los astrocitos.

#### ***Metabolismo y nutrientes***

Los astrocitos realizan un seguimiento de la actividad neuronal en su región y regulan el flujo sanguíneo de acuerdo con las necesidades, de manera que haya glucosa disponible (la fuente básica de energía en el cerebro), bien de sus reservas de glucógeno o de los vasos vecinos. Para ello

los astrocitos se disponen físicamente estableciendo un puente de continuidad entre los vasos y las neuronas (Simard y col., 2003; Zonta y col., 2003), contactando con aquellos a través de los pies terminales (que contienen transportadores de glucosa, Leloup y col., 1994; Leino y col., 1997). Esta disposición sirve, además, a la regulación del flujo sanguíneo cerebral induciendo vasodilatación o vasoconstricción en función de las necesidades.

Cuando los astrocitos detectan actividad neuronal, la glucosa que contienen sufre glicolisis, proceso que produce rápidamente ácido láctico. El ácido láctico es liberado y utilizado por las neuronas para producir ATP (Pellerin y Magistretti, 2004). Otro modo de proporcionar sustratos metabólicos es la producción de piruvato a partir de L-serina, sustancia que puede ser utilizada como fuente de ácido láctico; de hecho el enzima responsable, la serina racemasa, se encuentra preferentemente en los astrocitos (Foltyn y col., 2005). Que los astrocitos sean la fuente energética de las neuronas también significa que la alteración del metabolismo glial conlleva la vulnerabilidad de las neuronas a la lesión neurotóxica (Lian y Stringer, 2004).

### *Metabolismo iónico.*

Los astrocitos participan en la regulación de la concentración iónica en el conjunto del cerebro y, en particular, en las sinapsis. La comunicación bidireccional entre los astrocitos y las neuronas se consigue mediante la liberación y captación de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , y  $\text{H}^{+}$ . El  $\text{K}^{+}$  liberado durante la despolarización presináptica es captado por los astrocitos adyacentes y redistribuido entre un conjunto de astrocitos via gap junctions, lo que se conoce como tamponamiento espacial (Laming y col., 2000). Es así como el gradiente de potencial del equilibrio del  $\text{K}^{+}$  mueve este ión de un área de concentración elevada a otra de baja concentración, alejándolo de la neurona activa.

También fluctúa el pH intra y extracelular de un área concreta durante los episodios de actividad neuronal. Los astrocitos regulan el pH mediante varios procesos, incluyendo el intercambio y transporte de iones. En su respuesta a los cambios en las necesidades metabólicas los astrocitos alteran la expresión genética o su propia morfología, así como la de las neuronas y sinapsis de alrededor (Magistretti, 2006).

### *Gliotransmisión*

Otra de las vías cruciales de los astrocitos para controlar y responder al ambiente es la síntesis, liberación y regulación de varias moléculas de señalización, entre ellas la S100b, Ca<sup>2+</sup>, glutamato, y D-serina.

#### *S100b.*

La proteína S100b, así llamada por ser 100% soluble en sulfato de amonio saturado, es una molécula producida por los astrocitos que participa en multitud de cascadas de señales dependientes del Ca<sup>2+</sup>, que influyen en la estructura y función tanto de los propios astrocitos como de las neuronas (Rothermundt y col., 2003). Durante el desarrollo la S100b regula la proliferación y diferenciación celular y la sinaptogénesis (Rothermundt y col., 2004a), más tarde, en el SNC maduro, la S100b se acumula en las prolongaciones de los astrocitos donde va a modular niveles de actividad enzimática, factores de transcripción y fosforilación de proteínas (Zimmer y col., 1995). La expresión de S100b influye también en el metabolismo energético, homeostasis del calcio, y crecimiento y diferenciación celular, incluyendo el grado de extensión de las prolongaciones de los astrocitos, en parte regulando la incorporación al citoesqueleto dependiente de la fosforilación de GFAP (Garbuglia y col., 1999; Mbele y col., 2002). La S100b es secretada a la sinapsis por los astrocitos, donde se piensa que juega un papel en la plasticidad sináptica (Nishiyama y col., 2005).

Inhibiendo la expresión de S100b en astrocitos en cultivo se altera la morfología y proliferación de estas células (Selinfreund y col., 1990). Los cambios en la expresión de S100b pueden alterar el crecimiento de axones y dendritas (Whitaker-Azmitia y col., 1997; Nishiyama y col., 2002). A la inversa, en ausencia de astrocitos el crecimiento neuronal está muy limitado, tanto in vivo como in vitro, un fenómeno que podría depender de la funcionalidad de la S100b (Nagler y col., 2001; Ullian y col., 2001; Ullian y col., 2004). Las alteraciones en la expresión de S100b producen incluso cambios de conducta. La sobreexpresión de S100b en ratones transgénicos altera el aprendizaje espacial, reduce la conducta exploradora y la ramificación de las neuronas (Gerlai y col., 1994; Whitaker-Azmitia y col., 1997; Winocura y col., 2001), mientras que los ratones sin S100b, muestran una plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria aumentados (Nishiyama y col., 2002).

#### *Señalización por Ca<sup>2+</sup>*

El descubrimiento de que los astrocitos eran capaces de propagar ondas de Ca<sup>2+</sup> entre ellos fue uno de los factores que inició el renovado interés por estas células en la última década del pasado siglo (Cornell-Bell y col., 1990b; Charles y col., 1991). En cultivo la liberación de Ca<sup>2+</sup> por los astrocitos viaja a unas 20  $\mu\text{m/s}$ , alcanzando unos 20-60 astrocitos alrededor por cada onda, y afectando un área de unas 50-300  $\mu\text{m}$  (Tian y col., 2006).

La disposición de los astrocitos en microdominios permite que las fluctuaciones de Ca<sup>2+</sup> se propaguen por el sincitio de astrocitos a través de las uniones en hendidura (gap) (Cornell-Bell y col., 1990b; Saez y col., 2003). De esta manera los astrocitos se informan, ajustan y responden a una gran variedad de situaciones como una entidad individual o parte de una unidad funcional. Además, se ha comprobado la existencia de señalización entre astrocitos y señalización de astrocitos a neuronas utilizando las ondas de

Ca<sup>2+</sup> (Hassinger y col., 1996). Esto es así porque la liberación sináptica de varias moléculas (como el glutamato) activa a los astrocitos vía receptores ionotropos o metabotropos. En el caso de la activación mediada por mGluR, los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular aumentan (vía PLC e IP<sub>3</sub>), una vía con múltiples efectos en cascada (Hansson y Ronnback, 2003), entre ellos la liberación de glutamato y ATP por parte de los astrocitos.

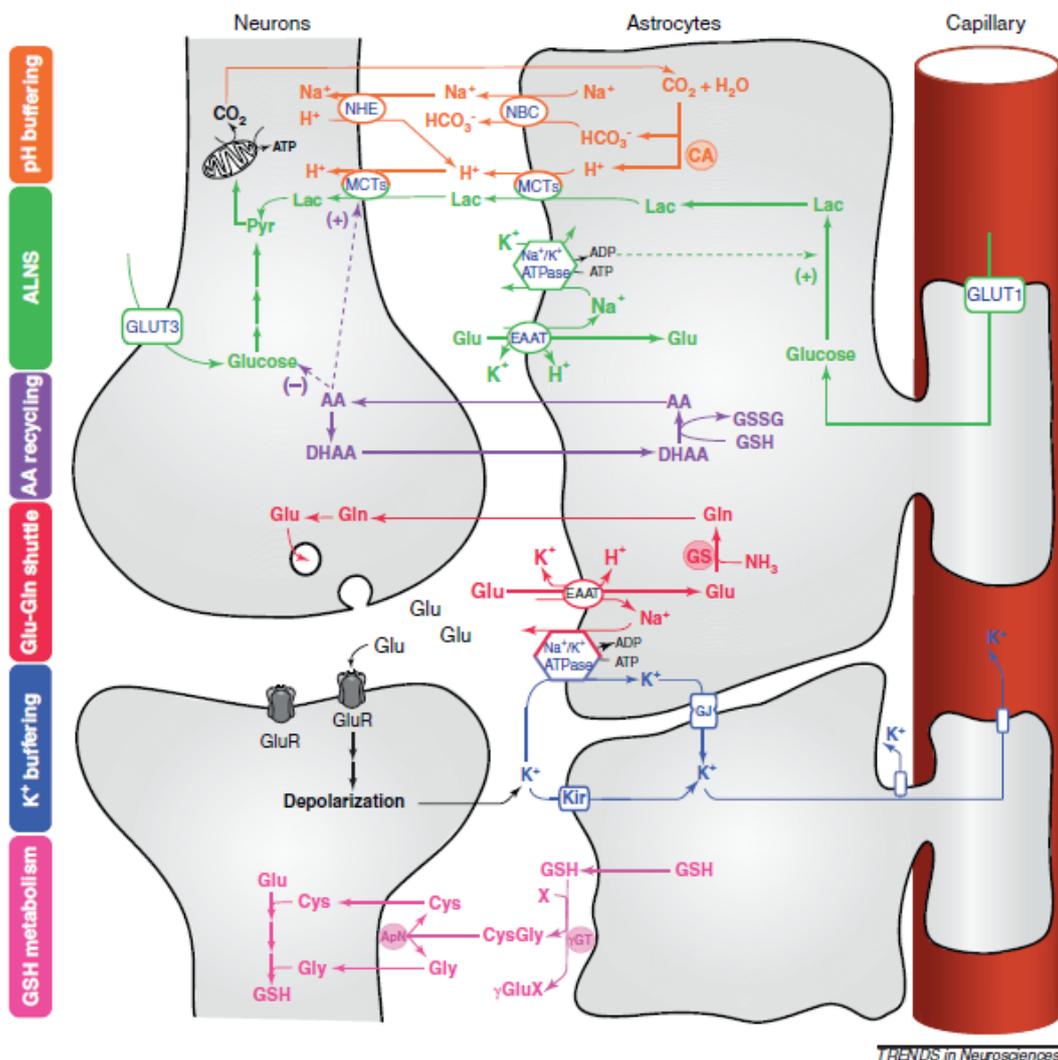
#### *Transmisión glutamatérgica.*

Además de la modulación bidireccional de la actividad sináptica vía Ca<sup>2+</sup>, los astrocitos pueden responder a la activación neuronal liberando transmisores, como el propio glutamato y su coagonista D-serina, que son parte de un sistema mayor que relaciona a los astrocitos y la transmisión glutamatérgica (Parpura y col., 1994; Schell y col., 1995; Montana y col., 2004; Mothet y col., 2005).

El glutamato es el primer neurotransmisor excitador del cerebro y los astrocitos juegan un papel capital en la regulación de la transmisión excitadora a varios niveles: controlando la síntesis, liberación, captación y reciclado del neurotransmisor. Los astrocitos pueden sintetizar glutamato a partir de glucosa vía piruvato carboxilasa. Dado que las neuronas no contienen este enzima dependen totalmente de los astrocitos para obtener el glutamato, tanto como sustrato metabólico como para la neurotransmisión (Hertz y Zielke, 2004).

Una vez liberado el glutamato en la sinapsis, la transmisión termina con el transporte del neurotransmisor por parte de los astrocitos, mediante sus transportadores de afinidad alta (EAATs) tipos 1, 2, 3, y 4 (Conti y col., 1998; Sonnewald y col., 2002; Hu y col., 2003; Kim y col., 2003; Su y col., 2003). Una vez en el astrocito, uno de sus destinos es ser convertido en glutamina por el enzima glutamina sintetasa (GS), un enzima dependiente de ATP que se detecta en la mayoría de los tejidos (Suarez y col., 2002). En el

cerebro este enzima está en el citoplasma astrocitario, donde mantiene el ciclo glutamato-glutamina y es responsable del metabolismo del nitrógeno y la detoxificación del amonio. Más aún, la GS puede modular fenómenos relacionados con la memoria como la LTP. Hay un estudio que muestra que el bloqueo de la GS en pollo anula la capacidad para consolidar la memoria (Gibbs y col., 1996).



Resumen de las acciones de los astrocitos (tomado de Allaman y col., 2011)

El glutamato captado por los astrocitos de la sinapsis puede ser utilizado en la vía metabólica (recuérdese que es un aminoácido que forma parte de las proteínas) o como neurotransmisor, pero no puede ser

transportado directamente a las neuronas vía sinapsis por su efecto excitotóxico si permanece activando los receptores (Danbolt, 2001).

Así pues el glutamato debe ser convertido en glutamina antes de volver a las neuronas vecinas para ser reutilizado como transmisor (Had-Aissouni y col., 2002). Una vez que la glutamina vuelve a la neurona presináptica se convierte de nuevo en glutamato, ahora por el enzima glutaminasa, y se empaqueta nuevamente en las vesículas sinápticas por los transportadores vesiculares (Bellocchio y col., 2000). La neurona presináptica tiene entonces glutamato para un nuevo ciclo que es esencial tanto para la eficacia de las sinapsis como para la supervivencia de las neuronas.

#### *Papel de la D-serina.*

La emergencia de la D-serina como modulador endógeno del receptor NMDA y como gliotransmisor es bastante reciente. La presencia de la D-serina en cantidades relevantes en el cerebro de los mamíferos fue señalada hace años (Hashimoto y col., 1992). Poco después se demostraba que se une con gran afinidad al sitio de la glicina en el receptor NMDA, con una potencia tres veces superior a la glicina (Matsui y col., 1995; Schell y col., 1995; Wolosker y col., 1999).

La liberación de D-serina desde los astrocitos *in vitro* está mediada por receptores tipo AMPA, kainato y mGluR (Schell y col., 1995; Martineau y col., 2005; Fujii y col., 2006). También se ha demostrado el almacenamiento vesicular y la liberación de D-serina (lo mismo que el glutamato y el ATP) por los astrocitos por mecanismos similares a los de las neuronas (Coco y col., 2003; Bezzi y col., 2004; Mothet y col., 2005). Otros métodos de liberación es a través de los canales de las gap junctions o por transportadores transmembrana, como sucede con el ATP y el glutamato (Ribeiro y col., 2002; Volterra y Meldolesi, 2005). El incremento en el glutamato sináptico por activación neuronal, desencadena la liberación de D-serina por los astrocitos

a la sinapsis donde, junto con el glutamato, activa al receptor NMDA (Martineau y col., 2005). Por tanto los astrocitos están implicados en la activación NMDA a través de la D-serina, participando en todas sus funciones, como la LTP y el aprendizaje o la memoria (Kelley y col., 2003; Martineau y col., 2005). En ratas algunos déficits en aprendizaje y memoria relacionados con el envejecimiento revierten administrando D-serina exógena (Mothet y col., 2006). Al contrario, en ausencia de astrocitos las neuronas del hipocampo son incapaces de producir LTP activada por NMDA (Yang y col., 2003).

La D-serina se elimina de la sinapsis por la acción de varios transportadores localizados tanto en las neuronas como en los astrocitos (Yamamoto y col., 2001; Javitt y col., 2002). La degradación se lleva a cabo, en parte, por la D-amino ácido oxidasa (DAAO), un enzima que expresan los astrocitos. La síntesis de D-serina es realizada por la serina racemasa, enzima preferentemente astrocitario (Schell y col., 1995; Schell y col., 1997; Wolosker y col., 1999a; Miranda y col., 2000; Yasuda, 2001) que parece ser el principal regulador de los niveles intra y extracelulares de D-serina (Foltyn y col., 2005; Kim y col., 2005).

#### **1.1.1.3.6 Los astrocitos en las enfermedades neurológicas y psiquiátricas**

Los astrocitos reaccionan frente a un buen número de agentes nocivos, incluyendo traumatismos, infecciones, epilepsia y degeneración neuronal. Los astrocitos reactivos, sea cual sea la circunstancia, muestran una hipertrofia de sus prolongaciones y una mayor producción de las proteínas GFAP y vimentina. La ablación genética de estos filamentos intermedios exagera las lesiones neuronales que produce la oclusión de la arteria cerebral media, lo que sugiere que la mayor producción de estas moléculas es beneficiosa en circunstancias de lesión (véase Halassa y Haydon, 2010).

Asimismo hay estudios que sugieren que, en algunas circunstancias, la astrocitosis reactiva se acompaña de proliferación de los astrocitos, e incluso se ha comprobado que los astrocitos adultos son capaces de dividirse en respuesta a lesión (Buffo y col., 2008). No obstante la mayor o menos expresión de los filamentos no guarda relación directa con la proliferación de los astrocitos.

Al revés de lo que sucede en las alteraciones neurológicas, en que se advierte un incremento en la expresión de las proteínas de los filamentos intermedios (GFAP), dos de los cuadros psiquiátricos más llamativos, la depresión mayor y la esquizofrenia, se caracterizan por una reducción en la expresión de esta proteína (y tal vez una reducción del número de células gliales) en la corteza prefrontal, según se desprende de estudios postmortem. Por el momento se desconoce si estos cambios se hallan entre las causas de los citados cuadros o si son consecuencia de las enfermedades (véase Halassa y Haydon, 2010).

Otros estudios han observado una expresión genética alterada de GFAP, transportadores de glutamato y glutamina sintetasa en la depresión mayor. En un modelo experimental de depresión el ciclo del glutamato en la corteza se halla reducido, pero la administración de Riluzol, que facilita la captación de glutamato por parte de los astrocitos, revierte los signos causados por el estrés (anhedonia, impotencia), lo que sugiere que la estimulación del ciclo glutamato-glutamina (que realizan los astrocitos) puede ser terapéutico en la depresión mayor.

¿Es posible que alguna de las enfermedades psiquiátricas se deba en parte a cambios o anomalías en la gliotransmisión? La respuesta no se conoce con certeza todavía, pero resulta curioso que la cicloserina, un análogo del gliotransmisor D-serina, se esté empleando en el tratamiento de la esquizofrenia. Hace años se empezó a especular que en ciertos cuadros psiquiátricos parece existir hipoactividad de los astrocitos, cuya consecuencia

es una disminución de la activación de los receptores neuronales tipo NMDA (Moises y col., 2002; Halassa y col., 2007). Un cuadro de hipoactivación como el planteado parece ser la vía final en la fisiopatología de la esquizofrenia, con lo que la hipoactividad glial podría estar detrás de esta terrible enfermedad.

Otra de las hipótesis sobre el origen de la esquizofrenia plantea que se debe a un trastorno del desarrollo y sugiere que, cuando a una vulnerabilidad genética se une la alteración en los procesos de neurogénesis, migración, diferenciación y/o formación de las sinapsis, podemos encontrar alguno de los defectos estructurales y funcionales que suelen estar presentes en esta enfermedad. Sin embargo, cuando se perturba el desarrollo las células afectadas no son sólo las neuronas; de hecho, un estudio reciente postmortem sobre el perfil de genes alterados en la esquizofrenia, indicó que los genes alterados con mayor frecuencia fueron los relacionados con la función glial (Sugai y col., 2004).

Hasta el momento existen evidencias fragmentarias, pero no tenemos una visión completa y acabada de las causas de estas enfermedades. Es necesario por tanto continuar los esfuerzos para poder aclarar, en un futuro próximo, el papel que tienen las células gliales en la patología neurológica y mental. Para una mayor información sobre el papel de la glía en la patología mental, véanse Toro y col., (2006); Bernstein y col., (2009); Kimelberg y Nedergaard (2010).

### **1.1.2 Breve presentación anatómica de las regiones del SN objeto de este estudio**

Como quiera que nuestro trabajo pretende revisar las modificaciones de la reactividad glial en un buen número de territorios del SNC, haremos ahora una breve presentación de la organización e importancia de dichas regiones, prescindiendo de las que no guarden relación con el trabajo realizado.

Las regiones seleccionadas para su estudio son la corteza cingular y el hipocampo, por lo que se refiere a regiones corticales, y el estriado, el complejo amigdalino y el núcleo Accumbens como representantes de los núcleos centrales. Hemos añadido el hipotálamo mediobasal por ser una región bien conocida por nuestro grupo y porque en esta región comenzamos a estudiar los efectos de los antipsicóticos sobre la glía.

Los territorios elegidos son de especial importancia en las tareas cognitivas y emocionales, son regiones que reciben una rica inervación de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico (Heimer y col., 2007), por lo que entendemos que han de estar implicadas en la respuesta a los tratamientos con antipsicóticos. Las regiones seleccionadas no son seguramente todas las dianas de los citados tratamientos, pero es cierto que se encuentran entre las más relevantes. Las notas que siguen están extraídas de los libros Neurociencia, de Purves y col. (2007)); Principios de Neurociencia (Heines, 2004) y Anatomy of Neuropsychiatry (Heimer y col., 2007).

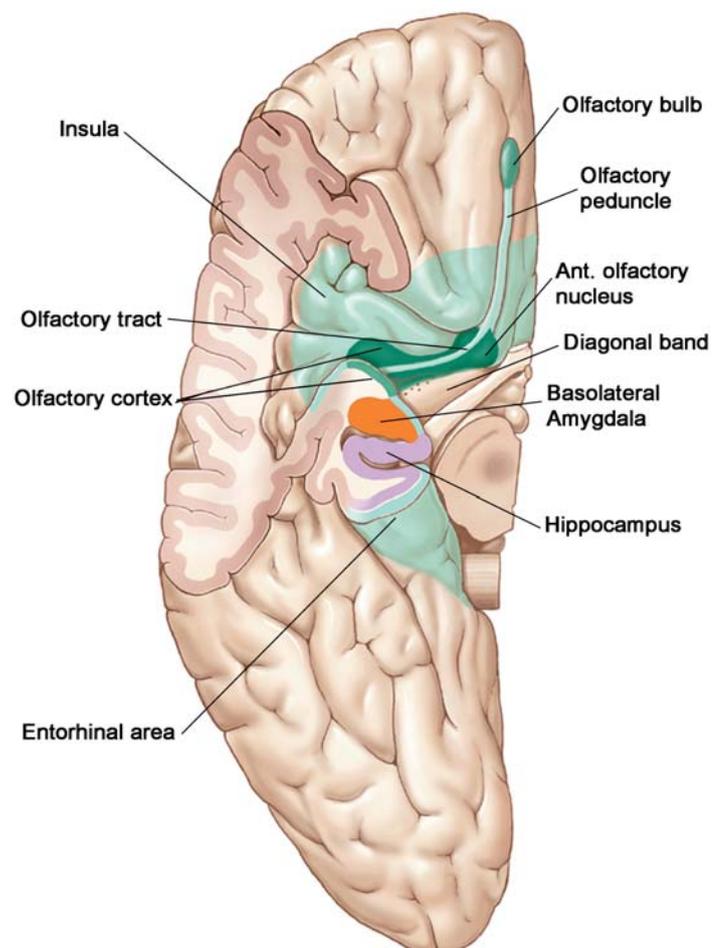
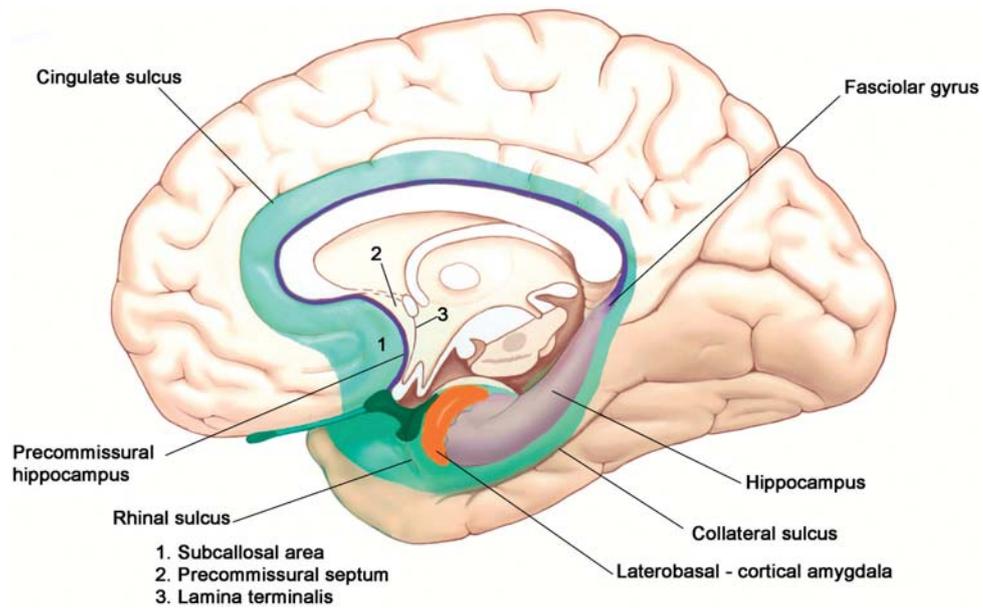
### 1.1.2.1 Corteza Prefrontal y Cingular

La corteza prefrontal es la región anterior de los lóbulos frontales, más concretamente comprende los territorios situados por delante de la corteza motora y premotora. Esta región se relaciona con funciones ejecutivas de la conducta, lo que significa que participa en la planificación de la conducta compleja, la previsión de las consecuencias de nuestros actos, la expresión de la personalidad, la toma de decisiones o la conducta social etc. En suma la corteza prefrontal regula los pensamientos y la conducta orientada a la consecución de objetivos.

Dentro de la corteza prefrontal existen muchas áreas y se pueden diferenciar varios territorios que, grosso modo, corresponden a las caras lateral, medial y orbitaria del lóbulo frontal.

La circunvolución o giro cingular es una estructura amplia en el cerebro humano, que representa la parte dorsal del *Grande lobe limbique* de Broca. Esta región cortical se sitúa alrededor del cuerpo calloso y de los rudimentos del hipocampo y dorsalmente está limitado por el surco cingular. Desde el punto de vista de la citoarquitectura, de adelante atrás, se describen varias divisiones funcionales.

Para la neuropsiquiatría la región anterior merece la mayor atención pues se asocia a alteraciones relacionadas con la motivación y el movimiento, lo que concuerda con sus amplias conexiones con la corteza orbitofrontal, amígdala, Accumbens, ínsula anterior y regiones vegetativas del tronco encefálico. Ya Papez decía que “la corteza cingular debe verse como un órgano receptor de la experiencia de la emoción”. La región dorsal, más cognitiva, está conectada con el córtex prefrontal dorsolateral, el córtex parietal y el área motora suplementaria.



Tomados de Heimer y col. (2007)

La circunvolución cingular también participa en las respuestas emocionales. En estudios experimentales en animales la estimulación del córtex cingular produce alteraciones del SN vegetativo, incluyendo cambios en los ritmos respiratorio y cardiaco, estimulación sexual y conductas orales. En humanos también se relaciona con la nocicepción, y su estimulación en pacientes ha provocado una amplia variedad de respuestas de tipo afectivo, tales como miedo, euforia, depresión y agresión, así como conductas de desinhibición, hipersexualidad y actividad obsesivo-compulsiva.

La lesión de la corteza cingular anterior produce un síndrome caracterizado por embotamiento emocional y motivación disminuída y se ha propuesto que en depresivos hay una disminución del flujo sanguíneo y del volumen del territorio. En la esquizofrenia también se ha encontrado una reducción de neuronas y del flujo sanguíneo en la corteza cingular anterior. La región posterior se relaciona más con una función visuoespacial, el aprendizaje y la memoria.

Las nuevas técnicas de neuroimagen funcional han implicado a la corteza cingular anterior y ventral en tareas cognitivas en que hay que seleccionar entre estímulos conflictivos o en competición (Stroop test), de manera que se piensa que una de las funciones de la corteza cingular ventral anterior es evaluar los estímulos externos y seleccionar las respuestas más apropiadas en función de nuestras prioridades y objetivos.

Finalmente mencionaremos que algunas evidencias proponen que la corteza cingular anterior juega un papel crítico en la regulación de los estados de humor y en la conducta emocional y social. En pacientes con lesiones adquiridas se observa apatía, falta de motivación y relativa insensibilidad al dolor, mientras que existe una actividad incrementada durante los episodios de manía

### 1.1.2.2 Hipocampo

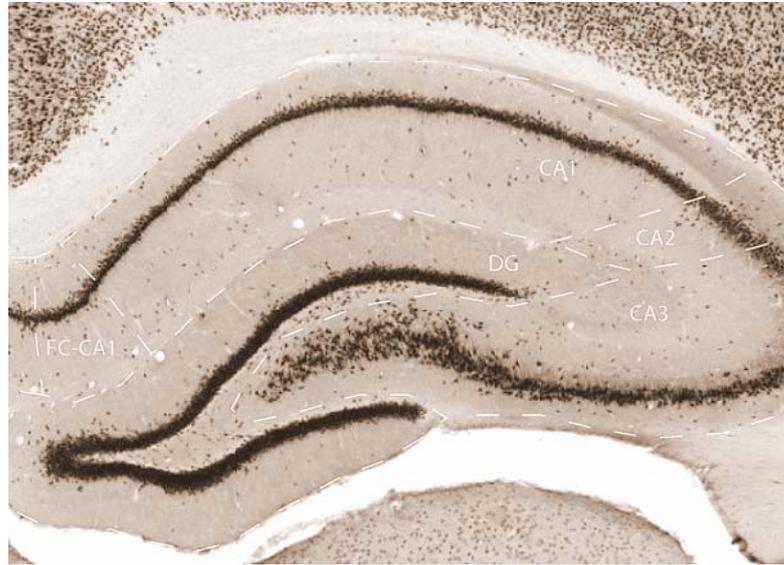
La región del hipocampo ha sido objeto de interés para los clínicos desde hace dos siglos, pues ya Bouchet y Cazauvieilh (1825) señalaban la presencia de patología en casos de epilepsia y psicosis.

El denominado hipocampo, por su semejanza con esta criatura, es también una parte del lóbulo límbico, en este caso constituye la parte ventral. En la actualidad sabemos que el hipocampo recibe sus aferencias sobre todo desde la corteza que lo rodea (entorrinal y perirrinal), desde la cual le llega información de muchas áreas de la corteza y de, prácticamente, todas las modalidades sensoriales. También está conectado con estructuras vecinas como la amígdala. En cuanto a sus eferencias, podemos distinguir el fórnix, el tracto más compacto, mediante el cual se conecta con el septum, núcleo Accumbens, tálamo anterior y cuerpos mamilares del hipotálamo. Las eferencias más difusas conectan este territorio con las regiones vecinas (corteza entorrinal).

Funcionalmente el hipocampo no es una parte esencial del cerebro emocional. Hoy sabemos que su papel es determinante en el establecimiento de la memoria de larga duración, concretamente de la memoria consciente, episódica. También pensamos que funciona más bien como un comparador de estímulos nuevos y familiares, actuando también en la iniciación o inhibición de las estrategias apropiadas a cada situación. A pesar de ser una de las regiones más investigadas del SN aún no comprendemos bien todas las funciones del hipocampo.

En los cortes frontales del cerebro de rata el hipocampo es diferente del humano, pues tiene una región dorsal bien desarrollada, que será el objeto de nuestras observaciones (ver la imagen que sigue). Lo que nosotros veremos será semejante a la imagen siguiente, donde se distinguen

los territorios del giro dentado (DG) y del cuerno de Ammón (Cornu Ammonis = CA: CA1, CA2, CA3).



Actualmente se sabe que el hipocampo está involucrado en la esquizofrenia, bien uni o bilateralmente, reduciéndose en esta patología. Más recientemente se ha prestado atención a las alteraciones del hipocampo en patologías relacionadas con el estrés, especialmente el estrés postraumático. Los adultos con estrés postraumático tienen disminuido el tamaño del hipocampo en ambos lados, comparándoles con individuos que han sufrido traumas (sin desarrollar estrés postraumático) y con controles no traumatizados.

El hipocampo es un territorio que muestra una gran plasticidad. En el hipocampo postnatal tienen lugar procesos de apoptosis, y también se ha establecido que es uno de los lugares donde existe neurogénesis en individuos adultos. Tal plasticidad debe guardar relación con su papel modulador en muchas conductas y en la memoria.

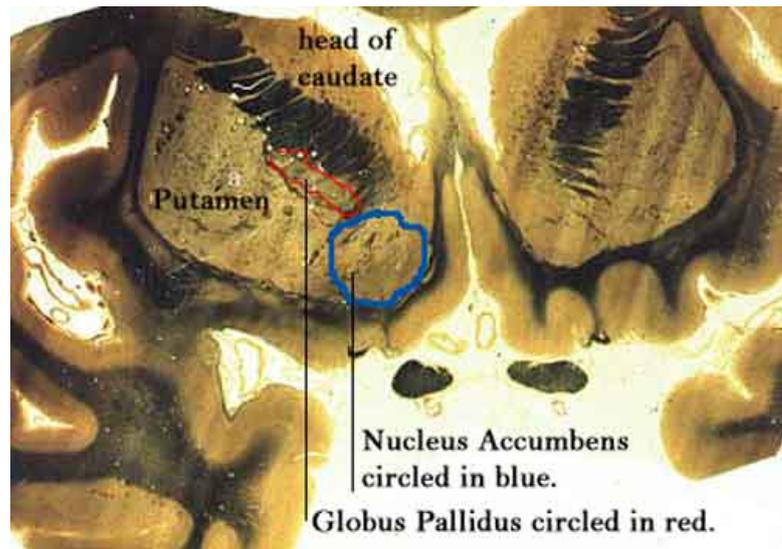
En la psicosis de Korsakoff, que se produce por deficiencia de tiamina casi siempre secundaria a alcoholismo, también se afecta la formación de recuerdos de memoria episódica. En este caso la patología más

llamativa se localiza en los cuerpos mamilares, uno de los destinos fundamentales del fórnix. El hipocampo es asimismo uno de los lugares más afectados en la enfermedad de Alzheimer, junto con la lesión de las cortezas entorrinal y perirrinal.

La organización del hipocampo es laminar, semejante a una corteza en la que sólo existen tres capas (Allocórtex). Estas capas están constituidas por neuronas que son diferentes en el DG y en el CA; la capa externa en ambos es la capa molecular, la capa media se llama granular en el DG y piramidal en el CA, conteniendo las neuronas eferentes de cada estructura. La capa interna es la capa multiforme, que en el CA también se conoce como estratum oriens y que contiene, además de neuronas, muchos elementos gliales. En la imagen siguiente se resume la conectividad del hipocampo.

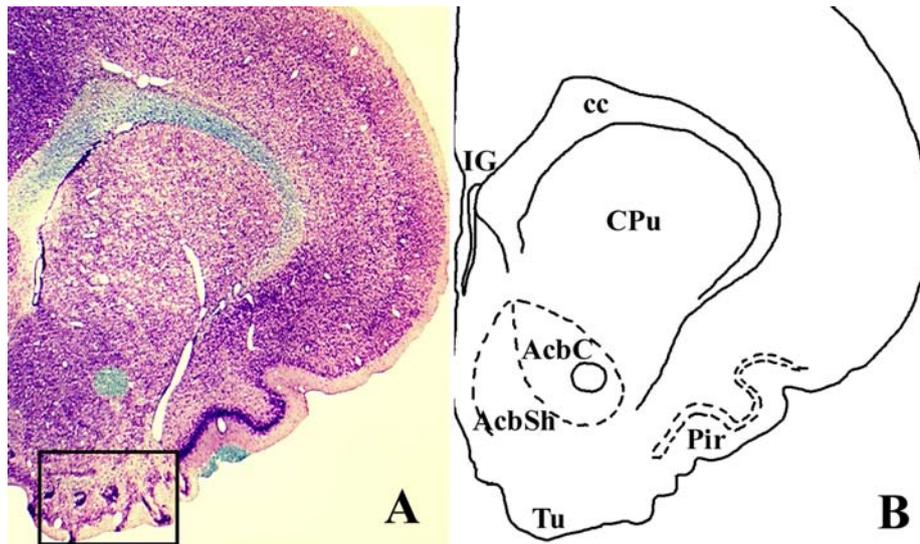
### 1.1.2.3 Cuerpo Estriado y Núcleo Accumbens

El cuerpo estriado, o simplemente estriado, es uno de los componentes principales de los núcleos centrales del cerebro o ganglios basales. Se trata de un conjunto de núcleos que se sitúan en el interior de cada hemisferio y que está integrado por los núcleos caudado y putamen (en humanos separados por la cápsula interna, pero en la rata en continuidad) y por el núcleo pálido. Los dos primeros constituyen el neostriado, tienen el mismo origen y organización, compartiendo también conexiones; el núcleo pálido constituye el paleostriado.



Otra terminología empleada por muchos autores es la de “complejo estriado” para referirse a la unidad funcional que integran el neostriado y el estriado ventral, denominación que se aplica al núcleo Accumbens y al tubérculo olfatorio. El núcleo Accumbens, (*nucleus Accumbens septi*, núcleo que yace sobre el septum) que forma parte de nuestro estudio, se sitúa en la región rostral y ventral del hemisferio, debajo de la zona donde el putamen se continúa con la cabeza del caudado (en humanos).

En la rata (véase en la imagen un corte frontal) el núcleo Accumbens se dispone alrededor y por debajo de la comisura blanca anterior y tiene dos partes bien diferenciadas, una región central y una corteza. Este núcleo es el destino principal de la vía dopaminérgica mesolímbica, que es clave en los circuitos de recompensa y se ha involucrado también en patologías como la esquizofrenia.



Uno de los rasgos que definen el complejo estriado son los estriosomas o parches. Se trata de regiones estriadas pobres en acetilcolinesterasa. Contienen grandes cantidades de uno o más neuropéptidos y diferentes tipos de receptores opiáceos. El resto del complejo estriado es la matriz, donde la colinesterasa es abundante.

Las aferencias más abundantes al estriado proceden de la corteza cerebral. Otras llegan desde el tálamo y la sustancia negra. La vía de salida del neostriado es el pálido, bien directamente o a través del núcleo subtalámico.

El núcleo pálido está integrado por neuronas gabaérgicas con una gran actividad espontánea, de forma que inhiben de forma tónica a sus zonas de proyección. Dentro de este núcleo se distinguen dos porciones, medial y lateral que cumplen funciones diferentes, al menos en humanos.

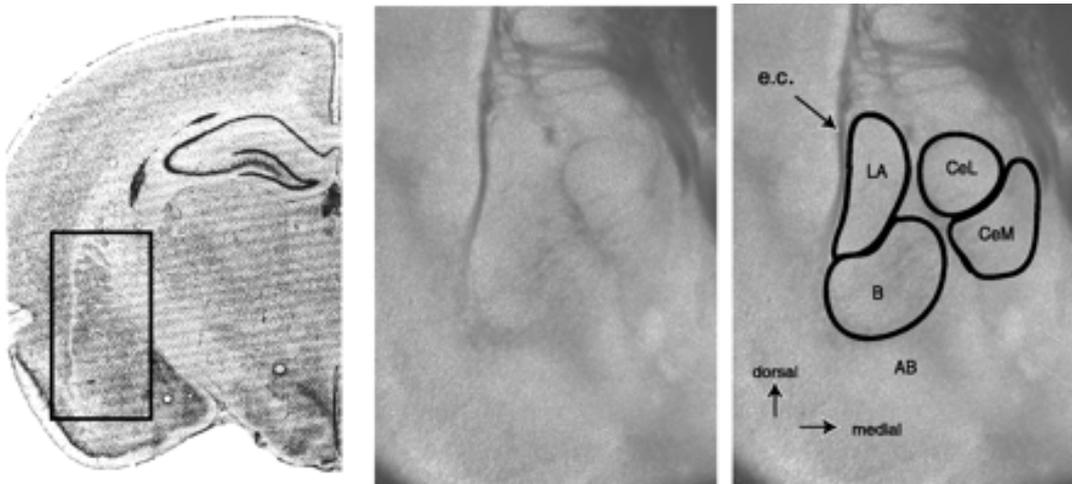
En todo caso, el complejo estriado, que recibe una amplia inervación cortical y dopaminérgica del tronco encefálico, conecta con el pálido y, a través de él proyecta al tálamo, desde donde la información vuelve a la corteza. De esta manera se constituyen una serie de circuitos de procesamiento de información que comienzan y terminan en la corteza y que

permiten modular la actividad cortical. Entre estos circuitos existen tres, el prefrontal dorsolateral, el orbitofrontal lateral y el límbico que son esenciales en los procesos cognitivos y emocionales.

#### 1.1.2.4 Complejo amigdalino

Al igual que el hipocampo el complejo nuclear amigdalino (denominado con frecuencia amígdala) se localiza en el lóbulo temporal, concretamente en su parte rostral y medial, por delante del hipocampo y del cuerno temporal del ventrículo lateral en los humanos.

Se trata de un conjunto de núcleos (hasta 13 subnúcleos en primates) que pueden sistematizarse en un grupo basolateral y otro corticomedial en el que se incluiría el núcleo central. Funcionalmente, el primero de los grupos está ampliamente conectado con la corteza y estructuras límbicas, mientras que el segundo tiene una mayor relación con el olfato.



La amígdala está conectada con un gran número de estructuras lo que le permite integrar información de diferentes modalidades e influir en las respuestas motoras y vegetativas.

Según los hallazgos experimentales en animales, los datos proporcionados por los estudios de neuroimagen y las observaciones realizadas en pacientes de la enfermedad de Urbach-Wiethe (en que se produce la degeneración bilateral de estas regiones), sabemos que el complejo amigdalino participa activamente en el aprendizaje y almacenamiento de las emociones, especialmente de emociones negativas como el miedo y, en general, en la evaluación emocional del ambiente. También tiene que ver con la conducta sexual.

La estimulación de la amígdala puede producir ansiedad y reacciones de miedo, y se ha observado su activación en los ataques de pánico, fobia social o estrés postraumático. En suma, parece que la amígdala es clave en la detección y evaluación subconsciente de potenciales amenazas y peligros que pueda haber en el ambiente.

En cuanto a su participación en patología mental se han observado alteraciones de la amígdala en pacientes con depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia.

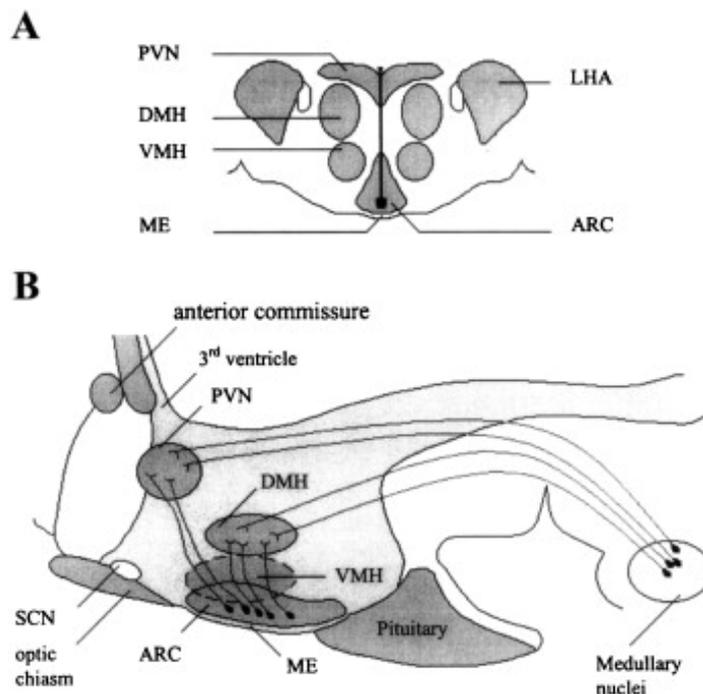
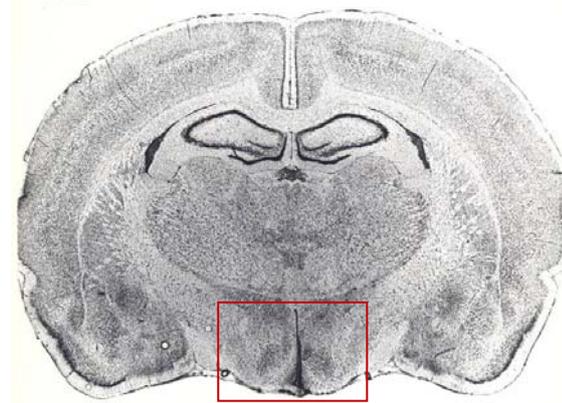
#### **1.1.2.5 Hipotálamo**

El hipotálamo es la división del diencéfalo que se relaciona con las funciones viscerales, autónomas y endocrinas. Todas estas funciones tienen un vínculo estrecho con la conducta afectiva y emocional. Esta situado a ambos lados del tercer ventrículo por debajo de los surcos hipotalámicos y se extiende a través del suelo de este ventrículo. En la cara ventral del encéfalo emerge el infundíbulo por detrás del quiasma óptico, al cual esta unida la hipófisis.

Externamente el hipotálamo está limitado en dirección rostral por el quiasma óptico, hacia ambos lados por las cintillas ópticas y hacia atrás por los cuerpos mamilares. La zona que forma el piso del tercer ventrículo se

denomina eminencia media del tuber cinereum. La porción rostral al tallo infundibular contiene la eminencia media anterior; la porción más distal del proceso infundibular es la neurohipófisis.

La eminencia media representa el punto final de convergencia de las vías del sistema nervioso central en el sistema endocrino periférico, es la interfase anatómica entre el cerebro y la hipófisis anterior.



El hipotálamo está conformado por un gran número de núcleos, de los cuales nos interesa especialmente el núcleo arcuato. Este núcleo,

relacionado con diversas funciones, como el control de la esfera gonadal o del apetito, contiene neuronas dopaminérgicas y es el origen de un corto tracto de fibras, el haz tuberoinfundibular, que termina en la eminencia media, desde donde pasa al lóbulo anterior hipofisario, donde actúa como una hormona inhibidora de la liberación de prolactina.

### 1.1.3 Antipsicóticos. Acciones sobre el sistema nervioso

Los antipsicóticos (también llamados neurolépticos o tranquilizantes mayores) son fármacos empleados sobre todo en el ámbito de la psiquiatría para el control de los síntomas de las psicosis, incluyendo alucinaciones, delirios o las alteraciones del pensamiento.

La primera generación de estas sustancias se descubrió en los años cincuenta del pasado siglo. Se conocen como antipsicóticos típicos y entre ellos tenemos fenotiazinas (Clorpromacina) y butirofenonas (Haloperidol). El primero, la Clorpromacina comenzó a emplearse como anestésico quirúrgico, pasando a un uso psiquiátrico al comprobarse su potente efecto calmante. En su momento se vio su acción como una lobotomía farmacológica. Recuérdese que la lobotomía, en su momento, se empleaba para tratar las psicosis en casos extremos, si bien su efecto sobre la conducta y la función mental eran muy marcados. La Clorpromacina reducía los síntomas de las psicosis de manera más específica, lo que permitió disminuir el aislamiento y la sedación en pacientes agitados. Hacia 1958 se introdujo el Haloperidol.

El primer tratamiento de una enfermedad psiquiátrica con Clorpromazina fue publicado por Delay, Deniker y Harl en 1952, describiendo una típica respuesta tranquilizante en un caso de excitación maníaca. Las acciones farmacológicas de los neurolépticos, tomando como base la Clorpromazina, se pueden describir como:

-Efecto antipsicótico: acción tranquilizante neuroléptica acompañada, sobre todo al iniciar el tratamiento, de una acción sedativa, aunque se desarrolla rápidamente tolerancia persistiendo la acción tranquilizante. El efecto antipsicótico empieza a ser evidente a las 2-3 semanas de tratamiento y en 6 meses se produce el efecto completo en la mayoría de los pacientes.

- Efecto Tranquilizante: disminuye la agitación y excitación
- Profilaxis de las recurrencias
- Depresión de algunas actividades del hipotálamo, como la acción sobre el centro termorregulador
- Bloqueo de los receptores dopaminérgicos y de la sobreactividad de esta catecolamina, produciendo una mejoría del cuadro psicótico.
- Reacciones extrapiramidales y como consecuencia un efecto parkinsoniano con temblor, rigidez, aquinesia, trastornos de la marcha, el lenguaje y la escritura.
- Acatisia: sensación subjetiva de intranquilidad motora que no permite al enfermo permanecer quieto.

Los antipsicóticos empezaron a emplearse en los 50 del siglo pasado, y andando el tiempo se ha ido conociendo su mecanismo de acción. Como se ha señalado, estos fármacos actúan mediante el bloqueo de receptores de neurotransmisores, particularmente los dopaminérgicos; la intensidad de la acción antagonista competitiva, es proporcional al efecto antipsicótico.

Lo que hoy sabemos es que todos los antipsicóticos típicos bloquean los receptores D2, y es necesario una ocupación del 60-70% para obtener actividad antipsicótica; ahora bien, si la ocupación excede del 80% aumentan los signos extrapiramidales (Kapur y col., 2006). La acción preferente sobre D2 se deduce de estudios realizados in vitro, si bien, in vivo, los fármacos no distinguen entre receptores D2 y D3, y dado que los últimos son más abundantes en territorios mesolímbicos, se postula ahora que la acción terapéutica se deba al bloqueo D3 y los signos extrapiramidales y la hiperprolactinemia al bloqueo D2.

Dada la frecuencia y seriedad de los efectos secundarios, con posterioridad se han desarrollado un buen número de antipsicóticos de segunda generación, también llamados antipsicóticos atípicos, entre los que podemos incluir Clozapina, Olanzapina, Risperidona y Ziprasidona. En el caso de Clozapina y Quetiapina, dos de los que menos signos extrapiramidales producen, se sabe que son clínicamente efectivos con una ocupación del 40% de los receptores D2.

Los antipsicóticos atípicos ofrecen ventajas sobre los típicos tales como mejoría en los síntomas negativos, prevención de recaída, mayor capacidad funcional, calidad de vida y disminución de síntomas extrapiramidales y mejor disquinesia tardía. A cambio tienen otros efectos secundarios como ganancia de peso, diabetes y dislipidemia.

Estos neurolépticos atípicos tienen una mayor actuación interfiriendo con la actuación de otros neurotransmisores, siendo importante el bloqueo de receptores de serotonina tipo 5-HT<sub>2</sub> (Clozapina, risperidona, olanzapina y ziprasidona ocupan más del 80% de los receptores corticales 5-HT<sub>2A</sub> en el rango terapéutico en humanos), el bloqueo de receptores alfa 1, alfa 2 e histaminérgicos esencialmente. El bloqueo de receptores centrales de Histamina se relaciona con el aumento de peso, uno de los efectos secundarios problemáticos y asociados sobre todo a olanzapina y clozapina.

Los antipsicóticos atípicos también tienen efectos sobre el sistema glutamatérgico, sistema que, en los últimos tiempos, es objeto de múltiples estudios por su relación con la etiopatogenia de la esquizofrenia (teoría hipoglutamatérgica). En este sentido se ha comprobado que algunos antipsicóticos de segunda generación como la clozapina y olanzapina antagonizan la capacidad de la ketamina o el polvo de ángel (fenciclidina, PCP) para inducir un cuadro tipo esquizofrenia.

Esquema tomado de Miyamoto y col. (2005) que resume la acción de los antipsicóticos.

**Table 1** Relative neurotransmitter receptor affinities for antipsychotics at therapeutic doses (adapted from Miyamoto *et al*<sup>h</sup> and modified)

Receptor	Cloza- pine	Risperi- done	Olanza- pine	Quetia- pine	Ziprasi- done	Sertin- dole	Sulpi- ride	Amisul- pride	Zote- pine	Aripipra- zole	Halope- ridol
D <sub>1</sub>	+	+	++	-	+	++	-	-	+	-	+
D <sub>2</sub>	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
D <sub>3</sub>	+	+	+	-	++	++	++	++	++	++	++
D <sub>4</sub>	++	-	++	-	++	+	-	-	+	+	++
5-HT <sub>1A</sub>	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-
5-HT <sub>1D</sub>	-	+	-	-	++	++	++	++	++	++	-
5-HT <sub>2A</sub>	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	+
5-HT <sub>2C</sub>	++	++	++	-	++	++	-	-	++	++	-
5-HT <sub>6</sub>	++	++	++	-	+	++	++	++	++	++	-
5-HT <sub>7</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
α <sub>1</sub>	+	++	++	++	++	++	-	-	++	++	+
α <sub>2</sub>	+	++	+	-	-	+	-	-	++	++	-
H <sub>1</sub>	++	-	++	++	-	+	-	-	++	++	-
m <sub>1</sub>	++	-	++	++	-	+	-	-	++	++	-
DA transporter	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	-
NA transporter	+	+	++	+	++	+	+	+	++	-	-
5-HT transporter	+	+	++	++	++	++	++	++	++	-	-

- = minimal to none; + = low; ++ = moderate; +++ = high; ++++ = very high.

Ahora bien, dado que ninguno de los antipsicóticos atípicos tiene afinidad por los receptores del glutamato, el mecanismo de acción no está claro. Al parecer el metabolito activo de la clozapina (N-desmetilclozapina) es un agonista potente de los receptores muscarínicos M1, a través de los cuales podría activar a los receptores NMDA.

Los antipsicóticos están entre los grupos de fármacos más rentables de la industria farmacéutica, generando unas ventas globales de unos 22 mil millones de dólares en 2008. Hacia 2003, en EEUU se estimaba el número de personas tratadas en 3.2 millones, correspondiendo 2/3 de los tratamientos a los más caros atípicos (cuatro veces más caros que los típicos). Ya en 2008, las ventas en EEUU ascendieron a catorce mil seiscientos millones de dólares, lo que les hace ser el grupo farmacológico en que más se gasta. Parte de este coste descomunal se debe a que los tratamientos antipsicóticos suelen ser crónicos.

### **1.1.3.1 Síndrome neuroléptico**

Los efectos secundarios de los antipsicóticos son numerosos y, en algunos casos serios, hasta el punto que hacen el tratamiento desagradable, lo que conduce con cierta frecuencia al abandono y las recaídas. Entre los síntomas que se incluyen en el síndrome neuroléptico estarían la supresión de los movimientos espontáneos y de las conductas complejas, a la vez que se conservan intactos los reflejos raquídeos y las conductas nociceptivas de evitación no condicionada.

Los neurolépticos reducen la iniciativa y el interés por el ambiente, lo mismo que las manifestaciones de las emociones o el afecto. La mayor parte de los neurolépticos bloquean la emesis, la hiperactividad y la agresividad inducidas por la apomorfina y otros agonistas dopaminérgicos.

Uno de los efectos secundarios más perturbadores de estos agentes es la acatisia que se manifiesta por un incremento de la actividad física e inquietud.

Los llamados antipsicóticos atípicos (con bajo riesgo de producir signos extrapiramidales adversos) como Clozapina y otras dibenzazepinas tienen baja afinidad por los receptores D2. Sin embargo son antagonistas Alfa1 – adrenérgicos activos, esta acción puede contribuir a los efectos sedantes e hipotensivos adversos.

La no existencia de antipsicóticos capaces de tratar toda la dimensión de la patología sugiere que un solo tratamiento no es suficiente y propone la búsqueda de tratamientos complementarios que puedan ser usados junto con los antipsicóticos tales como benzodiazepinas, Litio, anticonvulsivantes, antidepresivos, beta-bloqueantes y agonistas de la Dopamina

## 1.2 PLANTEAMIENTO

Ya hemos señalado que los astrocitos tienen su papel en la fisiopatología de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Hasta hace poco se admitía que, como regla general, las enfermedades neurológicas solían cursar con gliosis o astrocitosis (epilepsia, isquemia), mientras que en las enfermedades mentales (psiquiátricas) no se producía tal reacción y, más bien, se constataba una disminución de los elementos gliales (Bernstein y col., 2009).

En los últimos decenios se han llevado a cabo muchos estudios que han tratado de esclarecer el papel de la glía o sus alteraciones en la esquizofrenia (Véase Kondziella y col., 2007). Por el momento existe debate en muchos de los aspectos analizados; así, para Selemon y col., (1999) el tratamiento crónico con neurolépticos aumenta la densidad glial en la corteza frontal, mientras que Konopaske y col. (2008) encuentran una reducción del 20% en los astrocitos del lóbulo parietal de monos tratados con olanzapina y haloperidol.

Conforme nos acercamos al momento presente los estudios se han hecho más concretos, tratando de identificar los factores o compuestos de origen glial que pueden estar involucrados. Dos líneas de trabajo merecen nuestra consideración; por un lado la que trata de saber el papel de los factores de crecimiento (Growth factors, GF) producidos por la glía, por otro la que analiza el papel de la glía en las posibles alteraciones en la transmisión glutamatérgica.

En cuanto al papel de los GF se ha señalado que el tratamiento antipsicótico aumenta la producción de los factores de crecimiento nervioso (NGF) y derivado del cerebro (BDNF) (Angelucci y col., 2000; Bai y col., 2003). Asimismo Shao y col. (2006) afirman que la función neuroprotectora de los antipsicóticos puede ser debida a la liberación de GF pues el tratamiento con quetiapina, clozapina y haloperidol aumentan la secreción del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Más recientemente se ha comprobado que, en pacientes con un primer episodio psicótico, los niveles séricos de BDNF eran significativamente inferiores a los del grupo control, mientras que a los seis meses de tratamiento no había diferencias (González-Pinto y col., 2010). En la misma línea, Pedrini y col. (2011) observaron un aumento del BDNF sérico tras el tratamiento con clozapina, pero no tras el tratamiento con neurolépticos típicos.

En cuanto a las posibles disfunciones de la transmisión glutamatérgica en la esquizofrenia (teoría hipoglutamatérgica), sabemos que casi todos los aspectos de la misma están bajo el control de los astrocitos: síntesis de los precursores, liberación del transmisor y recaptación una vez liberado. Esto es así hasta el punto de que sin la participación de los astrocitos la normal función de las neuronas de glutamato es imposible (Hertz y Zielke, 2004).

También son relevantes los estudios sobre la expresión de los transportadores de glutamato, las moléculas que retiran de la hendidura

sináptica o el espacio extracelular el neurotransmisor liberado. Como ya apuntamos, estas moléculas, conocidas como GLT-1 y GLAST en roedores (o EAAT1 y EAAT2 en humanos) se localizan sobre todo en las células gliales perisinápticas (astrocitos) que captan el glutamato, lo transforman en glutamina por la acción del enzima glutamina sintetasa, y devuelven la glutamina a la neurona para la nueva síntesis de glutamato. Pues bien, hace pocos años varios autores observaron que los antipsicóticos como la clozapina disminuían la expresión del transportador EAAT2 en las células gliales (Melone y col., 2001; Schmitt y col., 2003), lo que debería aumentar la acción glutamatérgica en la neurona postsináptica al disminuir la captación del mismo por los astrocitos y, de ese modo, guardaría relación con los efectos terapéuticos (positivos) y con los secundarios.

En concordancia con lo anterior se evidenció que la expresión del transportador de glutamato GLT-1 está aumentada en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos no tratados (Matute y col., 2005; Vallejo-Illarramendi y col., 2005), de manera que el tratamiento antipsicótico vendría a incrementar los niveles extracelulares de glutamato.

Recuérdese que la teoría hipoglutamatérgica sobre el origen de la esquizofrenia postula que algunos de los síntomas observados son debidos a una disminución de la transmisión glutamatérgica en el córtex prefrontal. Esta hipoactividad correspondería a la vía glutamatérgica corticoestriada, y su efecto se traduciría en una reducción del filtro protector talámico (desinhibición del tálamo) que previene normalmente a la corteza de una sobresaturación a base de aferencias sensoriales irrelevantes, lo que provoca los síntomas psicóticos (véase De Keyser y col., 2008).

En resumen, existen varias líneas de evidencia basadas en hallazgos recientes que vienen a converger en la propuesta y realización del presente trabajo. Estas líneas se pueden resumir como sigue:

1) Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC, y son las encargadas de realizar la mayor parte de las funciones necesarias para el funcionamiento del sistema nervioso. Entre estas funciones, como se ha mencionado anteriormente, se encuentra la de controlar la fisiología de las neuronas así como el número y actividad de sus sinapsis (véase Allen y Barres, 2009; Halassa y Haydon, 2010; Giaume y col., 2010).

2) Los astrocitos tienen receptores para la mayoría de los neurotransmisores (Hösli y Hösli, 1993; Miyazaki y col., 2004), son capaces de captar señales de la actividad de las neuronas vecinas y responder secretando, a su vez, varias sustancias (ATP, glutamato, D-serina y otras) que influyen en la actividad neuronal, lo que ha dado lugar al concepto de gliotransmisión (Halassa y col., 2007; Allen y Barres, 2009; Navarrete y col., 2012).

3) Como corolario de lo anterior, los astrocitos pueden ser diana de muchos fármacos, entre ellos los antipsicóticos, y pueden, por tanto, tener un papel en su acción terapéutica (Kimelberg y Nedergaard, 2010); es más, los astrocitos pueden ser necesarios para que tenga lugar la acción terapéutica (Iwata y col., 2011).

4) De lo expresado anteriormente se deduce que, en respuesta a la administración de antipsicóticos, los astrocitos pueden modificar su reactividad, la expresión de ciertos marcadores o la producción de sustancias, como factores de crecimiento o transportadores de glutamato, mediando de esta manera en la acción terapéutica o en los efectos secundarios.

La repercusión de la esquizofrenia y del tratamiento antipsicótico sobre la expresión de otros marcadores gliales como la GFAP también ha sido analizada en algún estudio reciente. Así, Toro y col. (2006) refieren que la inmunorreactividad a esta proteína glial aumenta en la corteza frontal lateral y disminuye en el córtex orbitario de pacientes esquizofrénicos.

Nosotros planteamos realizar un estudio sobre la reacción de los astrocitos al tratamiento con antipsicóticos típicos y atípicos, analizando varias regiones del SNC mediante el marcaje de los astrocitos con GFAP. Partimos de la hipótesis de que el tratamiento con estos fármacos actúa sobre la astrogliá y que como consecuencia de tal acción los astrocitos mostrarán su capacidad plástica y responderán al cambio que supone el tratamiento modificando la expresión de GFAP y, tal vez, la morfología de sus prolongaciones en alguna de las regiones objeto de estudio.

El resultado es el presente trabajo de Tesis Doctoral titulada: **“Antipsicóticos y plasticidad neuroglial. Estudio inmunohistoquímico”**, con el que pretendemos optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Nuestro objetivo fundamental es analizar las posibles modificaciones en la inmunorreactividad de la GFAP tras el tratamiento crónico con antipsicóticos típicos y atípicos en varias regiones del cerebro de la rata.

Este objetivo genérico puede concretarse en los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinar si la GFAP inmunorreactiva se modifica específicamente en alguna de las regiones estudiadas y, en su caso, su relación con el antipsicótico empleado.
- 2- Precisar si se producen cambios en la reactividad a GFAP en los pies terminales de los astrocitos, es decir, en su relación con los vasos sanguíneos.
- 3- Analizar si en alguna de las regiones la expresión de GFAP cambia en las prolongaciones celulares.
- 4- Comprobar si existe alguna correlación entre los tipos de antipsicóticos y la reacción astrocitaria o si la respuesta es similar tras los diferentes tratamientos.