

Revista Médica Universitaria, Volumen 1, Número 1, Diciembre 2005, ISSN 1669-8991

## **Rol del glutamato y del sistema inmune en afecciones agudas y crónicas del SNC**

Rodríguez de Viñas, L y Brandi, A.

Alumnas de la Maestría en Investigación Clínica, Secretaría de Posgrado y RRII.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo

### **Introducción**

El glutamato es un aminoácido que está implicado en la mayoría de las funciones normales del Sistema Nervioso Central (SNC), es el mayor mediador de señales excitatorias y de la plasticidad del Sistema Nervioso, pero también puede ser altamente neurotóxico. Debido a las múltiples acciones fisiológicas en las que interviene su concentración en el espacio extracelular no debe sobrepasar ciertos límites, para ello la homeostasis de los sistemas glutamatérgicos (metabolismo, mecanismos de liberación, receptores y transportadores) están finamente regulados. El glutamato debe de estar presente en concentraciones correctas, en el momento y en el lugar correctos. La excitotoxicidad es un término acuñado para describir las modalidades degenerativas neuronales producidas por un exceso de glutamato en el espacio extracelular, este aumento induce una sobreactivación de los receptores de glutamato, cuyo resultado es la muerte celular, tanto neuronal como glial (astrocitos, oligodendrocitos y microglia). El glutamato en este caso actúa como una neurotoxina, pudiendo representar una vía final común en afecciones neurológicas. En afecciones agudas se produciría un fenómeno de excitotoxicidad aguda y en afecciones neurológicas crónicas de excitotoxicidad lenta o crónica.

La concentración de glutamato en la hendidura sináptica depende de la cantidad de glutamato liberado, de la velocidad a la que es liberado, y de la velocidad con que es eliminado de la hendidura sináptica. La acumulación sináptica de cantidades elevadas de glutamato y su acción prolongada sobre los receptores de glutamato postsinápticos podría deberse a: un aumento de la

liberación por episodios de sobreexcitación (epilepsia), destrucción tisular (traumatismos), o a la alteración de los mecanismos de recaptación por fallo de las proteínas transportadores de glutamato.

La acción de uno o más de estos mecanismos puede conducir a un aumento del glutamato extracelular y perturbar la homeostasis del glutamato en las lesiones agudas .

Los estudios neuroradiológicos e histológicos han demostrado que, además del compromiso neuronal puede dañarse la mielina y los oligodendrocitos, y también se afectan los axones . Tanto las neuronas como los oligodendrocitos expresan receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos, lo que les hace susceptibles a fenómenos de excitotoxicidad aguda o crónica. Un cuadro común de la inflamación del SNC es la producción de glutamato por los macrófagos y la glía. Los acontecimientos inflamatorios (citotoxicidad celular directa por los linfocitos T citotóxicos CTLs o la apoptosis inducida por la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$ ) producen lisis celular con la consiguiente liberación del glutamato intracelular. El estrés oxidativo, puede ser causa de lisis celular, induce la formación de radicales libres que reducen la eficacia de los transportadores de glutamato, por lo que se incrementan los niveles extracelulares de glutamato.

Estudios experimentales han demostrado que las citocinas proinflamatorias liberadas por las células Th1, macrófagos o glia activados parece que inhiben la expresión de transportadores de glutamato (GLAST y GLT) en los astrocitos encargados de eliminar el glutamato sináptico, lo que aumentaría el glutamato extracelular. Altas concentraciones de glutamato extracelular, genera sobreestimulación de los receptores ionotrópicos de glutamato acoplados a canales de calcio y subsecuentemente se produce un incremento de la entrada de calcio y sodio al interior de la célula y salida de K<sup>+</sup> al exterior. La consecuencia final es la lisis celular de las estructuras del Sistema Nervioso que expresan receptores de glutamato.

Recientemente se ha relacionado la patología axonal como causa irreversible de la discapacidad clínica de los pacientes con compromiso crónico del SNC.. En un primer momento la disminución de axones puede ser clínicamente silente, cuando el número de axones disminuye suficientemente y los

mecanismos compensatorios del SNC se agotan aparecen los síntomas permanentes. Existen estudios que demuestran un aumento de la actividad cortical compensatoria como consecuencia de la disminución de axones . Son importantes las técnicas no invasivas tales como la espectroscopia en la resonancia magnética (MRS), que nos permiten la monitorización de la pérdida de axones, la neuroplasticidad del SNC o la influencia de las terapias actuales. La MRS valora la cantidad del marcador neuronal N-acetyl-aspartato (NAA) en el SNC, nos ha mostrado su reducción en las lesiones agudas, y en las lesiones inactivas crónicas. Teóricamente, la reducción de NAA en los pacientes con lesión cerebral, puede reflejar el daño axonal y neuronal que acompañan a la desmielinización inflamatoria, a la alteración del metabolismo neuronal relacionado con la actividad, a la atrofia axonal o a la disminución de axones / neuronas.

Se ha sugerido que la degeneración neuronal y oligodendroglial serían secundarias a la rotura de axones y fibras miélicas, y a la falta de factores tróficos, aunque no se ha descartado la contribución de la excitotoxicidad crónica. Por tanto, en las distintas fases de disfunción axonal y neuronal aguda o crónica, el glutamato podría ser un factor secundario.

Se propone como mecanismo patogénico de la desmielinización, la muerte por excitotoxicidad de los oligodendrocitos debida a alteración aguda y crónica de la homeostasis del glutamato. ¿Cuál es primero ,el insulto inmunológico debido a alteración de la inmunidad celular y/o la alteración de la homeostasis de factores pro y antiinflamatorios? ¿el excitotóxico debido a acumulación exagerada de glutamato extracelular o a mecanismos bloqueados de la recaptación por los transportadores?.

La hipótesis excitotóxica primaria sostiene que la sobreactivación de los receptores de glutamato causarían lesión tisular y ésta iniciaría mecanismos inmunológicos. La respuesta no está resuelta, es posible que ambas hipótesis contribuyan en distinta proporción en los diversos estadios de una enfermedad. También es probable que ambos procesos, en diferentes estadios de la enfermedad, actúen de forma sucesiva o independiente.

Los estudios sobre el glutamato en suero o en líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes de EM difieren en los resultados, probablemente debido a la diversa selección de los pacientes y a los distintos métodos utilizados en la medición del glutamato. Westall y cols, analizan de forma seriada durante 3 años los niveles de glutamato en suero de pacientes con EM y en controles. Encuentran elevación significativa de los niveles de glutamato en el suero de pacientes con EM, uno o dos meses antes y durante el brote. La cifra es máxima durante el brote para después descender paulatinamente. Sugieren que los niveles séricos podrían ser predictivos del brote en algunos pacientes. Klivényi y cols, determinan diferentes aminoácidos, incluido el glutamato en el LCR de 17 pacientes con EM (no especifican si están en brote o en remisión clínica) y los comparan con 9 controles a los que se extrajo LCR al realizar una mielografía. Estos autores no encuentran diferencias, en la concentración de aminoácidos, entre ambos grupos. Stover y cols, determinan los niveles de glutamato y aspartato en LCR de pacientes con meningitis aséptica, EM silente y aguda, mielopatía vírica y espondilítica, y en controles. Los niveles de glutamato y aspartato se mostraron elevados en dichas patologías con respecto a los controles. Dichos investigadores afirman que la presencia de estos neurotransmisores en el LCR refleja la actividad patológica subyacente. Un cuadro común de la inflamación del SNC es el aumento de la producción de glutamato por los macrófagos y la glía. El incremento del glutamato en el LCR de los pacientes con EM, podría deberse a este fenómeno durante el brote. En los pacientes con meningitis bacteriana también se ha señalado que los linfocitos y los macrófagos activados producen grandes cantidades de glutamato. Los corticoides inhiben la función de los macrófagos. Estudios in vitro han demostrado que los corticoides reducen la liberación de glutamato de los macrófagos del SNC. Se atribuye a este efecto de los corticoides el beneficio clínico observado en la meningitis bacteriana aguda. Werner y cols, analizan mediante inmunohistoquímica la sustancia blanca de pacientes con EM y de controles. Utilizan marcadores de síntesis de glutamato (glutaminasa), transportadores de glutamato (GLAST o EAAT2), GIT-1 y EAAT1; marcadores de metabolismo y reciclaje de glutamato, glutamato dehidrogenasa (GDH) y glutamato sintetasa (GS); marcadores de daño axonal (SMI 32) y tipos de

células del SNC. Estos autores muestran que en las lesiones activas de EM, los macrófagos y la microglia próxima a los axones, dañados o distróficos, expresaban altos niveles de glutaminasa. Lo cual es consistente con actividad de síntesis de glutamato por estas células. La presencia de glutaminasa en macrófagos y glía es un cuadro general en inflamación del SNC, mientras que en personas normales y en condiciones no inflamatorias no se observa.

También demuestran que los tres transportadores de glutamato se expresan de forma marcada, en los oligodendrocitos, tanto en los controles, como en la sustancia blanca de los pacientes con EM. Por el contrario, el transportador GIT-1 se encontraba con bajo nivel de expresión en las lesiones activas de EM. Esta disminución selectiva del transportador glial de glutamato en los oligodendrocitos que rodean a la lesión activa es probable que se deba al TNF- $\alpha$  procedente del infiltrado inflamatorio. Esta citokina se ha visto que disminuye la captación de glutamato por los astrocitos. Al no recaptar el glutamato se potencia la excitotoxicidad por déficit de desintoxicación y acumulo de glutamato extracelular.

Por otra parte desde el punto de vista inmunológico, cobra fundamental importancia en la respuesta inflamatoria la acción de un conjunto de proteínas llamadas Citoquinas. Estas proteínas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad inespecífica y específica y su función es mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias. En general no se almacenan, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción génica. Dentro del grupo de las citoquinas, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es un importante mediador en la respuesta inflamatoria por infecciones principalmente por gram negativos y juega un importante rol en la inmunidad contra tumores. Se ha comprobado su presencia en procesos inflamatorios como la Artritis reumatoidea en altas concentraciones en plasma y líquido sinovial por lo que jugaría rol fundamental en la patogenia de ese tipo de patología.

La principal fuente celular de TNF $\alpha$  es el macrófago activado y el linfocito T los cuales a su vez son activados en el curso del proceso inflamatorio a través de las ramas de la inmunidad inespecífica (el monocito-macrófago en su función de fagocito profesional y como presentador de antígenos) y de la inmunidad específica (por la presentación de antígenos procesados en el contexto del

complejo mayor de histocompatibilidad :MHC clase II asociado a la liberación de otras citoquinas que producen una verdadera retroalimentación positiva como la Interleuquina 1 y 2, desde el mismo macrófago y el linfocito T.

El TNFa es pues un importante mediador de la inmunidad inespecífica y específica y un nexo fundamental entre las respuestas inmunes específicas y la inflamación aguda. Fue purificado en 1984 de macrófagos de ratón y se lo llamó caquectina debido a su efecto deletéreo sobre el peso corporal. Es una proteína trimérica transmembrana que se libera desde las membranas celulares de macrófagos y linfocitos T por acción de una metaloproteinasa. se induce en respuesta a la activación de las células productoras por interleuquina 1 cuya principal fuente son los propios macrófagos. Ejerce su acción a través de receptores transmembranas que median efectos intracelulares por activación de cascadas intracitoplasmáticas que ocasionan actividad genética a través del NFkB(receptor p75) con actividad inflamatoria o bien activan dominios de muerte intracelular que conducen a la muerte por apoptosis (receptor p55).

Las acciones biológicas del TNF se comprenden mejor en base a su cantidad. En concentraciones bajas actúa como regulador paracrino y autocrino de leucocitos y células endoteliales (activación de las células , secreción de Il1,6 TNF y quimioquinas en el caso de leucocitos y macrófagos, y aumentando la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales)

Cuando el estímulo para la producción de TNF es muy alto o persistente hay mayor cantidad de citoquinas y pasa al torrente circulatorio, actuando como hormona endocrina y produciendo acciones sistémicas. Dentro de ellas lo podemos ver como pirógeno endógeno sobre células reguladoras de la temperatura en hipotálamo (junto a Il1), sobre fagocitos mononucleares y células endoteliales produciendo estímulo para la secreción de Il1 y 6 relacionadas a la respuesta inflamatoria. A nivel del hepatocito aumenta la síntesis de proteína Amiloide A y otras reactantes de fase aguda. Sobre la coagulación altera equilibrio entre factores pro y anticoagulantes a nivel endotelial. Por otra parte en Médula ósea suprime la división de las Stem cells produciendo linfopenias.

La caquexia asociada a altos niveles de TNF (inicialmente llamado caquectina) se asocia a pérdida de peso por disminución del apetito y supresión de la

lipoproteínlipasa necesaria para la utilización de ácidos grasos por los tejidos, llevando a un estado metabólico de desgaste de células musculares y grasas ,como ocurre en el Wasting Síndrome de la infección por HIV. Es de notar que muchas de las acciones biológicas del TNF se potencian por el Interferón gama, el cual a su vez aumenta en infecciones virales.

En pacientes con SIDA se ha visto una alta incidencia de alteraciones neurológicas y cognitivas como resultado del propio HIV (encefalopatía asociada al SIDA). Hay estudios que muestran que los niveles de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con demencia por HIV son mayores que los que tienen pacientes HIV + sin demencia, asociado a mayores niveles de glutamato en plasma en los mismos pacientes. En otro estudio se mostró que los niveles de glutamato en LCR se relacionaron significativamente con la demencia por HIV, con la severidad de la atrofia cerebral y con los niveles de carga viral y CD4, ya que era mayor en pacientes sin tratamiento antirretroviral.

Algunos autores consideran que el glutamato en LCR proviene del mismo SNC y no del plasma porque demostraron la integridad de la barrera hematoencefálica por el número de células en LCR ,y sostienen que en SNC el glutamato aumenta por el efecto de proteínas virales o factores solubles de las células infectadas (esto se puede inferir del hecho de que pacientes con tratamiento antiretroviral no sólo disminuyen su carga viral y la replicación sino que también disminuyen los niveles de glutamato. Consideran además al glutamato como marcador biológico del rol de la excitotoxicidad en la progresión de la demencia por HIV.

En conclusión, aunque el avance ha sido grande, no contamos todavía con una demostración suficiente de la relación entre niveles de glutamato y funcionamiento del sistema inmune en afecciones agudas y crónicas del sistema nervioso central.

### **Objetivos específicos**

Determinar si el glutamato aumentado en forma exagerada y aguda es causa por si mismo de daño severo que pueda conducir a la muerte en el TEC.

Determinar si el aumento de glutamato sumado a alteración importante del

sistema inmune, acelera el daño neuronal en el tiempo, explicando la demencia por SIDA.

Comprobar si la falla en la restitución inmunológica de pacientes con HIV se asocia a niveles elevados de glutamato pese a tener carga viral no detectable.

### **Resultados esperados**

El glutamato aumentado en forma aguda y exagerada no sería causa directa de daño severo que conduzca a la muerte en el TEC.

El glutamato aumentado sumado a una alteración importante del sistema inmune en el SNC , produciría un aceleramiento en el desarrollo de la demencia por SIDA.

El daño neuronal se asociaría a una deficiente restitución inmunológica en pacientes con SIDA que perpetuaría el proceso inflamatorio en el tiempo, manteniendo niveles persistentemente elevados de glutamato .

### **Pacientes y métodos**

Pacientes con traumatismo de cráneo agudo y grave de servicio de Neurotrauma del Hospital Central y Español de Mendoza con captor de PIC.

Pacientes con Sida con afección del SNC del Hospital Central de Mendoza.

Estudios de laboratorio

Estudio en LCR y plasma de Glutamato por cromatografía de fase, TNF alfa por citometría de flujo, PCR por nefelometría , Glutaminasa por...

Niveles de CD 4 en sangre por Citometría de flujo

Carga viral para HIV por PCR

Estudios de neuroimágenes:

RMN con espectroscopia. PET.

Estudios psiconeurológicos para detección de daño cortical y subcortical cerebral.

### **Bibliografía**

1. Danbolt NC. Glutamate uptake. Prog Neurobiol 2001;1-105.



2. Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 2001;58:365-70.
3. Hugon J, Vallat JM, Dumas M Rôle du glutamate et de l'excitotoxicité dans les maladies neurologiques. *Rev Neurol (Paris)* 1996; 152: 239-248.
4. Trap BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, BöL. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-285.
5. Waxman SG. Multiple sclerosis as a neuronal disease. *Arch Neurol* 2000;57:22-24.
6. Cid C, Alcázar C, Regidor I, Masjuan J, Salinas M, Álvarez-Cermeño JC. Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci* 2002;193:103-109.
7. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, y col. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001;58:65-70
8. Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 2001;24:224-230.
9. Westall FC, Hawkins A, Ellison GW, Myers LW. Abnormal glutamic acid metabolism in multiple sclerosis *J Neurol Sci* 1980;47: 353-64.
10. Klivényi P, Kékesi K, Juhász GVécsei L. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1997;95:96-98.
11. Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempfski OS. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Europ J Clin Invest* 1997;27:1038-43.

12. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Maiwald M, Bruno K, Hacke W. Excess glutamate in cerebrospinal fluid in bacterial meningitis. *J Neurol Sci* 1996;143:126-131.
13. de Andrés C, Asensio MJ, Herranz AS, Cuadrado N. 14-3-3 testing in CSF is not sensitive to glutamate excitotoxicity in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis. Clinical and laboratory research* 2001; 7:Suppl 1;S35.
14. Martínez-Yélamos A, Sainz A, Sánchez-Valle R, Casado V, Ramón JM, Graus F, Arbizu T. 14-3-3 protein in the CSF as prognostic marker in early multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57:722-724.
15. Werner P, Pitt D and Raine CS. Multiple sclerosis: Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 2001;50:169-180.
16. Mugnaini E, Oertel WH. An atlas on the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: Björklund A, Hökfelt T, eds. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol 4, part 1. Amsterdam: Elsevier, 1985;436-608.
17. Solimena M, Folli F, Aparisi R, et al. Autoantibodies to GABAergic neurons and pancreatic cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990;322:1555-1560[Abstract].
18. Stayer C, Meinck HM. Stiff-man syndrome: an overview. *Neurologia* 1998;13:83-88[Medline].
19. Dinkel K, Meinck HM, Jury KM, et al. Inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff man syndrome. *Ann Neurol* 1998;44:194-201[Medline].
20. Honnorat J, Trouillas P, Thivolet C, et al. Autoantibodies to glutamate decarboxylase in a patient with cerebellar cortical atrophy, peripheral neuropathy, and slow eye movements. *Arch Neurol* 1995;52:462-468[Abstract].
21. Saiz A, Arpa J, Sagasta A, et al. Autoantibodies to glutamic acid

decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late onset insulin dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997;49:1026-1030[Abstract].

22. Abele M, Weller M, Mescheriakov S, et al. Cerebellar ataxia with glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Neurology* 1999;52:857-859[Abstract/Free Full Text].
23. Nemni R, Braghi S, Natali-Sora MG, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in palatal myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol* 1994;36:665-667[Medline].
24. Giometto B, Nicolao P, Macucci M, et al. Temporal lobe epilepsy associated with glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Lancet* 1998;352:457[Medline].
25. Peltola J, Kulmala P, Isojärvi J, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with therapy resistant epilepsy. *Neurology* 2000;55:46-50[Abstract/Free Full Text].
26. Trivedi R, Mundanthanam G, Amyes E, et al. Autoantibody screening in subacute cerebellar ataxia. *Lancet* 2000;356:565-566[Medline].
27. Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, et al. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 1996;39:1351-1356[Medline].
28. Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. *Diabetes* 1995;44:636-640[Abstract].
29. Seissler J, Bieg S, Yassin N, et al. Association between antibodies to the MR 67 000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Autoimmunity* 1994;19:231-238[Medline].
30. Schmidli RS, DeAizpurua HJ, Harrison LC, et al. Antibodies to glutamic

acid decarboxylase in at-risk and clinical insulin-dependent diabetic subjects: relationship to age, sex and islet cell antibody status, and temporal profile. *J Autoimmun* 1994;7:55-66[Medline].

31. Grimaldi LME, Martino G, Braghi S, et al. Heterogeneity of autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1993;34:57-64[Medline].
32. Butler MH, Solimena M, Dirx RJ, et al. Identification of a dominant epitope of glutamate decarboxylase (GAD65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome. *J Exp Med* 1993;178:2097-2106[Abstract].
33. Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *TiPS* 1998;19:500-505[Medline].
34. Steffen H, Menger N, Richter W, et al. Immune-mediated retinopathy in a patient with stiff-man syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:212-219[Medline].
35. Honeyman MC, Stone N, DeAizpurua H, et al. High T cell responses to the glutamic acid decarboxylase (GAD) isoform 67 reflect a hyperimmune state that precedes the onset of insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 1997;10:165-173[Medline].