

**SESIÓN ESPECIAL
CON INVESTIGADORES FORMADOS:
SOSTÉN TRÓFICO DEL SISTEMA NERVIOSO.
IMPLICANCIAS BÁSICAS Y CLÍNICAS**

MEDICINA (Buenos Aires) 2000; 60: 725

FACTORES TROFICOS Y ENFERMEDADES NEUROLOGICAS HUMANAS

ROBERTO E.P. SICA

División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA.

El factor de crecimiento neuronal (NGF) fué hallado hace ya algunas décadas¹ y constituyó la primera molécula para la que se demostró la capacidad de promover crecimiento, diferenciación y supervivencia neuronal². De inmediato se intuyó la posibilidad de que este tipo de compuestos fuesen útiles en el tratamiento de enfermedades neurológicas degenerativas humanas.

Los años transcurridos han probado que el avance, en ese aspecto, ha sido lento sin que hasta hoy se produjeran hechos de relevancia en la obtención de ese objetivo.

En los últimos años una serie de factores con propiedades similares a los del NGF fueron descritos, tales como el derivado del cerebro (BDNF), el de la glia (GDNF), las neurotrofinas (N3 y N4/5), el similar a la insulina (IGF1, IGF2), el neurotrófico ciliar (CNTF), el de crecimiento fibroblástico (FGF), el transformador de crecimiento beta (TGFbeta) y otros, capaces de mantener en salud a diferentes poblaciones neuronales, agrupados en distintas familias según sus características estructurales³.

Teóricamente los factores tróficos podrían actuar como protectores neuronales en diversas alteraciones del sistema nervioso central (SNC) y del periférico (SNP) previniendo la muerte de neuronas y rescatando otras que hubieran ingresado en el estado de enfermedad. Por ejemplo, el IGF1 ha probado ser efectivo en modelos animales de enfermedad de neurona motora, e igual ha sucedido con el CNTF, el BDNF y la NT-3. Por otra parte, el NGF ha exhibido marcado efecto protector sobre neuronas colinérgicas en cultivo, que son las mismas que se comprometen tempranamente en la demencia

de Alzheimer⁴. En la enfermedad de Parkinson experimental se ha mostrado el beneficio del FGF, del TGFbeta y del GDNF, que son capaces de mantener vivos a los trasplantes de células cromafines⁵. En lo que respecta al SNP, algunos pocos intentos experimentales se han hecho tratando de proteger a receptores periféricos y a los axones que a ellos llegan mediante el empleo de IGF y de NGF, con resultados variables.

Diversas pruebas terapéuticas han sido completadas ya, y otras estan en vias de ejecución, empleando estas moléculas en enfermedades degenerativas primarias del SNC. El mayor énfasis ha sido puesto en la esclerosis lateral amiotrófica en la que ya se han ensayado el CNTF, el IGF 1 y el BDNF sin que hayan logrado modificar el curso natural de la enfermedad. Sin embargo, en todos esos intentos la via de administración ha sido la subcutanea que, aparentemente, no es la mas apropiada. Muy posiblemente la modificacion de la ruta de aplicacion de estos factores, mediante la introduccion directa de ellos en el SNC a traves de distintos procedimientos, permita obtener resultados mas alentadores para el control de esas dolencias.

Bibliografía

1. Levi-Montalcini R. Science, 1987, 263: 1154-1162.
2. Thoenen H. TINS, 1991, 14: 165-170.
3. Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS. TMS, 1994, 17:182-190.
4. Hefti F. J Neurosci, 1986, 6: 2155-2162.
5. Oppenheim RW. Nature, 1995, 373: 344-347.

**SESIÓN ESPECIAL
CON INVESTIGADORES FORMADOS:
SOSTÉN TRÓFICO DEL SISTEMA NERVIOSO.
IMPLICANCIAS BÁSICAS Y CLÍNICAS**

MEDICINA (Buenos Aires) 2000; 60: 726-728

EL PAPEL DEL CALCIO EN LA PROTECCIÓN NEURONAL

MÓNICA LIDIA FISZMAN

Laboratorio de Neurociencias, Fundación CIMAE, Argentina.

Es conocido el papel de la actividad neuronal en los fenómenos de plasticidad. También se ha descripto que la interrupción de las sinapsis podría afectar la viabilidad de las neuronas.

En esta comunicación se aportan evidencias sobre los efectos de la actividad neuronal sobre la neurogénesis, diferenciación y supervivencia de las neuronas. Se estudiaron células granulares del cerebelo (CGC) en diferentes estadios de maduración *in vitro*, plaqueadas en condiciones que no favorecen el crecimiento glial y en ausencia de factores tróficos (medio químicamente definido). Para recrear la actividad neuronal se trataron las células con CIK 25 mM (25K) que induce despolarización y aumento de las concentraciones del calcio intracelular.

Los parámetros biológicos estudiados fueron neurogénesis (24 horas *in vitro*), neuritogénesis/plasticidad (48 horas *in vitro*), supervivencia (7 días *in vitro*).

Los resultados obtenidos en neuroblastos sugieren que los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) se expresan ya en este estadio del desarrollo y son funcionales ya que tras su activación con 25K se produce un influxo de calcio (Fura-2) que es bloqueado con nifedipina. Se produce también un aumento de la proliferación de los neuroblastos que es bloqueado por nifedipina, y magnesio. El efecto sobre la neurogénesis es mediado por la cascada de la MAPK.

Las neuronas inmaduras (48 horas *in vitro*) crecidas a baja densidad y en ausencia de contactos sinápticos presentan una morfología bipolar simple, sin arborizaciones. La actividad neuronal induce en ellas un incremento muy significativo de la red neurítica. Este efecto neuritogénico se debe al influxo de calcio a juzgar por los experimentos con Fura-2 y bloqueantes farma-cológicos de CCVD. En este caso la cascada enzimática que se activa es la de la CaMKII.

La población de neuronas maduras que sobrevive en condiciones de reposo (5K) a los 7 días es reducida en número (40% con respecto a las de 25K) con neuritas cortas y escasas. Por el contrario las CGC plaqueadas en medios despolarizantes presentan una densa red neurítica y son mayores en número. Esta situación es independiente de la presencia de suero y glía en las condiciones de cultivo. El efecto depende exclusivamente del influxo de calcio y tanto la MAPK como la CaMKII median el efecto neuroprotector que activa el calcio.

Se concluye que los niveles de calcio intracelular juegan un papel determinante regulando el número de neuronas. El calcio ejerce diferentes efectos biológicos dependiendo del estadio de madurez de la célula. En interneuronas (CGC) el calcio parece ser el único determinante de la supervivencia a largo plazo.

FUNCIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO EN LA NEUROPROTECCIÓN

D.P. CARDINALI, L.I. BRUSCO, R.A. CUTRERA

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.

El organismo sano se caracteriza por un alto grado de orden temporal en sus funciones y las desviaciones de este orden acompañan a numerosas patologías. Los dos grandes tipos de desincronizaciones circadianas en el hombre son: (a) las internas, como consecuencia de alteraciones patológicas crónicas o del proceso normal de envejecimiento; (b) las externas, derivadas de la

necesidad del trabajo nocturno o de los vuelos transmeridianos. A medida que la edad avanza la amplitud de los ritmos disminuye y se modifica la oscilación intrínseca del reloj circadiano, con adelantos de fase. Ello se agrava en las enfermedades neurodegenerativas de la vejez, como la enfermedad de Alzheimer. En general el sueño del geronte está alterado con aumento en el número y

duración de los episodios de despertar, abolición del sueño lento y disminución de la latencia del sueño REM. Existe también disminución de la amplitud de los ritmos diarios de secreción de hormonas como la melatonina o el cortisol, participantes en la exportación de la señal circadiana a diversos tejidos. La secreción de hormonas cuya liberación está vinculada con el sueño lento, como la hormona de crecimiento, se suprime, así como numerosos fenómenos anabólicos en el SNC. La razón de estos cambios está en la degeneración celular de los núcleos supraquiasmáticos, con consecuencia directa de disminución de la longitud y amplitud de los ciclos. La reciente incorporación de la melatonina como terapéutica para la reducción de amplitud de ritmos circadianos en gerontes, remarcablemente el sueño, nos ha permitido examinar su eficacia en distintas patologías de la vejez. Se discutirán distintos estudios experimentales y clínicos sobre la acción de la melatonina. En un modelo de artritis por adyuvante de Freund en ratas

observamos que la melatonina revierte la depresión del ritmo diario en LH y aumenta la amplitud del ritmo en ACTH observadas en animales viejos. En otro estudio se verificó que la melatonina revierte la depresión relacionada con la vejez de los ritmos circadianos en linfocitos T y CD4+. En un estudio polisomnográfico en gerontes con insomnio primario crónico observamos que la administración de melatonina redujo el tiempo despierto durante el sueño y aumentó la duración y eficiencia del sueño, con aumento en el sueño en estadio 2, sin modificaciones en el REM. En una serie de 27 pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con melatonina (9-12 mg/día) se observó reducción significativa de la agitación vespertal (sundowning) acompañada de enlentecimiento en la evolución clínica de la enfermedad. En conjunto, los resultados avalan la hipótesis de que la restauración de la amplitud en el sistema circadiano se acompaña fenómenos reparativos y neurotróficos significativos.

PROGESTERONE : LOCAL BIOSYNTHESIS AND TROPHIC EFFECTS IN THE NERVOUS SYSTEM

R. GUENNOUN¹, H. COIRINI^{1,2}, F. LABOMBARDA², Y. BENMESSAHEL¹, Ph. LIERE¹, S. GONZALEZ², E-E BAULIEU¹, A.F. DE NICOLA², M. SCHUMACHER¹

¹ INSERM U488, 80, rue du général Leclerc, 94276 Bicêtre, France. ² Instituto de Biología y Medicina Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

Some steroids, such as progesterone (P4), can be synthesized in the central and peripheral nervous system by neurones and glial cells and thus they have been termed "neurosteroids". This observation raises the questions of the regulation of neurosteroid synthesis and of its biological significance. We have addressed them by studying the expression, activity, and regulation of the enzyme 3 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase (3 β -HSD) in both the central and peripheral nervous system. Indeed, the conversion of pregnenolone, a 3 β -hydroxy- Δ 5-ene steroid, into P4, a Δ 4-oxo steroid by 3 β -HSD is an essential step in the biosynthesis of all steroid hormones. We have also demonstrated an important role of the locally formed P4 in myelination after sciatic nerve injury.

In rat brain, 3 β -HSD mRNA is expressed in neurones of olfactory bulb, striatum, cortex, thalamus, hypothalamus, septum, habenula, hippocampus and cerebellum. Nucleotide sequencing of RT-PCR amplified cDNA fragments indicated that the 4 known isoforms are expressed in the brain, with the isoform 1 being the more abundant.

In the spinal cord, similar patterns of 3 β -HSD mRNA expression were observed in the cervical, thoracic, lumbar and sacral regions. The following gradient of

distribution was observed: dorsal horn (layers I-III) > central canal (layer X) \geq ventral horn (layers VIII and IX) >> ventral funiculus and/or lateral funiculus (white matter). The number of grains per cell was higher on motoneurones than in the neurones of the dorsal horn in all the regions of the spinal cord. To evaluate if neurosteroid levels are influenced by trauma, we measured by a gas-chromatographic/mass-spectrometric method, the levels of P4, its precursor pregnenolone, and its 5 α -reduced derivatives in the spinal cord after transection at the thoracic level (T10). 72h after injury the levels of pregnenolone, 5 α -progesterone, and 3 α ,5 α -tetrahydroprogesterone increased in the lumbar region as compared to control animals.

In the peripheral nervous system, expression of 3 β -HSD mRNA and formation of P4 by rat Schwann cells are dependent on signals produced by dorsal root ganglia sensory neurones. This was shown *in vitro* and *in vivo* in the regenerating rat sciatic nerve after different types of injury. The regulation of 3 β -HSD mRNA after lesion was similar to the regulation of myelin protein mRNAs, suggesting an important role of locally formed P4 in myelination. This was demonstrated in the regenerating mouse sciatic nerve. Blocking the local synthesis of progesterone by trilostane or its action by

RU486 after lesion inhibited the formation of new myelin sheaths. A mechanism by which P4 promotes myelin formation may be the activation of specific myelin protein genes. However, the effects of P4 may be indirect, by increasing the expression of transcription factors, which are involved in myelination. The transcription factor Krox-20 (Egr-2) that is expressed in Schwann cells plays an important role in the myelination of peripheral nerves

and is rapidly induced by P4. This stimulation was observed within 15 minutes and is specific as other steroids had no effect.

This work was supported by the association Française contre les Myopathies (AFM), by the European community (Biomed 2, contract BMH4-CT97-2359) and ECOS-SECYT program (A98SO1) between the governments of France and Argentina.

HORMONAS ESTEROIDEAS: NUEVAS PERSPECTIVAS PARA LA NEURODEGENERACIÓN

A.F. DE NICOLA, M.C. GONZALEZ DENISELLE, S. GONZALEZ

Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

El ratón Wobbler posee una mutación de expresión autosómica recesiva (*wr*), la cual produce degeneración temprana de las motoneuronas de la médula espinal y del tronco encefálico, además de una pronunciada astrogliosis. Se lo ha empleado como un modelo genético de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y de la atrofia muscular espinal infantil. La médula espinal del Wobbler y la de pacientes con ELA presentan diversas patologías en común, que vuelven a este animal un modelo útil para evaluar terapéuticas no convencionales. Entre estas neuropatologías mencionaremos: 1) cambios degenerativos de motoneuronas grandes y medianas, incluyendo pérdida de sustancia de Nissl; 2) cambios axonales que semejan la degeneración Walleriana; 3) hiperplasia de neurofibrillas con alteración del flujo axonal.; 4) ausencia de gránulos de lipofucsina en motoneuronas; 5) astrogliosis con aumento de la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP); 6) aumento de la expresión de la proteína asociada al crecimiento (GAP43) y 6) mayor expresión de óxido nítrico sintetasa .

Existen evidencias directas e indirectas sobre el aumento del estrés oxidativo en la medula espinal del ratón Wobbler, lo que ha llevado a considerar la posibilidad del tratamiento con antioxidantes. Los esteroides poseen potencia antioxidante y neuroprotectora, ya se trate de estrógenos, glucocorticoides, progesterona y los 21-aminoesteroides. Los últimos, llamados también Lazaroide derivan de los glucocorticoides, no poseen efectos secundarios, su potencia antioxidante es 3 veces superior a la vitamina E y 10 veces mayor a la metilprednisolona, y se intercalan en las membranas previniendo la peroxidación lipídica. El tratamiento con un 21-aminoesteroide de ratones Wobbler se efectuó durante 4 días por implante de un pellet sc de 50 mg. Se escogieron tres parámetros anormalmente elevados en los ratones Wobbler y en pacientes con ELA para evaluar la acción

del Lazaroide: número de astrocitos GFAP positivos, expresión del ARNm para GAP-43 y actividad de la óxido nítrico sintetasa (NADPH-diaforasa). Resultados: a) Los ratones Wobbler presentaron hipertrofia e hiperplasia astrocitaria, la que aumentó post-tratamiento con Lazaroide en el asta ventral y dorsal de la médula espinal. b) En ratones controles la expresión del ARNm de la GAP43 en motoneuronas fue baja o indetectable, mientras que se obtuvo hiperexpresión en Wobbler, la que se atenuó significativamente por tratamiento con el Lazaroide; c) La reacción histoquímica para NADPH-diaforasa mostró una elevación entre 2-3 veces en motoneuronas del Wobbler, la que fue significativamente disminuida por tratamiento con el Lazaroide.

Integrar estos datos en una hipótesis unitaria es una tarea difícil, aunque sugerimos las siguientes posibilidades: Primero, dada la función de los astrocitos en el mantenimiento de la función neuronal, la hiperreactividad astrocitaria producida por el Lazaroide se podría encuadrar como inductora de la neuroprotección. Segundo, la atenuación de la GAP-43 se debería en parte a la atenuación de la respuesta neuronal exagerada a la degeneración. Asimismo, la atrofia muscular por desnervación que caracteriza al Wobbler y que provocaría la hiperexpresión de GAP-43 podría mejorarse por el Lazaroide, ya que posee acción miogénica. Tercero, el Lazaroide prevendría la neurotoxicidad por exceso de óxido nítrico y formación de peroxinitritos al reducir la actividad de la NADPH-diaforasa (óxido nítrico sintetasa). Los datos aportados por el tratamiento con anti-oxidantes en el ratón Wobbler, sugieren que estos compuestos tendrían un potencial valor terapéutico en enfermedades degenerativas de motoneurona (Trabajo subsidiado por CONICET –PIP4103; UBA TM13, FONCYT BID 802 OC AR PICT 97 05-00438) e Instituto Universitario de Ciencias de la Salud, (Fundación Barceló).