

03081

1
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**“NEURODEGENERACION RELACIONADA CON LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER: NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA, PROTEINA
B-AMILOIDE Y CITOESQUELETO”**

PRESENTA:

M. en C. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR; CIUDAD UNIVERSITARIA

MEXICO; D. F., 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Agradecimientos

Resumen

Abstract

lista de abreviaturas

Página...

CAPITULO I

- Generalidades sobre muerte celular 1
- Muerte por apoptosis vs muerte por necrosis 2
- Factores comunmente asociados con enfermedades neurodegenerativas 6
- El envejecimiento como causa de muerte neuronal 11

CAPITULO II

- Padecimientos degenerativos crónicos del sistema nervioso central: hipótesis excitotóxica (revisión)

CAPITULO III

- La muerte neuronal en la Demencia de Alzheimer 15
- Alteraciones del citoesqueleto 19
- Amiloidosis 26
- Proteasas e inhibidores de proteasas 32
- Apolipoproteína E 35
- Neurotransmisores y neuromoduladores 37
- Alteraciones membranales 40
- Transducción de señales 41
- Factores ambientales y neurodegeneración 42
- Astroglía y microglía 44
- Biología molecular 44
- Bases moleculares para la terapia 47

CAPITULO IV

- Objetivos de la tesis 50

ARTICULOS ORIGINALES

- Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons.
- Neuronal loss and temporal changes in the pattern of MAP2 immunocytochemistry elicited by kainate and dihydrokainate in rat hippocampus in vivo. (Manuscrito para ser enviado).
- β -amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices.

CAPITULO V

- Conclusiones generales 53

BIBLIOGRAFIA

62

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Tapia por su asesoría para la realización de este trabajo de tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio 201.

A los miembros del jurado que revisaron y aportaron importantes comentarios a mi trabajo.

Al Dr. Peter Davies y a la Dra. Bridget Shafit-Zagardo por el apoyo académico y económico durante mi estancia en el Departamento de Neuropatología en Albert Einstein College of Medicine.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que produce demencia y se caracteriza por una serie de anomalías estructurales en el cerebro, de las cuales las más importantes son la presencia de las marañas neurofibrilares compuestas por los filamentos apareados helicoidales, y los depósitos insolubles de la proteína β -amiloide (β AP) que conforman las llamadas placas seniles. Un aspecto bioquímico importante para entender los mecanismos básicos que conducen a la pérdida neuronal en la EA se refiere a los cambios en las proteínas asociadas a los microtúbulos. Las proteínas tau y MAP2 están involucradas en la formación de las marañas neurofibrilares, y ambas, consistentemente, se encuentran hiperfosforiladas. Esto ha llevado a estudiar algunos mecanismos de fosforilación/desfosforilación relacionados con la muerte neuronal. En vista de que se conoce poco acerca de estos mecanismos y su repercusión sobre la viabilidad neuronal, en la presente tesis estudiamos los efectos celulares de la fosforilación de proteínas tau y MAP2 en cultivos de neuronas corticales y de astrocitos de rata y en una línea celular de neuroblastoma humano, utilizando un agente inhibidor de fosfatasas 1 y 2A (el ácido okadaico). En este trabajo encontramos que el aumento de fosforilación de tau y MAP2 se asocia con desestabilización de los microtúbulos, retracción de los procesos neuronales y neurodegeneración.

En vista de que la neurotransmisión excitadora ha sido implicada en la EA, decidimos estudiar los efectos de agonistas de glutamato sobre la proteína MAP2 y su relación con la neurodegeneración *in vivo*. Para esto se administraron dos drogas que incrementan la transmisión excitadora, el dihidrokainato y el kainato, en el hipocampo de

la rata. El análisis inmunocitoquímico para MAP2 mostró que previamente a la neurodegeneración existe una retracción de los procesos neurales y posteriormente, conforme avanza la muerte neuronal, una redistribución de la MAP2 hacia el soma y, finalmente pérdida de la proteína.

Por último, y con base en estudios previos que demuestran el efecto del péptido activo 25-35 de la proteína β -amiloide en la homeostasis de Ca^{2+} , se estudió la acción de este péptido sobre la liberación de aminoácidos excitadores en rebanadas de hipocampo de ratas jóvenes y viejas. En este trabajo encontramos que el péptido 25-35 incrementa la liberación de glutamato y aspartato en condiciones de despolarización neuronal en animales jóvenes como viejos.

De los anteriores hallazgos puede concluirse que: 1) la fosforilación de las proteínas MAP2 y tau induce desestabilización del citoesqueleto y neurodegeneración, 2) la proteína MAP2 es un blanco susceptible a la excitotoxicidad por sobreactivación de receptores de amino ácidos excitadores y 3) el péptido activo 25-35 de la proteína β -amiloide puede potenciar la transmisión excitadora en animales jóvenes y viejos.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive dementing disorder of the elderly, characterized by a series of structural abnormalities in the brain. Two histopathological hallmarks have been described: the presence of neurofibrillary tangles in cell bodies and proximal dendrites, composed by paired helical filaments, and the extracellular deposits of the β -amyloid protein (β AP) which are found forming the senile plaques.

The role of tau protein is prominent in the mechanisms that induce the formation of paired helical filaments and the MAP2 protein has been also involved. Both proteins are found in a hyperphosphorylated state in AD but little is known about how the rate of phosphorylation or dephosphorylation is related with alterations of neuronal function and with neurodegeneration. With the use of okadaic acid, a potent and a selective inhibitor of the protein phosphatase 1 and 2A, we induced increased phosphorylation of MAP2 and tau and we observed early cytoskeletal disruption and ultimately cell death in primary rat cortical neurons and astrocytes and in a human neuroblastoma cell line (MSN).

On the other hand, the excitatory neurotransmission has been implicated in some neuropathological diseases including AD. We decided to study the effect of glutamate agonists, kainate and dihydrokainate, on MAP2 protein in the rat hippocampus *in vivo*. We found that both drugs induced neuronal damage which was associated with early loss of MAP2 immunoreactivity. As Neuronal damage progressed, MAP2 was shifted from dendrites to the neuronal soma and finally was lost.

Some studies suggest that β AP and particularly the active peptide 25-35 may render neurons more vulnerable to excitotoxic insult by a mechanism involving intracellular

Ca²⁺ dyshomeostasis. We found that 25-35 peptide potentiated the K⁺-induced release of glutamate and aspartate from hippocampal slices in young and aged rat tissue.

From the above results we conclude that: 1) the phosphorylation of MAP2 and tau proteins induces cytoskeletal disruption and finally leads to neuronal death, 2) MAP2 protein is a susceptible target of the excitotoxicity induced by glutamate receptors overactivation and 3) the 25-35 peptide of β AP potentiate the excitatory neurotransmission in young and aged animals.

LISTA DE ABREVIATURAS:

α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato	AMPA
Apolipoproteína E	ApoE
Dihidroquinato	DHK
Enfermedad de Alzheimer	EA
Factor de crecimiento nervioso	NGF
Factor inhibitorio del crecimiento	GIF
Factor neurotrófico cerebral	BDNF
Filamentos helicoidales apareados	FHA
Kainato	KA
(+)-5metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo[a,d]cicloheptano-5,10-imina maleato	MK-801
N-metil-D-aspartato	NMDA
Pirrolidín dicarboxilato	PDC
Proteína asociada a microtúbulos-2	MAP2
Proteína asociada a microtúbulos-tau	Tau
Proteínas asociadas a microtúbulos	MAPs
Proteína β -amiloide	β AP
Proteína cinasa activada por mitógenos	MAPcinasa
Proteína precursora del amiloide	APP
7-sulfamoyl-benzo(f)-quinoxalina	NBQX

CAPITULO 1

*"Ser inmortal es baladí; menos el hombre
todas las criaturas lo son, pues ignoran
la muerte..."*

Jorge Luis Borges

Introducción

La muerte, como fenómeno biológico, ha ocupado gran parte de la reflexión científica y ha estimulado el desarrollo de numerosos paradigmas experimentales para tratar de conocer sus mecanismos más íntimos.

Son múltiples los enfoques con los cuales se ha tratado de encarar el problema de la muerte en general y su incorporación en diferentes categorías ha condicionado su estudio o análisis desde diferentes y variados puntos de vista: de una aproximación mítica o religiosa sobre su origen y sus consecuencias, al desarrollo, por parte del discurso científico, de hipótesis moleculares que explican la tendencia de la vida a evadir el equilibrio termodinámico o el arribo inexorable al estado de máxima entropía.

Acotando el problema de la muerte en general, el estudio de la muerte celular ha permitido el abordaje científico de un sistema restringido donde se ha pretendido comprender algo acerca de los mecanismos que inician, mantienen y finalmente determinan la detención del proceso vital.

Algunos estudios consideran el problema de la muerte celular como el resultado final de un proceso de desarrollo y maduración anatomo-funcional, genéticamente programado. Otras investigaciones se enfocan a los acontecimientos que determinan la

muerte selectiva de poblaciones celulares: mecanismos de agresión externa o desajustes que inducen dishomeostasia. Sobre esto último existen numerosos ejemplos: la muerte celular de ciertos órganos sometidos al estrés resultante de procesos vasculares obstructivos (isquemia), la muerte por intoxicaciones o infecciones provenientes del ambiente, la muerte por autoagresión en las enfermedades autoinmunes o la muerte por privación de factores químicos necesarios para la supervivencia celular.

Para la neurociencia básica y clínica, uno de los temas de mayor interés es el de la pérdida neuronal selectiva que ocurre en algunos padecimientos neurológicos como la corea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, entre otros. Estos procesos patológicos comparten dos aspectos comunes: 1) la degeneración neuronal se inicia después de un período de diferenciación y función normales y, 2) sólo se afectan poblaciones selectivas de neuronas.

Muerte por apoptosis vs muerte por necrosis

Son dos los mecanismos generales de muerte celular que se han descrito a la fecha: la muerte celular programada y la muerte no programada o por necrosis. Dentro del primer tipo de muerte existe una variedad que tiene una serie de cambios celulares característicos que han llevado a acuñar el término de apoptosis. Aunque muchos autores usan indistintamente los términos "apoptosis" y "muerte celular programada", ambos procesos son de hecho diferentes. La muerte celular programada es un término funcional que describe la muerte celular que ocurre de manera normal durante la vida de organismos pluricelulares. Por otro lado la apoptosis es un término descriptivo

introducido por Kerr y cols. (1971) para definir un tipo de muerte celular que exhibe ciertos cambios morfológicos característicos. Este tipo de muerte es única, porque es consecuencia de una "decisión" tomada por la célula, basada en la información proveniente del ambiente, de su propio estado metabólico y de su estado de desarrollo. Todas estas señales se integran en un mecanismo común de muerte celular iniciado por genes particulares. Existen muchos ejemplos de muerte por apoptosis que pueden considerarse dentro de la muerte celular programada y viceversa, puede haber apoptosis que no sea resultado de un plan celular pre-establecido. Así mismo, no todos los ejemplos de muerte celular programada ocurren por apoptosis (Schwartz y cols., 1993). Por el contrario, en varias condiciones patológicas donde ocurre muerte celular no fisiológica y no apoptótica, las características morfológicas muestran un patrón de cambios comunmente asociados con la necrosis. En este tipo de muerte la célula no tiene elección de morir pues ésta ocurre como resultado de un estímulo agresor que puede ser multicausal y que impide que la célula pueda tomar su propia "decisión".

La muerte celular programada se observa generalmente, durante el desarrollo de organismos complejos cuyo objetivo es el ajuste del número de poblaciones celulares que conformarán algún tejido, aunque también se ha descrito en el organismo adulto bajo ciertas condiciones patológicas y no patológicas. La apoptosis es un tipo de muerte controlada que escapa a la respuesta inflamatoria y cuya secuencia de cambios histopatológicos consiste en: condensación de la cromatina en densas masas uniformes; aparición de protuberancias intracitoplasmáticas con la membrana celular sellada, lo que origina la formación de los llamados cuerpos apoptóticos; desaparición de los cuerpos

apoptóticos por células adyacentes que los degradan dentro de los lisosomas (Russell y cols., 1972; Matter, 1979; Bursch y cols., 1990).

Además del análisis morfológico que ha revelado cambios conspicuos en las células que mueren por apoptosis, el análisis bioquímico ha logrado importantes hallazgos sobre el control de este fenómeno. El aspecto bioquímico más extensamente estudiado es la fragmentación del ADN nuclear que resulta, al inicio, en la aparición de un patrón de bandas de 50-300 kb y más tarde fragmentos de ADN oligonucleosomal (Wyllie, 1980; Umansky, 1982; Arends y cols., 1990; McConkey y Orrenius, 1994). Aunque todavía no se caracterizan completamente las endonucleasas responsables se sabe que algunas de ellas son enzimas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} e inhibidas por Zn^{2+} y en mamíferos las evidencias señalan a la ADNasa I, una enzima que en muchas células existe en un estado inactivado al formar complejos con actina (Peitsch y cols., 1993). Otro aspecto bioquímico interesante es la prevención de la apoptosis con inhibidores de síntesis de proteínas, como la cicloheximida (Yamada y Ohyama, 1988); sin embargo, la cicloheximida no previene la apoptosis en todas las circunstancias. Una proteína específica que se ha relacionado directamente con la apoptosis es la transglutaminasa (Fesus y cols., 1987). Se ha demostrado que esta enzima induce la formación de entrecruzamientos proteínicos responsables de la inducción y mantenimiento de los cuerpos apoptóticos. Por otra parte, en la condensación celular se ha atribuído un papel importante a cambios en las proteínas del citoesqueleto (Wyllie y cols., 1980).

Como la muerte celular programada es el resultado de varios procesos celulares

que se activan debido a la participación de genes particulares, muchos estudios se han enfocado a la búsqueda y caracterización de estos genes y sus productos.

La primera evidencia de que se requerían genes particulares para la inducción de la muerte celular deriva de los trabajos pioneros de Horvitz y cols., realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis y cols., 1991). Dos genes importantes se han caracterizado en este nemátodo, el ced-3 y el ced-4 (de las siglas en inglés *cell death*) cuyas mutaciones inhiben el proceso de la muerte celular programada (Ellis y Horvitz, 1986). Mutaciones en otro gen, el ced-9, por el contrario, activan la muerte por apoptosis y por lo tanto se le conoce como un "gen anti-muerte" (Hengartner y cols., 1992). En mamíferos se han descrito genes homólogos como el bcl-2, cuya secuencia guarda homología con el ced-9 y se ha caracterizado como un regulador negativo de la muerte celular (Tsujimoto y cols., 1985). Recientemente también se ha clonado en mamíferos un gen homólogo de ced-3 que codifica para una proteína llamada ICE (cuyas siglas del inglés significan "enzima convertora de interleucina 1 β "; Yuan y cols. 1993), que es una proteasa de cisteína y cuyo papel en la apoptosis pudiera estar relacionado con la activación de ADNasa I al liberarla de su unión con la actina (Vaux y cols., 1994). Otros genes de mamíferos cuya participación en la apoptosis se ha demostrado son el nur77 y el c-myc, y el p53, definido como un gen supresor de tumores que detiene a las células durante el ciclo celular en la fase G1 y también es inductor de apoptosis por irradiación γ en timocitos (Clarke y cols., 1993). La figura 1 muestra un esquema de las proteínas intracelulares que participan en la muerte celular programada.

En la muerte celular por necrosis, el panorama es muy diferente y sus principales

<u><i>c. elegans</i></u>	<u>Mamíferos</u>	<u>Papel en la muerte celular</u>	<u>Función</u>
CED-9	Bcl-2	preventivo	opuesto Bax
?	Bax	promotor	opuesto bcl-2
?	Bcl-x (largo)	preventivo	opuesto Bcl-x corto
?	Bcl-x (corto)	promotor	opuesto Bcl-x largo
CED-3	ICE	promotor	proteasa
CED-4	?	promotor	?

Figura 1 Esquema que muestra las proteínas involucradas en la muerte celular programada.

características son: hinchamiento o edema celular y de los organelos subcelulares, condensación irregular de la cromatina, daño a la integridad de la membrana celular que resulta en la liberación de enzimas proteolíticas lisosomales y desintegración celular (Trump y cols., 1981). La muerte por necrosis generalmente se acompaña de inflamación exudativa y puede involucrar un gran número de células.

Hasta el momento se desconoce cuál de los dos tipos de muerte celular predomina en las enfermedades neurodegenerativas, pero se ha sugerido que la muerte por apoptosis puede participar en la corea de Huntington y en la EA. Por otro lado se ha avanzado en el conocimiento de algunos factores que a continuación se mencionan y que comunmente se asocian a la neurodegeneración o que contribuyen a la citotoxicidad.

Factores comunmente asociados a enfermedades neurodegenerativas.

Deficiencia de energía. El SNC tiene una alta tasa de consumo de oxígeno y poca capacidad para almacenar sustratos de alta energía, lo cual puede explicar su especial vulnerabilidad ante diferentes agentes agresores. Los ejemplos más evidentes de inducción de muerte neuronal por privación energética son, sin duda, aquellos que se originan por la falta de riego sanguíneo o isquemia y por la hipoglucemia. Ciertos casos de neurotoxicidad por hormonas como los glucocorticoides también se pueden explicar por la falta del suministro adecuado de glucosa a las células (Sapolsky, 1986). En este sentido y con base en datos epidemiológicos, se ha encontrado cierta asociación entre la isquemia y el inicio de cambios citotóxicos que se observan en la EA. En otros padecimientos como la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington, se han

documentado reducciones en la actividad del complejo I de la cadena del transporte de electrones (Shapira y cols., 1990; Mann y cols., 1992), así como disminuciones en la actividad de la citocromo oxidasa en pacientes con EA (Parker y cols., 1990). Aunque es dudoso que estos cambios sean de la suficiente magnitud para causar las severas pérdidas neuronales que se observan en estos padecimientos, la disminución energética crónica puede incrementar la vulnerabilidad de las células ante otros agentes agresores.

Uno de los hallazgos que señala una asociación entre defectos en la producción mitocondrial de energía y muerte neuronal es el dato de que la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un inhibidor del complejo I y causa lesiones histológicas, bioquímicas y clínicas indistinguibles del Parkinson idiopático, tanto en humanos como en primates (Tanner, 1989).

A pesar de los datos experimentales en favor de los defectos de la fosforilación oxidativa en enfermedades neurodegenerativas, estos defectos no pueden explicar la relativa selectividad de la pérdida neuronal en áreas cerebrales particulares, y no está claro si son causa o consecuencia de la neurodegeneración.

Radicales libres. La formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno es otra causa común de daño celular probablemente involucrada en la pérdida neuronal asociada a condiciones patológicas agudas y crónicas. Aunque los radicales libres se forman como una consecuencia normal del funcionamiento metabólico celular, su excesiva producción o fallas en los mecanismos endógenos de su eliminación pueden incrementar su concentración a niveles citotóxicos. Existe evidencia de que tasas anormales de formación de radicales libres o de sus productos, como peróxidos lipídicos

o malondialdehído, se producen después de ciertos períodos de hipoxia o isquemia (Schmidley, 1990), en la sustancia nigra de pacientes con Parkinson (Jenner y cols., 1992), y en el cerebro de pacientes con EA (Subbarao y cols., 1990).

Los principales radicales libres son el superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo ($\cdot OH$). Estas especies reactivas pueden atacar químicamente a diferentes moléculas y alterar su función normal: oxidar ADN y causar mutaciones, u oxidar lípidos, dañar la membrana y aumentar la liberación de aminoácidos excitotóxicos. Las células poseen mecanismos protectores contra el efecto de los radicales libres, entre los que están, el α -tocoferol (vitamina E) que es un antioxidante hidrofóbico y que ejerce su mayor efecto al donar hidrógenos a los radicales alcoxilos y peroxilos y proteger así de la peroxidación de lípidos; el ácido ascórbico (vitamina C) que es un antioxidante hidrofílico y el glutatión, un tripéptido sintetizado intracelularmente y que en su estado reducido elimina especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, en las células existen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa que son responsables de la degradación de $\cdot O_2^-$ y H_2O_2 .

Varias enzimas del metabolismo cerebral, como la monoamino oxidasa, la tirosina hidroxilasa y la L-amino oxidasa producen H_2O_2 como un subproducto normal de su actividad, al igual que la auto-oxidación de sustancias endógenas como el ácido ascórbico y las catecolaminas. La formación de óxido nítrico (NO), un segundo mensajero difusible, reacciona rápidamente con el O_2^- para dar peroxinitrito que a su vez se transforma a $\cdot OH$. Este radical hidroxilo es una de las especies más reactivas. Aunque el H_2O_2 se descompone lentamente hacia $\cdot OH$, esta conversión se acelera

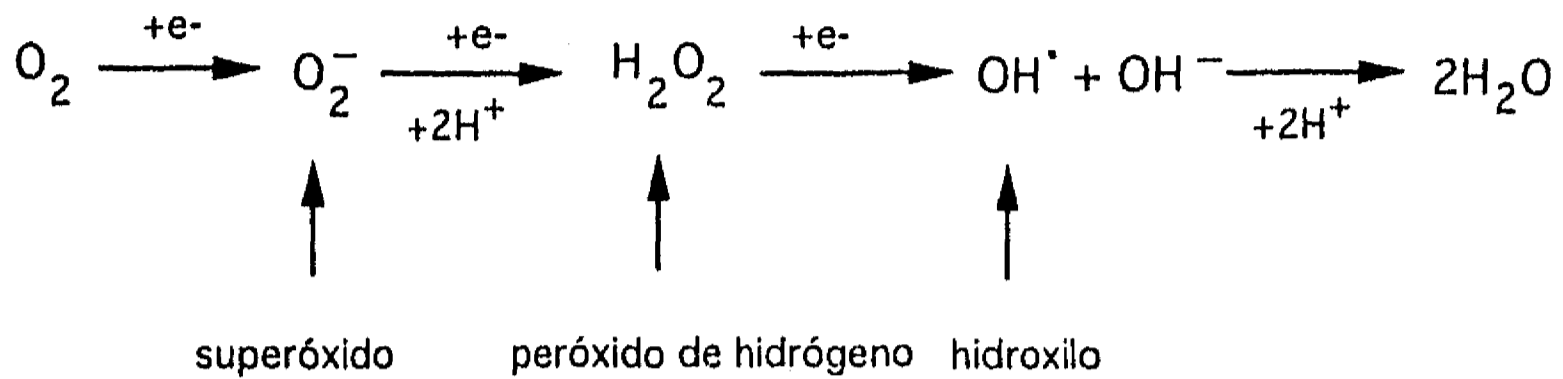
importantemente en presencia de Fe^{2+} por la reacción de Fenton. La vía de generación de $\cdot\text{OH}$ en presencia de metales pesados, probablemente interviene en la neurodegeneración observada en varios padecimientos. En la enfermedad de Parkinson, la sustancia nigra pigmentada tiene una alta concentración de hierro que puede favorecer la formación de radicales libres que acompañan la muerte neuronal (Ben-Shachar y cols., 1991). La Figura 2 muestra algunas de las reacciones que generan radicales libres.

Son varios los ejemplos de neurodegeneración en donde se ha documentado la participación de radicales libres. Además de los ya mencionados se pueden incluir: la etapa de reperfusión después de isquemia cerebral que se asocia con el incremento de aniones superóxido y la esclerosis lateral amiotrófica familiar, en donde se han demostrado mutaciones en el gen que codifica a la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc (Roses y cols., 1993).

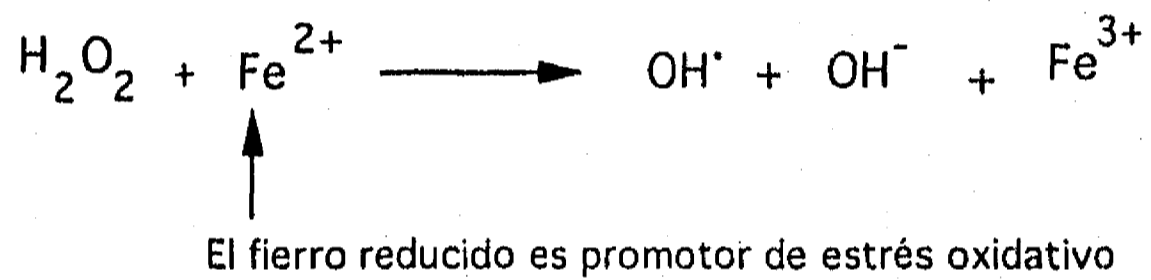
Acido glutámico y Ca^{2+} . Numerosos estudios sugieren que sistemas químicos que normalmente participan en la emisión o recepción de señales dentro del SNC pueden alterarse y ser parcial o totalmente responsables de ciertos tipos de patología neuronal, incluida la degeneración celular. Entre estos sistemas de comunicación interneuronal, la neurotransmisión excitadora y el ácido glutámico en particular, parecen desempeñar un papel importante en la iniciación y propagación de la actividad epiléptica (Meldrum, 1988), en la muerte neuronal que ocurre en la isquemia cerebral y la hipoglicemia (Rothman, 1983) y en algunos casos de degeneración celular crónica (Lipton y Rosenberg, 1994).

El daño cerebral excitotóxico característico es de naturaleza postsináptica. En su

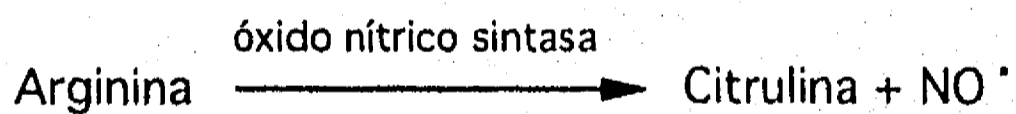
Generación de algunas especies reactivas de oxígeno



Reacción de Fenton



Generación de óxido nítrico



Autooxidación de la dopamina



Figura 2 Algunas reacciones del metabolismo que generan radicales libres

forma aguda, este daño se manifiesta por edema focal de dendritas y cambios citopatológicos agudos como edema mitocondrial y del retículo endoplásmico. En el tipo crónico existe pérdida de interneuronas con preservación de elementos presinápticos y de axones de paso. Si bien el daño excitotóxico se puede producir por la activación de los tres principales receptores para aminoácidos excitadores: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ixosazolpropionato (AMPA) y kainato, la activación del tipo NMDA, que se encuentra asociado a un canal de Ca^{2+} , favorece la sobrecarga de este catión en el interior de las neuronas con la consecuente serie de sucesos patológicos asociados.

La elevación del Ca^{2+} activa gran número de enzimas proteolíticas, puede generar radicales libres e incrementar la salida de más neurotransmisores excitotóxicos.

Aunque una excesiva entrada de Ca^{2+} a las células puede contribuir a la serie de cambios membranales, citoplásmicos y nucleares que conducen a la neurotoxicidad, por sí sola no parece ser suficiente para inducir muerte celular. Sin embargo, el modo de entrada del Ca^{2+} y su localización subcelular sí son fenómenos críticos que determinan la citotoxicidad (Tymianski y cols., 1993).

Los estudios sobre las deficiencias en la producción, almacenamiento o utilización de la energía celular como la participación de los radicales libres y del glutamato conforman las líneas de investigación más activas en el campo de la neurodegeneración aguda o crónica, ya que parecen ser los mecanismos generales más importantes de muerte celular en las dos versiones descritas para el organismo adulto: la apoptosis y la necrosis.

Muerte neuronal por envejecimiento

Los estudios demográficos actuales revelan aumentos importantes en la esperanza de vida de los seres humanos, lo cual se ha relacionado alarmantemente con una mayor prevalencia de enfermedades neurodegenerativas.

De entre todas las células del cuerpo, las neuronas poseen una serie de características que las hacen únicas en muchos sentidos. Este tipo de células tienen una longevidad muy grande y esto permite que presenten alteraciones particulares con la edad. Las neuronas dañadas o con alteraciones morfológicas o funcionales no pueden reemplazarse pues no tienen divisiones mitóticas. Por otro lado, la gran diversidad de tipos neuronales y su localización diferencial dentro del sistema nervioso permite una gama de alteraciones particulares para cada tipo celular y para algunas regiones del cerebro. Sin embargo, todavía no es posible definir de manera precisa, qué cambios en el número o en la función de las neuronas se asocian directamente con la senectud.

Se han descrito cambios regresivos de las dendritas y atrofia del soma neuronal a lo largo de la edad así como aparición de inclusiones citoplasmáticas que pueden alterar la función cerebral. Las neuronas de cerebros envejecidos poseen abundantes gránulos de lipofuscina. Este pigmento es una mezcla compleja de lípidos, proteínas y carbohidratos y un alto contenido de enzimas hidrolíticas, como la fosfatasa ácida, que hace pensar que se forman a partir de lisosomas residuales o degradados. La acumulación de lipofuscina generalmente se considera un signo de degeneración neuronal pero el mecanismo por el cual pueden morir las neuronas se desconoce. Más aún, individuos viejos pueden tener un alto contenido de este pigmento sin

manifestaciones de daño neuronal.

Existen otro tipo de inclusiones específicas y de cambios neuronales como la degeneración granulovascular, formada por vacuolas de nucleos densos aregentofílicos y hematoxilínofílicos y positivos a la presencia de estructuras de citoesqueleto; la degeneración neurofibrilar (de la que se hablara ampliamente más adelante), que aparece en la demencia senil pero también en el envejecimiento normal; los cuerpos de Lewy que incidentalmente aparecen en individuos mayores de 60 años y se encuentran formados por estructuras densas y láminas concéntricas de material amorfo; los cuerpos de Hirano, estructuras eosinofílicas formadas por actina y proteínas asociadas a actina y observados también, de manera esporádica, en individuos viejos.

Sin embargo, como muchas de estas manifestaciones morfológicas asociadas al envejecimiento se presentan de forma exacerbada en ciertos padecimientos neurodegenerativos, ha sido difícil establecer la correlación causa-efecto entre los cambios debidos al envejecimiento normal y los que resultan de un proceso patológico.

Los cambios neuronales asociados con la edad no escapan a algunos de los cambios observados durante envejecimiento de un organismo considerado de manera integral. Por lo tanto, algunas de las preguntas sobre la repercusión de la senescencia en la función cerebral son preguntas que se han abordado desde el punto de vista de las teorías generales sobre envejecimiento.

En este sentido son muy interesantes los experimentos realizados por Rose en 1991, quien ha producido cepas de moscas longevas que sobreviven el doble de las moscas normales. Estas cepas de *Drosophila melanogaster* son más robustas que las

normales y resisten mejor el estrés. Rose y otros investigadores, basados en teorías evolucionistas, han suscrito la idea de que la senescencia está programada en los genes y que su manipulación puede impedir el envejecimiento y consecuentemente la muerte. Estos trabajos en *Drosophila* han mostrado que las moscas longevas poseen una versión inusualmente activa de la enzima CuZn superóxido dismutasa. La actividad de esta enzima, como ya se ha mencionado, protege en contra del daño oxidativo al neutralizar los radicales superóxido. Por otro lado, se ha visto que otros cambios bioquímicos se asocian a tasas elevadas de longevidad. Estos cambios incluyen mayor almacenamiento de lípidos y mejor utilización de carbohidratos. En 1988 Johnson y cols., reportaron también un incremento del 70% en la longevidad de *Caenorhabditis elegans*, derivado de una mutación del gen age-1 que resulta en un aumento importante en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. De esta manera, parece que la neutralización de radicales libres puede jugar un efecto protector y regulador de la senescencia. Los radicales libres inducen daño en el ADN (particularmente en el mitocondrial), el cual se ha hipotetizado como causa importante en la génesis de padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson y la EA. Por otro lado, como parte de la falla metabólica, se ha encontrado un importante incremento de grupos carbonilo (que resultan de la oxidación de proteínas) en fibroblastos extraídos de pacientes con defectos genéticos que causan envejecimiento prematuro tales como la progeria y el síndrome de Werner (Brown, 1992).

A pesar del gran progreso realizado por la investigación básica a partir de estudios de células en cultivo, formación de radicales libres, genes relacionados con el control del

ciclo celular y otros campos promisorios, el proceso de envejecimiento en humanos todavía representa para el investigador un campo de estudio incipiente. Un factor que añade confusión a este tipo de estudios es que los cambios celulares que se dan asociados con la edad no ocurren de manera uniforme ni entre individuos ni entre las diferentes células que los conforman.

Padecimientos degenerativos crónicos del sistema nervioso central

Hipótesis excitotóxica

Clorinda Arias

RESUMEN

Los aminoácidos excitadores desempeñan un papel importante en la transmisión sináptica. Este grupo de compuestos puede activar mecanismos bioquímicos que llevan a la degeneración celular y a la muerte neuronal. Dado que un gran número de sinapsis en el sistema nervioso central utilizan aminoácidos excitadores, se ha abierto un vasto campo para la investigación básica sobre plasticidad y patología nerviosa.

La bestia está echada, indescifrable.
Se refunde, menos mal, en el último
recoveco del laberinto.

Mireya Cueto

INTRODUCCIÓN

La muerte celular, uno de los fenómenos biológicos tal vez menos conocidos, ha merecido una parte importante de la reflexión científica biomédica del siglo XX. Durante este período han aparecido muchos trabajos orientados al desarrollo de diseños y paradigmas experimentales que permiten explicar sus causas y proponer estrategias terapéuticas con objeto de retardar o controlar su aparición.

Algunos estudios consideran el problema de la muerte celular como el resultado final de un proceso de desarrollo y maduración anatómico-funcional, genéticamente programado. Otras investigaciones se enfocan a los acontecimientos que determinan la muerte selectiva de poblaciones celulares: mecanismos de agresión externa o desajustes de los mecanismos homeostáticos inherentes a un organismo. Sobre esto último existen múltiples ejemplos: la muerte de células por intoxicaciones o infecciones provenientes del ambiente, la muerte celular de ciertos órganos sometidos al estrés de procesos vasculares obstructivos (isquemia), o la muerte de grupos celulares por autoagresión en las enfermedades autoinmunes.

Para la neurociencia básica y clínica, uno de los temas de mayor interés es el de la

Recibido el 21 de noviembre de 1990
Aceptado el 14 de enero de 1991

Ana B Clorinda Arias Álvarez. Actualmente realiza estudios de doctorado en investigación biomédica básica en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Su área de investigación está relacionada con el empleo de excitotoxinas para la inducción de epilepsia experimental.

pérdida neuronal selectiva que ocurre en algunos padecimientos neurológicos hereditarios como la corea de Huntington, la demencia de Alzheimer y algunas degeneraciones espinocerebelosas. Estos procesos patológicos comparten dos aspectos comunes: 1) la degeneración neuronal se inicia después de un período de diferenciación y función normales y, 2) sólo se afectan poblaciones selectivas de neuronas.

Numerosos estudios sugieren que sistemas celulares que participan normalmente en la emisión o en el procesamiento de señales dentro del sistema nervioso central (SNC) pueden alterarse y ser parcialmente responsables de ciertos tipos de patología neuronal, incluida la degeneración celular. Entre estos sistemas de comunicación interneuronal, la neurotransmisión excitadora y los aminoácidos que participan en ella parecen desempeñar un papel crucial en la iniciación y propagación de la actividad epiléptica (Meldrum, 1988), en la muerte neuronal que ocurre de manera aguda en la isquemia cerebral transitoria y en la hipoglucemia (Rothman, 1983; Simon y col, 1984; Rothman y Olney, 1986; Sanberg y col, 1986), y en algunos casos de degeneración celular crónica (para una revisión véase Choi, 1988; Meldrum y col, 1990).

El primer informe sobre los efectos neurotóxicos de aminoácidos con función excitadora en el SNC fue presentado hace más de tres décadas por Lucas y Newhouse (1957), al observar que la administración sistémica de L-glutamato (glu) causaba degeneración de las capas internas de la retina del ratón. Diez años más tarde, estos hallazgos fundamentaron el desarrollo del concepto de excitotoxicidad cuando Olney y col (1971) vinculó la acción neurotóxica del glu con sus efectos excitadores.

La relevancia de ese concepto ha aumentado desde que se demostró que un número muy grande de sinapsis en el SNC utilizan

aminoácidos excitadores (AAE) (Cotman y col, 1988) y que existe correlación entre la excitación neuronal excesiva y la neurodegeneración (Coyle y col, 1981; Rothman, 1985; Frandsen y Schousboe, 1987; Siman y Card, 1988). De hecho, la acción excitadora es obligada para que la toxicidad ocurra, ya que compuestos análogos de AAE que no son excitadores, tampoco son neurotóxicos (Nadler y col, 1981; Lancaster y Wheal, 1982).

I. AMINOÁCIDOS EXCITADORES Y SUS RECEPTORES

Los principales compuestos candidatos de la transmisión sináptica excitadora en el SNC de vertebrados son los aminoácidos dicarboxílicos L-glutamato y L-aspartato (Krnjevic, 1974; Curtis y Johnston, 1974). Además de éstos, se ha demostrado recientemente la participación de sus análogos sulfínicos y sulfónicos en modelos neuronales *in vitro*, como las rebanadas de hipocampo y el cultivo de células de cerebelo y corteza cerebral (Do y col, 1986). Junto con estos aminoácidos, otro compuesto, el ácido quinolínico (quin), es capaz de interaccionar de manera selectiva con receptores específicos de AAE. El quin es un metabolito endógeno que deriva de la vía que produce nicotinamida a partir de triptofano y que se conoce como vía de la kinurenina. Tanto el quin como algunos de los metabolitos involucrados en esta ruta tienen efectos moduladores de la neurotransmisión excitadora en el SNC. (Lapin 1981; Stone y Connick, 1985). La tabla I muestra los aminoácidos con actividad excitadora y su concentración en el cerebro de mamíferos. Existen también di péptidos como el N-acetil-aspartil-glutamato y su metabolito el N-acetil-aspartato que parecen ser ligandos endógenos de alta afinidad para el receptor al

Tabla I

Aminoácidos excitadores en el SNC de mamíferos

	Concentración ($\mu\text{mol/g}$ tejido)	
	Cerebro de rata	Cerebro de humano
Aspartato	2.6	1.2
Glutamato	11.3	10.2
Sulfinato de cisteína	0.012	—
Cisteato	0.01-0.1	—
Homocisteato	—	—
Quinolinato	—	0.0008

Datos recopilados por Meldrum (1988).

glutamato (Zaczek y col, 1983; Ory-Lavollee y col, 1987).

Estos compuestos con actividad excitadora utilizan receptores específicos que se han caracterizado mediante diferentes estrategias experimentales, como las respuestas electrofisiológicas, los estudios de unión al receptor y los mecanismos moleculares del sistema de transducción involucrado. Una clasificación general divide a estos receptores en dos grupos. Uno de ellos es el grupo de receptores acoplados a proteínas G, con propiedades metabotrópicas (Gundersen y col, 1984; Sladeczek y col, 1985; Sugiyama y col, 1987) y un segundo grupo de receptores operan por apertura de canales catiónicos (Mayer y Westbrook, 1987; Watkins y Olverman, 1987). Para este último tipo se han descrito tres subtipos principales: el N-metil-D-aspartato (NMDA), el kainato (AK) y el quisqualato (AQ).

El receptor para NMDA es el mejor estudiado hasta el momento ya que es el único para el que se dispone de antagonistas competitivos selectivos. La activación de este receptor se asocia con un incremento en la permeabilidad para Ca^{2+} y Na^+ , y es inhibida por Mg^{2+} (Nicoll y col, 1988; Ascher y Nowak, 1987; McDermott y Dale, 1987; Mayer y Westbrook, 1987). Para este subtipo de receptor se han descrito varios ligandos endógenos como el L-aspartato, el homocisteato (Do y col, 1986) y el quinolinato (Stone y Connick, 1985). Un tipo de modulación importante para este receptor es el que ejercen la glicina (Kleckner y Dingledine, 1988) y las poliaminas, como la espermina, que favorecen la unión de ligandos al sitio del NMDA (Ramson y Deschenes, 1990).

Los ácidos kaínico y quisqualico son de origen natural y fueron aislados de alga marina *Digenea simplex* y de la raíz de la planta *Quisqualis fructus* respectivamente (Takemoto, 1978). Los antagonistas para sus sitios de unión, disponibles actualmente, son los derivados 6, 7-dinitro-quinoxalina-2, 3-diona y 6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2, 3-diona (DNQX y CNQX) que, a concentraciones micromolares, inhiben las respuestas al AK y al AQ sin afectar las inducidas por NMDA (Honoré y col, 1988; Blake y col, 1988).

Los sitios de activación de kainato inducen respuestas mediadas por un ionóforo de Na^+ con un perfil de inhibición y activación por fármacos similar al del AQ (Ascher y Nowak, 1988).

Para el AQ existen dos tipos de receptores, uno relacionado con la activación de canales de Na^+ y un segundo tipo que promueve el metabolismo del fosfatidil inositol con formación de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), de diacilglicerol y la movilización de Ca^{2+} intracelular (Sladeczek y col, 1985; Sugiyama y col, 1987). La respuesta al AQ medida por activación del ionóforo se potencia por Zn^{2+} . La figura 1 muestra esquemáticamente los 4 tipos de receptores para AAE y el mecanismo de transducción propuesto.

A la luz de los datos disponibles recientemente deben hacerse dos cambios en la nomenclatura anterior; el uso de α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA) para designar el ligando que se une a los receptores del AQ con actividad despolarizante, y el de *trans*-1 amino-ciclopentil-1, 3-dicarboxilato (ACPD) para indicar los receptores del AQ que inducen formación de fosfatidil inositol. Estos cambios se incluyen debido al amplio espectro de acciones no específicas que presenta el AQ, a diferencia de la selectividad de efectos del AMPA y el ACPD (Monaghan y col, 1989). Recientemente han sido clonados y localizados de manera selectiva y abundante en el SNC, cuatro tipos de cDNAs que codifican para

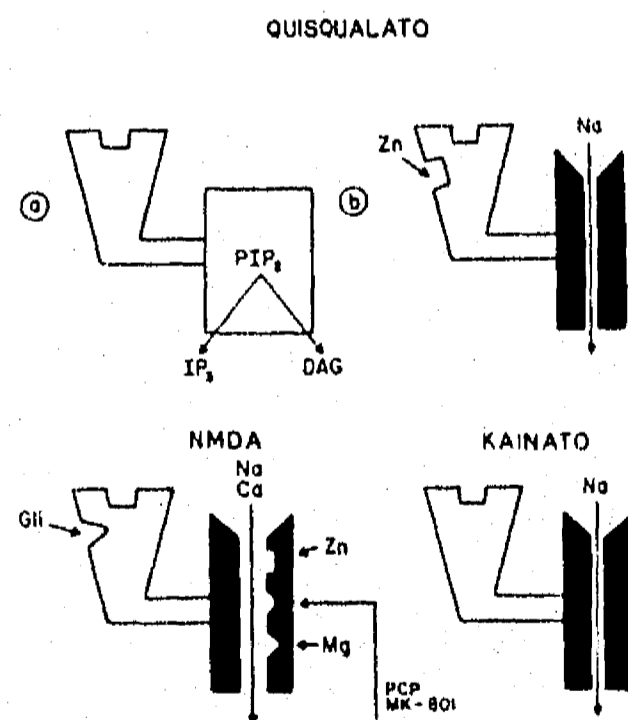


Figura 1. Uno de los criterios para la clasificación de los receptores activados por aminoácidos excitadores es el sistema de transducción utilizado. En esta figura se muestran los tres tipos de receptores del glutamato: N-metil D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y quisqualato (AQ). Se han descrito dos subtipos para el receptor del quisqualato, uno que promueve la formación de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) (a); y otro que opera por apertura de un canal catiónico (b). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; PIP_2 , fosfatidil inositol-4, 5-bifosfato; Gli, glicina; PCP, fenciclidina.

Tabla II
Receptores de aminoácidos excitadores

<i>Tipo de receptor</i>	<i>Agonistas</i>	<i>Antagonistas</i>	<i>Función</i>
<i>NMDA</i>			
sitio NMDA	NMDA L-GLU L-ASP IBO	D-AP5 CCP D- α -AA CGS-19755	Asociada con la plasticidad neuronal
sitio GLI	GLI D-SER	HA-966 KIN 7-CL-KIN Ciclo-LEU	
Canal		PCP TCP MK-801 Ketamina	
<i>KA</i>			
	KA Domoato QA L-GLU	CNQX DNQX	Ha sido difícil distinguir sus efectos de los del AMPA
<i>AMPA</i>			
	AMPA QA L-GLU	CNQX DNQX	Generación del componente rápido del EPSP
<i>LAP4</i>			
	L-AP4 L-SOP L-GLU	?	
<i>ACPD</i>			
	trans-ACPD L-GLU QA IBO	?	

Resumen de los ligandos representativos para cada uno de los AAE recopilados por Monaghan y col (1989). Abreviaturas: D- α -AA, D- α -amino-adipato; ACPD, 1-amino-ciclopentil-1, 3-dicarboxilato; AMPA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato; AP4, 2-amino-4-fosfonobutirato; AP5, 2-amino-5-fosfonavalerato; ASP, aspartato; CNQX, 6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2, 3-diona; CPP, 3-(2-carboxipiperazina-4-il) propil-1-fosfato; ciclo-Leu, ciclo-leucina; DNQX, 6,7-dinitro-quinoxalina-2, 3-diona; GLU, glutamato; GLI, glicina; IBO, ibotenato; KA, kainato; KIN, kinurenato; MK-801, dibenzociclohepteneimina; NMDA, N-metil-D-aspartato; PCP, feniciclidina, QA, quisqualato; SER, serina; SOP, serina-O-fosfato; TCP, L-(1-tienil-ciclohexil) piperidina.

receptores relacionados con el receptor al AMPA. Este tipo de abordaje molecular abre grandes posibilidades para una mejor comprensión de los receptores de AAE en condiciones normales y patológicas (Keinanen y col, 1990). La tabla II resume la clasificación actualizada de los tipos de receptores de AAE, los ligandos empleados para su caracterización, y la función propuesta en el SNC.

II. MECANISMOS DE EXCITOTOXICIDAD

Aunque el glu tiene gran afinidad para los tres tipos de receptores de AAE, no ha sido fácil demostrar su neurotoxicidad *in vivo*. Aun evitando la barrera hematoencefálica con inyecciones directas de glu en alguna de las áreas del cerebro, se requieren altas concentraciones para observar daño neuronal.

Mangano y Schwarcz (1983) encontraron que la infusión de $0.5\mu\text{l/h}$ de glu durante dos semanas directamente en el hipocampo de la rata no alteraba la función ni la morfología de la zona. Sin embargo, el glu es una neurotoxina potente y tal vez el umbral alto para demostrar su neurotoxicidad *in vivo* se deba a los eficientes mecanismos de remoción o recaptura que existen para este aminoácido (Schousboe, 1981). *In vitro*, sin embargo, ha sido más sencillo observar su potencia tóxica. En cultivos celulares, la exposición por 90 min a una solución de glu $100\mu\text{M}$ induce un daño neuronal generalizado que consiste en edema pericarial y dendrítico, desintegración nucleoplásmica y citoplásmica y colapso de la membrana nuclear y plasmática (Siman y Card, 1988).

El daño cerebral excitotóxico característico es de naturaleza postsináptica. En su forma aguda, este daño se manifiesta por edema focal de dendritas y cambios citopatológicos agudos como edema mitocondrial y del retículo endoplásmico. En el tipo crónico existe pérdida de neuronas intrínsecas con preservación de elementos presinápticos y de axones de paso. Si bien el daño excitotóxico se puede producir por activación de los tres principales receptores de AAE (NMDA, AK y AQ), existe evidencia de que la toxicidad regional selectiva puede depender, entre otros factores, de la distribución particular de estos receptores y de las propiedades bioquímicas de las células blanco. Así, estudios *in vivo* e *in vitro* sobre la toxicidad en el hipocampo señalan a las neuronas de la región CA1 como las más susceptibles al daño por AK en correlación con alta densidad de receptores (Nadler y col, 1978). Utilizando técnicas histoquímicas de distribución de la enzima NADPH diaforasa, en el cuerpo estriado se ha sugerido que los sitios NMDA y AK se asocian con poblaciones celulares diferentes (Beal y col, 1986; Kho y Choi, 1988), lo cual parece conferir vulnerabilidad diferencial a las neuronas que contienen somatostatina o NADPH diaforasa. Estas neuronas son muy resistentes al daño inducido por NMDA y no al producido por AK o AQ (Davies y Roberts, 1987). Finalmente, la susceptibilidad de las neuronas a la toxicidad inducida por AAE puede variar con la edad y depender de características particulares del desarrollo neuronal (McDonald y Johnston, 1990).

Experimentos *in vitro* sugieren que la toxicidad del glutamato tiene dos componentes que corresponden, desde el punto de vista

temporal, al daño edematoso agudo y a la degeneración crónica tardía (Olney y col, 1986; Maney y col, 1989) y desde el punto de vista espacial, a la activación de receptores de NMDA o no-NMDA. El daño edematoso agudo se relaciona con la movilización de Na^+ y Cl^- extracelular y puede ser mimetizado por otros agentes despolarizantes (Rothman, 1985; Choi y col, 1987). La apertura de canales de Na^+ y la entrada subsecuente de Ca^{2+} y agua parecen ser los sucesos responsables del hinchamiento celular en la primera fase de excitotoxicidad. El segundo componente que lleva a la degeneración celular, depende del Ca^{2+} extracelular y de los efectos tóxicos que produce la entrada masiva de este catión. La elevación sostenida del Ca^{2+} citosólico es capaz de inducir desajustes en varios procesos celulares, incluidos los de generación de energía (Siesjo, 1988). Esto cobra particular importancia al demostrarse que un nivel energético celular bajo, potencia la capacidad neurotóxica del NMDA (Novelli y col, 1988).

La elevación del Ca^{2+} citosólico activa un gran número de enzimas proteolíticas, como es el caso de la calpaína I, que se asocia con los receptores de glutamato en hipocampo de rata (Siman y Noszek, 1988). La calpaína I degrada varias proteínas estructurales, incluidas la tubulina, la espectrina, las proteínas del sistema de microtúbulos, etc, por lo que su participación en la degradación celular es evidente. Otras funciones celulares que sufren desajustes importantes son: el metabolismo de los fosfolípidos, que puede llevar a la generación de ácido araquidónico y a la producción de radicales libres citotóxicos; la producción de radicales superóxido por la activación de xantina oxidasa dependiente de la concentración de Ca^{2+} (Dykens y col, 1987); la activación de proteína cinasa C con movilización de Ca^{2+} ; y, finalmente, la activación transináptica de numerosas vías nerviosas al ser estimulada la liberación dependiente de Ca^{2+} de diferentes neurotransmisores (algunos de ellos excitadores), cerrándose así un círculo de retroalimentación positiva. La figura 2 resume los sucesos activados por Ca^{2+} que se correlacionan causalmente con la muerte celular.

La participación del Ca^{2+} en el ciclo de toxicidad, que inicia con la activación sostenida de receptores para AAE y que culmina en degeneración neuronal, se apoya en múltiples evidencias. El receptor de NMDA

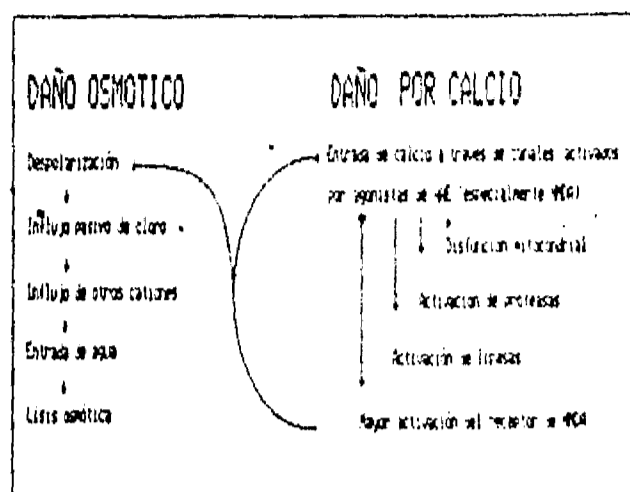


Figura 2. Resumen de los sucesos postsinápticos propuestos en relación con la neurotoxicidad inducida por aminoácidos excitadores. Esquema tomado de Rothman y Olney (1987).

se asocia directamente con un ionóforo de Ca^{2+} , y puede ser la principal ruta de entrada excesiva de este catión (Murphy y col, 1987). Experimentos realizados en cultivo de neuronas han demostrado que la exclusión de Ca^{2+} del medio extracelular atenúa la muerte celular inducida por glu (Choi, 1987), por homocisteato (Kim y col, 1987), por Quin (Kim y Choi, 1987) o por AK (Rothman y col, 1987).

Sin embargo, no todo el trabajo experimental apoya la participación del Ca^{2+} en la neurotoxicidad inducida por AAE. Algunos trabajos niegan la participación de este catión, y atribuyen la muerte celular a la lisis osmótica que resulta de un influjo pasivo de iones de Cl^- (Rothman, 1985; McCaslin y Smith, 1988).

Contrariamente a los efectos agudos inducidos por la activación sostenida de receptores de NMDA, la exposición al AMPA o al AK es bien tolerada hasta por 30 min a concentraciones de 1 mM (Choi y col, 1988). Sin embargo, con exposiciones más prolongadas estos compuestos son potentes neurotóxicos, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel sustancial en las degeneraciones neuronales crónicas y que los mecanismos de degeneración inducidos por activación de receptores de NMDA o no-NMDA pueden ser fundamentalmente distintos.

III. AAE Y NEUROTOXICIDAD EN ENFERMEDADES DEGENERATIVAS CRÓNICAS

La neurotoxicidad producida por AAE puede estar involucrada en la patogénesis de dos tipos de enfermedades del SNC: 1) el daño agudo que se observa en estados con-

vulsivos prolongados, riego sanguíneo comprometido, hipoglucemia y trauma mecánico, y, 2) el asociado a diferentes condiciones neurológicas que se manifiestan como enfermedades degenerativas crónicas. Aunque la hipótesis que vincula los efectos excitotóxicos de algunos aminoácidos con la muerte neuronal es atractiva, por el momento son pocas las evidencias directas que la apoyan, debido a la dificultad de establecer relaciones causales.

Dos condiciones neuropatológicas raras se asocian con deficiencias enzimáticas que alteran los niveles de AAE: la deficiencia de sulfito oxidasa y la deficiencia de glutamato deshidrogenasa. La primera se manifiesta como una enfermedad mortal de la infancia caracterizada por una degeneración amplia y generalizada de neuronas del SNC y se asocia con niveles elevados del ácido L-cisteinsulfínico, que es un agonista del glu sobre receptores de AAE (Olney y col, 1975). La segunda es exclusiva de la etapa adulta y se expresa como un deterioro neurológico progresivo que involucra al cerebelo y al sistema motor, y se acompaña de un nivel elevado de glu plasmático (Plaitakis y Berl, 1982).

A. Disfunción glutamatérgica y degeneración selectiva de motoneuronas

La asociación entre procesos neurodegenerativos y alteraciones en el metabolismo del glu fue descrita por primera vez en tres pacientes con diagnóstico de atrofia olivopontocerebelosa (AOPC) (Plaitakis y Berl, 1982). Esta enfermedad se manifiesta en la vida adulta y se caracteriza por síntomas de ataxia cerebelosa, espasticidad y parkinsonismo. El primer dato metabólico alterado que se encontró fue una disminución del 50% de la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) en leucocitos y en cultivos de fibroblastos obtenidos de los pacientes afectados. La GDH cataliza la reacción de interconversión de glutamato y α -ceto-glutarato por un proceso dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP). Concomitante con este defecto enzimático se encontró un incremento del 100% del glu y una disminución del α -ceto-glutarato plasmáticos. Desde entonces, se han descrito reducciones significativas de GDH en varias enfermedades neurológicas que comparten la atrofia múltiple de sistemas neuronales motores (Plaitakis y Berl, 1984; Konagaya y col, 1986; Hussain y col, 1989).

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la degeneración selectiva de áreas del SNC que reciben aferencias glutamatérgicas se debe a la exposición constante a concentraciones elevadas de glu. Como la degeneración motora es la que predomina en los pacientes con actividad reducida de GDH, y como el glu sirve de neurotransmisor excitador de vías corticoespinales, la posibilidad de una alteración metabólica semejante se ha propuesto para explicar otro tipo de degeneración motora conocida como esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Son ya varios los estudios en pacientes con ELA que dan evidencias en este sentido al encontrar índices del metabolismo del glu alterados: niveles de glu anormalmente elevados en plasma y líquido cefalorraquídeo; disminución en el contenido cerebral de glu y reducción en el contenido de glu, aspartato, N-acetilaspártato y N-acetil aspartilglutamato en la médula espinal (Plaitakis, 1990; Rothstein y col, 1990). Sin embargo, estos datos no han podido ser reproducidos por otros grupos (Perry y Hansen, 1990).

Aunque la hipótesis de que una alteración en el metabolismo del glu pueda estar asociada con el origen de la ELA es especulativa, la idea es atractiva, principalmente por sus repercusiones terapéuticas.

B. Excitotoxicidad, ELA-PD y latirismo

Desde el siglo XVIII, la dieta de los indígenas chamorro de las Islas Marianas de Guam y Rota, incluye las semillas del fruto de la falsa palma *Cycas circinalis*. Los chamorros llaman a esta palma "Federico", y documentos de mediados del siglo XIX mencionan cómo los habitantes la utilizaban para la elaboración de tortillas, y el procedimiento de "destoxificación" que seguían. En esos escritos se explica cómo la "nuez" de la cicadacea se sumergía durante varios días en agua que era renovada constantemente, y cómo el agua de los primeros lavados resultaba extremadamente tóxica para los animales.

La prevalencia poco usual de un tipo de parálisis hereditaria entre los chamorros fue informada por primera vez en la literatura médica en 1900. Sin embargo, no fue sino hasta la Segunda Guerra Mundial, cuando médicos militares reconocieron esta forma de parálisis como esclerosis lateral amiotrófica, y en 1961 se caracterizó en esta población un segundo síndrome neurológico endémico, llamado complejo parkinsoniano-demencial (PD).

El análisis químico de *C circinalis* revela la presencia de varios glucósidos, incluyendo cicasina, y dos tipos de aminoácidos no protéicos, entre ellos el α -amino- β -metilaminopropiónico (β -N-metilamino-alanina o L-BMAA). Este aminoácido posee propiedades neurotóxicas, como ha sido demostrado en macacos sometidos a administraciones orales repetidas. La toxicidad se manifiesta por signos de disfunción de motoneuronas, alteraciones extrapiramidales y conductuales, y cambios neuropatológicos en células de Betz en corteza motora y en neuronas del asta anterior de la médula espinal (Spencer y col, 1987). Sin embargo, estudios sobre el contenido de BMAA en *C circinalis*, y de los tiempos de latencia entre la ingesta del producto tóxico y la aparición de las manifestaciones patológicas han llevado a concluir que no existe suficiente evidencia para relacionar la ingesta de BMAA con ELA-PD en Guam (Duncan y col, 1990).

El latirismo es un padecimiento neurológico, caracterizado por paraplejia espástica atribuida a la ingesta de la excitotoxina exógena β -N-oxalilamino-L-alanina (BOAA) encontrada en la leguminosa *Lathyrus sativus*, en algunas partes del mundo (Spencer y col, 1986). La neurotoxicidad producida por la L-BOAA se manifiesta de manera aguda o subaguda, y puede establecerse con bastante precisión la relación causa-efecto entre la ingesta del producto tóxico y la aparición de signos neurológicos aberrantes.

La actividad tóxica del L-BOAA, evaluada en explantes de corteza motora de ratón, parece ser mediada por receptores de AMPA, AK, o de ambos, mientras que la de L-BMAA es atenuada sustancialmente por AP7 o MK801, que son antagonistas selectivos del receptor de NMDA (Pearson y Nunn, 1981; Bridges y col, 1989). La figura 3 muestra

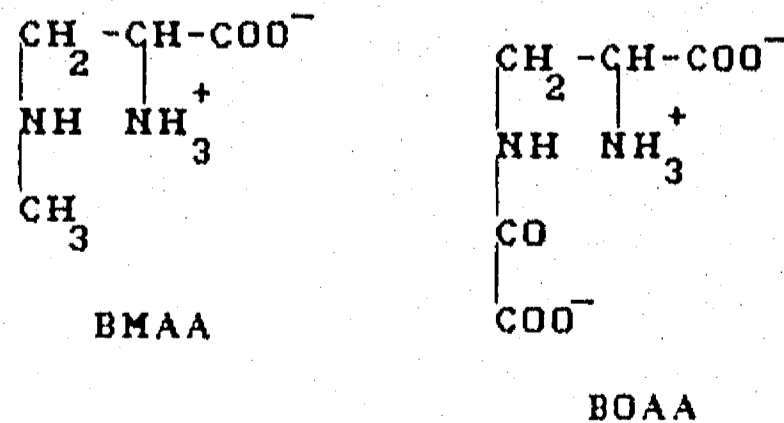


Figura 3. Relaciones estructurales entre los aminoácidos no protéicos con propiedades excitotóxicas: el L-BMAA (β -N-metilamino alanina) y el L-BOAA (β -N-oxalilamino-L-alanina).

la analogía estructural entre L-BMMA y L-BOAA.

Los ejemplos anteriores de enfermedades neurodegenerativas debidas a posibles precursores o agonistas de AAE contenidos en la dieta, son importantes para apoyar la hipótesis neurotóxica. Sin embargo, la pregunta de por qué el daño ocasionado por sobreexcitación es selectivo, continúa vigente. Plaitakis (1990) argumenta que la vulnerabilidad selectiva reside en las propiedades particulares de la inervación de neuronas motoras o en los factores asociados que pueden potenciar esta inervación, o en ambos. Él sugiere que uno de estos agentes potenciadores puede ser la glicina, que además de tener un papel en la neurotransmisión inhibitoria, es un modulador positivo de las respuestas mediadas por NMDA. De este modo, numerosas regiones del SNC pueden ser capaces de compensar los efectos debidos a altas concentraciones de glu, excepto en la médula espinal y en el tallo cerebral, donde la glicina promueve las acciones del NMDA.

C. Probable mecanismo excitotóxico en la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento autosómico dominante caracterizado por movimientos coreicos y demencia, con deterioro progresivo y muerte entre los 15 y los 20 años después de la aparición de los síntomas. Estudios genéticos han identificado el locus alterado en el brazo corto del cromosoma 4 (Gusella y col, 1983). Las manifestaciones patológicas que se describen en estudios *postmortem* en humanos se limitan al SNC y se caracterizan fundamentalmente por atrofia neostriatal. La atrofia celular sigue un curso progresivo y se han definido

cinco estadios de severidad, del 0 al 4 (Von-Sattel y col, 1985). Las neuronas espinosas medianas, el tipo celular predominante en el neostriado, son particularmente vulnerables en la EH. De éstas, las más sensibles son las neuronas que contienen GABA/encefalinas que proyectan al globus pallidus lateral, y las que contienen GABA/sustancia P que envían eferencias a la sustancia nigra (Reiner y col, 1988). Las interneuronas de mediano y de gran tamaño sin espinas se encuentran relativamente preservadas, por lo menos en los estadios tempranos del padecimiento (Ferrante y col, 1985). Este último tipo de neuronas se caracteriza por su contenido de NADPH-diaforasa, somatostatina y neuropéptido Y (Kowall y col, 1987a).

Los primeros trabajos en modelos animales de EH utilizaron inyecciones intraestriatales de AK (Coyle y Schwarcz, 1976) y, aunque el patrón de degeneración observado con esta neurotoxina no mimetiza por completo los aspectos histopatológicos y neuroquímicos de la EH, este modelo dio la pauta para establecer la hipótesis de excitotoxicidad en la patología señalada. En apoyo a esta hipótesis, Beal y col (1986) mostraron que la administración de ácido quinolínico (quin), otro agonista de receptores de AAE, que actúa en el receptor de NMDA, reproducía, en un modelo animal, tanto el patrón neuroquímico como los cambios histopatológicos de la EH. La administración de quin en estriado de ratas reduce los niveles de neurotransmisores localizados en neuronas espinosas medianas (GABA, sustancia P) y afecta en menor grado el contenido de somatostatina de las neuronas sin espinas. El examen histoquímico muestra preservación relativa de las neuronas que contienen NADPH-diaforasa. Estos hallazgos, sin embargo, no han podido ser reproducidos

Tabla III

Perfil neuroquímico en la EH y en las lesiones estriatales inducidas por kainato/ibotenato y quinolinato

Sustancia Neuroactiva	EH	AK/IBO	QUIN
GABA/GAD	↓	↓	↓
ChAT	↓	?	?
Dopamina	sc	sc	sc
Vasopresina	sc	sc	sc
Somatostatina	↑	↓	sc
Neuropeptido Y	↑	↓	sc

↓ = disminución, ↑ = incremento, sc = sin cambio. Tomado de Kowall y col (1987b).

por otros autores (Davies y Roberts, 1988). La tabla III resume las alteraciones inducidas en el patrón neuroquímico por la inyección intraestriatal de excitotoxinas.

En estudios bioquímicos *postmortem* de tejido estriatal humano, se encuentran alteraciones metabólicas de la síntesis del quin y del ácido kinurénico. Éstas consisten en un aumento de la actividad catalítica de la enzima 3-hidroxiantranílico oxidasa que sintetiza quin (Shwarcz y col, 1988) y una disminución de la síntesis del ácido kinurénico, el cual es un inhibidor de receptores de AAE (Beal y col, 1986). Por otro lado, en putamen de pacientes con EH, los receptores de NMDA se han encontrado significativamente reducidos (DiFiglia, 1990):

A pesar de las pruebas presentadas a favor de la participación de un mecanismo excitador excesivo como factor involucrado en el origen de la EH, el retardo en la aparición de la sintomatología, la lenta evolución del proceso y la localización preferencial de la pérdida neuronal (zonas del caudado cerca de los ventrículos laterales) (VonSattel y col, 1985), son características que no pueden ser explicadas fácilmente ni reproducidas con el uso de excitotoxinas en modelos animales.

La búsqueda de mecanismos inductores de muerte celular selectiva en la EH continúa, y recientemente se ha informado de alteraciones en el complejo I de la cadena respiratoria (oxidoreductasa NADH: ubiquinona), que plantean la posibilidad de que una disminución progresiva de la actividad de la cadena respiratoria pueda explicar la expresión tardía de la EH. Las perturbaciones en la actividad del complejo I pueden provocar la acumulación de AAE, incrementar la producción de radicales libres altamente reactivos y disminuir la síntesis de ATP (Parker y col, 1990).

D. Disfunción glutamatérgica en la enfermedad de Alzheimer

Aunque en la demencia de tipo Alzheimer se ha reconocido la vulnerabilidad preferente de las neuronas colinérgicas de los núcleos basales del cerebro anterior, algunos aspectos de este padecimiento no han podido ser explicados por la hipótesis de degeneración colinérgica, como la falta de correlación entre las eferencias colinérgicas a la corteza cerebral y las áreas corticales con placas seniles y neurofibrilares (Mesulam y col, 1986). Por

otro lado, el deterioro severo en los procesos de memoria y de aprendizaje que se observa en los pacientes con Alzheimer, ha llevado a buscar alteraciones de los sistemas de neurotransmisión cuya participación se ha implicado en las funciones cognitivas. En este sentido, son interesantes los hallazgos de una disminución del número de receptores de NMDA en neocorteza (Greenamyre y col, 1985). La disminución más importante se observa en las láminas corticales externas y en las regiones hipocámpicas CA1 y CA2. En corteza cerebral, el total de la unión de glu se encuentra disminuido entre el 35 y el 40%, y la densidad de receptores de NMDA se reduce aproximadamente un 60%. Esta reducción parece confinarse al sistema de transmisión glutamatérgica, y no parece estar relacionada con un efecto generalizado debido a la atrofia cortical, ya que ni el receptor colinérgico muscarínico ni el GABA/benzodiazepínico se alteran (Greenamyre y col, 1987). Los síntomas de desconexión cortical, que representan un aspecto prominente de la demencia de Alzheimer, pueden explicarse por una desafrentación glutamatérgica. Las placas seniles y neurofibrilares se concentran en las zonas de terminales glutamatérgicas, así como en las zonas donde se encuentran los cuerpos celulares que las originan (Pearson y col, 1985). Estudios en corteza y en hipocampo, utilizando tinciones de Golgi, sugieren la existencia de un edema terminal dendrítico de neuronas piramidales, que se inicia en las espinas dendríticas (Scheibel y col, 1975). Estos hallazgos, junto con otra línea de evidencias que muestran inmunorreactividad para glu en las neuronas piramidales que contienen las placas neurofibrilares (Maragos y col, 1987), han llevado al planteamiento de un escenario de secuencia de sucesos que pueden ocurrir en la demencia de Alzheimer y donde la transmisión excitadora puede desempeñar un papel importante.

A pesar de la aparente participación del sistema glutamatérgico, tanto en la patogénesis como en las manifestaciones clínicas que se presentan en la demencia de Alzheimer, deben diseñarse nuevas estrategias experimentales con el fin de corroborar la hipótesis de neurotoxicidad.

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Las evidencias que señalan al glu como un protagonista importante en el origen

de las enfermedades neurodegenerativas, permiten diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el manejo racional de este grupo de padecimientos hasta ahora intratables. En años recientes, han aparecido numerosos reportes en los que se señalan los efectos protectores de antagonistas de receptores de NMDA o no-NMDA en algunos paradigmas experimentales en los que se ha implicado el mecanismo de la excitotoxicidad. Existen sin embargo, varios aspectos que tienen que ser esclarecidos antes de que la herramienta terapéutica propuesta teóricamente, pueda materializarse. En primer lugar, no se ha determinado aún si el bloqueo de la transmisión glutamatérgica, en términos de la eficacia para proteger contra la neurodegeneración, es compatible con un funcionamiento normal del SNC. Por otro lado, algunos de los antagonistas del receptor de NMDA, que ya han sido utilizados en la práctica clínica para tratamientos agudos en otras patologías, producen, como efecto colateral, síntomas relacionados con la esquizofrenia (Honey y col, 1985; Huettnner y Bean, 1988). Sin embargo, como la mayoría de las sinapsis excitadoras rápidas del SNC parecen actuar por medio de receptores de tipo no-NMDA (Mayer y Westbrook, 1987), debe esperarse que funciones vitales de control respiratorio y cardiovascular no se alteren por el bloqueo de receptores de NMDA. Los antagonistas con que actualmente se cuenta son del tipo de la feniclidina, y presentan gran lipofilia (lo que asegura un buen transporte a través de la barrera hematoencefálica), y gran efectividad para proteger los efectos tóxicos de los agonistas. Ejemplo de estos compuestos son la ketamina, el dextrorfan y el MK-801. Algunos otros antagonistas que se están estudiando actualmente incluyen a los del sitio de la glicina como el kinurenato, el HA-966 (Fletcher y Lodge, 1988) y la cicloleucina (Snell y Johnson, 1988).

El uso crónico de estos compuestos para el tratamiento de padecimientos como la ELA o la EH no ha sido valorado y es de esperarse que pueda inducir efectos colaterales indeseables. En particular, el bloqueo de las sinapsis que utilizan NMDA puede interferir con los fenómenos de plasticidad neuronal y de esta manera agravar las alteraciones de memoria y de aprendizaje (Collingridge y Bliss, 1987).

El potencial terapéutico del antagonismo de la neurotoxicidad inducida mediante receptores no-NMDA debe ser un área vital de exploración con el fin de contar con anta-

gonistas específicos. La reciente clonación de genes relacionados con los sitios para AMPA (Keinanen y col, 1990), puede ser el peldaño inicial para la obtención de tales antagonistas.

Además del uso de antagonistas de receptores de la transmisión excitadora, pueden emplearse otras estrategias para la modulación de las sinapsis que utilizan AAE. Es posible, por ejemplo, manipular presinápticamente las neuronas glutamatérgicas con el fin de reducir la tasa de síntesis o de liberación del glu. Los antagonistas de adenosina, la cual reduce la liberación de neurotransmisores en una gran variedad de sinapsis (Corradetti y col, 1984), son eficaces para disminuir *in vivo* el daño neuronal por hipoxia (Evans y col, 1988). La disminución en la biodisponibilidad de la glutamina, que a su vez reduce la síntesis de glu, es una maniobra que también ha probado ser útil para reducir el daño neuronal por hipoxia (Goldberg y col, 1988). El uso clínico de aminoácidos de cadena ramificada como L-leucina, L-isoleucina y L-valina también puede ser considerado por su capacidad de activar la GDH de cerebro de humano a concentraciones fisiológicas (Plaitakis y Shashidharan, 1988). Por último, puede postularse otro tipo de efectos neuroprotectores con el uso de inhibidores de sucesos postsinápticos determinados específicamente por AEE: los esteroides 21-amino, que inhiben radicales libres inductores de lipoperoxidación (Braugher y col, 1987) y los gangliósidos que inhiben la translocación de proteína cinasa C (Vaccarino y col, 1987).

Combinaciones farmacológicas sinergistas podrían ofrecer posibilidades terapéuticas adicionales que permitan mayor esperanza de vida y condiciones de existencia más digna para los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

Los AAE pueden actuar como excitotoxinas capaces de causar neuropatología selectiva cuando se excede la concentración normal en el espacio sináptico. El incremento de estos compuestos en el SNC puede ser la consecuencia de alteraciones en su metabolismo o de disponibilidad periférica, de alteraciones en los sistemas de transporte localizados en la barrera hematoencefálica o de desajustes en los mecanismos sinápticos de liberación o recaptura. Las biología molecular y celular de la transmisión excitadora siguen intrigando a los investigadores de esta

área y siguen estimulando el desarrollo de estrategias experimentales que puedan llevar a correlacionar los procesos normales que involucran AAE, tales como la maduración (Aruffo y col, 1987), el crecimiento neuronal (Mattson y col, 1988) y la plasticidad (Collingridge y Bliss, 1987), con los mecanismos responsables de la excitotoxicidad. ¿Es la excitotoxicidad la expresión exagerada de un mecanismo natural de señalamiento nervioso que involucra un elaborado sistema de segundos mensajeros? ¿Puede representar el desajuste de un mecanismo de selección neuronal necesario durante los procesos de crecimiento y de desarrollo?

Éstas son algunas de las interrogantes que deberán ser contestadas con objeto de profundizar nuestro conocimiento sobre el fenómeno de la muerte neuronal, y así aumentar las expectativas de disponer de herramientas terapéuticas que nos permitan influir en este poco conocido fenómeno, y en la medida de lo posible alterar su, hasta ahora, inexorable curso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Drs Ricardo Tapia, Alfredo Saldívar y Roger Gutiérrez sus valiosas sugerencias durante la corrección del manuscrito.

REFERENCIAS

- Aruffo, C, R Ferszt, AG Hildebrandt y J Cervos-Navarro, *Dev Neurosci* (1987) 9, 228-239.
- Ascher, P, y L Nowak, *Trends Neurosci* (1987) 10, 284-288.
- Ascher, P, y L Nowak, *J Physiol* (1988) 399, 227-245.
- Beal, MF, NW Kowall, DW Ellison, MF Mazurek, KJ Swartz y JB Martin, *Nature* (1986) 321, 168-171.
- Blake, JF, MW Brown y GL Collingridge, *Neurosci Lett* (1988) 89, 182-186.
- Braugher, JM, JF Prefenzer, RL Chace, LA Duncan, EJ Jacobsen y JM McCall, *J Biol Chem* (1987) 262, 10438-10440.
- Bridges, RJ, DR Stevens, JS Kahle, PB Nunn, M Kadri y CW Cotman, *J Neurosci* (1989) 9, 2073-2079.
- Collingridge, GL, y TV Bliss, *Trends Neurosci* (1987) 10, 288-293.
- Cotman, CW, DT Monaghan y AH Ganong, *Annu Rev Neurosci* (1988) 11, 61-80.
- Corradetti, R, G LoConte, F Moroni, MB Passani y G Pepeu, *Eur J Pharmacol* (1984) 104, 19-26.
- Coyle, JT, y R Schwarcz, *Nature* (1976) 263, 244-246.
- Coyle, JT, SJ Bird, RHEvans, RL Gulley, JV Nadler, WJ Nicklas y JW Olney, *Neurosci Res Prog Bull* (1981) 19, 331-427.
- Curtis, DR, y GAR Johnston, *Ergeb Physiologie* (1974) 69, 98-188.
- Choi, DW, *J Neurosci* (1987) 7, 369-379.
- Choi, DW, MA Maulucci-Gedde y AR Kriegstein, *J Neurosci* (1987) 7, 357-368.
- Choi, DW, *Neuron* (1988) 1, 623-634.
- Choi, DW, J Koh y S Peters, *J Neurosci* (1988) 8, 185-196.
- Davies, SW, y PJ Roberts, *Nature* (1987) 327, 326-329.
- Davies, SW, y PJ Roberts, *Science* (1988) 241, 474-475.
- DiFiglia, M, *Trends Neurosci* (1990) 7, 286-289.
- Do, KQ, PL Herrlign, P Streit, WA Turski y M Cuenod, *J Neurosci* (1986) 6, 2226-2234.
- Duncan, MW, CS Steele, IJ Kopin y PM Sanford, *Neurology* (1990) 40, 767-772.
- Dykens, JA, A Stern y E trenkner, *J Neurochem* (1987) 49, 1222-1228.
- Evans, MC, JH Swan y BS Meldrum, *Neurosci Lett* (1988) 83, 287-292.
- Ferrante, RJ, NW Kowall, MF Beal, EP Richardson y JB Martin, *Science* (1985) 230, 561-563.
- Fletcher, EJ, y D Lodge, *Eur J Pharmacol* (1988) 151, 161-162.
- Frandsen, AA, y A Schousboe, *Neurochem Int* (1987) 10, 583-591.
- Goldberg, MP, H Monyer y DW Choi, *Neurosci Lett* (1988) 94, 52-57.
- Greenamyre, JT, JB Penney, AB Young, CJ D'Amato, SP Hicks e I Shoulson, *Science* (1985) 227, 1496-1499.
- Greenamyre, JT, JB Penney, AB Young, CJ D'Amato y AB Young, *J Neurochem* (1987) 48, 543-551.
- Gusella, JF, NS Wexler, PM Conneally, SN Naylor, MA Anderson, RE Tanzi, PC Watkins, K Ottina, MR Wallace, AY Sakaguchi, AB Ypung, I Shoulson, E Bonilla y JB Martin, *Nature* (1983) 306, 234-238.
- Gundersen, CB, R, Miledi e I Parker, *Proc R Soc London Ser B* (1984) 221, 127-143.
- Honey, CR, Z Miljkovic y JF McDonald, *Neurosci Lett* (1985) 61, 135-139.
- Honoré, T, SN Davies, J Drejer, EJ Fletcher, EJ Jacobsen, D Lodge y FE Nielsen, *Science* (1988) 241, 701-703.
- Huettner, JE, y BP Bean, *Proc Natl Acad Sci* (1988) 85, 1307-1311.
- Hussain, YP, V Zannis y A Plaitakis, *J Biol Chem* (1989) 264, 20730-20735.
- Keinanen, K, W Wisden, B Sommer, P Werner, A Herb, TA Verdoorn, B Sakmann y PH Seeburg, *Science* (1990) 249, 556-560.
- Kho, J, y DW Choi, *Brain Res* (1988) 446, 374-378.
- Kim, JP, y DW Choi, *Neuroscience* (1987) 23, 423-432.
- Kim, JP, J Koh y DW Choi, *Brain Res* (1987) 437, 103-110.
- Kleckner, NW, y R Dingledine, *Science* (1988) 241, 835-837.
- Konagaya, Y, M Konagaya y T Takayanagi, *J Neurol Sci* (1986) 74, 231-236.
- Kowall, NW, RJ Ferrante y JB Martin, *Trends in Neurosci* (1987a) 10, 24-29.
- Kowall, NW, RJ Ferrante, MF Beal, EP Jr Richardson, M Sofroniew, AC Cuello y JB Martin, *Neuroscience* (1987b) 20, 817-828.
- Krnjevic, K, *Physiol Rev* (1974) 54, 418-540.
- Lancaster, B, y HV Wheal, *J Comp Neurol* (1982) 211, 105-114.
- Lapin, IP, *Epilepsia* (1981) 22, 257-265.
- Lucas, DR, y JP Newhouse, *Arch Ophthalmol* (1957) 58, 193-201.
- McDermott, AB, y N Dale, *Trends Neurosci* (1987) 10, 280-284.
- McDonald, JW, y MV Johnston, *Brain Res* (1990) 15, 41-70.
- McCaslin, PP, y TG Smith, *Eur J Pharmacol* (1988) 152, 341-346.
- Mangano, RM, y R Schwarcz, *Brain Res Bull* (1983) 10, 47-51.
- Maney, H, M Favaron, A Guidotti y E Costa, *Mol Pharmacol* (1989) 36, 106-112.
- Marago, WF, JT Greenamyre, JB Penney, Jr, y AB Young, *Trends Neurosci* (1987) 10, 65-68.
- Mattson, MP, A Taylor-Hunter y SB Kater, *J Neurosci* (1988) 8, 1704-1711.
- Mayer, ML, y GL Westbrook, *Prog Neurobiol* (1987) 28, 197-276.
- Meldrum, BS, "Excitatory amino acids in epilepsy and in acute and chronic neuronal degenerative disorders, *Amino Acid*

- Availability and Brain Function in Health and Disease* (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988) pp 325-332.
- Meldrum BS, y J Garthwaite, *Trends in Pharmacol Sci* (1990) 11, 379-387.
- Mesulam, M-M, L Volicer, JK Markis, EJ Mufson y RC Green, *Ann Neurol* (1986) 19, 144-151.
- Monaghan, DT, RJ Bridges, y CW Cotman, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1989) 29, 365-402.
- Murphy, SN, SA Thayer y RJ Miller, *J Neurosci* (1987) 7, 4145-4148.
- Nadler, JV, BW Perry y CW Cotman, *Nature* (1978) 271, 676-677.
- Nadler, JV, DA Evenson y GJ Cuthbertson, *Neuroscience* (1981) 6, 2505-2517.
- Nicoll, RA, JA Kauer y RC Malenka, *Neuron* (1988) 1, 97-103.
- Novelli, A, JA Reilly, PG Lysko y RC Henneberry, *Brain Res* (1983) 451, 205-212.
- Olney, JW, OL Ho y V Rhee, *Exp Brain Res* (1971) 14, 61-70.
- Olney, JW, CH Misra y T deGubareff, *J Neuropathol Exp Neurol* (1975) 34, 167-177.
- Olney, JW, MT Price, L Samson y J Labruyere, *Neurosci Lett* (1986) 65, 65-71.
- Ory-Lavollee, RD Blakely y JT Coyle, *J Neurochem* (1987) 48, 895-899.
- Parker, WD, SJ Boyson, AS Luder y JK Parks, *Neurology* (1990) 40, 1231-1234.
- Pearson, S, y PB Nunn, *Brain Res* (1981) 206, 178-182.
- Pearson, RCA, MM Esiri, RW Hiorns, GK Wilcock y TPS Powell, *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82, 4531-4534.
- Perry, TL, y S Hansen, *Neurology* (1990) 40, 20-24.
- Plaitakis, A, y SY Berl, *Science* (1982) 216, 193-196.
- Plaitakis, A, y SY Berl, *Ann Neurol* (1984) 15, 144-153.
- Plaitakis, A, y P Shashidharan, *Lancet* (1988) 2, 680-682.
- Plaitakis, A, *Ann Neurol* (1990) 28, 3-8.
- Ramson, R, y N Deschenes, *Synapse* (1990) 5, 294-298.
- Reiner, A, RL Albin, KD Anderson, CJ D'Amato, JB Penney, y AB Young, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85, 5733-5737.
- Rothstein, JD, G Tsai, RW Kuncel, L Clawson, DR Cornblath, DB Drachman, A Pestronk, BL Stauch y JT Coyle, *Ann Neurol* (1990) 28, 18-25.
- Rothman, SM, *Science* (1983) 220, 536-537.
- Rothman, SM, *J Neurosci* (1985) 5, 1483-1489.
- Rothman, SM, y JW Olney, *Ann Neurol* (1986) 6, 105-111.
- Rothman, SM, y JW Olney, *Trends in Neurosci* (1987) 10, 299-302.
- Rothman, SM, y JH Thurston y RE Hauhart, *Neuroscience* (1987) 22, 471-480.
- Sanberg, M, SP Butcher y H Hagberg, *J Neurochem* (1986) 47, 178-184.
- Schousboe, A, *Int Rev Neurobiol* (1981) 22, 1-45.
- Schawrcz, R, B Okuno, RJ White, ED Bird y WO Whetsell, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85, 4079-4081.
- Scheibel, ME, RD Lindsay, U Tomiyasu y AB Scheibel, *Exp Neurol* (1975) 47, 392-403.
- Siesjo, BK, *Ann NY Acad Sci* (1988) 522, 638-661.
- Siman, R, y JP Card, *Neuroscience* (1988) 26, 433-447.
- Siman, R, y JC Noszek, *Neuron* (1988) 1, 279-287.
- Simon, RP, JH Swan, T Griffiths y BS Meldrum, *Science* (1984) 226, 850-852.
- Sladeczek, F, JP Pin, M Recasens, J Bockaert y S Weiss, *Nature* (1985) 317, 717-719.
- Snell, LD, y KM Johnson, *Eur J Pharmacol* (1988) 151, 165-166.
- Spencer, PS, A Ludolph, MP Dwivedi, DN Roy, J Hugon y HH Schaumburg, *Lancet* (1986) 2, 1066-1067.
- Spencer, PS, PB Nunn, J Hugon, AC Ludolph, SM Ross, DN Roy y RC Robertson, *Science* (1987) 237, 517-522.
- Stone, TW, y JH Connick, *Neuroscience* (1985) 15, 597-617.
- Sugiyama, H, I Ito, y C Hirono, *Nature* (1987) 325, 531-533.
- Takemoto, T, "Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino-acids", *Kainic as a Toll in Neurobiology* (Raven Press, Nueva York, 1978) pp 1-15.
- Vaccarino, F, A Guidotti y E Costa, *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) 84, 8707-8711.
- VonSattel, JP, RH Myers, TJ Stevens, RJ Ferrante, ED Bird y EP Richardson, *J Neuropathol Exp Neurol* (1985) 44, 559-577.
- Watkins, JC, y HJ O'Overman, *Trends Neurosci* (1987) 10, 265-272.
- Zaczek, R, y cols, *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) 80, 1116-1119.

ABSTRACT

Excitatory amino acids play a crucial role in synaptic transmission. These compounds can trigger neuronal degeneration and cell death. Given that excitatory amino acid-synapses comprise the vast majority of synapses, new avenues for multidisciplinary study not only in plasticity but also in pathology have emerged recently.

CAPITULO III

La muerte neuronal en la Enfermedad de Alzheimer.

La EA como entidad clínica surgió a raíz de los estudios histopatológicos del médico alemán Alois Alzheimer realizados hacia 1906 en una mujer de 51 años, fallecida después de cuatro años de evolución de un cuadro demencial. Entre los signos y síntomas sobresaliente se encontraron pérdida de la memoria, desorientación en tiempo y espacio y deterioro cognoscitivo progresivo. En el análisis anatomopatológico, utilizando métodos de impregnación argéntica, se describieron por primera vez las marañas neurofibrilares como elementos asociados. Actualmente, todos los estados demenciales que en el análisis histopatológico cursan con marañas neurofibrilares y placas seniles, descritas por primera vez por Bloq y Marinesco en 1892, se diagnostican como EA, independientemente de la edad de inicio.

La EA es la forma más común de demencia en individuos mayores de 60 años y, ciertamente, uno de los padecimientos degenerativos del SNC mas devastadores. Con el avance de la medicina moderna la expectativa de vida de los seres humanos va en aumento, y por esta razón el problema de la EA se hace cada vez más importante ya que su principal factor de riesgo se asocia al envejecimiento. El estudio prospectivo sobre "Envejecimiento en el Bronx" (Aronson y cols., 1991), iniciado en 1980, muestra que la frecuencia anual de la demencia alcanza un 6% en individuos mayores de 85 años. En otros análisis epidemiológicos se menciona que aproximadamente el 11% de los individuos de más de 65 años tienen grados de demencia de moderada a media y el

4.4% se encuentran severamente demenciados. Cerca del 55% de los casos de demencia senil son del tipo Alzheimer y se calcula que para el año 2,000 el número de pacientes se habrá duplicado. En México no existen estudios estadísticos rigurosos en este sentido, ya que para 1990 se registraron únicamente 111 defunciones por EA. Sin embargo en otros análisis estadísticos se menciona que en el momento actual hay 350000 casos. De cualquier manera la EA, un padecimiento hasta ahora incurable es, sin duda, un mal creciente. En la tabla 1 se presenta la lista de otros padecimientos neurodegenerativos y metabólicos que pueden cursar con demencia sin pertenecer al tipo de Alzheimer.

Cuadro Clínico. De acuerdo con el Manual de Diagnóstico y Estadística (DSM-III-R) de la Asociación Americana de Psiquiatría, los criterios para el diagnóstico de demencia incluyen la evidencia demostrable de pérdida de la memoria asociada con deterioro de alguna otra función cognoscitiva o con cambios en la personalidad. Los criterios de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10) para el diagnóstico presuntivo de EA se basan en la aparición insidiosa de un cuadro demencial y deterioro intelectual lento, en ausencia de otra enfermedad cerebral o sistémica. Según el ICD-10, se requiere una evolución de los síntomas de al menos 6 meses y en grado suficiente para impedir el desempeño de las actividades habituales.

La demencia en la EA se manifiesta principalmente por una profunda pérdida de la memoria, disminución en la capacidad para realizar tareas rutinarias, alteraciones del juicio, desorientación, cambios en la personalidad, dificultad para aprender y pérdida de patrones lingüísticos. Estos signos y síntomas se han dividido en tres etapas. La primera

TABLA 1. Otros tipos de demencia en enfermedades metabólicas, degenerativas y cerebrovasculares.

ORIGEN	TIPO DE ENFERMEDAD
Demencia asociada a enfermedades neurodegenerativas	Enfermedad de Parkinson Enfermedad de Cuerpos de Lewy Parálisis supranuclear progresiva Enfermedad de Huntington Degeneraciones subcorticales Degeneraciones corticales Esclerosis lateral amiotrófica Enfermedad de Hallervorden-Spatz
Demencia asociada a causas metabólicas	Enfermedad de Wilson Enfermedad de peroxisomas Enfermedad de lipoproteínas Lipidosis de origen desconocido Encefalopatía con acidosis láctica y episodios cerebrovasculares (MELAS) Leucodistrofia metacromática Enfermedad de Lafora
Demencia asociada a enfermedad cerebrovascular	Infartos cerebrales múltiples Atrofia cortical granular Estado lacunar con infartos quísticos Enfermedad de Binswanger (ateroesclerótica) Leuco-Araiosis (ateroesclerótica) Angiopatía amiloidea

se caracteriza por pérdida de la memoria a corto plazo, pérdida de la memoria topográfica y desorientación en tiempo y espacio. En la etapa dos hay un deterioro marcado de todos los aspectos de la memoria, además de disfasia, dispraxia (debida a daño del lóbulo parietal) y agnosia. En esta etapa se han reportado focos epilépticos en el 5-10% de los casos. El deterioro de la personalidad se manifiesta primariamente como pérdida del juicio y capacidad del pensamiento abstracto y puede culminar con un franco estado psicótico. En la tercera y última etapa el deterioro intelectual es severo y el paciente pierde todo contacto con el mundo que le rodea, no reconoce a sus familiares e incluso puede no reconocer su propia imagen frente al espejo. Hay aumento del tono muscular, incontinencia de esfínteres y caquexia. En esta tercera etapa el paciente se encuentra prácticamente descerebrado. La muerte suele ocurrir en un plazo de 6 a 12 años una vez iniciada la enfermedad.

Desde un punto de vista molecular y bioquímico existen grandes avances sobre el conocimiento de la EA, aunque el evento patogénico clave que conduce a la demencia aún sea un misterio. Los estudios más recientes sobre los cambios patológicos sugieren que, funcional y estructuralmente, la EA involucra alteraciones predominantemente de la corteza cerebral, aunque las zonas de lesión parecen afectar selectivamente ciertas poblaciones neuronales y se ha encontrado cierta distribución laminar y especificidad regional y de conectividad alteradas. Lo anterior lleva a la conclusión importante de la existencia de diferentes grados de vulnerabilidad neuronal en la EA (Morrison, 1993, ver tabla 2).

Los dos marcadores histopatológicos clásicos de la EA son las placas seniles y

TABLA 2. Características morfológicas y neuroquímicas que se asocian con una mayor vulnerabilidad o resistencia en la Enfermedad de Alzheimer

Tipo neuronal	Marcadores neuroquímicos	Vulnerabilidad/resistencia
<u>Células Piramidales</u>	Subtipo de receptor a GLU Kainato/AMPA	Muy vulnerables
	Neurofilamentos no fosforilados. MAPs	Vulnerables
	Calbindina	Vulnerables
	Superóxido Dismutasa Cu/Zn	Vulnerables
	Proteína cinasa Ca ²⁺ /calmodulina tipo II	Vulnerables
	Otras cinasas	Muy vulnerables
<u>Interneuronas</u>		
Doble ramillete	Calbindina/somatostatina	Resistentes
En canasta	Parvalbumina	Resistentes
Bipolares	Calretina	Resistentes
Otros tipos	Calbindina	Vulnerables
	Somatostatina	Vulnerables
	Somatostatina/NADPH/ neuropéptido Y	Muy resistentes
	Sustancia P	Muy vulnerables

marañas neurofibrilares. Las placas seniles consisten en grupos de neuritas distróficas y procesos celulares gliales que rodean un núcleo de proteína amiloide, y se localizan principalmente en áreas de la neocorteza, el hipocampo y la amígdala. Las marañas neurofibrilares son depósitos anormales de proteína intraneuronal que se ensambla formando los filamentos helicoidales apareados (FHA), que pueden encontrarse en las mismas áreas que las placas y en regiones subcorticales como el núcleo basalis de Meynert, el locus ceruleus y el núcleo dorsal del rafé. Además de estos dos marcadores clásicos, se han descrito otros cambios patológicos asociados con la demencia, como la pérdida neuronal masiva que principalmente involucra regiones de la formación hipocampal y la neocorteza.

Ni las marañas neurofibrilares ni las placas seniles son elementos histopatológicos exclusivos de la EA. Las marañas neurofibrilares se observan en otros padecimientos neurodegenerativos, como en el complejo demencial Parkinsónico de Guam, la demencia pugilística, el Parkinson postencefalítico, el síndrome de Down en adultos y en pequeña proporción en padecimientos menos comunes como la panencefalitis esclerosante subaguda, la enfermedad de Hallervoden-Spatz y la enfermedad neurovisceral por almacenamiento de lípidos. A diferencia de las marañas neurofibrilares, que se asocian siempre a neurodegeneración patológica y nunca se ven en animales, las placas seniles pueden observarse de manera abundante en individuos ancianos no demenciados y en algunas especies animales particularmente en primates. Estudios recientes han demostrado que en sujetos no demenciados, la presencia de placas seniles no se asocia a neuritas distróficas con inclusiones de FHA (Blessed y cols., 1968; Katzman y cols.,

1988; Kowall y Kosik, 1987). Estos datos apuntan hacia la participación de las alteraciones del citoesqueleto como el evento causal directamente involucrado con la muerte neuronal en la EA.

A continuación se presentarán algunos de los estudios más recientes sobre alteraciones de ciertos mecanismos bioquímicos involucrados en la muerte neuronal en la EA.

Neuropatología Bioquímica

Papel del citoesqueleto en la neurodegeneración.

El citoesqueleto neuronal está formado por una densa red de proteínas fibrilares que provee de una trama molecular a las neuronas para darles soporte y definir su forma. Por sus características estructurales dinámicas, el citoesqueleto permite a las neuronas experimentar cambios dramáticos ante una gran variedad de estímulos y se relaciona estrechamente con procesos de desarrollo, plasticidad, envejecimiento y muerte (Daniels, 1972; Black y Greene, 1982; Dinsmore and Solomon, 1991; Matsumaya y Jarvik, 1989). Una gran variedad de proteínas se encuentran formando parte de esta red molecular permitiendo el arreglo de tres tipos de estructuras principales: los microfilamentos, los neurofilamentos y los microtúbulos (tabla 3).

En mamíferos, los neurofilamentos están compuestos por tres subunidades proteicas que, con base en su movilidad electroforética, se han designado como neurofilamentos pesados, medios y ligeros, cuyas masas moleculares son, respectivamente, de 200, 168 y 70 kDa. A partir del uso de anticuerpos monoclonales, se ha demostrado que los neurofilamentos de axones son proteínas muy fosforiladas

TABLA 3. DIFERENTES COMPONENTES DEL CITOESQUELETO NEURONAL

TIPO

PROTEINAS CONSTITUTIVAS

MICROTUBULOS

(25-29 nM diámetro, formados por polímeros largos de dímeros de tubulina. Localizados en axones y dendritas. Funciones de soporte, transporte, crecimiento, división celular.

α y β tubulina
MAPs (proteínas asociadas)

NEUROFILAMENTOS

(10 nm diámetro, localización principal en axones. Principal soporte para la neurona).

NF-H (pesados) 200 kDa
NF-M (medianos) 168 kDa
NF-L (ligeros) 70 kDa

MICROFILAMENTOS

(5-7 nM diámetro, son polímeros formados por unidades de actina globular en forma de doble hélice. En la célula, la actina se encuentra mayoritariamente despolimerizada y concentrada en sitios membranales, donde se une a varias proteínas estructurales como la *fodrina*.

Actina

mientras que en los cuerpos celulares y en las dendritas prácticamente no contienen fosfato (Schwartz, 1985).

Los microtúbulos parecen ser las estructuras del citoesqueleto cuya alteración bioquímica se asocia directamente con la muerte celular en la EA (Flament y Delacourte 1989; Zhang y cols., 1989), aunque también se han reportado cambios en las proteínas que componen los neurofilamentos.

Los microtúbulos son estructuras tubulares cuya unidad monomérica es la tubulina, un heterodímero formado de dos proteínas globulares llamadas α - y β - y una cantidad importante de proteínas asociadas (MAPs). Los microtúbulos se relacionan funcionalmente con los neurofilamentos y están implicados en varios aspectos de la fisiología de las neuronas, incluyendo la división celular, la motilidad, el crecimiento de axones y dendritas, el mantenimiento de la morfología neuronal y el transporte de diferentes componentes citoplásmicos (Vale y cols., 1985; Matus, 1990). Los microtúbulos son estructuras inestables, dinámicas, que crecen y se retraen constantemente. Un gran número de datos experimentales señalan que el papel de las MAPs se relaciona con el mantenimiento de la estabilidad de los microtúbulos en axones y dendritas, y por lo mismo, se ha sugerido su papel como factores determinantes de la forma neuronal y de la regulación del balance rigidez/plasticidad de los procesos neuronales (Matus, 1988). Algunas de estas MAPs son específicas de neuronas y estudios bioquímicos e inmunológicos han identificado a la MAP1, la MAP2 y la tau como las más importantes en mamíferos adultos. La MAP1 se localiza en dendritas y axones; la MAP2 en somas y dendritas y la tau es casi exclusivamente un marcador axonal. La presencia de MAP2

o tau en las neuronas tiene repercusiones morfológicas interesantes. Por ejemplo, el espacio entre los microtúbulos axonales es de 20 nm, mientras que en las dendritas es de 100 nm. En el cerebro maduro se ha postulado que la MAP2 y la tau contribuyen a la estabilidad estructural de dendritas y axones, mientras que en el desarrollo, estas proteínas ejercen un papel importante en la estabilización de los procesos neuronales que emergen detrás del cono de crecimiento y permiten que los microtúbulos se encuentren en un estado mucho menos rígido (figura 3).

En el cerebro de pacientes con EA el citoesqueleto de un gran número de neuronas se desagrega progresivamente y se reemplaza por haces de FHA. Estos FHA se asocian, produciendo las marañas neurofibrilares que se localizan principalmente en el cuerpo neuronal, llenando casi todo el citoplasma de las células afectadas (Iqbal y Grundke-Iqbal, 1991). Acumulaciones de los FHA también se observan en las neuritas distróficas que rodean los acúmulos extracelulares de proteína amiloide de las placas neuríticas (seniles). Una tercera localización de los FHA ocurre en neuritas y en el neuropilo de la corteza telencefálica, formando los llamados hilillos de neuropilo (figura 4).

Los estudios sobre la composición bioquímica de los FHA se han dificultado por su escasa solubilidad en detergentes y su gran resistencia a la proteólisis. Los procedimientos convencionales para el estudio molecular de los FHA combinan su extracción de fracciones de tejido crudo obtenido de individuos fallecidos con EA, la digestión con proteasas y su ulterior separación por centrifugación en gradientes de sacarosa o CsCl. Debido a la dificultad para extraer FHA muy purificados, aún no se

Proteínas asociadas a microtúbulos

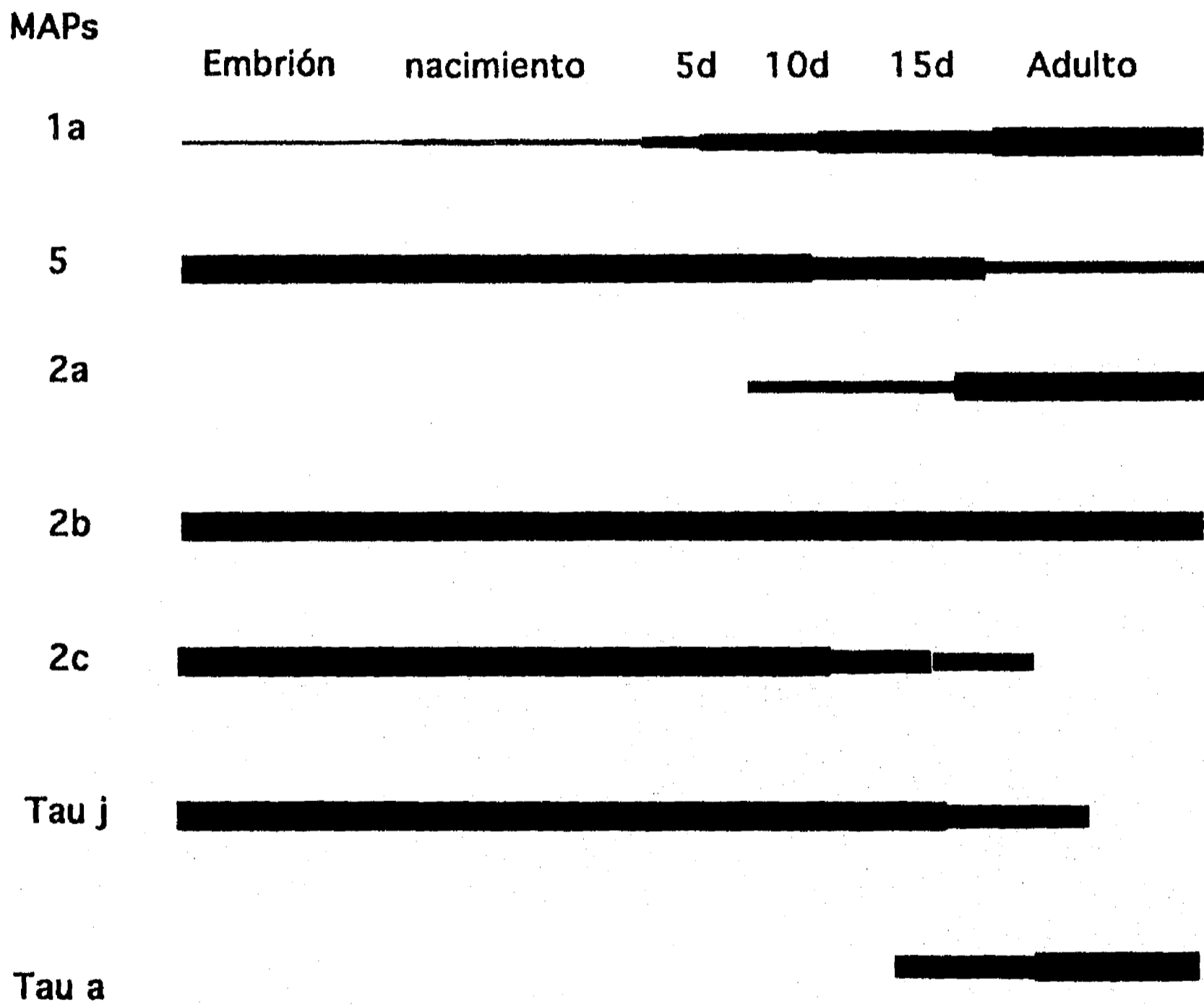


Figura 3 Representación diagramática de los cambios y abundancia de las diferentes MAPs durante el desarrollo del cerebro de la rata.

El grosor de la línea representa la cantidad relativa de estas proteínas en cada etapa del desarrollo.

conoce perfectamente su composición bioquímica (Greenberg y Davies, 1990). Sin embargo el patrón de polipéptidos y su inmunoreactividad cruzada sugieren que la proteína tau forma parte importante de su composición (Delacourte y Defossez, 1986; Grundke-Iqbal y cols., 1986; Wischik y cols., 1988). Asimismo, se han podido secuenciar fragmentos de otras proteínas asociadas, como la MAP2 y otras no relacionadas con el citoesqueleto, como es el caso de la proteasa ubiquitina la cual forma parte de un sistema celular de marcaje de proteínas es para su ulterior degradación (Mori y cols., 1987).

La tau como marcador molecular de la EA. La proteína asociada a microtúbulos tau pertenece a una familia de proteínas heterogéneas derivadas de un gen que, por procesamiento alternativo del ARNm, genera 6 isoformas en el adulto normal, cuyos pesos moleculares oscilan entre 45 y 68 kDa (Francon y cols., 1982; Himmler, 1989). La tau se ha considerado un marcador importante en la EA, en virtud de que es el principal componente bioquímico encontrado en los FHA. En estas estructuras la tau, que normalmente contiene 2-3 moles de fosfato, aparece hiperfosforilada, con 5-9 moles de fosfato por mol de tau. Todas las isoformas de tau aisladas de cerebros de pacientes con EA contienen más fosfatos que las 6 isoformas normales (Goedert y cols., 1992). Aunque todavía es materia de controversia, las isoformas anormales de tau parecen idénticas en composición y secuencia de aminoácidos al grupo de proteínas específicas de la EA, denominadas colectivamente como A68 (Lee y cols., 1991). La A68 difieren de la tau del adulto normal con respecto al grado y a los sitios de fosforilación, que aumentan su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Se ha identificado hasta el momento

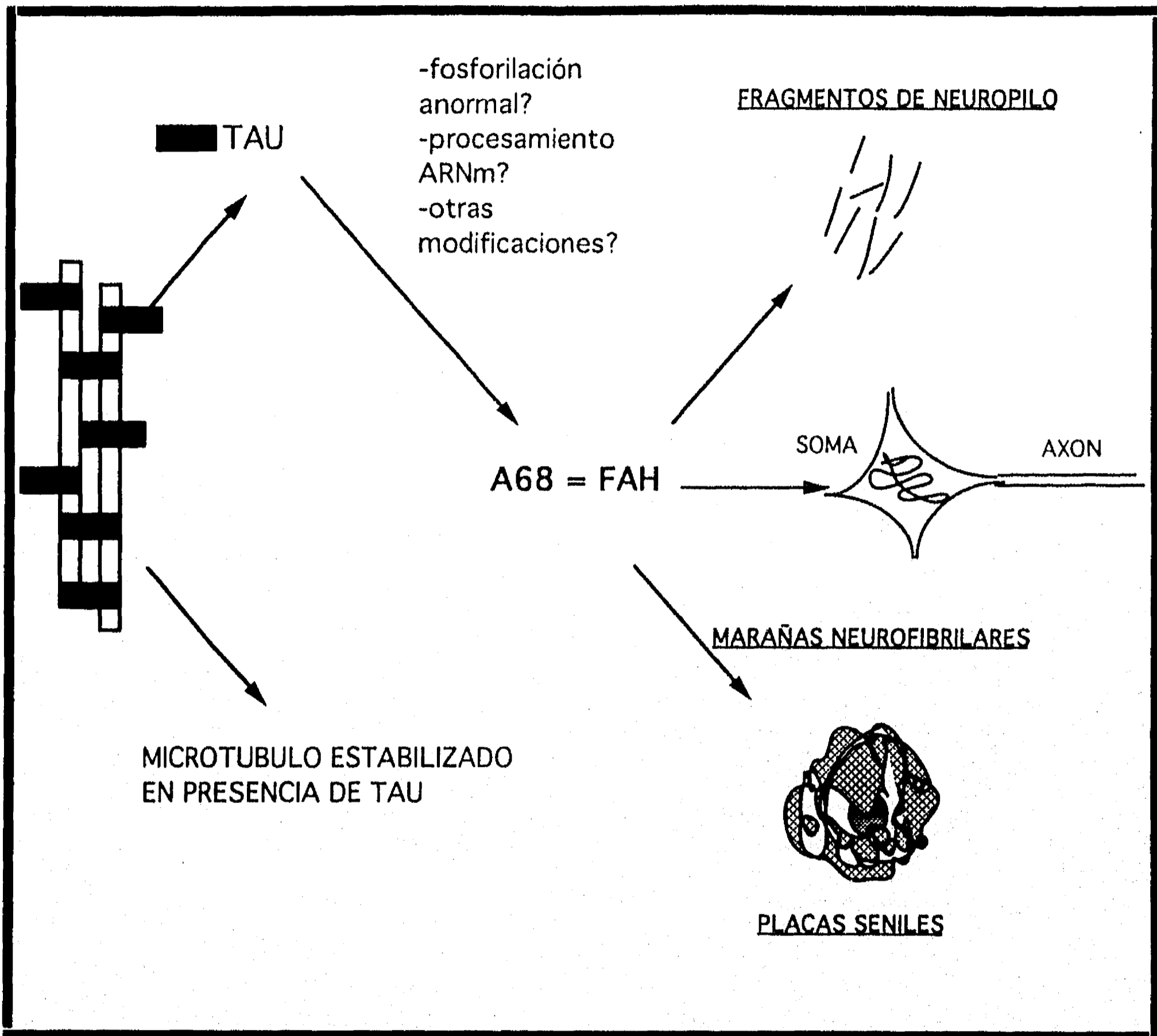


Figura 4 Modelo hipotético de la formación de los filamentos apareados helicoidales (FAH). La tau estabiliza a los microtúbulos y en condiciones patológicas puede transformarse en la proteína A68, la cual tiende a autoensamblarse y formar los FAH en sus tres localizaciones en el sistema nervioso central.

el sitio 396, que corresponde al aminoácido serina, como uno de los sitios de fosforilación anormal de la proteína tau extraída de los FHA (Bramblett y cols., 1993). La producción de proteína A68 (tau modificada) disminuye enormemente su capacidad para unirse a los microtúbulos precisamente en aquellas regiones del cerebro que contienen niveles altos de A68 y numerosas lesiones neurofibrilares. Esto ha sugerido una relación precursor-producto entre tau y A68.

La proteína tau promueve, en condiciones normales, el ensamblaje de los microtúbulos (Cleveland y cols., 1977). El mecanismo por el cual se favorece la polimerización de la tubulina involucra aspectos estructurales y bioquímicos de la tau, como la presencia de dominios de secuencias repetidas de aminoácidos (que se conocen como sitios de unión a microtúbulos) y su grado de fosforilación (Butner y Kirschner, 1991). Por ejemplo, la proteína tau extraída de cerebros fetales contiene sólo tres dominios repetidos de unión a microtúbulos y no se une con tanta eficiencia como la del adulto, que contiene cuatro de estos dominios. El papel del grado de fosforilación de la proteína es menos claro, lo mismo que los aminoácidos involucrados. Es posible que algunos de los sitios de fosforilación anormal que aparecen en la proteína A68 sean sitios de fosforilación normales en la tau fetal. Esto es, que la fosforilación anormal de la tau de cerebros con EA en la serina 396, recapitule los cambios de la tau durante etapas tempranas del desarrollo (Bramblett y cols., 1993).

El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes específicos de la proteína tau ha permitido conocer mucho acerca de los cambios bioquímicos que ocurren en esta proteína en la EA. Así, por ejemplo, se ha determinado que los dos tercios del

segmento carboxilo terminal corresponden al fragmento de tau integrado al núcleo de los FHA a través de sus dominios repetidos. El anticuerpo monoclonal denominado 423 identifica específicamente una ruptura en la tau integrada a los FHA en el residuo 395 del ácido glutámico (Novak y cols., 1989). A partir de este hallazgo, resulta plausible pensar que la hiperfosforilación de la tau no es la única alteración que influye en la disfunción de esta proteína en la EA, sino que su ruptura, inducida probablemente por ciertas proteasas también es importante (Novak y cols., 1993).

Entre los anticuerpos monoclonales producidos a partir de fragmentos aislados de los FHA es digno de mención el Alz-50, descrito en 1986 por Wolozin y cols., que fue uno de los primeros utilizados para el marcaje inmunohistoquímico de las marañas neurofibrilares y con el cual originalmente se describió a la proteína tau modificada como proteína A68. Secciones de cerebros obtenidos de pacientes, teñidos para inmunohistoquímica con Alz-50, muestran, sin embargo, que el grueso del teñido no se encuentra exactamente en las marañas neurofibrilares sino en los procesos neuronales. Este hallazgo concuerda con la hipótesis de que no solo la hiperfosforilación de la tau desencadena los mecanismos que finalmente conducen a la muerte neuronal. Es posible que el incremento de fosforilación que se ha descrito para otras proteínas, como la MAP2 y los neurofilamentos de alto peso molecular, represente un evento general de alteración metabólica que conduce a la neurodegeneración. Es asimismo probable que el anticuerpo Alz-50 reconozca algún otro componente molecular cuya naturaleza precisa aún se desconoce (Davies, 1993).

Se están realizando estudios numerosos para conocer el papel de proteína

quinasas o proteína fosfatasas que pudieran ser responsables de la fosforilación anormal o la falta de remoción de fosfatos en los residuos de aminoácidos, que transforman a la proteína tau en la proteína A68. De las proteína cinasas cuya actividad pudiera estar involucrada en la etiopatogenia de la EA se pueden mencionar la MAP cinasa (también conocida como ERK 2, y que activada por mitógenos), la calcio-calmodulina cinasa y la proteína cinasa dependiente de AMPc (Baudier y Cole, 1987; Yamamoto y cols., 1988; Drewes y cols., 1992). Las proteína fosfatasas candidatas de disfunción son los tipos 1 y 2A (Gong y cols., 1993).

En la figura 5 se presenta un esquema de la tau con los dominios repetidos y los epítopes fosforilados reconocidos por diferentes anticuerpos.

Dada la estructura de las neuronas, una de sus funciones vitales es el transporte de materiales del soma a las terminales nerviosas. El ensamblaje correcto de los microtúbulos es esencial para realizar esta función. En la EA el ensamblaje de los microtúbulos es totalmente defectuoso, tal vez como resultado de las profundas alteraciones que sufre la tau. Mas aún, la unión del guanosín trifosfato (GTP) a la subunidad β de la tubulina, la cual inicia su polimerización para formar microtúbulos estables, es promovida por tau, por lo que la pérdida de una tau funcional altera gravemente la función de los microtúbulos en varios aspectos.

En todas las células, la tasa de acumulación de proteínas anormales depende de la velocidad de su transporte, síntesis y degradación. De esta manera, algunos componentes que son normalmente transportados del cuerpo neuronal a las terminales pueden acumularse en el soma neural y retardar su degradación en las neuronas

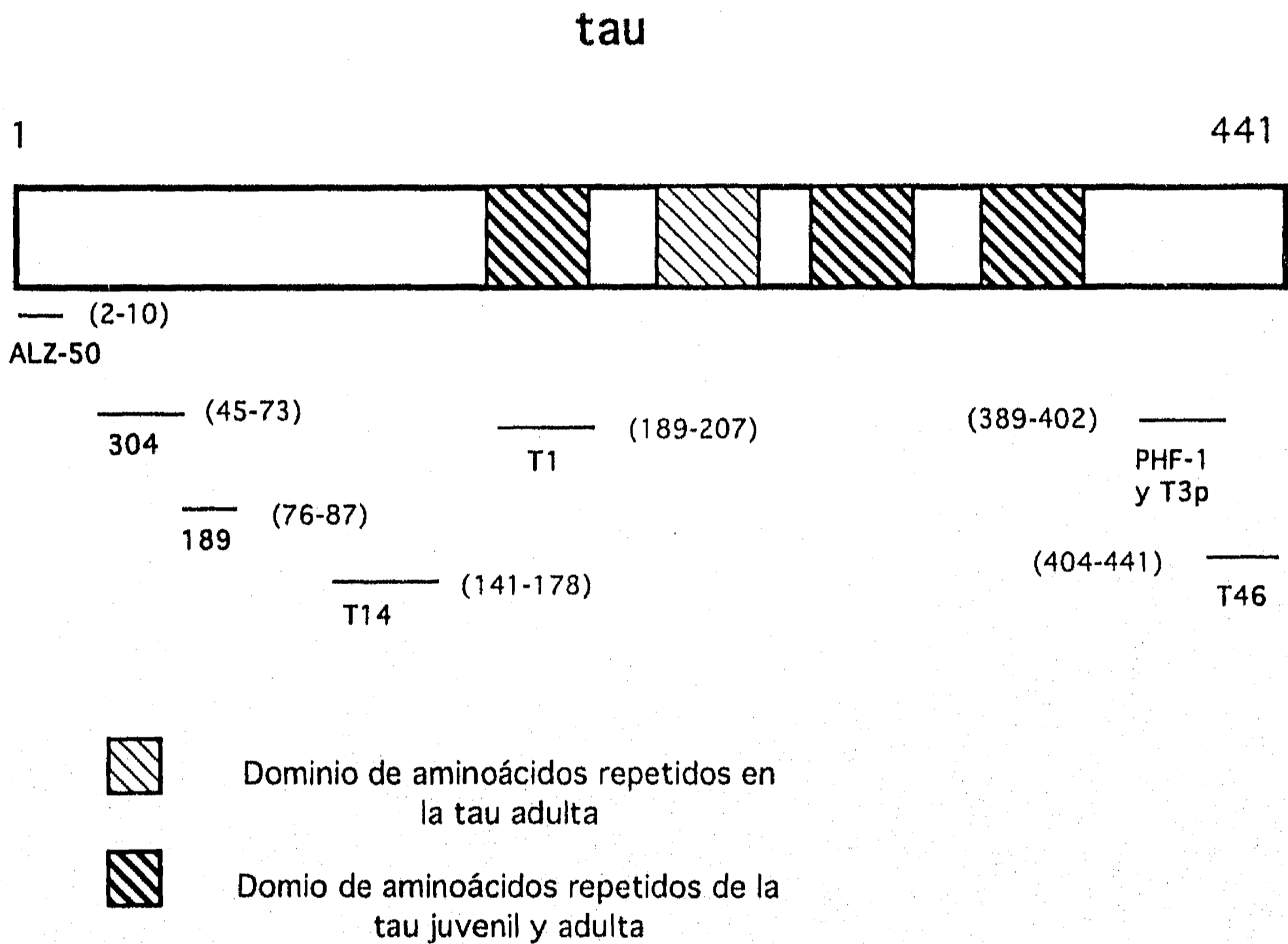


Figura 5 Esquema de la proteína tau y los diferentes segmentos de aminoácidos contra los cuales se han desarrollado anticuerpos. Con letras oscuras se designa el nombre de los anticuerpos y con números claros el segmento de aminoácidos a que corresponde.

afectadas, lo cual explicaría la localización somática preferente de los FHA.

De las evidencias señaladas se puede resumir lo siguiente:

1) Algunos sistemas de fosforilación-desfosforilación son defectuosos en la EA, lo que lleva a una hiperfosforilación de la proteína tau y algunas otras proteínas neuronales, 2) la fosforilación anormal de la tau contribuye a un ensamblaje defectuoso de los microtúbulos que consecuentemente impide un flujo axoplásmico normal y pudiera conducir a la neurodegeneración y 3) los cambios en la proteína tau son sólo uno de los indicios de anormalidades metabólicas generales que afectan el comportamiento neuronal las cuales aun se desconocen.

Amiloidosis

La presencia de depósitos amiloideos, conocidos como placas seniles, se ha identificado con el proceso de envejecimiento y con la EA. Las placas seniles se componen de neuritas dispuestas sobre un material positivo a la tinción con tioflavina S/rojo Congo y se observan más frecuentemente en la amígdala, el hipocampo y la neocorteza. El amiloide está formado por filamentos extracelulares de 7-10 nm de diámetro (fibrillas amiloideas) que se acumulan en depósitos esféricos en el tejido cerebral (placas seniles) y la microvasculatura meníngea (angiopatía congofílica). El análisis de la composición bioquímica de los depósitos amiloideos ha revelado la presencia de un péptido hidrofóbico, compuesto de 39-43 aminoácidos, llamado proteína β -amiloide (β AP) (Masters y cols., 1985; Miller y cols., 1993). La secuencia parcial de aminoácidos del amiloide leptomeníngeo fue reportado por Glenner en 1984 quien, definió al péptido amiloide (β AP) de 4.2 kD. La β AP que se deposita en las placas

nueuríticas y en la vasculatura cerebral corresponde a péptidos de 42-43 y 39-40 residuos de aminoácidos, respectivamente.

La β AP es un fragmento proteolítico de una proteína conocida como proteína precursora del amiloide (APP), y comprende 28 aminoácidos inmediatos del grupo amino terminal del dominio transmembranal más los primeros 11-15 residuos de dicho dominio de la APP (figura 6).

La APP pertenece a un grupo complejo de polipéptidos enclavados en la membrana con una masa molecular de 100-140 kD y que son susceptibles de modificarse por O- o N- glucosilación, fosforilación, sulfatación, proteólisis y secreción de su región extramembranal (Kang y cols., 1987; Robakis y cols., 1987). La heterogeneidad de la APP se debe en parte al procesamiento alternativo de los 19 exones que contiene el gen, y que puede dar lugar a más de las 10 isoformas de la APP. El gen para esta proteína, en los humanos, se localiza en el cromosoma 21. Cuatro de los 10 ARNm codifican para APPs de 695, 751 y 770 aminoácidos y contienen el fragmento de la β AP. Las APP₇₇₀ y APP₇₅₁ contienen un fragmento dentro de su molécula homólogo en secuencia a la familia de los inhibidores de proteasas de serina de tipo Kunitz (nexina II) (Kitaguchi y cols., 1988).

Las APPs son proteínas ubicuas, ya que se han encontrado prácticamente en todas las células y tienen un alto grado de conservación evolutiva (Rosen y cols., 1989). Sin embargo, nadie conoce cabalmente la función de estas proteínas de cuyo metabolismo se pueden originar fragmentos de secreción amiloidogénicos y fragmentos no amiloidogénicos. Existen numerosos trabajos que tratan de asignar un papel funcional

PROTEINA PRECURSORA DE LA PROTEINA β -AMILOIDE

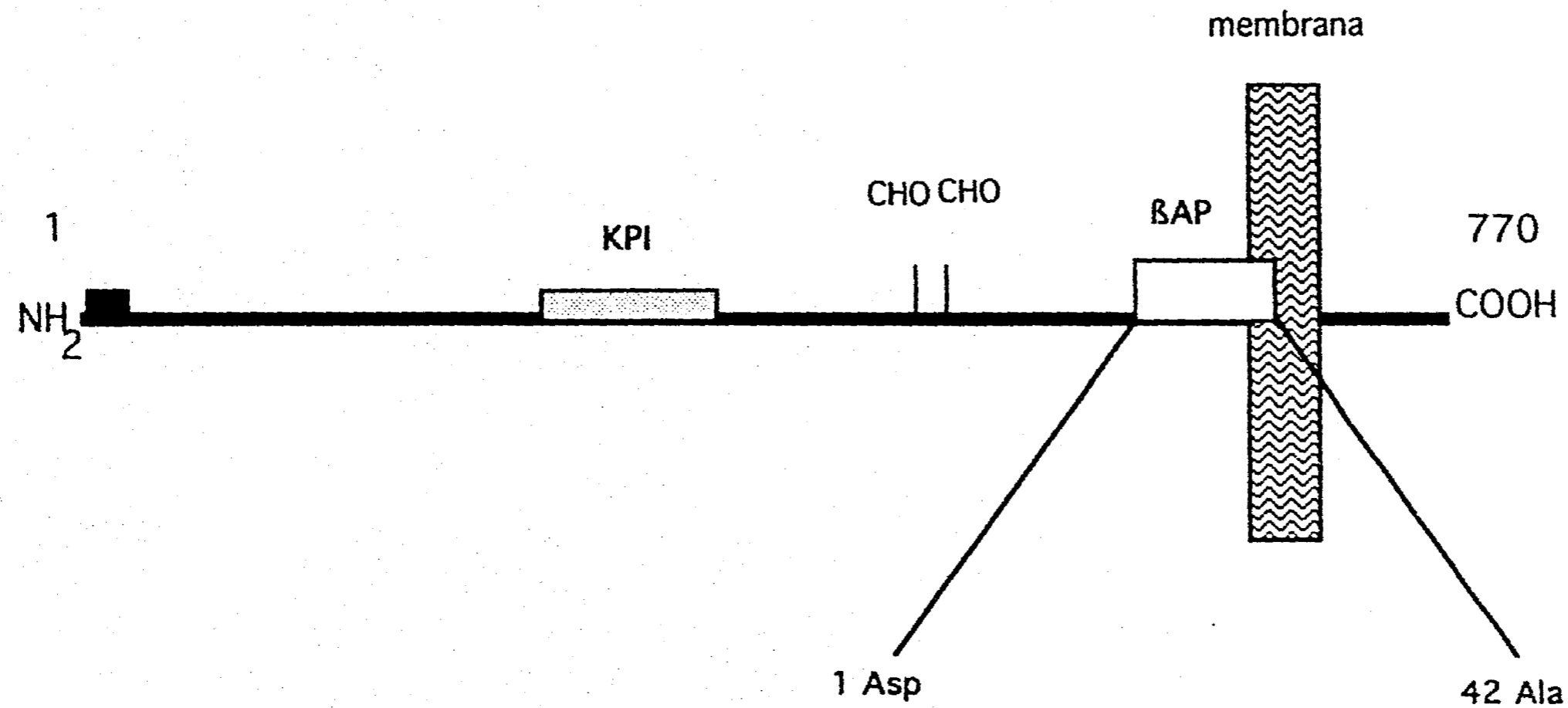


Figura 6 Esquema que muestra a la proteína precursora de la BAP. La proteína precursora está formada por 770 aminoácidos y en alguna de sus variantes posee un residuo que tiene una alta homología con los inhibidores de proteasas de tipo Kunitz (KPI). La BAP es una proteína de 42 aminoácidos con una región transmembranal.

a la APP, la β AP y los fragmentos de APP que son producidos y secretados normalmente durante el metabolismo de una gran variedad de células (Seubert y cols., 1992). Se ha sugerido que la APP, por ser una proteína transmembranal, puede funcionar como un receptor de superficie celular o que puede tener un papel importante como molécula de adhesión (Schubert y cols., 1989). La APP₇₇₀ y los fragmentos de APPs que se secretan contienen a la proteasa nexina II (Kitaguchi y cols., 1988). Sin embargo, el significado funcional exacto de la APP sigue siendo materia de conjetura.

La mayoría de las formas secretadas de APP se producen después de que la molécula completa es hidrolizada por una enzima hipotética, llamada APP secretasa, entre la Lis 16 y la Leu 17 de la secuencia de β AP, lo que impide que la β AP se produzca (Esch y cols., 1990; Sisodia y cols., 1990). Por este motivo, resulta muy importante entender los mecanismos de modulación de la actividad de esta secretasa que estarían regulando la amiloidogénesis cerebral. En cultivos de tejidos se tiene evidencia de que varios agentes como los ésteres de forbol y los agonistas colinérgicos de tipo muscarínico, influyen en la actividad de la secretasa (Caporaso y cols., 1992; Buxbaum y cols., 1992; Nitsch y cols., 1992).

El procesamiento intracelular de la APP y las rutas metabólicas que pueden generar la β AP ocupan a buena parte de los investigadores en el área de la EA. Una teoría considera que es necesario un daño previo en la membrana neuronal para que se pueda generar β AP a partir de la APP, ya que el carboxilo terminal de la β AP es membranal. Aunque la mayoría de APP se localiza en la membrana, recientemente se ha encontrado una fracción importante de esta proteína en compartimentos intracelulares

(Haass y cols., 1991). La ruptura de la molécula de APP para producir formas de secreción se lleva a cabo en el aparato de Golgi o en las mismas vesículas de secreción (Sambamurti y cols., 1992). En apoyo a lo anterior, se ha encontrado en extractos celulares y en vesículas a la nexina II contenida en la molécula de APP. Las moléculas de APP no hidrolizadas alcanzan la superficie membranal y se insertan en ella. La secreción de la APP que se encuentra en la superficie membranal se inhibe por agentes que inhiben la endocitosis. Además, la APP contiene una señal de internalización en su dominio citoplasmático. La APP reinternalizada es procesada y degradada muy probablemente por lisosomas (Haass y cols., 1992).

Como la molécula de β AP sólo se encuentra en condiciones patológicas o durante la senescencia, se puede suponer que su aparición en el tejido nervioso es el resultado de un procesamiento aberrante de la molécula de APP. Hasta el momento no es claro cómo se puede producir la β AP a partir de la ruptura hidrolítica de la APP, en virtud de que el sitio de probable ruptura es inaccesible a la proteólisis. Al no existir hasta el momento un buen modelo animal de amiloidogénesis, la posibilidad de encontrar agentes que interfieran con el metabolismo de la APP y con la producción de la β AP es todavía lejana aunque sin duda importante para entender los mecanismos moleculares de la EA.

Recientemente se ha encontrado evidencia de una ruta metabólica que genera fragmentos del carboxilo terminal que contienen a la molécula de β AP. Estos fragmentos se purificaron de fracciones membranales aisladas de corteza cerebral, microvasculatura meníngea, plaquetas, y de células en cultivo que sobreexpresan a la APP (Seubert y cols., 1992), así como en el medio de células en cultivo y líquido cefalorraquídeo de

humanos como resultado del metabolismo celular normal (Haass y cols., 1992). Estas formas normales de producción de amiloide contienen grupos N-terminal y C-terminal heterogéneos. Una pregunta importante que surge de estos hallazgos es si la β AP que se deposita en las placas amiloideas deriva de estos péptidos de β AP secretados normalmente o si proviene de rutas diferentes. Otros hallazgos importantes en relación con la presencia de β AP se deben a la existencia de otros padecimientos relacionados con la β AP fuera del cerebro, y a que la β AP puede ser un tipo de molécula reactiva inducida por un agente endógeno y/o exógeno. En apoyo a lo anterior se ha descrito una enfermedad neurodegenerativa conocida como hemorragia cerebral familiar con amiloidosis tipo Dutch, la cual se caracteriza principalmente por depósitos de proteína amiloide en vasos cerebrales, lo que origina múltiples infartos y neurodegeneración consecuente. Este padecimiento está asociado a una sustitución de una glutamina por un ácido glutámico en la posición 693 de la β APP₇₇₀ o la posición 618 de la β APP₆₉₅ que corresponde al residuo 22 de la β AP. Se ha demostrado que esta mutación acelera la tasa de fibrillogénesis de la β AP (Van Nostrand y cols., 1992).

Mecanismos de neurodegeneración por β AP. Los estudios clínicos e histopatológicos realizados en sujetos viejos y en pacientes con EA, parecen indicar que la mera presencia de los depósitos de β AP en la materia gris cerebral es insuficiente para inducir neurodegeneración. Esta conclusión se basa en el hecho de que en la corteza cerebral de ancianos no demenciados pueden encontrarse numerosos depósitos de proteína amiloide, y que el cerebelo de pacientes con EA contiene una gran cantidad de depósitos de β AP sin presentar signos de degeneración. Una explicación a lo anterior es que la

evolución temporal en cuanto a la composición bioquímica de las placas seniles es importante para influir en la muerte neuronal. De acuerdo con esto, se han descrito un gran número de variables que influyen en el desarrollo de la citopatología local asociada a los depósitos de β AP: (1) la velocidad de acumulación de β AP con respecto al tiempo; (2) su estado fisicoquímico resultante particularmente del tamaño del péptido, y de su grado de conformación β -plegada y su tendencia a agregarse en estructuras fibrilares; y (3) la presencia de otras proteínas asociadas a la β AP, como glucoproteínas de heparan sulfato, α 1-antiquimotripsina, componentes de la vía clásica del complemento, y apolipoproteína E.

Las alteraciones neuríticas y gliales se asocian en forma más regular a las placas amiloideas maduras que contienen muchos de los elementos mencionados, mientras que las placas más tempranas, más difusas y menos densas son las que predominan en la corteza cerebral en ancianos normales. Parece cobrar cada vez más fuerza la noción de que la forma de proteína β AP que en solución no adopta una conformación β -plegada es relativamente inerte, y que la neurotoxicidad de esta proteína se asocia a su capacidad de formar agregados fibrilares que parecen inducir una respuesta inflamatoria crónica y lentamente causar neurodegeneración. En tejido nervioso proveniente de roedores (rata o ratón) se ha observado que, a pesar que estas especies animales secretan β AP 1-40, esta proteína es altamente soluble y no forma agregados fibrilares. La diferencia entre la β AP producida en roedores con respecto a la de humanos radica en la sustitución de tres aminoácidos: Arg-Gli, Tir-Fen y His-Arg en las posiciones 5, 10 y 13 de la proteína respectivamente, lo que altera las propiedades fisicoquímicas de la

β AP confiriéndole resistencia para la formación de depósitos (Shivers y cols., 1988).

Otra área de gran interés y fecunda investigación aborda el papel de los depósitos de β AP como un factor que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas ante agresiones que por sí mismas no causarían daño celular. De estos agentes agresores son de tomar muy en cuenta el papel de la neurotoxicidad mediada por el Ca^{2+} , aminoácidos excitadores, hipoglucemia y radicales libres (Mattson y cols., 1990). El desarrollo recientemente logrado de ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de una forma humana mutante de la APP que incluye la sustitución de la valina 717 por una fenilalanina, ha logrado reproducir las placas neuríticas, la pérdida sináptica la astrocitosis y la microgliosis (Games y cols., 1995) y ha dado fuerza de nuevo al papel de la proteína amiloide y la neurodegeneración.

Muchos estudios se necesitan aún para elucidar los requerimientos bioquímicos precisos que inducen daño neuronal y la particular vulnerabilidad de cierto tipo de neuronas expuestas de manera crónica a los depósitos de amiloide.

Proteasas e inhibidores de proteasas.

Existen múltiples evidencias que señalan el papel de las vías proteolíticas en las enfermedades neurodegenerativas (Sisodia y cols., 1990; Koo y cols., 1991). La mayor atención a este tema se ha enfocado a la posible remoción del material degenerado o a la amplificación del daño tisular, por proteasas liberadas de células necróticas. El papel de las proteasas celulares ocupa un lugar importante en un amplio espectro de la fisiología celular: el ensamblaje y la reorganización del citoesqueleto durante los mecanismos de transducción de señales, el tráfico vesicular y el empaquetamiento de

proteínas, y la regulación de proteínas clave como proteína cinasas y fosfatasas. La pérdida de control de una o más proteasas puede de esta manera incidir -si no causalmente al menos en asociación- en los mecanismos neuropatológicos de la EA. Así, como ya se mencionó, existe evidencia de la participación de una secretasa intracelular responsable de la generación de fragmentos no amiloidogénicos a partir de la APP₇₇₀ o APP₇₅₁ dentro del aparato de Golgi o en algún compartimento postGolgi (Selkoe, 1989).

Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico de las marañas neurofibrilares en la EA, ha mostrado depósitos de la proteína ubiquitina. La ubiquitinización de proteínas se conoce como parte de un mecanismo de marcaje de proteínas para su ulterior proteólisis dependiente de ATP (Mayer y cols., 1991). La ubiquitinización de proteínas parece ser parte de un sistema de marcaje mucho más complejo pues se ha implicado en la regulación de la expresión de genes, en la respuesta al estrés celular y en la proteólisis lisosomal, en la modulación de receptores de la superficie celular, en la reparación del ADN, en la incorporación de proteínas a las mitocondrias, en la captura de precursores de neurotransmisores en sinaptosomas, en la biogénesis de peroxisomas, en el ensamblaje de los ribosomas, en la regulación de vías de secreción y en la muerte celular programada (Ciechanover, 1994).

Se desconoce la razón de la concurrencia de los depósitos de ubiquitina junto con los de proteínas asociadas a los microtúbulos. Se ha sugerido, sin embargo, que una disfunción del sistema lisosomal de proteólisis ligado a ubiquitina participe en la génesis del daño bioquímico que lleva a la formación de depósitos de proteínas anormales en la EA. Estos depósitos que conforman las marañas neurofibrilares se encuentran

constituídos principalmente, como ya se ha mencionado, por tau, pero también se ha descrito la presencia de otras proteínas asociadas a microtúbulos como la MAP2 y otras proteínas provenientes de los neurofilamentos. En las enfermedades crónicas neurodegenerativas donde la participación de filamentos intermedios es indiscutible, también se han descrito estas inclusiones de conjugados proteína-ubiquitina. (Dickson y cols., 1990). Hasta el momento se han descrito tres formas de depósitos de conjugados proteína-ubiquitina en enfermedades neurodegenerativas idiopáticas y transmisibles en humanos, sin que se conozca hasta el momento el papel que éstos juegan en el mecanismo de muerte celular: a) asociación de depósitos proteína-ubiquitina con inclusiones filamentosas; b) estructuras circulares con inmunorreactividad positiva para ubiquitina en el soma neuronal y el neuropilo, relacionadas a alguna forma de organelos pleiomórficos lisosomales y c) depósitos de ubiquitina y catepsinas lisosomales adyacentes a los depósitos amiloideos.

La inmunorreactividad para ubiquitina va en aumento paralelamente al grado de maduración de las marañas neurofibrilares, siendo más prominente en las llamadas "marañas fantasmas", que corresponden a las lesiones neurofibrilares con destrucción total de la neurona (Mayer y cols., 1992).

Varios estudios han señalado una disfunción lisosomal directamente relacionada con la EA. Los lisosomas son estructuras que participan mayoritariamente en el recambio de membranas y de proteínas de membrana. Durante el envejecimiento y durante los inicios de varios procesos neurodegenerativos, las membranas neuronales se encuentran, sin duda, alteradas en respuesta a varios estímulos nocivos (particularmente

el daño oxidativo por radicales libres). Los cambios membranales descritos en la EA incluyen: cambios en la composición lipídica, cambios estructurales y funcionales de proteínas transmembranales, incremento importante de enzimas lipolíticas y cambios en la fluidez. Un aumento en el recambio de estas membranas dañadas puede en parte aumentar el contenido de lisosomas en las neuronas. Además del incremento en el número de lisosomas, se han descubierto cambios en su composición y en el contenido de hidrolasas, lo cual puede comprometer de manera importante la función proteolítica normal de la neurona (Nixon y cols., 1992).

Apolipoproteína E.

En 1993 apareció en la literatura científica el primer trabajo sobre la participación de la apolipoproteína E4 (ApoE4) en la EA esporádica y la familiar de aparición tardía (Strittmatter y cols, 1993).

La ApoE es una lipoproteína de peso molecular de 34 KDa, sintetizada en el hígado, que forma parte de las lipoproteínas de muy baja densidad. Estas proteínas son importantes en el transporte de triglicéridos del hígado a tejidos periféricos; en la redistribución de colesterol entre las células, y forman parte de los quilomicrones sintetizados en el intestino que transportan colesterol y triglicéridos. Los efectos fisiológicos de la ApoE se inician al interaccionar con el receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL) y con el receptor de proteína/macroglobulina α 2 relacionado con el LDL (LRP) (Mahley, 1988). En el sistema nervioso central, la ApoE es sintetizada por astrocitos y puede aislarse del líquido cefalorraquídeo (Snipes y cols., 1986).

Con el uso de técnicas de análisis del punto isoeléctrico y electroforésis

bidimensional ha sido posible detectar la naturaleza molecular polimórfica de la ApoE. Se han encontrado tres isoformas principales, conocidas como ApoE2, E3 y E4, que son el producto de tres alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) del mismo locus genético. De la expresión de estos tres alelos se generan tres fenotipos homocigotos (ApoE2/2, E3/3 y E4/4) y tres fenotipos heterocigotos (ApoE3/2, E4/3 y E4/4). El fenotipo más común es el E3/3. La ApoE4 se une normalmente a los receptores específicos, pero se asocia con niveles elevados de colesterol plasmático y LDL (Pitas y cols., 1987; Mahley, 1988).

En la EA se ha podido detectar inmunorreactividad para ApoE en las placas seniles, y se ha demostrado que se puede unir *in vitro* con la β AP (Strittmatter y cols., 1993). Se ha encontrado una mayor cantidad de β AP (por inmunorreactividad) en pacientes con EA que han heredado los dos alelos para la ApoE4, con respecto a aquellos que no los han heredado. Esto apoya la noción de que pacientes con EA de inicio muy tardío y que son homocigotos para ApoE3 acumulan depósitos de amiloide a una tasa mucho más baja (Schmechel y cols., 1993).

La ApoE4 se une en función del pH a la β AP mucho más rápidamente que la ApoE3, así que los pacientes que heredan dos alelos para ApoE4 unen más β AP y forman muchas más placas seniles. *In vitro*, la incubación de β AP con ApoE induce la formación de fibrillas constituídas por ambas moléculas. De este modo, los depósitos de β AP pueden ser tomados como un marcador patológico, relativamente característico de la EA y cuyo número y tamaño es función del genotipo heredado de ApoE y no necesariamente un agente directo en la patogénesis de la muerte neuronal. En resumen, los sujetos que presentan el fenotipo para ApoE4/4, tienen un mayor riesgo para padecer

la EA de inicio temprano o con características más severas, en relación con el número de placas seniles y con su estado de maduración (Strittmatter y cols., 1994). Además de la asociación que se ha encontrado entre la ApoE4 y los depósitos de amiloide, también una fracción de esta lipoproteína se asocia a neuronas que contienen marañas neurofibrilares. Esta asociación ha llevado a Strittmatter y cols. (1994) a plantear la hipótesis de la participación de la ApoE4 en la hiperfosforilación de la tau y su ulterior depósito en los FHA. Sus resultados sugieren que la ApoE3 se une a la proteína tau y posiblemente regula su metabolismo. Como la ApoE4 no se une a la tau, esta regulación puede no estar presente en individuos homo o heterocigotos para ApoE4. En la figura 7 se presenta un diagrama de esta hipótesis que describe que en los individuos que poseen los alelos E4, al no unir tau, se favorece su hiperfosforilación y de esta manera hay una mayor tendencia a formar FHA.

Neurotransmisores y neuromoduladores.

La demostración de anomalías sustanciales en la EA en los sistemas de neurotransmisión que utilizan acetilcolina, llevó a postular al déficit colinérgico como la causa primaria de la enfermedad. Sin embargo, ahora es claro que no en todos los pacientes existe una disminución considerable de marcadores colinérgicos, e inclusive en algunos pacientes se ha encontrado un número normal de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert. Sin embargo, varios estudios han demostrado consistentemente la pérdida de 30% a 95% de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (Geula y Mesulam, 1993). En otros estudios no se ha encontrado una correlación positiva entre la pérdida de neuronas colinérgicas del cerebro anterior y la

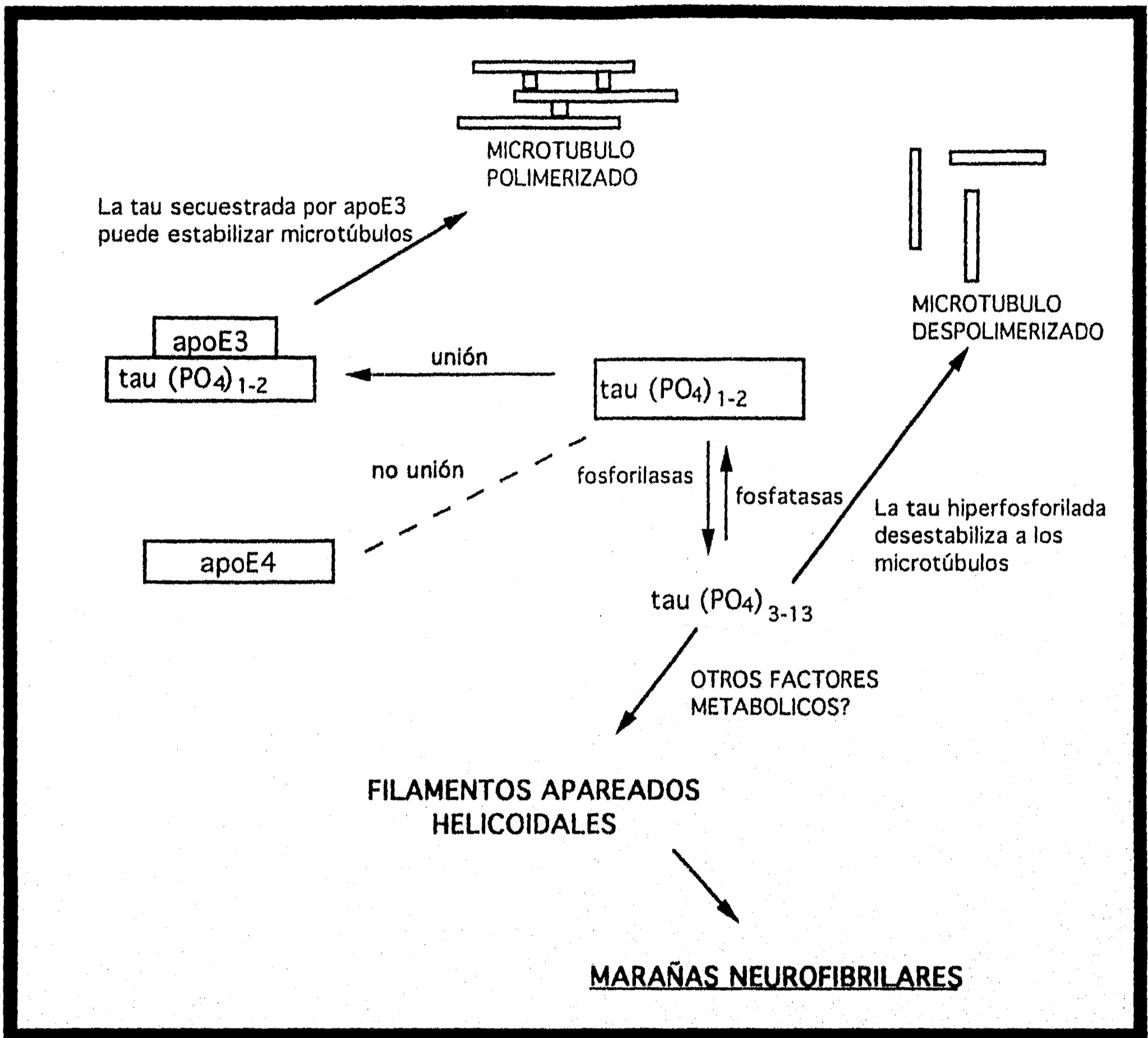


Figura 7 Modelo propuesto para explicar cómo la apoE4 no se une a la proteína tau en tanto que la apoE3 sí lo hace. Al quedar una poza de tau atrapada con apoE3 se evita su hiperfosforilación. En los sujetos con mayor expresión de apoE4, la tau queda libre y es más fácilmente sustrato para fosforilasas. La tau con mayor cantidad de fosfatos puede formar los filamentos apareados helicoidales.

disminución en la acetilcolina cortical. Existe evidencia de que el blanco inicial de la neurodegeneración son neuronas colinoceptivas corticales, las cuales se depletan o pierden la capacidad de expresar proteínas esenciales para el mantenimiento de las neuronas colinérgicas (Mufson y cols., 1987). La disminución colinérgica puede, de este modo, reflejar efectos transinápticos de desafrentación colinérgica cortical. Por estos hallazgos es entonces muy probable que el déficit colinérgico neocortical explique sólo en parte el deterioro cognitivo que se presenta en la EA.

En otros estudios bioquímicos post-mortem se han descrito deficiencias en gran número de neurotransmisores, lo cual, entre otras conclusiones, lleva a pensar que una terapia basada en la sustitución farmacológica no es posible.

Neurotransmisores subcorticales. La atrofia del núcleo caudado no es un hallazgo constante en la EA, aunque la concentración de dopamina puede encontrarse reducida. Estudios en otras áreas subcorticales como el hipotálamo han demostrado niveles reducidos de noradrenalina (Gottfries y cols., 1983). Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra se encuentran sistemáticamente dañadas, a tal grado que la tercera o quinta parte de los pacientes con este padecimiento presentan signos de parkinsonismo (Pearce y cols., 1984).

Neurotransmisores corticales. La corteza recibe al menos 4 vías de neurotransmisión. Una es la entrada colinérgica, la cual, como ya se mencionó, suele estar depletada en la EA. Por otro lado, las vías que utilizan dopamina y noradrenalina no parecen estar alteradas. La situación de la aferencia serotoninérgica es compleja. Aunque se ha descrito depleción de serotonina (5-HT) en el núcleo del rafé, en la corteza cerebral los

niveles de 5-HT y su metabolito el 5-HIAA no se encuentran alterados (Palmer y cols., 1988). Uno de los neurotransmisores más ampliamente distribuido en la corteza es el GABA, el cual está presente en interneuronas corticales en asociación con diferentes neuropéptidos, en particular la somatostatina. Las células GABAérgicas con somatostatina se encuentran disminuídas en número y la enzima que sintetiza el GABA, la descarboxilasa del ácido glutámico, está presente en las placas seniles (Lowe y cols., 1988). No se han descrito cambios en los niveles de glicina, taurina y algunos neuropéptidos como colecistocinina, galanina, péptido intestinal vasoactivo y neuropéptido Y (Rossor y cols., 1981; Beal y cols., 1988). Algunos estudios post-mortem mencionan disminución en los niveles de somatostatina (Davies y cols., 1980), pero ésto no ha sido confirmado. Además, pruebas farmacológicas con un análogo de somatostina, el octreotide, no han demostrado ser benéficas para mejorar las deficiencias cognoscitivas (Mouradian y cols., 1991).

El examen histológico de cerebros de pacientes con EA muestran, invariablemente, grados de atrofia de moderada a severa en los lóbulos temporal, parietal y frontal, con alargamiento ventricular y aplanamiento de los surcos. Existe evidencia definitiva que señala al glutamato como el principal transmisor excitador de las fibras de asociación cortico-corticales y de las principales vías del hipocampo. Estudios histológicos indican fehacientemente una degeneración temprana de las vías glutamatérgicas (Procter y cols., 1988; Spencer, 1987).

Neurotransmisores hipocampales. En los pacientes con EA existe en número elevado marañas neurofibrilares y placas neuríticas en la corteza entorrinal y en la región de CA1.

Estudios recientes de imagenología muestran que la atrofia del hipocampo ocurre de manera temprana durante el desarrollo del padecimiento. Varios grupos de investigación han descrito disminuciones de hasta un 80% en el contenido del neurotransmisor excitador glutamato y de todos los marcadores colinérgicos. Estos datos han llevado a plantear la hipótesis "excitotóxica" de este padecimiento (Hyman y cols., 1987; Kowal y Beal, 1991, ver figura 8).

Alteraciones membranales.

De las estructuras celulares, la membrana plasmática de las neuronas parece ser el sitio más susceptible de daño durante el proceso de envejecimiento. Es un hecho bien reconocido el declinar de las funciones membranales con la edad. Estudios realizados in vivo con la técnica de espectroscopía de resonancia magnética (^{31}P), en voluntarios normales de diferentes edades, señalan una disminución en los niveles de monoésteres de fosfato y un incremento en los diésteres de fosfato por arriba de los 50 años de edad (Panchalingam y cols., 1990). Estos hallazgos probablemente correlacionan con la pérdida de procesos neuríticos durante la senectud. Este mismo tipo de estudios realizados en pacientes con EA muestran, en etapas iniciales del padecimiento, niveles altos de monoésteres de fosfato, seguido de un incremento, en etapas avanzadas, de los diésteres de fosfato, lo que marca una diferencia en el metabolismo de los fosfolípidos con respecto al envejecimiento normal. Lo anterior lleva a la conclusión de que las alteraciones primarias y específicas en los componentes estructurales de la membrana pueden participar activamente en los mecanismos de neurodegeneración que ocurren en la EA.

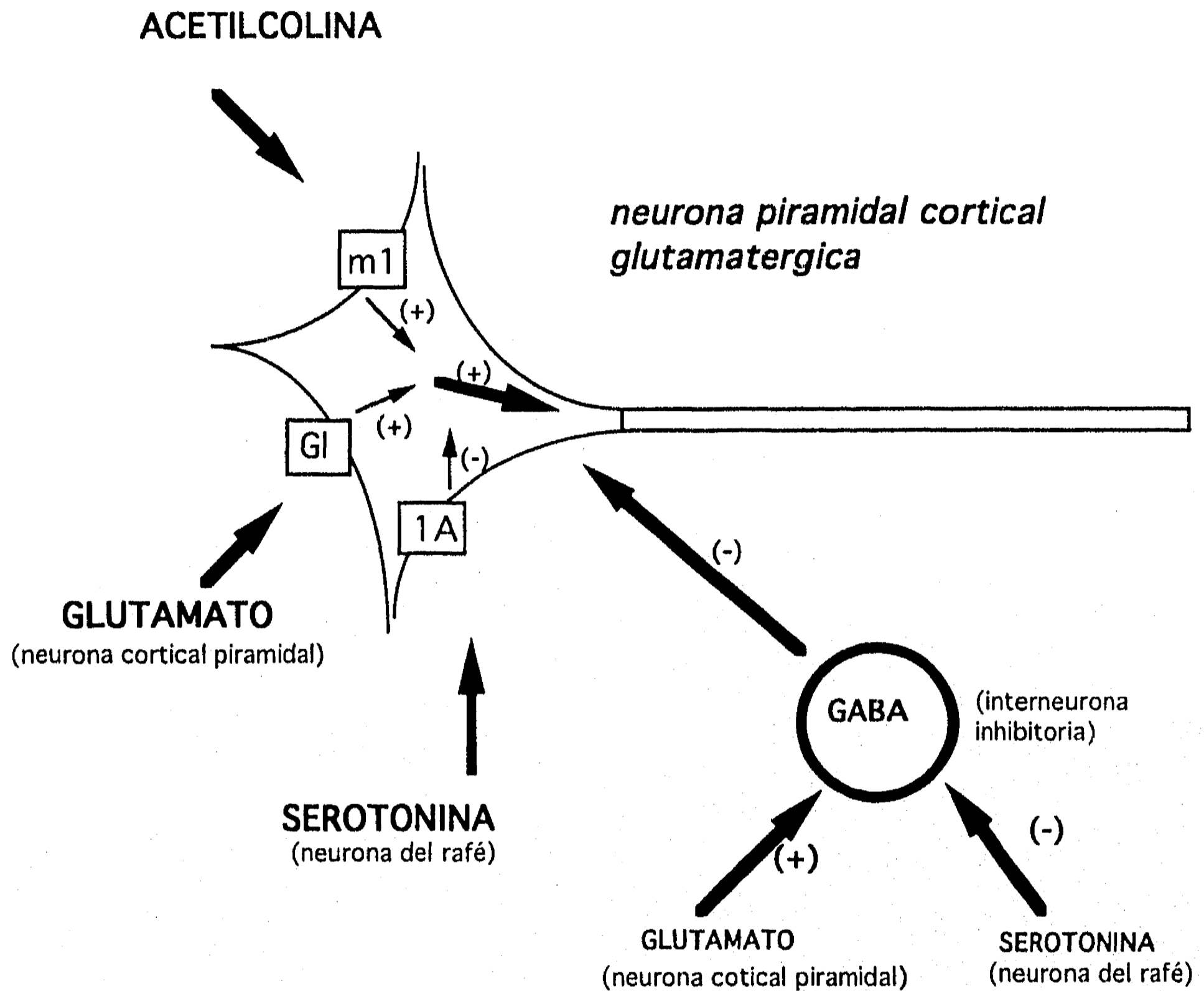


Figura 8 Representación esquemática del efecto de algunos neurotransmisores sobre una neurona cortical piramidal glutamatergica. En la EA se ha observado pérdida de este tipo de neuronas lo que lleva a una reducción de la transmisión excitadora. Las neuronas gabaérgicas se conservan, por lo que el tono inhibitorio tal vez se encuentre incrementado. En la figura aparecen los diferentes receptores a través de los cuales se excita (+) o inhibe (-) la neurona piramidal.

Otros estudios in vivo han descrito cambios en el metabolismo energético mitocondrial evidenciados en la relación PCr/Pi. Una disminución de la fosfocreatinina (PCr) probablemente refleja un esfuerzo metabólico adicional para mantener niveles energéticos adecuados en el cerebro de pacientes con EA. Estos análisis han llevado a concluir que los precursores inmediatos del ATP (ADP y PCr) se encuentran disminuídos en etapas tempranas del padecimiento, lo cual significa que el cerebro de pacientes con Alzheimer se encuentra bajo condiciones severas de estrés oxidativo que puede ser causa de la disfunción neuronal (Pettegrew y cols., 1994).

Factores tróficos y mecanismos de transducción de señales.

Siendo una parte vital del funcionamiento neuronal los mecanismos que permiten la emisión, recepción y procesamiento de señales, alteraciones de algunos de estos mecanismos pueden llevar a la muerte neuronal. En particular se han descrito alteraciones en la transducción de señales en asociación con los marcadores patológicos en la EA. Además del papel que pueden desempeñar las diferentes señales externas, en el proceso de la neurodegeneración, existe múltiple evidencia de alteraciones de la maquinaria molecular intracelular encargada de la transducción de tales señales. Así, se ha documentado una disfunción de proteínas G relacionada con las alteraciones del citoesqueleto (McLaughlin y cols., 1991), así como cambios en los mecanismos que generan AMPc y la consecuente activación de la proteína cinasa A (Ohm y cols, 1991). Por otro lado, se han encontrado cambios en el metabolismo del inositol trifosfato (IP3) en fibroblastos de pacientes con EA. Finalmente, también parece haber alteraciones en la actividad de la proteína cinasa C y cambios en la tasa de fosforilación y

desfosforilación de proteínas (Horsburgh y Saitoh, 1994). Por otro lado, la ausencia o pérdida de alguno de los factores neurotróficos ha sido propuesto como el proceso que inicia la neurodegeneración (Stopa y cols., 1990). Sin embargo, no ha sido posible confirmar deficiencia del factor de crecimiento neural (NGF) ni del número de sus receptores, y las neuronas que degeneran en la EA no son sólo del tipo de neuronas dependientes de NGF. Otro factor, de la misma familia que el NGF que se conoce como factor derivado del cerebro (BDNF) parece estar más involucrado, ya que se ha demostrado una reducción en los niveles de su ARNm en el hipocampo de pacientes afectados. Muy recientemente, el interés se ha enfocado hacia el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), en virtud de que este factor trófico da soporte vital a una variedad mucho más grande de neuronas que el NGF cuyo blanco son preferentemente neuronas colinérgicas. En la EA el bFGF se encuentra marcadamente elevado en neuronas en asociación con las placas neuríticas (Stopa y cols., 1990). Se ha descrito también una disminución importante del factor inhibitorio del crecimiento (GIF), la cual podría ser responsable del incremento en la actividad neurotrófica que resulta en una arborización aberrante de procesos neuronales y eventualmente lleva al tipo de muerte neuronal observada en la EA (Uchida y cols., 1991).

Factores ambientales y EA.

Cada vez existe mayor información acerca de la participación de diferentes agentes como el calcio, aluminio, sílice y zinc en la patogénesis de algunos procesos neurodegenerativos.

El aluminio (Al) se ha encontrado depositado en el centro de las placas seniles y

en las neuronas que contienen las marañas neurofibrilares. Estas observaciones han sugerido que la exposición al Al puede ser un factor ambiental importante que desencadene una serie de mecanismos patológicos que lleven a la neurodegeneración en la EA.

La exposición diaria al Al ocurre de manera amplia sobre todo por ingesta de alimentos y de agua. Poco se conoce acerca de la absorción de este elemento a través del tracto digestivo cuando se encuentra en forma insoluble, pero el Al disuelto en el agua puede ser absorbido fácilmente. Una predicción sobre la hipótesis de que el Al pueda desencadenar EA es que individuos muy expuestos a este elemento tendrían un mayor riesgo para desarrollar la enfermedad, pero los estudios epidemiológicos no han aportado datos para apoyar esta hipótesis. Otro tipo de estudios han sido sobre la determinación de la concentración de Al en huesos y en cerebro, y en ellos tampoco se ha encontrado una correlación significativa. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de un efecto tóxico del Al que requiera una exposición crónica (Michel y cols., 1990).

A raíz del hallazgo sobre los efectos deteriorantes del zinc sobre las facultades cognoscitivas en pacientes con EA, la posibilidad de una conexión entre ambos ha cobrado gran actualidad. De hecho, en un estudio de 1994 se ha demostrado que este catión puede ser un elemento importante en la formación de placas amiloideas al inducir su agregación y precipitación. Sin embargo, estos estudios son incipientes y no aclaran las condiciones que llevan a la neurodegeneración selectiva de ciertas neuronas ni al proceso de maduración de las placas seniles hacia su forma neurítica (Bush y cols., 1994).

Respuesta celular en la EA (astroglía y microglía).

La presencia de daño neuronal, sea cual sea su origen primario, siempre induce la rápida proliferación de glía reactiva y de microglía en el sitio de la lesión. Tanto los astrocitos como la microglía son capaces de producir APP en cantidades similares a las encontradas en las neuronas, y también es un hecho indiscutible el hallazgo de microglía en el centro de las placas seniles maduras. Una de las señales que estimula enormemente la producción de APP parece ser la citocina interleucina 1 (IL-1) cuya fuente, en el sistema nervioso central es precisamente la microglía. En pacientes con EA y en sujetos con síndrome de Down, los niveles de IL-1 se encuentran muy elevados en los astrocitos y en la microglía. La microglía activada en el sitio de una lesión también produce glutamato, el cual puede inducir o agravar un estado de toxicidad neuronal incrementando los niveles de Ca^{2+} intraneuronal. Además de la respuesta normal de la glía ante la presencia de daño neuronal, su introducción en un sistema celular en crisis puede generar la liberación de productos neurotóxicos e inducir el establecimiento de un círculo vicioso capaz de agravar la pérdida celular (Nieto-Sampedro y Mora, 1994).

Factores genéticos

El análisis molecular de la EA se ha enfocado a los dos tipos de lesiones histopatológicas predominantes: las placas de amiloide y las marañas neurofibrilares. Ambos marcadores morfológicos contienen filamentos proteínicos que pueden modificar profundamente la integridad estructural de las neuronas y ser causa de la distrofia y muerte celular.

Una de las aproximaciones moleculares al estudio de la EA ha llevado a un gran

número de grupos de investigación a efectuar análisis genéticos de grupos familiares muy grandes, en donde se ha descrito un patrón de herencia dominante para esta enfermedad (Breitner y cols., 1988). Cabe señalar en este punto que no en todos los individuos estudiados con EA, presentan un patrón de herencia típico. De esta manera existen grupos de enfermos con antecedentes hereditarios y muchos otros que aparentemente padecen la EA de manera esporádica. La edad de aparición es variable y abarca desde la tercera hasta la novena décadas, aunque en la mayoría de los casos ocurre alrededor de la sexta. Por mucho tiempo se ha sospechado de la alteración de un gen, y se ha propuesto la dominancia autosómica con una penetrancia dependiente de la edad, como un modelo de herencia (Rocca y cols., 1986).

Antes de 1988 la similitud neuropatológica entre la EA y el síndrome de Down (trisomía 21) llevó a varios investigadores a enfocarse en el cromosoma 21 como probable candidato para contener un gen alterado en asociación con este padecimiento. Investigaciones sobre esta asociación cobraron ímpetu al ser clonado el gen de la APP, localizado en el cromosoma 21 y describirse, en cuatro familias con miembros afectados por la EA de inicio temprano, análisis de ligación positiva para el cromosoma 21 (St George-Hyslop y cols., 1987). También se conocen mutaciones en el gen de la APP en la EA de inicio temprano, pero estos casos no suman más del 3% del Alzheimer familiar. Otras mutaciones estudiadas y atribuidas al cromosoma 21 parecen no corresponder al locus de la APP. Hasta el momento se han documentado 6 mutaciones en el gen de la APP: una segregó con la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis; tres se asociaron con EA corroborado por autopsia; uno se reportó en un paciente con EA

familiar sin estudio de necropsia y uno más se asoció con demencia presenil y hemorragia cerebral. Una de las mutaciones en el gen de la APP mejor documentada es la mutación del par de bases 2149 del gen de la APP que induce un cambio G-T y altera el aminoácido 717 del transcrito de la APP₇₇₀ (Chartier-Harlin y cols., 1991). Otra mutación relacionada con el Alzheimer familiar en el gen de la APP es la que ocurre en los codones 670/671 que cambian Lis→Asn y Met→Leu (Citron y cols., 1991).

Resultados más recientes han confirmado que un grupo mucho mayor de pacientes de inicio temprano señala hacia un locus genético en el cromosoma 14 (St George-Hyslop y cols., 1992). Algunos candidatos de genes que se localizan en el cromosoma 14q.24.3 incluyen α -1-antiquimotripsina, c-fos, y una de las proteínas de choque térmico. La región promotora del gen de la APP contiene elementos promotores de "choque térmico" los cuales podrían activarse por trauma, anoxia, alcohol así como un elemento promotor de c-fos que podría también activarse por los eventos anteriores. Muy recientemente se ha identificado este gen del cromosoma 14, cuya alteración parece ser responsable del 70-80% de la EA familiar y del 5-10% de todos los casos de EA (Sherrington y cols., 1995). El producto de la expresión de este gen es la proteína S182, la cual, por su similitud con la proteína SPE-4 del nemátodo *C. elegans*, podría ser una proteína membranal con función transportadora de otras proteínas en distintos compartimentos celulares. Como entre esas proteínas está la APP, una hipótesis es que ésta no se transporte adecuadamente cuando el gen S182 está defectuoso, y como consecuencia se facilite su hidrólisis en el sitio que genera el fragmento β AP, como se revisó anteriormente.

En 1991 Pericak-Vance y cols. describieron en pacientes con EA de inicio tardío, asociación con el cromosoma 19. Estudios posteriores llevaron a localizar al gen de la ApoE4 en el cromosoma 19 y a relacionar la presencia del alelo E4 con la EA familiar de origen tardío y con muchos casos de EA esporádica.

Desafortunadamente, la aparente heterogeneidad causal en la EA puede ser el reflejo de la participación de diferentes defectos en un gen, de alteraciones de múltiples genes y factores ambientales que afectan de manera no determinada los eventos de recombinación genética de manera individual.

Un estudio muy reciente realizado en un grupo familiar del Volga que padecen la EA de inicio temprano y con un patrón genético autosómico dominante, ha encontrado la presencia de un locus para esta enfermedad en el cromosoma 1 (Levy-Lahad y cols., 1995). El producto del gen es la proteína denominada STM2 y tiene un 67% de homología con respecto a la proteína S182. Este patrón de similitud sugiere que ambas proteínas puedan tener en las células, funciones muy similares.

Bases moleculares para la terapia en la EA

Existen múltiples problemas para el desarrollo de una terapia racional en la EA. Una primera aproximación al diseño y búsqueda de fármacos sería la distinción de dos estrategias principales: a) la prevención o detención del daño neuronal, y b) la restitución de las funciones neuronales perdidas.

Además del problema inicial del diagnóstico, sobre el cual el clínico nunca tiene el 100% de certeza, el grado de avance con el cual se presentan los pacientes en cuando al deterioro cognitivo es muy variable, además de complicarse con la presencia

de otros signos y síntomas secundarios.

Drogas que mejoran la condición cognoscitiva. Hasta hace aproximadamente 30 años la disfunción cognitiva se trataba exclusivamente con drogas vasodilatadoras. Actualmente se han desarrollado fármacos cuya finalidad es restituir la memoria y mejorar el aprendizaje. Al ser reportadas las anomalías colinérgicas y por estar relacionado este neurotransmisor con los procesos de memoria, los esfuerzos terapéuticos se han enfocado a mejorar la transmisión colinérgica. Para esto se han utilizado inhibidores de la acetilcolinesterasa como el THA (tetrahidroaminoacridina) que administrada en dosis orales junto con lecitina ha demostrado mejorar la memoria verbal (Kwo-On-Yuen y cols., 1990). Muchos otros agentes colinérgicos se han probado como la arecolina, la oxotremorina, RS-86, la pilocarpina y el betanecol. Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha demostrado fehacientemente su eficiencia como alternativa terapéutica.

Control sobre la muerte neuronal. Otros enfoques terapéuticos han probado la posibilidad de drogas que retarden la muerte neuronal o mejoren la disfunción de las neuronas en las etapas iniciales del padecimiento. Para esto se han utilizado gangliósidos como el GM1 o compuestos como la L-acetil-carnitina, sin que ninguno de los dos haya demostrado ser de gran utilidad (Ala y cols., 1990; Spagnoli y cols., 1991). La veta terapéutica más promisorio para el futuro parece ser el lograr el diseño de compuestos capaces de: 1) frenar el autoensamblaje de la proteína tau, responsable del desarrollo de los FAH; 2) inhibir la producción de los fragmentos amiloidogénicos provenientes de la APP; o 3) impedir el daño por estrés oxidativo o por el incremento en el Ca^{2+} intraneuronal.

Se están realizando muchos progresos en la investigación de los mecanismos moleculares que desencadenan la muerte neuronal en la EA, lo cual permite pensar como posibilidad, tal vez no a tan largo plazo, contar con herramientas de ingeniería genética, como es la introducción de ciertos genes a partir de vectores virales modificados, que nos permitan detener la progresión de esta enfermedad tan incapacitante y ofrecer condiciones de vida digna a los ancianos con riesgo de padecerla.

Perspectivas para los estudios de la EA

Existen numerosas preguntas que deberán ser analizadas y contestadas mediante el empleo de las más diversas estrategias de análisis clínico y básico tales como: ¿Cómo deriva la proteína β AP del APP? ¿Cuáles son las diferentes rutas metabólicas de la APP para generar diferentes fragmentos amiloidogénicos? ¿Qué señales dentro del SNC regulan el metabolismo de la APP? ¿Cuál es la función normal de la APP y de la β AP? ¿Por qué existe una vulnerabilidad particular de ciertos grupos neuronales a la neurodegeneración? ¿Existe una correlación entre el ciclo celular y la muerte neuronal? ¿Cuáles son las causas directas de las alteraciones del citoesqueleto y en particular del metabolismo anormal de tau? ¿Qué determina la formación de los FHA y la muerte neuronal? y finalmente, ¿Las características funcionales, altamente especializadas, del cerebro influyen en la muerte celular después de un período de diferenciación y función normales?

Desde un punto de vista básico las respuestas a estas y otras preguntas darán luz sobre los mecanismos finales que determinan la muerte neuronal en la EA y nos

acercarán al conocimiento de sus causas primarias. Para el clínico estas mismas respuestas permitirán el diseño de estrategias terapéuticas que prevengan o retrasen esta devastadora patología y permitan ofrecer expectativas de vida más dignas para los enfermos con EA.

CAPITULO IV

La muerte neuronal en la Enfermedad de Alzheimer como paradigma.

Objetivos de la tesis:

Una limitación importante en los estudios básicos sobre la muerte neuronal en la EA proviene del hecho de no contar con un buen modelo animal que reproduzca las anormalidades celulares encontradas: defectos en el citoesqueleto -particularmente en los microtúbulos y sus proteínas asociadas- y expresión aberrante de la proteína β -amiloide y sus posibles efectos neurotóxicos. No son pocos los esfuerzos por desarrollar tales modelos animales y son dignos de mención los realizados en roedores transgénicos que han llevado al desarrollo de uno de los más cercanos modelos animales de la EA. Este modelo se basa en la sobre-expresión del gen de la APP con una mutación descrita en humanos (Games y cols., 1995).

Se han desarrollado también varios modelos *in vitro* en donde se ha intentado inducir la aparición de las alteraciones del citoesqueleto que llevan a la formación de los FHA. De estos modelos, la inducción de marcadores antigénicos relacionados con alteraciones en la proteína tau en neuronas expuestas a glutamato, parece ser una fuente importante de información sobre los mecanismos Ca^{2+} -dependientes de citotoxicidad (Mattson, 1995). Tomando algunas de las preguntas planteadas a lo largo de los anteriores capítulos, el objetivo general de la tesis es el siguiente:

Objetivo general: Estudiar el papel de los aminoácidos excitadores, la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, y de la β AP en la muerte neuronal que ocurre en la EA, en modelos animales *in vitro* e *in vivo*.

Una de las líneas de investigación importante en los estudios sobre muerte neuronal en la EA se ha enfocado en los mecanismos que controlan la fosforilación de proteínas del citoesqueleto. En relación con lo anterior, el primer objetivo particular de la presente tesis es el siguiente:

Objetivo 1: Utilizando al ácido okadaico como agente inductor de fosforilación de proteínas, estudiar la posible correlación entre la hiperfosforilación de MAP2 y tau y la neurodegeneración en cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos de rata y neuronas MSN derivadas de un neuroblastoma humano.

En el objetivo 2 se exploró los efectos de análogos de neurotransmisores excitadores sobre la proteína MAP2 del citoesqueleto y en la neurodegeneración:

Objetivo 2: Estudiar el curso temporal de la neurodegeneración en el hipocampo de la rata inducida por la aplicación *in vivo* de agonistas de glutamato y correlacionarlo con cambios en la proteína MAP2.

Por último, se estudiaron los efectos de la β AP sobre los mecanismos de liberación de neurotransmisores Ca^{2+} -dependientes y su probable participación en la muerte neuronal.

Objetivo 3: Estudiar el efecto del fragmento 25-35 de la β AP en los mecanismos Ca^{2+} -dependientes de liberación de aminoácidos en rebanadas de hipocampo de rata, con énfasis en los aminoácidos excitadores.

Okadaic Acid Induces Early Changes in Microtubule-Associated Protein 2 and τ Phosphorylation Prior to Neurodegeneration in Cultured Cortical Neurons

Clorinda Arias, Nishi Sharma, Peter Davies, and Bridget Shafit-Zagardo

Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, U.S.A.

Abstract: Microtubules and their associated proteins play a prominent role in many physiological and morphological aspects of brain function. Abnormal deposition of the microtubule-associated proteins (MAPs), MAP2 and τ , is a prominent aspect of Alzheimer's disease. MAP2 and τ are heat-stable phosphoproteins subject to high rates of phosphorylation/dephosphorylation. The phosphorylation state of these proteins modulates their affinity for tubulin and thereby affects the structure of the neuronal cytoskeleton. The dinoflagellate toxin okadaic acid is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. In cultured rat cortical neurons and a human neuroblastoma cell line (MSN), okadaic acid induces increased phosphorylation of MAP2 and τ concomitant with early changes in the neuronal cytoskeleton and ultimately leads to cell death. These results suggest that the diminished rate of MAP2 and τ dephosphorylation affects the stability of the neuronal cytoskeleton. The effect of okadaic acid was not restricted to neurons. Astrocytes stained with antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) showed increased GFAP staining and changes in astrocyte morphology from a flat shape to a stellate appearance with long processes. **Key Words:** Cytoskeleton—Microtubule-associated proteins—Phosphorylation—Neurotoxicity—Okadaic acid. *J. Neurochem.* **61**, 673–682 (1993).

The neuronal cytoskeleton is prominent in the development of neurite outgrowth, polarity, and the establishment and maintenance of synaptogenesis. Microtubules and their associated proteins play a significant role in the promotion of neurite extensions (Daniels, 1972; Black and Greene, 1982; Dinsmore and Solomon, 1991), the induction of distinctive morphologies between axons and dendrites (Binder et al., 1985; Matus 1988, 1990), axonal transport (Vale et al., 1985), neuronal plasticity (Mareck et al., 1980; Aoki and Siekevitz, 1985), and neuronal degeneration (Matsuyama and Jarvik, 1989). Microtubule-associated proteins (MAPs) interact with tubulin and in vitro systems promote the assembly of microtubules by lowering the critical concentration of tubulin required for polymerization (Murphy and Borisy,

1975). Among different MAPs, MAP2 and τ are objects of great interest because of the finding of abnormal deposition of these proteins in neurofibrillary tangles found in Alzheimer's disease. It is generally believed that the function of MAP2 and τ is to stabilize neurites. Transfection of τ and MAP2 cDNAs into fibroblasts results in a change from a loose network of microtubules into thick bundles of microtubules, typical of neuronal nerve processes (Kanai et al., 1989; Lewis and Cowan, 1990).

In the adult brain, two high molecular mass proteins (280 kDa), MAP2a and MAP2b, have been identified in dendrites and neuronal cell bodies. During early developmental stages, only MAP2b and MAP2c are present. The apparent molecular mass of MAP2c is 68 kDa (Couchie and Nunez, 1985; Riederer and Matus, 1985). τ consists of a family of developmentally regulated polypeptides (Kosik et al., 1989) with apparent molecular mass of 45–55 kDa. In rats, only two τ bands are identifiable in prenatal brains, and four to six bands in adults (Francon et al., 1982). Both the alternative splicing of τ mRNA (Himmler, 1989) and protein phosphorylation (Lindwall and Cole, 1984) contribute to the reported heterogeneity. MAP2 and τ possess a nearly identical microtubule binding domain (Lewis et al., 1989). In rat brain, MAP2 has been found in a variety of phosphorylation states (Tsuyama et al., 1987), which are thought to influence its affinity for microtubules, as well as for other proteins (micro- and neurofilaments). In cell-free systems, MAP2 can be efficiently

Resubmitted manuscript received December 15, 1992; accepted January 4, 1993.

Address correspondence and reprint requests to Dr. B. Shafit-Zagardo at Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave., Bronx, NY 10461, U.S.A.

Abbreviations used: DMSO, dimethyl sulfoxide; GFAP, glial fibrillary acidic protein; LDH, lactate dehydrogenase; MAP, microtubule-associated protein; OA, okadaic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PHF, paired helical filaments; PIPES, piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid); PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate.

phosphorylated by type II cyclic AMP-dependent protein kinase (Vallee, 1980; Theurkauf and Vallee, 1983), by protein kinase C (Akiyama et al., 1986), and by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (Schulman, 1984; Yamamoto et al., 1985; Goldenring et al., 1985). The regulatory subunit of type II cyclic AMP-dependent kinase binds to a 31-amino acid region of MAP2 (Rubino et al., 1989). MAP2 is dephosphorylated in vitro by protein phosphatases 1 and 2A (Yamamoto et al., 1988) and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase (Goto et al., 1985).

Little is known of how the phosphorylation state of MAP2 and τ is regulated in vivo and how the rate of phosphorylation or dephosphorylation could be related to normal and altered cell functions, nor is it clear which protein kinases and phosphatases are involved. Okadaic acid (OA) is a polyether C38 fatty acid isolated from a black sponge, *Halichondria okadai* (Tachibana et al., 1981), and is the major toxic component associated with diarrhetic seafood poisoning (for review, see Cohen et al., 1990). OA is a very potent neurotoxin to cultured cerebellar neurons (Fernandez et al., 1991) and to hippocampus when injected in vivo (Kowall et al., 1991). The OA effects on cells are attributed to its properties as a potent and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatases 1 and 2A (Bialojan and Takai, 1988). OA has virtually no effect on other protein phosphatases and protein kinases, although it has been demonstrated that inhibition of protein phosphatases by OA results in an apparent "activation" of protein kinases (Sassa et al., 1989; Fujiki et al., 1990). In view of this putative action as a protein phosphatase inhibitor, an increasing number of studies using OA have revealed novel processes that are controlled by phosphorylation/dephosphorylation mechanisms.

In the present study, we report that, in primary rat cortical neurons and in a human neuroblastoma cell line (MSN), low doses of OA induce dramatic early changes in the phosphorylation state of MAP2 and τ and alter the neural cytoskeleton prior to neurodegeneration.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

Cerebral cortical cultures were prepared from 17-day-old embryonic rats. The brains were removed, and dissected free of meninges, and minced with forceps in phosphate buffered saline (PBS)-glucose solution and incubated with 0.2% trypsin at 37°C for 30 min. The cortices were dissociated mechanically using a Pasteur pipet and the pellet resuspended in Eagle's minimum essential medium and Ham's (F-12) (1:1) with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin solution. The cells were plated at a density of 10^7 cells in 100-mm dishes precoated with poly-L-lysine. For immunocytochemical staining, cells were plated on poly-L-lysine-coated, 12-mm round coverslips in 35-mm diameter dishes. Cytosine arabinoside (10

μM) was added to cultures 3 days after plating to inhibit the replication of nonneuronal cells. The cultures were maintained in a humidified atmosphere (5% $\text{CO}_2/95\%$ air) at 37°C and fed twice a week for use after 10–12 days in vitro. The cultures were characterized immunocytochemically using specific markers for astroglial cells [glial fibrillary acidic protein (GFAP)] and microglia (RCA). By this approach, we determined that 70–80% of the cells in culture were neurons.

The human neuroblastoma cell line (MSN) was maintained in RPMI 1640 medium containing nonessential amino acids with 15% fetal calf serum in an atmosphere of 5% $\text{CO}_2/95\%$ air.

Electrophoresis and immunoblot

Cell cultures were washed in PBS buffer, and a heat-stable cytoplasm protein fraction was obtained by the modified method of Herzog and Weber (1978). Briefly, the cells were resuspended in 3 ml of extraction buffer [140 mM NaCl, 0.8 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] and centrifuged for 5 min at 300 g in a refrigerated centrifuge. The pellet was resuspended in 200 μl of piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) buffer (80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , and 100 mM PIPES, pH 6.8, with 0.1 mM PMSF and 0.1 mM leupeptin), and the mixture was frozen at -70°C for 2 h, thawed, and centrifuged at 300 g for 5 min. Pellets were resuspended in 200 μl of fresh PIPES buffer, homogenized, and centrifuged at 300 g for 5 min. Supernatants were retained. 0.75 M NaCl and 0.2% mercaptoethanol were added, and the mixtures were boiled for 5 min and centrifuged at 300 g for 10 min. The enriched heat-stable MAP supernatants were collected and stored at -20°C until use. The total amount of protein was determined by a Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.) analytical procedure.

Five micrograms of protein from primary neurons or MSN cells was loaded in a 5–8% gradient sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (Laemmli, 1970) and subsequently transferred to nitrocellulose paper by the method of Towbin et al. (1979). After 1 h of incubation in PBS solution containing 5% nonfat dry milk and 0.1% Tween-20, the blots were incubated with the following: AP-18 (1:50), which recognizes MAP2a, MAP2b, and MAP2c (Tucker et al., 1988); tau 46 (1:1,000), which recognizes a highly conserved domain in τ and MAP2 (Trojanowski et al., 1989) and PHF-1 (1:50), a monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope in a population of τ proteins that are associated with paired helical filaments isolated from extracts of Alzheimer's disease brain homogenates (Greenberg and Davies, 1990; Greenberg et al., 1992). After 2 h, the blots were washed in PBS/0.1% Tween 20 and subsequently incubated with goat anti-mouse IgG, horseradish peroxidase conjugate (1:1,000) for 2 h. Blots were washed with PBS/0.1% Tween 20, and immunodetection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL kit from Amersham, Arlington Heights, IL, U.S.A.) and detected on Kodak X-Omat film.

Immunocytochemistry and morphological analysis

Cells on coverslips were fixed in 100% methanol for 20 min on ice, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in Tris-saline buffer, and incubated with AP-18 (1:50), PHF-1 (1:50), and GFAP (1:300) for 2 h as described by Wolozin and Davies (1987). Immunodetection was performed with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) U.S.

ing AP-18 and tau 46, the staining pattern of MAP2b and MAP2c corresponded to that described at early stages of neuronal development (Tucker et al., 1988).

Incubation with OA

Cells were washed twice with Krebs-Ringer medium (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4). After a 15-min preincubation period, 10–250 nM OA (Moana BioProducts, Honolulu, HI, U.S.A.) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells and incubated at 37°C over time. DMSO used at a final concentration of 0.005–0.1% had no effect on cellular morphology or on MAP2 and τ electrophoretic mobility. The incubation with OA was stopped by washing the cells with extraction buffer, and the heat-stable proteins containing MAP2 and τ were obtained.

Alkaline phosphatase treatment

Heat-stable protein preparations were incubated at 37°C for 2 h or 6 h with 100 units/ml alkaline phosphatase (Sigma) in 0.1 M Tris, pH 8.4, 1 mM PMSF, and 10 μ g/ml leupeptin. Five micrograms of protein was loaded per lane.

Neurotoxicity assay

Cells were grown on 100-mm dishes and incubated with Krebs-Ringer medium in the presence of OA at 250 nM. Aliquots of the incubation medium were taken at 30, 60, and 90 min. In addition, after a 30-min incubation, OA was removed, fresh medium without OA was added, and the cells were incubated for an additional 24 h. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the overlying media was determined using the spectrophotometric method based on the measurement of NADH oxidation in a pyruvate-containing medium (Bergmeyer et al., 1963). The results are expressed as the percentage of maximal releasable LDH by cell lysis using 0.5% Triton X-100.

Trypan blue inclusion into dead cells was used as an additional measurement of cell death. Following treatment with OA, floating and adherent cells were removed from the flask and counted. MSN cells were removed by tapping the flask, whereas the neuronal cells were trypsinized. Cells were counted in a hemocytometer, and the number of dead cells was reported as a percentage of the blue cells versus the total number of cells. All cell preparations were counted in triplicate, and the assays were performed at least three times.

RESULTS

OA induced a decrease in the electrophoretic mobility of MAP2b, MAP2c, and τ in primary cultures from rat brain

Although AP-18 recognizes MAP2a, MAP2b, and MAP2c, only MAP2b and MAP2c are present in neurons at early developmental stages, as detected by immunoblotting in rat neuronal cultures (Cáceres et al., 1986; Tucker et al., 1988). With equal protein loading, there was less MAP2b relative to MAP2c in the heat-stable MAP fraction. In the presence of OA, a decrease in electrophoretic mobility of MAP2b and MAP2c was detected. Figure 1a shows the temporal course of the OA effects on MAP2. At 5 min after OA treatment, a shift in electrophoretic mobility of MAP2c, but not in MAP2b, was observed. After 15

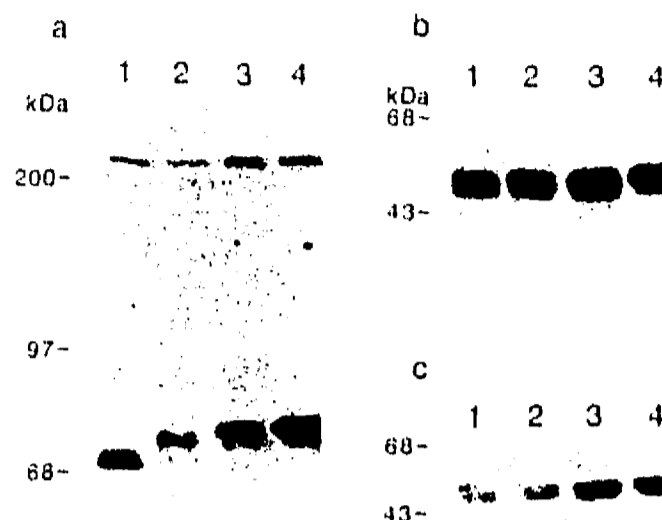


FIG. 1. Kinetics of OA effects on MAP2 and τ electrophoretic mobility. Immunoblotting was conducted using the following monoclonal antibodies: AP-18 to study changes in MAP2b and MAP2c (a; upper and lower bands, respectively), and tau 46 (b) and PHF-1 (c) to analyze changes in τ . Rat cortical neurons were incubated in the absence (lanes 1, controls) or presence of OA at a dose of 250 nM for 5 min (lanes 2), 15 min (lanes 3), or 30 min (lanes 4).

min, changes in the electrophoretic mobility of both MAP2b and MAP2c were detected, and no further changes were seen at 30 min or 90 min of incubation (data not shown). The monoclonal antibody tau 46, which recognizes the carboxy terminus of MAP2 and τ molecules, was used to study MAP2 and τ immunostaining. MAP2 immunostaining with tau 46 was identical to the staining pattern observed with AP-18 (data not shown). Although a shift in the migration of τ was detected, it was not of the same magnitude as observed for MAP2c and was only clearly detectable after 30 min of incubation with the drug (Fig. 1b). τ isolated from fetal brain is recognized by antibodies associated with PHF extracted from Alzheimer's disease brains (Kosik et al., 1986); therefore, we studied the effect of OA on fetal τ using the monoclonal antibody PHF-1. In Fig. 1c, we demonstrate the presence of PHF-1 immunoreactivity in untreated rat cortical neurons (lane 1) and following treatment with OA. As seen in lane 4, the shift in electrophoretic mobility was observed 30 min after OA treatment. These results indicate that τ protein as recognized by tau 46 and PHF-1 is a substrate of protein kinases and is phosphorylated at site(s) that causes a decrease in the electrophoretic mobility.

The effect of varying concentrations of OA on the electrophoretic mobility of MAP2 and τ in culture was determined by western blot analysis and immunoblotting. As shown in Fig. 2, 30-min pretreatment with OA induced changes in the electrophoretic mobility of both MAP2 and τ . The diminished mobility of MAP2 and τ proteins in the SDS-acrylamide gel was remarkable at 10, 25, and 250 nM (Fig. 2). Again, the pattern of staining with AP-18 and tau 46 was identical for MAP2b and MAP2c. No further changes were found at the higher dose of 500 nM (data not shown).

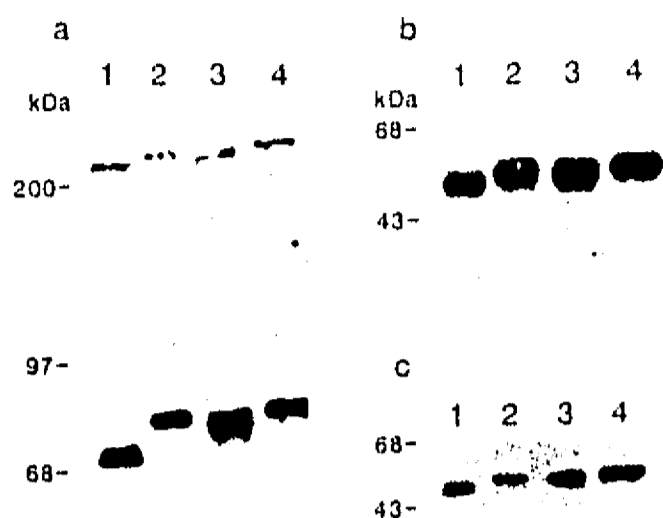


FIG. 2. Dose-response effects of OA on MAP2 and τ electrophoretic mobility. Cultured neurons were incubated in the absence (lanes 1, controls) or presence of OA at different doses [10 nM (lanes 2), 25 nM (lanes 3), and 250 nM (lanes 4)] for 30 min. The heat-stable protein fraction was resolved in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the proteins analyzed by western blot and immunoblot. **a:** MAP2b and MAP2c (upper and lower bands, respectively; AP-18). **b:** τ (tau 46). **c:** τ (PHF-1).

Human neuroblastoma cells (MSN) were also examined to determine whether MAP2b and MAP2c reacted with OA in an analogous fashion to the rat neuronal cultures. In MSN cells, the ratio of MAP2c to MAP2b protein is similar to that observed in primary neurons. When OA was applied at 250 nM to the MSN cells, a shift in the electrophoretic mobility of MAP2b and MAP2c was observed at 30, 60, and 90 min (Fig. 3a). In contrast to the results in primary neurons, 10 nM OA had no effect on the electrophoretic mobility of MAP2b or MAP2c (Fig. 3b).

Incubation of OA-treated heat-stable protein homogenates with alkaline phosphatase prior to electrophoresis and immunoblotting reversed the OA-induced decrease in electrophoretic mobility of MAP2b, MAP2c, and τ

The effect of incubating OA-treated heat-stable homogenates with alkaline phosphatase prior to electro-

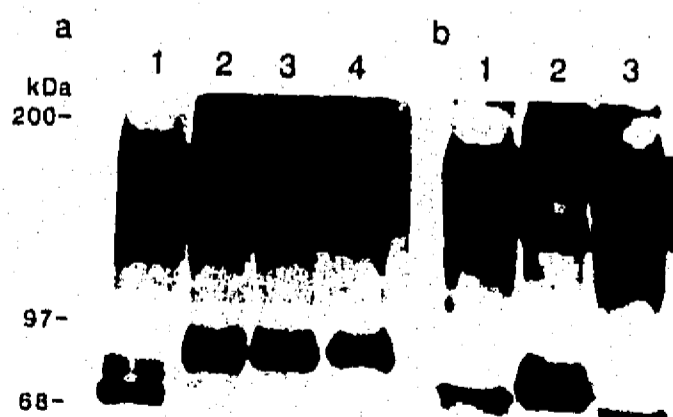


FIG. 3. OA effects on MAP2b and MAP2c from human neuroblastoma cells (MSN). **a:** Kinetics of the effects of 250 nM OA on MAP2b (upper bands) and MAP2c (lower bands): control (lane 1), 30 min (lane 2), 60 min (lane 3), and 90 min (lane 4). **b:** Dose-response effects induced by 30-min OA incubation on MAP2b (upper bands) and MAP2c (lower bands) electrophoretic mobility: control (lane 1), 250 nM (lane 2), and 10 nM (lane 3).

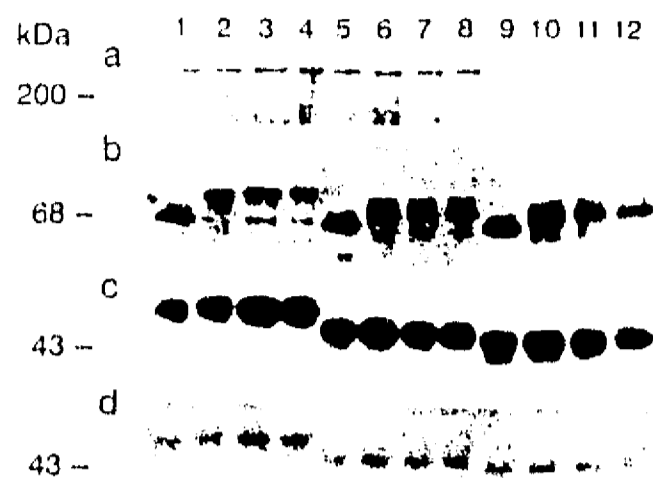


FIG. 4. Alkaline phosphatase reverses the electrophoretic shift of MAP2 and τ induced by OA treatment in rat cortical cultures. Immunoblotting was conducted using the monoclonal antibodies AP-18 (**a**, MAP2b; **b**, MAP2c), tau 46 (**c**, τ), and PHF-1 (**d**, τ). Rat cortical neurons were incubated in the absence (lanes 1, 5, and 9) or the presence of 250 nM OA for 5 min (lanes 2, 6, and 10), 15 min (lanes 3, 7, and 11), or 30 min (lanes 4, 8, and 12). Following OA treatment, equivalent amounts of heat-stable homogenate were incubated in either 0.1 M Tris, pH 8.4, containing 1 mM PMSF and 10 μ g/ml leupeptin (lanes 1-4), or 100 units/ml alkaline phosphatase in Tris buffer for 2 h (lanes 5-8) or 6 h (lanes 9-12). Five micrograms of heat-stable protein homogenates was loaded per lane.

phoresis and immunoblotting was examined to determine whether the effect of OA on MAP2 and τ was a direct result of protein phosphorylation. As shown in Fig. 4, increased migration of MAP2 (Fig. 4a and b) and τ (Fig. 4c and d) was observed following treatment with alkaline phosphatase. Both 2-h and 6-h treatments with 100 units/ml alkaline phosphatase were efficient in removing phosphates from these phosphoproteins. The data suggest that AP-18 recognizes a phosphorylated epitope on MAP2b; however, the intensity of MAP2c immunoreactivity does not appear to be affected by the OA or the alkaline phosphatase treatment. In Fig. 4d, PHF-1 recognized a phosphorylated epitope, and treatment with alkaline phosphatase decreased the immunoreactivity in both the control and the OA-treated samples.

Characterization of the morphological changes induced by OA

To determine whether inhibition of phosphatases results in changes in the neuronal cytoskeleton, rat primary cultures were treated with 250 nM OA over time and subsequently stained with antibodies for MAP2 (AP-18) or τ (PHF-1). In untreated cortical cultures, the majority of the neurons showed immunoreactivity to AP-18 (Fig. 5a). Staining was seen in the cell body and neurites. Following a 5-min incubation with OA, the pattern of staining of MAP2 and τ and the cellular morphology began to change. At 5-30 min, there was dramatic neurite retraction and clumping of cell bodies, with the majority of MAP2 immunoreactivity observed within the cell bodies (Fig. 5b-d).

PHF-1 immunoreactivity was present in almost all

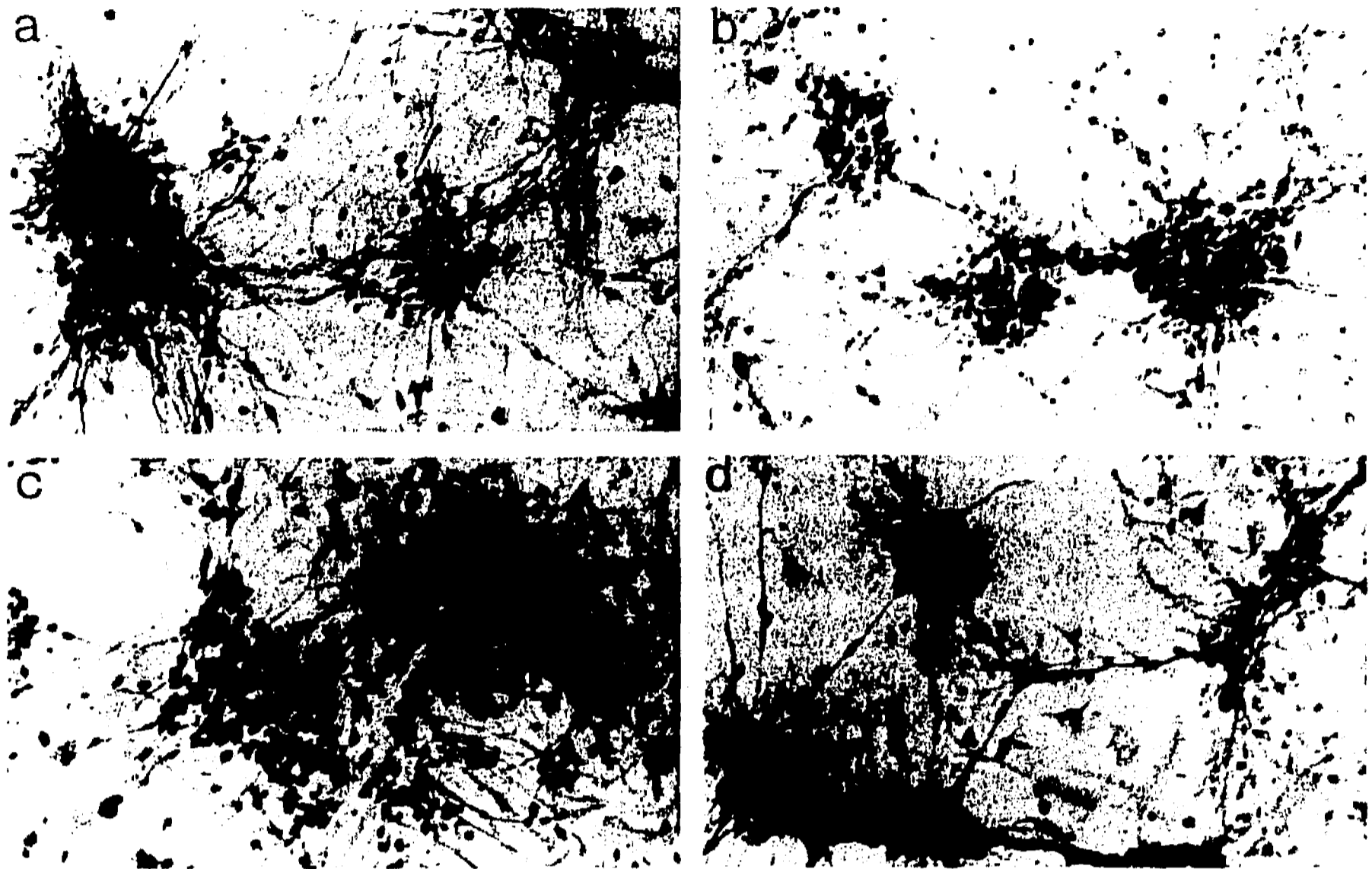


FIG. 5. Neuronal retraction and altered MAP2 staining observed in the presence of OA. a: Untreated rat cortical neurons (10 days in vitro) immunostained with the monoclonal antibody AP-18 to MAP2b and MAP2c. Staining is observed in cell bodies and dendrites. After 250 nM OA exposure for 5 min (b), 15 min (c), and 30 min (d), an increase in the MAP2 immunoreactivity is observed over time while neuronal processes retract. Magnification: $\times 42$.

neurons and was seen mainly in neuronal processes. The pattern of staining was different from that of AP-18, as PHF-1 stained axonal processes and bundles of fibers (arrowhead) that connected groups of neurons and only sparse staining was observed in neuronal soma (Fig. 6a). Following a 5-min (Fig. 6b) and 15-min (Fig. 6c) incubation with 250 nM OA, the pattern of PHF-1 staining was clearly different. An increase in PHF-1 immunostaining within cell bodies was observed. In addition, degeneration of the neuronal branches, as well as the fiber bundles, was detected after a 30-min OA exposure (Fig. 6d).

Although MSN cells are devoid of well defined neuritic processes, short exposure to OA (15–30 min) induced retraction of the small branches and the cells became detached from the coverslips (Fig. 7).

To determine whether proliferating glial cells would have a protective effect on the cultured neurons in the presence of OA, cultures were grown in the absence of cytosine arabinoside and then were stained with AP-18 and PHF-1. OA-treated cultures, stained with AP-18 or PHF-1, demonstrated the same morphology in the presence and absence of the previously added cytosine arabinoside (data not shown). As shown in Fig. 8, astrocytes within the culture were affected dramatically by OA. Glial cells stained with

antibodies to GFAP showed changes in shape and intensity of staining. Prior to OA treatment, the majority of the astrocytes were flat with short processes (Fig. 8a). After exposure to 250 nM OA for 15 min (Fig. 8b) and 30 min (Fig. 8c), the astrocytes appeared stellate with long processes. Cultures stained with RCA, a lectin used to characterize microglia, appeared unchanged following OA treatment (data not shown).

Neurotoxicity assay

LDH activity was monitored as a tool to evaluate neuronal death during the course of the experiments. Figure 9 shows the activity of this enzyme expressed as a percentage of the maximum LDH activity releasable after 30-, 60-, and 90-min incubation with 250 nM OA and at 24 h following a 30-min exposure to 250 nM OA. The LDH release experiments showed that at 24 h more than 50% of the total enzyme was released from damaged neurons. In addition, trypan blue incorporation into cells was examined following treatment with OA. In the neuronal cultures and the MSN cells, there was no difference in the untreated control, DMSO-treated cells, or OA-treated cells at 90 min: approximately 1% of the cells were trypan blue-positive. At 24 h, 26% of the OA-treated neuronal cells were trypan blue-positive; the untreated controls

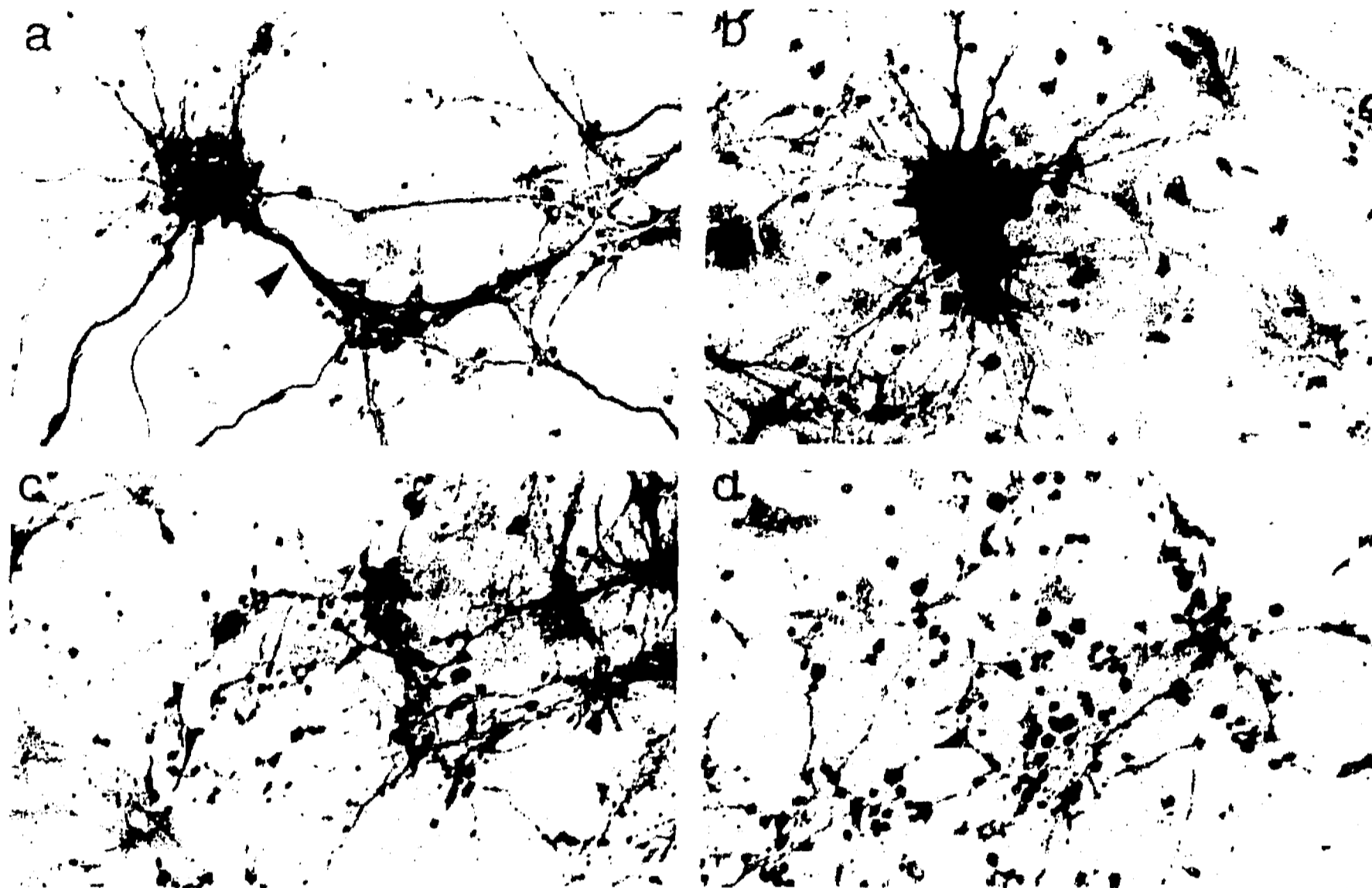


FIG. 6. Increased τ immunostaining and degeneration of fiber bundles and neuronal branches following OA treatment. Rat cortical neurons (10 days in vitro) were immunostained with the monoclonal antibody PHF-1. a: Basal levels of immunolabel and the well defined bundles of fibers (arrowhead). After 250 nM OA exposure for 5 min (b), 15 min (c), and 30 min (d), the pattern of PHF-1 staining is increased within cell bodies and the degeneration of fiber bundles and neuronal branches is evident. Magnification: $\times 83$.

incubated in the Krebs–Ringer medium for the same period of time had 33% trypan blue-positive cells. The total cell numbers in the OA-treated cultures and the untreated cultures were not dramatically different (4.7×10^6 versus 3.3×10^6 cells). MSN cells treated with OA in Krebs–Ringer solution for 5.5 h or 24 h had 13% and 38% trypan blue-positive cells, respectively, as compared to 9% in the DMSO-treated or untreated control cells.

DISCUSSION

OA induces electrophoretic shifts in MAPs

The toxin OA causes remarkable and early changes in the electrophoretic mobility of MAP2 and τ and has dramatic effects on the cytoskeleton. Alkaline phosphatase treatment of heat-stable homogenates previously treated with OA reversed the induced shift in the electrophoretic mobility of MAP2 and τ proteins, demonstrating that OA affects phosphorylation as a result of protein phosphatase inhibition. Although OA is a potent neurotoxin (Fernandez et al., 1991; Kowall et al., 1991), we have demonstrated that neurons and astrocytes are affected by OA before any neurotoxicity is evident. Microglia appear to be unaffected at the times and doses examined.

Both MAP2b and MAP2c were affected by OA, but the changes in MAP2c preceded those of MAP2b. The change in MAP2c was observed after 5-min OA treatment, whereas the changes in MAP2b were observed at 30 min. In addition, the shift in the electrophoretic mobility of MAP2c was more dramatic than was observed for MAP2b. MAP2c lacks a large portion of the projection arm of MAP2b, and the absence of this region may lend flexibility to neurons during development. Also, MAP2c is not as efficient as MAP2b in binding to microtubules. It is possible that differential phosphorylation of MAP2b and MAP2c is involved in creating this flexibility. This hypothesis would be supported by the morphologic data, which demonstrate retraction of neurites in the presence of OA.

MAP2 and τ are efficiently dephosphorylated in vitro by protein phosphatases 1 and 2A (Yamamoto et al., 1988) and by the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin (protein phosphatase 2B; Goto et al., 1985). Protein phosphatase 2A is inhibited completely by 1 nM OA, whereas protein phosphatase 1 is resistant to this concentration, but is inhibited completely by 1 μM in vitro (Bialojan and Takai, 1988) and in vivo (Haystead et al., 1989). Our results suggest that protein phosphatase 1 and 2A are

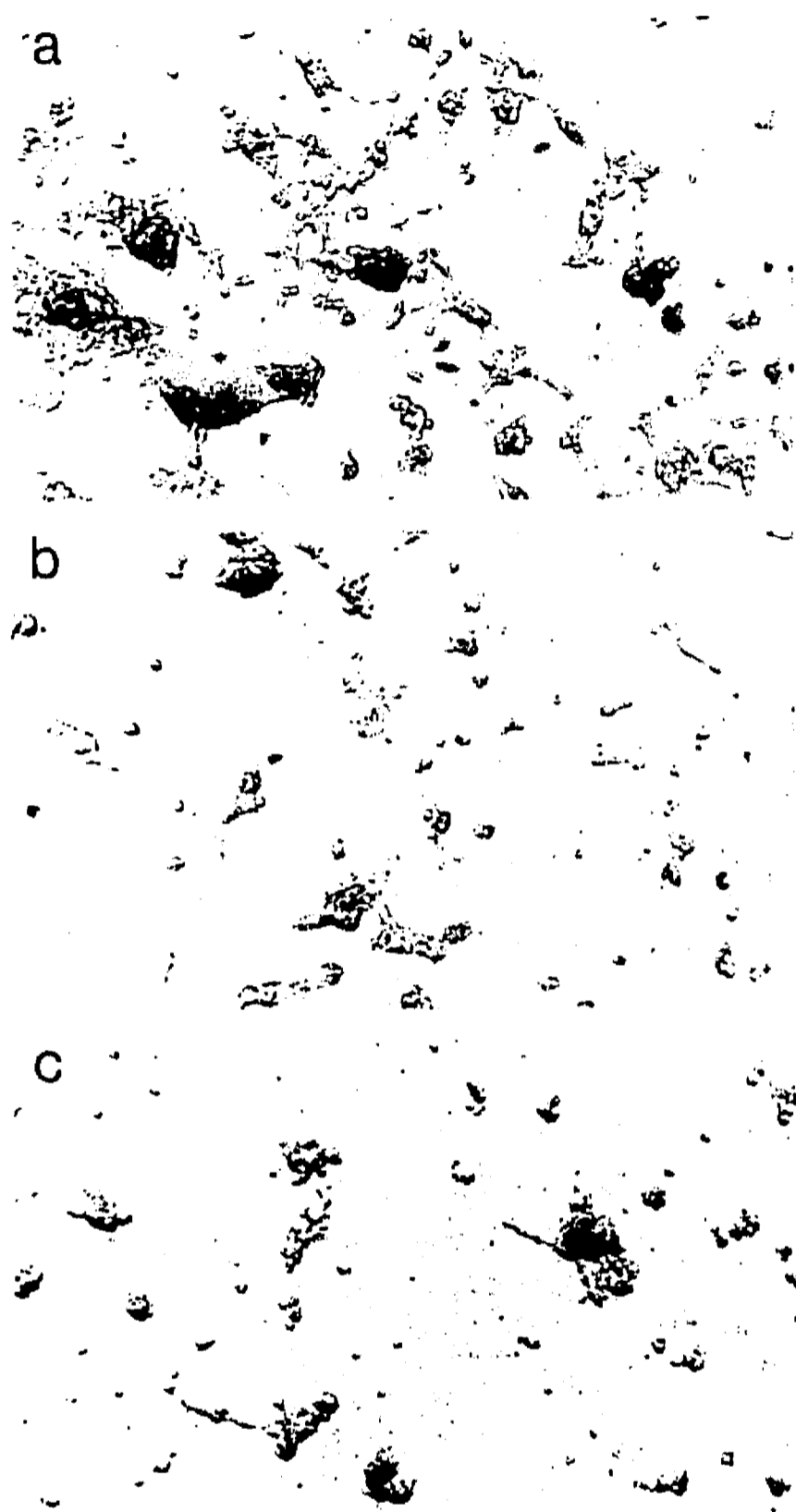


FIG. 7. OA effects on human neuroblastoma cell (MSN) morphology. MSN cells were plated on coverslips and visualized directly by using a phase-contrast microscope. **a**: Normal morphology of MSN cells. Also shown are MSN cells after 15-min (**b**) and 30-min (**c**) exposure to 250 nM OA. Magnification: $\times 78$.

involved in MAP2 and τ dephosphorylation in cultured neurons and that protein phosphatase 2A may be more involved in view of the remarkable change observed in MAP electrophoretic mobility induced by OA at the lowest concentration of 10 nM. All effects on intact cells were maximal at 250 nM. However, heat-stable MAP2b and MAP2c extracted from the human neuroblastoma cell line MSN were unaffected by 10 nM OA, but were affected by 250 nM. This may be due to the tumorigenic nature of the MSN cells.

Two subcellular distributions of τ have been reported in neurons: a highly phosphorylated τ mainly located in the somatodendritic compartment, and a

less phosphorylated τ in axons (Papasozomenos and Binder, 1987). Biochemical evidence suggests that abnormal τ from Alzheimer's disease brains is found in the somatodendritic compartment (Delacourte et al., 1990). If this is the case, OA-induced increases in phosphorylation of τ -related PHF proteins and the change in subcellular distribution observed may be a useful system to study abnormal deposition of cytoskeletal proteins due to changes in phosphorylation. In rat cortical cultures treated with OA, a change in the electrophoretic mobility of τ was observed with tau-46 and PHF-1. The fetal human and rat forms of τ



FIG. 8. OA effects on the astrocyte cytoskeleton. Cultures were stained with anti-GFAP. Prior to OA exposure, astrocytes are flat and with short processes (**a**). After exposure to 250 nM OA for 15 min (**b**) or 30 min (**c**), the astrocytes appear stellate and extended processes are evident. Magnification: $\times 155$.

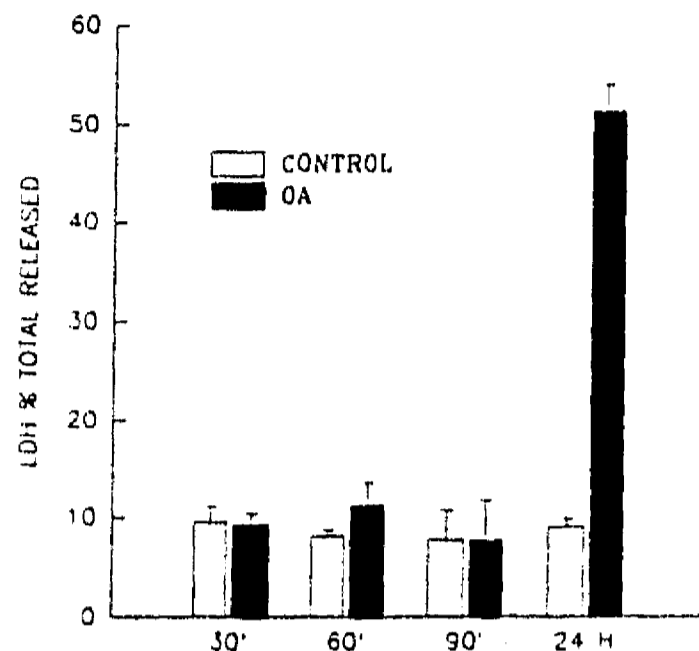


FIG. 9. Early cytoskeletal changes precede OA-induced cell death. The soluble enzyme LDH was used as an index of neuronal death after OA exposure. Cortical neurons were plated in 100-mm dishes, and the assay was conducted by removing aliquots of the Krebs-Ringer medium after 30, 60, and 90 min in the presence of 250 nM OA and at 24 h following a 30-min exposure to 250 nM OA. The results are expressed as percentage of the maximum LDH activity releasable by cell lysis using 0.5% Triton X-100. Each bar represents the mean \pm SEM of four experiments.

are highly reactive to PHF antibodies produced by immunization with PHF extracts from Alzheimer's disease brains (Kosik et al., 1986; Greenberg and Davies, 1990; Greenberg et al., 1992).

OA induces morphological changes in cultured neurons leading to neurodegeneration

OA induced early increases in phosphorylation of MAP2 and τ that preceded neuronal death. The neurotoxic effect of OA was quantified in cultured neurons at different times by measuring the activity of the cytosolic enzyme LDH and by trypan blue. At 24 h, more than 50% of the total enzyme activity was found in the incubation medium and many neurons were detached from the plate. As measured by trypan blue exclusion, not all of the detached cells were dead. During the first 90 min of incubation, there was no detectable release of the LDH into the cellular medium and less than 1% of the total cell population was trypan blue-positive. At 90 min, we observed dramatic changes in the electrophoretic mobility of MAP2 and τ and alterations in neuronal morphology. From the well documented mechanisms of action of OA and in view of the proposed role of MAPs in neurite formation and stabilization, the disruption of the neural network that starts with neurite retraction and leads finally to neuronal degeneration might be reflected by either direct or indirect changes in the phosphorylation equilibrium of MAP2 and τ . An indirect way in which these MAPs might be affected could be by phosphorylation of a protein such as Ca^{2+} channels, which may result in increased intracellular Ca^{2+} levels, which, in turn, might increase phosphorylation

of MAPs and alter neuronal morphology. We have determined that a range of concentrations of the Ca^{2+} ionophore A23187 alters the electrophoretic mobility of MAP2 over time; however, none of these conditions results in the morphologic changes observed in the presence of OA (manuscript in preparation). Our data are in agreement with those of Chiou and Whitehead (1992), who propose that protein phosphatase activity is essential for maintaining neurite outgrowth.

OA is not specific for phosphatase activity on MAP2 or τ and is capable of inhibiting the dephosphorylation of a wide array of cellular proteins. OA-induced rounding of monolayer neuroblastoma cells, condensation of chromatin, and reorganization of the cytoskeleton typical of apoptosis rather than necrosis have been reported (Boe et al., 1991). Disruption of the neurofilament network in rat dorsal root ganglion neurons with 1 μ M OA following 30 min of treatment has been observed (Sacher et al., 1992). In the presence of nanomolar amounts of OA, neurite degeneration was detected in nerve growth factor-primed PC12 cells (Chiou and Whitehead, 1992). In a cell-free system, OA induced changes in the dephosphorylation rate of B-50, a phosphoprotein related to neural development and neurotransmitter release (Han and Dokas, 1991), and in cerebellar granule cells Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II was also affected (Fukunaga et al., 1989); however, in these studies, the dose of OA was higher and time of exposure was considerably longer.

In conclusion, OA is an extremely powerful tool for studying the regulatory processes involved in the phosphorylation/dephosphorylation of cytoskeletal proteins in living neurons, and allows for the study of mechanisms of neural degeneration that have been proposed to involve abnormal protein phosphorylation.

Acknowledgment: We are grateful to Drs. V. Lee and L. Binder for the use of tau 46 and AP-18, respectively. We would like to thank Drs. N. Carrasco, S.-H. Yen, T. Calderon, and I. Vincent for their helpful comments. This work was supported by National Institutes of Health grant AG06803.

REFERENCES

- Akiyama T., Nishida E., Ishida J., Saji N., Ogawara H., Hoshi M., Miyata Y., and Sakai H. (1986) Purified protein kinase C phosphorylates microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* **261**, 15648-15651.
- Aoki C. and Siekevitz P. (1985) Ontogenic changes in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulatable phosphorylation of cat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP 2): effects of normal and dark rearing and the exposure to light. *J. Neurosci.* **5**, 2465-2483.
- Bergmeyer H. U., Bent E., and Hess B. (1963) Lactic dehydrogenase. in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed), pp. 736-741. Academic Press, New York.
- Bialojan C. and Takai A. (1988) Inhibitory effect of marine-sponge

- toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**, 283-290.
- Binder L. I., Frankfurter A., and Rebhun L. E. (1985) The distribution of tau polypeptides in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* **101**, 1371-1378.
- Black M. M. and Greene L. A. (1982) Changes in the colchicine susceptibility of microtubules associated with neurite outgrowth: studies with nerve growth factor responsive PC12 pheochromocytoma cells. *J. Cell Biol.* **95**, 379-386.
- Boe R., Gjertsen B. T., Vintermyr O. K., Houge G., Lanotte M., and Doskeland S. O. (1991) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **195**, 237-246.
- Cáceres A., Banker G. A., and Binder L. (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **6**, 714-722.
- Chiou J.-Y. and Westhead E. W. (1992) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, inhibits nerve growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Neurochem.* **59**, 1963-1966.
- Cohen P., Holmes C. F. B., and Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98-102.
- Couchie D. and Nunez J. (1985) Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for immature brain. *FEBS Lett.* **188**, 331-335.
- Daniels M. P. (1972) Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro. *J. Cell Biol.* **53**, 164-176.
- Delacourte A., Flament S., Dibe E. M., Hublau P., Sablonnière B., Hémon B., Schérrer V., and Défossez A. (1990) Pathological proteins tau 64 and tau 69 specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **80**, 111-117.
- Dinsmore J. H. and Solomon F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neural differentiation. *Cell* **64**, 817-826.
- Fernandez M. T., Zitko V., Gascon S., and Novelli A. (1991) The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for cultured cerebellar neurons. *Life Sci.* **49**, 157-162.
- Francon J., Lennon A. M., Fellous A., Mareck A., Pierre M., and Nunez J. (1982) Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *Eur. J. Biochem.* **129**, 465-471.
- Fujiki H., Suganuma M., Nishiwaki S., Yoshizawa S., Winyar B., Sugimura T., and Schmitz F. J. (1990) A new pathway of tumor promotion compounds, in *The Biology and Medicine of Signal Transduction* (Nishizuka Y., Endo M., and Tanaka C., eds), pp. 340-344. Raven Press, New York.
- Fukunaga K., Rich D. P., and Soderling R. (1989) Generation of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 21830-21836.
- Goldenring J. R., Vallano M. L., and DeLorenzo R. J. (1985) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 at distinct sites by calmodulin-dependent and cyclic-AMP-dependent kinases. *J. Neurochem.* **45**, 900-905.
- Goto S., Yamamoto H., Fukunaga K., Iwasa T., Matsukado Y., and Miyamoto E. (1985) Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, τ factor, and tubulin by calcineurin. *J. Neurochem.* **45**, 276-283.
- Greenberg S. G. and Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct τ proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5827-5831.
- Greenberg S. G., Davies P., Schein J., and Binder L. I. (1992) Hydrofluoric acid-treated, PHF proteins display the same biochemical properties as normal τ . *J. Biol. Chem.* **267**, 564-569.
- Han Y.-F. and Dokas L. A. (1991) Okadaic acid-induced inhibition of B-50 dephosphorylation by presynaptic membrane-associated protein phosphatases. *J. Neurochem.* **57**, 1325-1331.
- Haystead T. A. J., Sim A. T. R., Carling D., Honnor R. C., Tsukitani Y., Cohen P., and Hardie D. G. (1989) Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* **337**, 78-81.
- Herzog W. and Weber K. (1978) Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. *Eur. J. Biochem.* **92**, 1-8.
- Himmler A. (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1389-1396.
- Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T., and Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* **109**, 1173-1184.
- Kosik K. S., Joachim C. L., and Selkoe D. J. (1986) Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4044-4048.
- Kosik K. S., Orecchio L. D., Bakalis S., and Neve R. L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**, 1389-1397.
- Kowall N. W., Beal M. F., McKee A. C., and Kosik K. S. (1991) Okadaic acid produces dose-dependent neurotoxic lesion and increased phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. (Abstr.) *J. Cell Biol.* **115**, 385a.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lewis S. A. and Cowan N. (1990) Microtubule bundling. *Nature* **345**, 674.
- Lewis S. A., Ivanov E., Lee G.-H., and Cowan N. J. (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* **342**, 498-505.
- Lindwall G. and Cole R. D. (1984) The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J. Biol. Chem.* **259**, 12241-12245.
- Mareck A., Fellous A., Francon A., and Nunez J. (1980) Changes in composition and activity of microtubule-associated proteins during brain development. *Nature* **284**, 353-355.
- Matsuyama S. S. and Jarvik L. F. (1989) Hypothesis: microtubules, a key to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8152-8156.
- Matus A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* **11**, 29-44.
- Matus A. (1990) Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J. Physiol. (Paris)* **84**, 134-137.
- Murphy D. B. and Borisy G. G. (1975) Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2696-2700.
- Papasozomenos S. C. and Binder L. I. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskeleton* **8**, 210-226.
- Riederer B. and Matus A. (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6006-6009.
- Rubino H. M., Dammerman M., Shafit-Zagardo B., and Erlichman J. (1989) Localization and characterization of the binding site for the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase on MAP2. *Neuron* **3**, 631-638.
- Sacher M. G., Athlan E. S., and Mushynski W. E. (1992) Okadaic acid induces the rapid and reversible disruption of the neurofilament network in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 524-530.
- Sassa T., Ritcher W., Uda N., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., and Hirota F. (1989) Apparent "activation" of

- protein kinases by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 939-944.
- Schulman H. (1984) Phosphorylation of microtubule-associated proteins by a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J. Cell Biol.* **99**, 11-19.
- Tachibana K., Scheuer P. J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y., and Schmitz F. J. (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2469-2471.
- Theurkauf W. E. and Vallee R. B. (1983) Extensive cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* **258**, 7883-7886.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Trojanowski J. O., Schuck T., Schmidt M. L., and Lee V. M.-Y. (1989) Distribution of tau protein in the normal human central and peripheral nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 209-215.
- Tsuyama S., Terayama Y., and Matsuyama S. (1987) Numerous phosphates of microtubule-associated protein 2 in living rat brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 10886-10892.
- Tucker R. P., Binder L. I., Viereck C., Hemmings B. A., and Matus A. I. (1988) The sequential appearance of low- and high-molecular-weight forms of MAP2 in the developing cerebellum. *J. Neurosci.* **8**, 4503-4512.
- Vale R. D., Reese T. S., and Sheetz M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- Vallee R. (1980) Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP 2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3206-3210.
- Wolozin B. and Davies P. (1987) Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann. Neurol.* **22**, 521-526.
- Yamamoto H., Fukunaga K., Goto S., Tanaka E., and Miyamoto E. (1985) Ca^{2+} , calmodulin-dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of microtubule-associated protein 2, τ factor, and tubulin, and comparison with the cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J. Neurochem.* **44**, 759-768.
- Yamamoto H., Saitoh Y., Fukunaga K., Nishimura H., and Miyamoto E. (1988) Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J. Neurochem.* **50**, 1614-1623.

**NEURONAL LOSS AND TEMPORAL CHANGES IN THE PATTERN OF MAP2
IMMUNOCYTOCHEMISTRY ELICITED BY KAINATE AND DIHYDROKAINATE IN RAT
HIPPOCAMPUS IN VIVO**

C. Arias, I. Arrieta, L. Massieu and R. Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México. AP 70-253, 04510-México, D.F., México.

Address correspondence to:

Ricardo Tapia, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510-México, D.F., México

Phone 52-5-6225642 Fax 52-5-6225607

Running title: MAP2 changes during excitotoxicity

Neurotoxicity mediated by excitatory amino acids is thought to play a role in slowly progressing neurodegenerative disorders. Alterations in cytoskeletal proteins have been associated with the formation of neurofibrillary tangles and with the mechanisms of neuronal death occurring in Alzheimer disease. In the present work single focal injections of kainate (KA) and of the glutamate transport inhibitor dihydrokainate (DHK) into rat dorsal hippocampus were used to determine if changes in the levels or distribution of the microtubule-associated protein MAP2 are associated with the mechanisms of neurotoxicity. After 3, 12, 24 and 48 after treatment, the hippocampus was studied by Nissl stain and immunocytochemistry of MAP2. At 3 h, both KA and DHK induced neuronal damage mainly in CA1 region, which was associated with loss of dendritic MAP2 immunoreactivity. Neuronal damage progressed at 12 and 24 h after drug exposure, and at this time accumulation of MAP2 into the somata of pyramidal neurons became evident. The neuronal damage and the changes in MAP2 induced by DHK were at all times restricted to the CA1 region and were totally prevented by the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist (+)-5methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801) but not by the non-NMDA receptor antagonist 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)-quinoxaline (NBQX). In contrast, after 12-48 h the KA-induced alterations included CA1, CA3 y CA4 subfields, and they were prevented by NBQX, but not by MK-801, only in CA1. These results show early MAP2 disruption associated with excitotoxicity produced by overactivation of different glutamate receptors located in discrete hippocampal regions.

Excitatory amino acid (EAA) neurotransmission in the mammalian central nervous system is mediated principally by glutamate and structurally related compounds, which under certain conditions become potent excitotoxins. Neurotoxicity mediated by excitatory amino acids (EAA), particularly glutamate, are thought to play a role in neurological disorders such as stroke, ischemia or slowly progressing neurodegenerative diseases^{5,6,7,12,13} and

Functional diversity of the glutamate actions is reflected by the presence of different receptor subtypes, that have been classified as: NMDA receptor, which recognizes N-methyl-D-aspartate and the non-NMDA receptors recognizing α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate (AMPA) or kainate (KA). At present, however, it is an open question which kind of EAA receptors is activated during an in vivo acute or chronic increase of the endogenous glutamate levels, and what is the contribution of the different EAA receptors in glutamate-induced neurodegeneration. The neurotoxic actions of glutamate can be observed by activation of different subtypes of glutamate receptors with specific agonist⁶ or by inhibiting its high affinity uptake²⁹.

Cytoskeletal proteins play important roles in maintaining neuronal form and function and appear to be abnormally processed in Alzheimer's disease¹⁷. Microtubule-associated proteins (MAPs) are a heterogeneous group of proteins that colocalize with microtubules. One of the most prominent MAPs is the heat-stable MAP2, which is involved in the stabilization of microtubules, the organization of intracellular organelles and in the maintenance of neuronal cytoarchitecture¹⁸. Moreover, MAP2 can function as a substrate for second messenger-regulated proteins, which suggests that it might play a role in transducing neurotransmitter signals in neurons³⁴. MAP2 is a dendritic phosphoprotein

which is very sensitive to proteolysis induced by ischemia or by EAA receptor agonists, both in vivo^{11,31,33,35} and in neuronal cell cultures¹⁶.

The aim of the present work was two fold: first, to study the temporal course of the KA-induced neurodegeneration, as related to changes in MAP2 neuronal distribution, in rat hippocampus in vivo. Second, to test whether similar changes could be produced by dihydrokainate (DHK), an inhibitor of the glutamate transporter^{2,15,26}. Furthermore, the specific NMDA receptor antagonist (+)-5methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801) and the non-NMDA receptor antagonist 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)-quinoxaline (NBQX) were tested as potential blockers of DHK- and KA-induced neuronal changes.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Stereotaxic injections.

Male Wistar rats (220-250 g weight) were used throughout the study. Animals were anesthetized with 3-4% halothane in 95% O₂/5% CO₂ mixture and secured in a stereotaxic frame with the nose bar positioned at -3.3 mm. Unilateral injections were made into following coordinates, with reference to bregma²⁵: A 3.8, L 2.6 and V 3.7. DHK and KA were dissolved in 1 M NaOH, and the pH was adjusted to 7.0-7.5 and brought to the desired volume with 10 mM phosphate buffer pH 7.4. KA (2 nmol/ μ l) and DHK (200 nmol/ μ l) were infused in a 1 μ l volume at a rate of 0.5 μ l/min, using a microsyringe mounted in a microinjection pump (Carnegie model CMA/100). Control animals were injected with 1 μ l of 10 mM phosphate buffer. When the effect of MK-801 was tested, it

was administered i.p. 30 min before intrahippocampal injection at a dose of 2 mg/kg. In the case of the non-NMDA receptor antagonist NBQX, the drug was coinjected in the hippocampus with KA or DHK, at a dose of 50 nmol/ μ l. NBQX was dissolved in 0.2 M NaOH, the pH was adjusted to 7.5-8.0 and brought to final volume with 10 mM phosphate buffer.

MAP2 Immunocytochemistry and Nissl staining.

At 3, 12, 24 or 48 h after intrahippocampal injections, the control and treated rats were anesthetized and perfused transcardially with 250 ml of 0.9% NaCl followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Brains were removed, left in fixative for 24 h, and transferred successively to 10, 20 and 30% sucrose (24 h each). Coronal 40 μ m thick sections were obtained in a cryostat and alternate sections from each brain were used for cresyl violet stain and for MAP2 immunocytochemistry. For immunocytochemistry, free-floating sections were incubated at room temperature for 30 min in phosphate buffer saline (PBS) containing 0.25% triton X-100 and 3% H₂O₂ and left overnight at 4°C in 5% albumin-PBS. Slices were then exposed for 72 h at 4°C to a 5% albumin-PBS solution containing the MAP2 primary antibody (5 μ g/ml). At the end of this period the slices were incubated twice with PBS (5 min each) and processed using the anti-mouse IgG (1:500) and the Vectastain ABC-biotin-avidin-peroxidase kit, with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative controls consisted of eliminating the primary antibodies from the procedure. Non-injected hippocampus from drug-treated rats, as well as phosphate buffer injected hippocampus from control rats, were evaluated as further negative controls. At least 4 cresyl violet and 4 MAP2

immunocytochemistry sections from each brain and 4-8 rats in each experimental group were examined.

Materials

Monoclonal antibodies to MAP2 were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), and secondary antibodies (anti-mouse IgG) from Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL, USA). To increase immunostaining, a Vectastain ABC biotin-avidin-peroxidase kit was used (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Paraformaldehyde was purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and KA, DHK, MK-801 and NBQX were from Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK).

RESULTS

Neurotoxic effect of KA and DHK

Intrahippocampal administration of KA induced neuronal loss, observed by Nissl staining, that began as early as 3 h, particularly in the CA1 area (Fig. 1a-d, top panels). After 12 h, neuronal loss progressed to involve pyramidal neurons in CA1, CA3-4 and some granular neurons in the dentate gyrus, which appeared pycnotic and intensely stained. This pattern of cell damage persisted at 24 h (Fig. 1a-d, center and bottom panels) and 48 h (not shown). The excitotoxic damage elicited by KA was partially prevented by the coinjection of the non-NMDA receptor antagonist NBQX. In agreement with a previous report (Moncada et al., 1991), this antagonist protected CA1 subfield at all times studied, but was ineffective to protect CA3-4 subfields (Fig. 2a-d, top panel only 24 h shown). In contrast, neuronal degeneration induced by KA was not protected by the

systemic injection of the NMDA-receptor antagonist MK-801, at any time tested (Fig. 3a-d).

Differently from KA, DHK administration induced neuronal damage restricted to the CA1 pyramidal cells. Three h after injection the lesion was very similar to that observed with KA, although the dose of DHK was a 100-fold higher. After 12 h a total loss of CA1 pyramidal neurons occurred, and no further changes were observed at 24 h (Fig. 4a-d, in first 3 panels) or 48 h (not shown). As shown in Fig. 4 (bottom right panel), in contrast to KA, the previous injection of MK-801 completely prevented the DHK-induced damage, whereas NBQX was ineffective (Fig. 2a-b, bottom panel).

KA and DHK effects on MAP2

MAP2 immunoreactivity in the non injected hippocampus was observed mainly in the dendritic fields of all regions, notably in the apical dendrites of the CA1 pyramidal neurons in the stratum radiatum and their branches in the stratum moleculare. Immunostaining was also visible in the network of processes in the stratum oriens, probably corresponding to basket cells dendrites and basal dendrites of pyramidal cells (Fig. 1e). In the CA3-CA4 region the dendritic branches of pyramidal neurons were intensely stained (Fig. 1g), as well as the dendrites of granule cells within the dentate gyrus. In all hippocampal subfields perikarya were only slightly stained (Fig. 1e).

Notable changes were observed in the pattern of MAP2 distribution after KA injection, and the time course of these changes can be correlated with that of neuronal damage. At 3 h after KA administration a notable decrease of dendritic immunostaining was observed in CA1 and to a less degree also in CA3-4 subfields (Fig. 1e-h, top panels).

This decrease was more pronounced at 12 h and at this time the immunoreactivity was increased in the somata of the pyramidal neurons (Fig. 1e-h, center panels). At 24 h a total loss of MAP2 staining in dendrites occurred and the immunoreactivity persisted in neuronal somata (Fig. 1e-h, bottom panels). In excellent agreement with the observations in the Nissl stained sections, the coinjection of NBQX, but not of MK-801, prevented the KA-induced changes in MAP2 in CA1 (compare Fig. 2f, top panel, with Fig. 3f), whereas the alterations occurring in CA3-4 were not modified by NBQX (Fig. 2h, top panel).

DHK treatment produced changes in MAP2 distribution similar to those seen with KA, but the loss of dendritic immunostaining was more pronounced at 3 h and, as with the Nissl staining, it was restricted to the CA1 subfield (Fig. 4c-d, 3, 12 and 24 h). A shift of MAP2 localization to neuronal bodies was prominent at 12 h (Fig. 4d, top right panel) and at 24 h it had been considerably lost (Fig. 4d, bottom left panel). Similarly to the morphological alterations, pretreatment with MK-801, but not with NBQX, prevented the DHK induced changes in MAP2 (compare Fig. 4d, bottom right panel, with Fig. 2d bottom panel).

DISCUSSION

KA- and DHK-induced selective neuronal loss

Most of the studies of neuronal damage in vivo with KA have been carried out at relatively long periods after injection³. In the present study we show that neurodegeneration occurs as early as 3 h after the intrahippocampal administration of KA, and that at 12 h the intensity of damage is already comparable to that seen at 24 or 48

h. This early damage is in agreement with a previous report in which a smaller KA dose than that of the present work was used³³ and the damage was restricted to CA3-4 hippocampal subfields. At the 2 nmol dose used here, KA effects were found in CA1, CA3, CA4 and in some neurons of the dentate gyrus, while notably CA2 was spared.

A possible explanation for this selectivity is the different localization of the non-NMDA receptors in different hippocampal subfields. Thus, the damage produced by KA in CA1 is probably due to an interaction with the AMPA receptor subtype, since such receptors are highly concentrated in this region, as judged from radioactive AMPA binding studies^{19,20,23,27} and from the distribution of the corresponding mRNA¹⁰. Strong support for this conclusion is the finding that the KA-induced neuronal damage in CA1 was prevented by the coinjection of the non-NMDA receptor antagonist NBQX, which has a higher affinity for the AMPA receptor than for the KA receptor⁸. A similar protection by NBQX has been previously reported at much longer time periods after KA injection²¹. In contrast to CA1, in CA3-4 the effect of KA is probably mediated by an agonist action on the high affinity KA receptor, since this receptor subtype is highly concentrated in CA3-4³⁶ and NBQX, which is only a weak antagonist of KA binding⁸, was without significant protective effect.

The neurodegeneration produced by DHK in the hippocampus has not been previously reported, and it is consistent with its notable neurotoxic effect in the striatum at 7 days after intrastriatal administration¹⁵. The hippocampal damage shown here was evident as early as 3 h after injection and, in contrast to the damage produced by KA, it was surprisingly restricted to the CA1 region at all times studied. DHK is an inhibitor of

glutamate transport^{2,28} and it has been shown to increase the extracellular concentration of glutamate in vivo^{4,15,22}. However, no correlation has been found between the DHK-induced glutamate elevation and neurodegeneration in the striatum, and therefore it has been suggested that the cell damage might be due to a direct activation of EAA receptors¹⁵. Furthermore, the epileptiform activity induced by intrahippocampal administration of DHK was also not correlated with increased glutamate levels but involved activation of NMDA receptors, since it was blocked by NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonovalerate⁴. These data suggest that the neurotoxic action of DHK found in the present work was not due only to augmented extracellular glutamate but to a direct activation of EAA receptors. Since the damage was observed only in the CA1 subfield and it was completely prevented by the NMDA receptor antagonist MK-801 but not by NBQX, we conclude that such receptors are of the NMDA type. Consistently with this conclusion, the NMDA receptor subtype is much more abundant in CA1 than in the other hippocampal subfields, which were not affected by DHK (Young, et al., 1991).

Changes in MAP2 immunoreactivity

The effect of EAA receptor agonists on MAP2 protein has been examined in different biological preparations. Pharmacological stimulation of rat hippocampal neurons by intracerebroventricular administration of KA or NMDA induces selective loss of MAP2 in hippocampal homogenates³¹ and in the CA3 region 3 h after intrahippocampal injection of KA³³. Differently from these studies, we have found a temporal pattern of changes in MAP2 distribution after KA in the CA1 and CA3-4, the regions susceptible to KA neurotoxicity, consisting of an early loss in dendritic MAP2 immunoreactivity after 3 h,

when neurons apparently are still alive (as seen by Nissl staining), followed by an accumulation MAP2 immunoreactivity in neuronal somata at 12 h after treatment and finally a decrease or even a total loss of immunoreactivity at 24 or 48 h. A similar pattern of MAP2 changes, but limited to CA1, was observed with DHK, in close agreement with the localization of neuronal damage produced by this compound.

These results suggest that MAP2 is a susceptible target of the excitotoxicity due to overactivation of both NMDA and non-NMDA receptor subtypes (see discussion above). Furthermore, this susceptibility appears initially as an intraneuronal redistribution of MAP2, from its normal dendritic localization to the neuronal somatas, followed by a later phase, characterized by loss of the protein, probably due to hydrolysis by activation of calpain I or other Ca^{2+} -dependent proteases^{9,32}, at a time when the Nissl staining showed highly damaged neurons. A possible mechanism of the apparent MAP2 redistribution is a disruption of microtubule function due to an increased Ca^{2+} concentration²⁶, or a structural protein change due to phosphorylation^{1,24}. It is interesting that perikarial accumulation and loss of dendritic immunoreactivity of MAP2 after KA and DHK are similar to those occurring post-mortem in human and rat hippocampus³⁰ and reproduce some aspects of the neurofibrillary tangles formation in Alzheimer disease¹⁴.

CONCLUSION

In the present paper we describe temporal changes in the intraneuronal distribution of MAP2 due to activation of different EAA receptors by KA and DHK, that can be prevented specifically by MK-801 and NBQX, in several regions of the hippocampus. The

observed changes in MAP2 demonstrate that alterations of the normal dendritic localization of the protein is a sensitive marker of excitotoxicity and could be involved in the mechanisms of neuronal degeneration.

Acknowledgements We thank Mr. Federico Jandete García for assistance in the histological procedures. This work was supported by DGAPA (IN200493) and PADEP (030365), UNAM.

REFERENCES

1. Arias C., Sharma N., Davies P. and Shafit-Zagardo B. (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule associated protein 2 and τ phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* **61**, 673-682.
2. Arriza J. L., Fairman W. A., Wadiche J. I., Murdoch G. H., Kavanaugh M. P. and Amara S.G. (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* **14**, 5559-5569.
3. Ben-Ari Y. (1985) Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**, 375-403.
4. Butcher S.P., Lazarewicz J., and Hamberger A. (1988) In vivo microdialysis studies on the effects of decortication and excitotoxic lesions of kainic acid induced calcium fluxes, and endogenous amino acid releases in the rat striatum. *J. Neurochem.* **49**, 1355-1360.
5. Cowburn R. J., Hardy J., Roberts P. and Briggs R. (1988) Presynaptic and postsynaptic glutamatergic function in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **86**, 109-113.
6. Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
7. Greenamyre J. and Young A. (1989) Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **10**, 593-602.
8. Honoré T. (1991) Inhibitors of kainate and AMPA ionophore receptors. In *Excitatory*

Amino Acids Antagonists (B. S. Meldrum, Ed.), pp. 180-190.

9. Johnson G. V. W., Letersky J. M. and Jope R. S. (1991) Degradation of microtubule associated protein 2 and brain spectrin by calpain: A comparative study. *J. Neurochem.* **56**, 1630-1638.
10. Keinänen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T. A., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1990) A family of AMPA selective glutamate receptors. *Science* **249**, 556-560.
11. Kitagawa K., Matsumoto M., Niinobe M., Mikoshiba K., Hata R., Ueda H., Handa N., Fukunaga R., Isaka Y., Kimura K. and Kamada T. (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage- immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* **31**, 401-411.
12. Lipton S. A. and Rosenberg P. A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.* **330**, 613-622.
13. Maragos W. F., Greenamyre J. T., Penney J. B. and Young A. B. (1987) Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci.* **10**, 65-68.
14. McKee A.C., Kowall N. W. and Kosik K. S. (1989) Microtubular reorganization and dendritic growth response in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **26**, 652-659.
15. Massieu L., Morales-Villagran A. and Tapia R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* **64**, 2262-2272.
16. Mattson M. P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca²⁺ influx in cultured hippocampal neurons.

Neuron **2**, 105-117.

17. Matsuyama, S. S., and Jarvik L. F. (1989) Hypothesis: microtubules, a key of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8152-8156.
18. Matus A. (1990) Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J. Physiol. (Paris)* **84**, 134-137.
19. Monaghan D. T. and Cotman C. W. (1982) Distribution of [³H]-kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res.* **252**, 91-100.
20. Monaghan D. T., Yao D., Nguyen L. and Cotman C. W. (1985) Excitatory amino acid binding sites: correspondence between autoradiographic and membrane fraction preparation. *Soc. Neurosci. Abstr.* **11**, 110.
21. Moncada C., Avin B., Le Peillet E. and Meldrum B. S. (1991) Non-NMDA antagonists protect against kainate more than AMPA toxicity in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **133**, 287-290.
22. Muñoz M. D., Herreras O., Herranz A. S., Solis J. M. Martín del Río R. and Lerma J. (1987) Effects of dihydrokainic acid on extracellular amino acids and neuronal excitability in the "in vivo" rat hippocampus. *Neuropharmacology* **26**, 1-8.
23. Nielsen E. O., Drejer J., Cha J-H. J., Young A. B. and Honoré T. (1990) Autoradiographic characterization and localization of quisqualate binding sites in rat brain using the antagonist [³H]6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione: Comparison with (R,S)-[³H]α-amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding sites. *J. Neurochem.* **54**, 686-695.
24. Papasozomenos S. CH. and Binder L. I. (1987) Phosphorylation determines two

- distinct species of tau in the central nervous system. *Cell Motil. Cytoskelet.* **8**, 210-226.
25. Paxinos G. and Watson C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, Sidney.
26. Pirollet F., Margolis R. L. and Job D. (1992) Ca⁽²⁺⁾-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in neuronal tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **1160**, 113-119.
27. Olsen R. W., Szamraj O. and Houser C.R. (1987). [³H]AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res.* **402**, 243-254.
28. Robinson M. B., Sinor J. D., Dowd L. A. and Kervin J. F. (1993). Subtypes of sodium dependent high affinity L-[³H] Glutamate transport activity: Pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. *J. Neurochem.* **60**, 167-179.
29. Rosenberg P. A., Amin S. and Leitner M. (1992) Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J. Neurosci.* **12**, 56-61.
30. Schwab C., Bondada V., Sparks D. L., Cahan L. D. and Geddes J. W. (1994) Postmortem changes in the levels and localization of microtubule-associated proteins (tau, MAP2 and MAP1B) in the rat and human hippocampus. *Hippocampus* **4**, 210-225.
31. Siman R. and Noszek J. C. (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* **1**, 279-287.
32. Siman R., Noszek J. C. and Kegerise C. (1989) Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J. Neurosci.* **9**,

1579-1590.

33. Stein-Behrens B., Mattson M. P., Chang I., Yeh M. and Sapolsky R. (1994) Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J. Neurosci.* **14**, 5373-5380.
34. Yamauchi T. and Fujisawa H. (1982) Phosphorylation of the microtubule-associated protein 2 by calmodulin dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 975-981.
35. Yanagihara T., Brengman J. and Mushynsky W. (1990) Differential vulnerability of microtubule components in cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* **80**, 499-505.
36. Young A. B., Sakurai S. Y., Albin R. L., Makowiec R. and Penney J. B. (1991) Excitatory amino acid receptor distribution: quantitative autoradiographic studies. In *Excitatory amino acids and synaptic transmission* (H. Wheal and A Thompson, Ed). pp. 19-31.

FIGURE LEGENDS

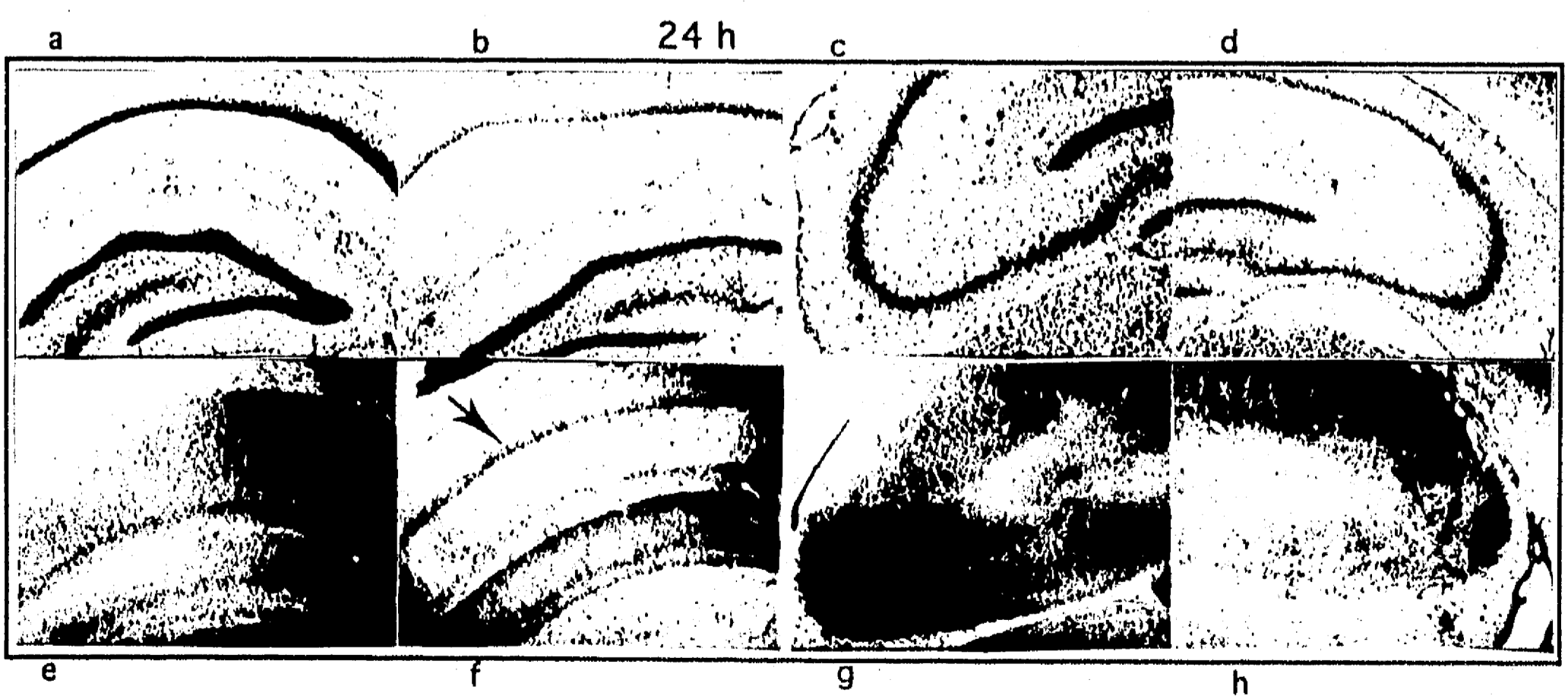
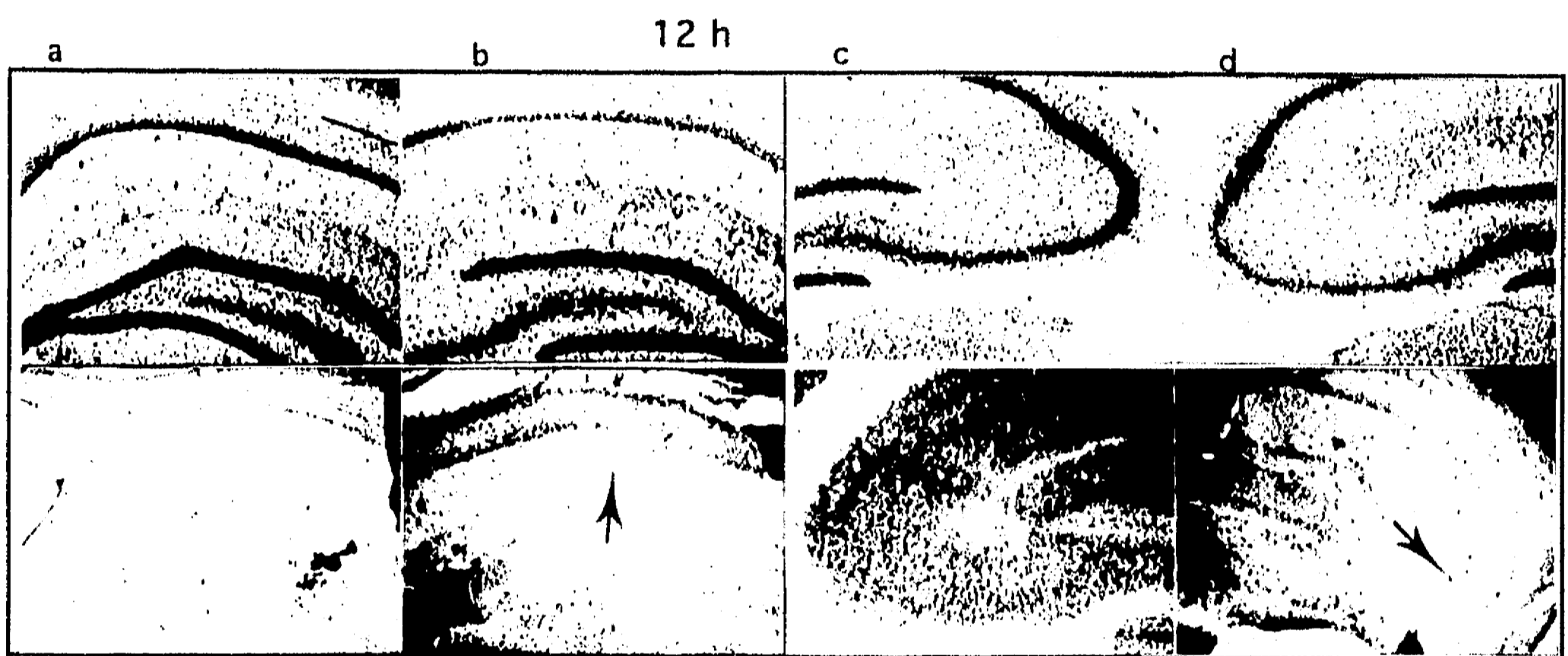
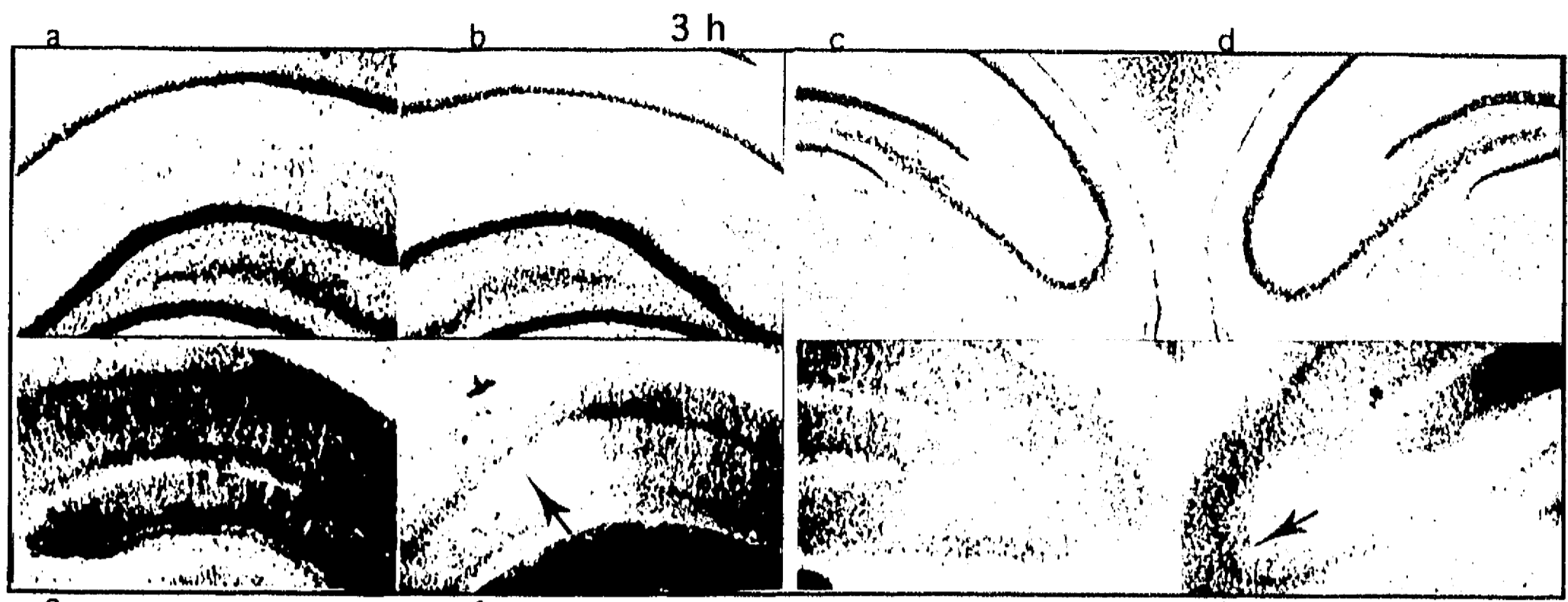
Figure 1 Temporal course of changes in cresyl violet staining (panels a-d) and MAP2 immunoreactivity (panels e-h) after KA injection. The non-injected control hippocampus is shown in the left panels (a,e and c,g) and the KA-injected hippocampus in the right panels (b,f and d,h), after the time shown above each set of micrographs. Three h after KA treatment CA1 pyramidal neurons changed from a rounded and well defined form to a stellate and pycnotic appearance (compare a and b), while neurons in CA3 region are unchanged (compare c and d). A loss in dendritic MAP2 immunoreactivity is observed at 3 h in CA1 (compare e and f) while CA3 was less affected (compare g and h). After 12 h of KA the loss of cells in CA1 and CA3-4 became evident (a-d), as well as dendritic loss and perikarial accumulation of MAP2 in CA1 (compare e and f) and CA3-4 (compare g and h). 24 h after KA the cell loss is prominent in all regions except CA2 (a-d) and the MAP2 immunoreactivity is observed in CA1 and CA3-4 (e-h). Each micrograph is representative of 5 sections from 4-6 different animals.

Figure 2 Protective effect of NBQX on KA-induced and lack of effect on DHK-induced neurotoxicity. NBQX was coinjected with KA or DHK and its protective action was evaluated 24 h later. Cresyl violet staining is shown in the top micrographs and MAP2 immunostaining in the bottom micrographs. NBQX completely prevented the cell loss and the MAP2 changes produced by KA in CA1 (compare a with b and e with f) while CA3 was not protected (compare c with d and g with h). NBQX failed to protect the DHK-induced cell loss (compare a and b) and MAP2 changes (compare c and d). Micrographs

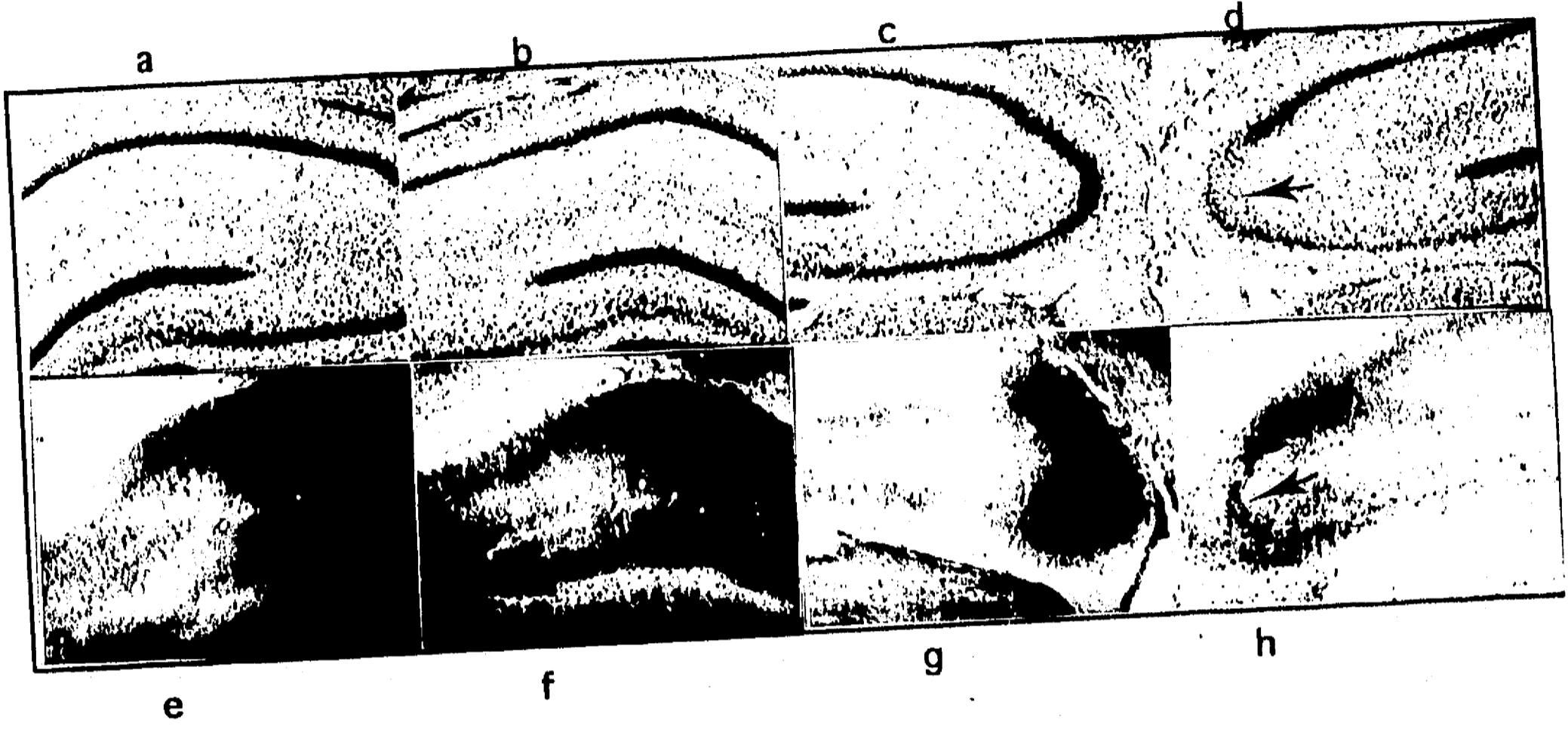
are representative of 5 sections from 4 different animals.

Figure 3 Lack of protection by i.p. MK-801 against cell loss (a-d) and MAP2 changes (e-h) induced by KA, in both CA1 and CA3 regions. Micrographs are representative of 5 sections from 4 different animals.

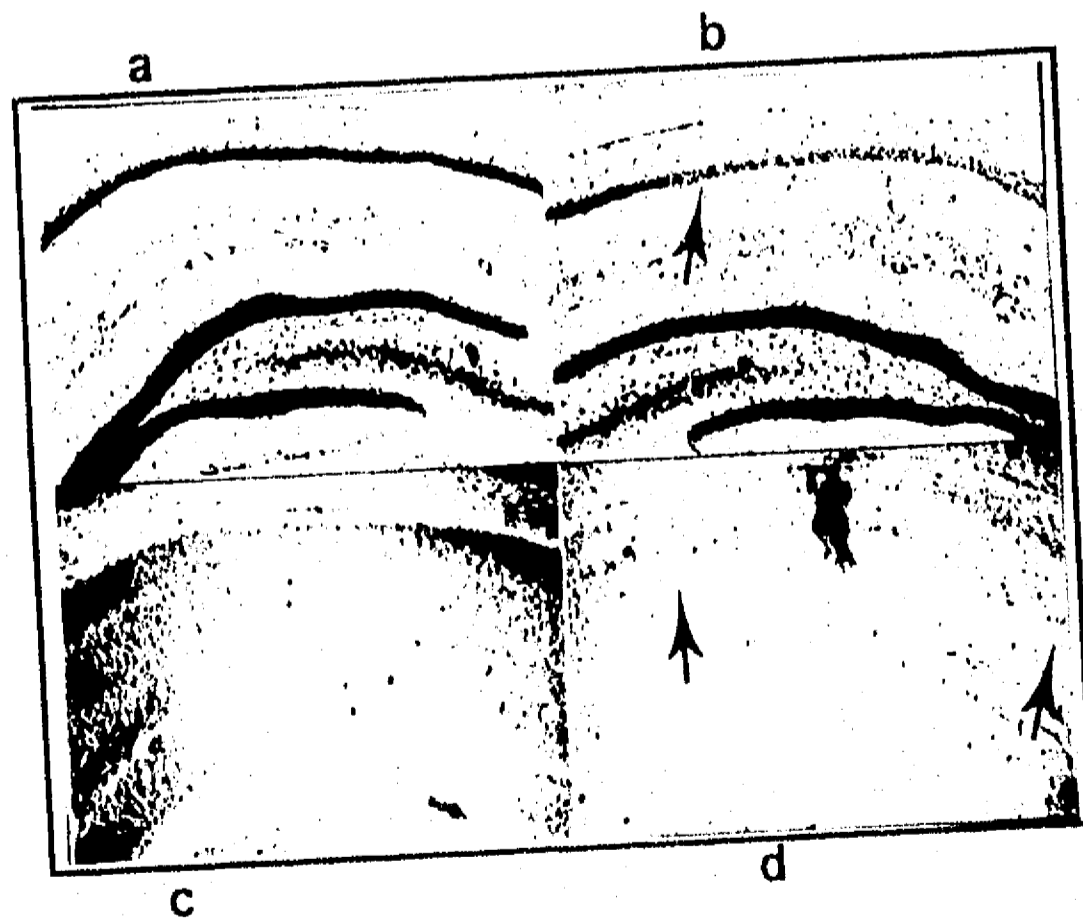
Figure 4 Temporal course of changes in cresyl violet staining (panels a,b) and MAP2 immunoreactivity (panels c,d) after DHK injection, and the protection by i.p. MK-801. The non-injected control hippocampus is shown in the left panels (a,c) and the DHK-injected hippocampus in the right panels (b,d). Only the CA1 region is shown because no other region was affected by DHK. At 3 h after DHK notable changes in the shape of pyramidal cell was observed (compare a and b) and a dramatic loss of dendritic MAP2 (compare c and d). At 12 h there is a substantial loss of cells in CA1 (compare a and b) and MAP2 is concentrated in neuronal somata (compare d with c and with d at 3 h). At 24 h the cell loss persisted (compare a and b) and the somatic MAP2 decreased notably (compare d with c and with d at 12 h). All these changes were totally prevented by i.p. MK-801, as shown in the bottom right panels. Micrographs are representative of 5 sections from 4-8 different animals.



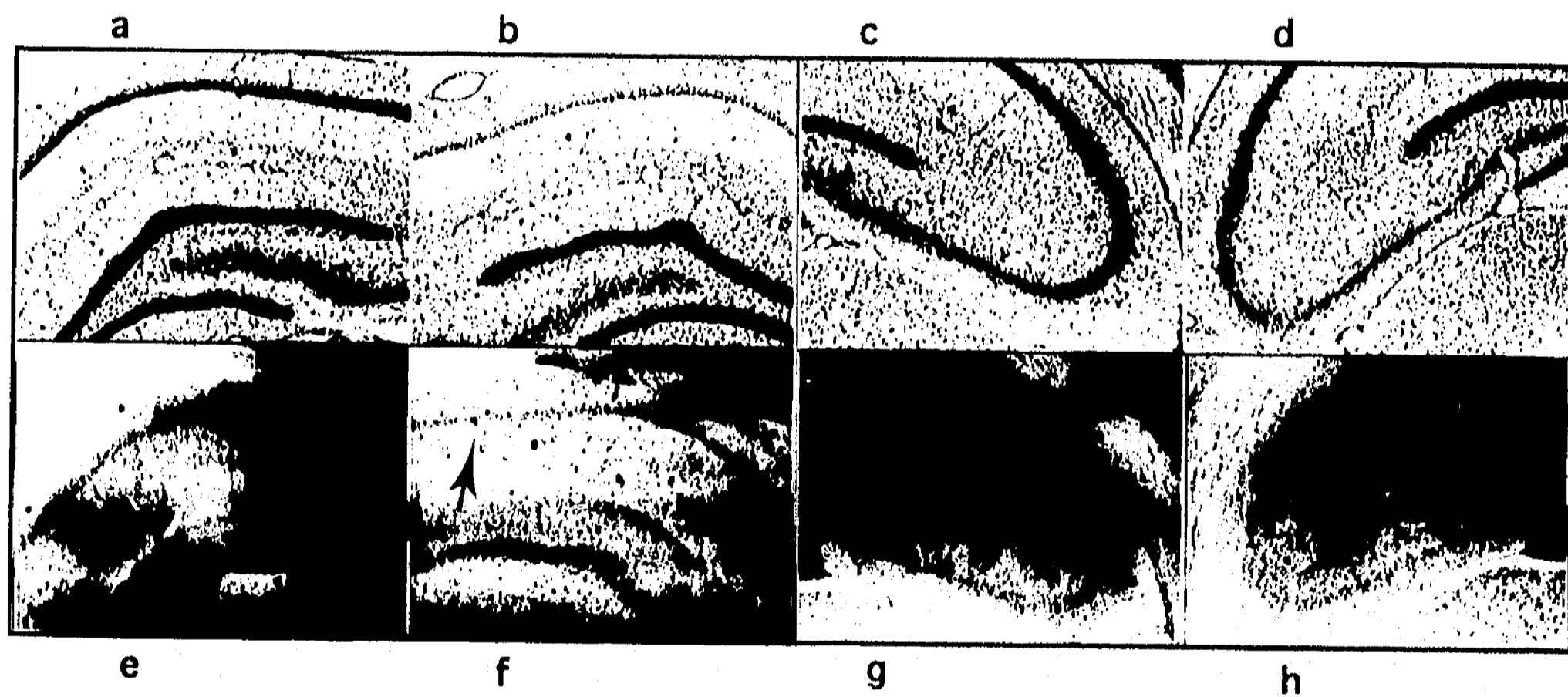
KA + NBQX



DHK + NBQX

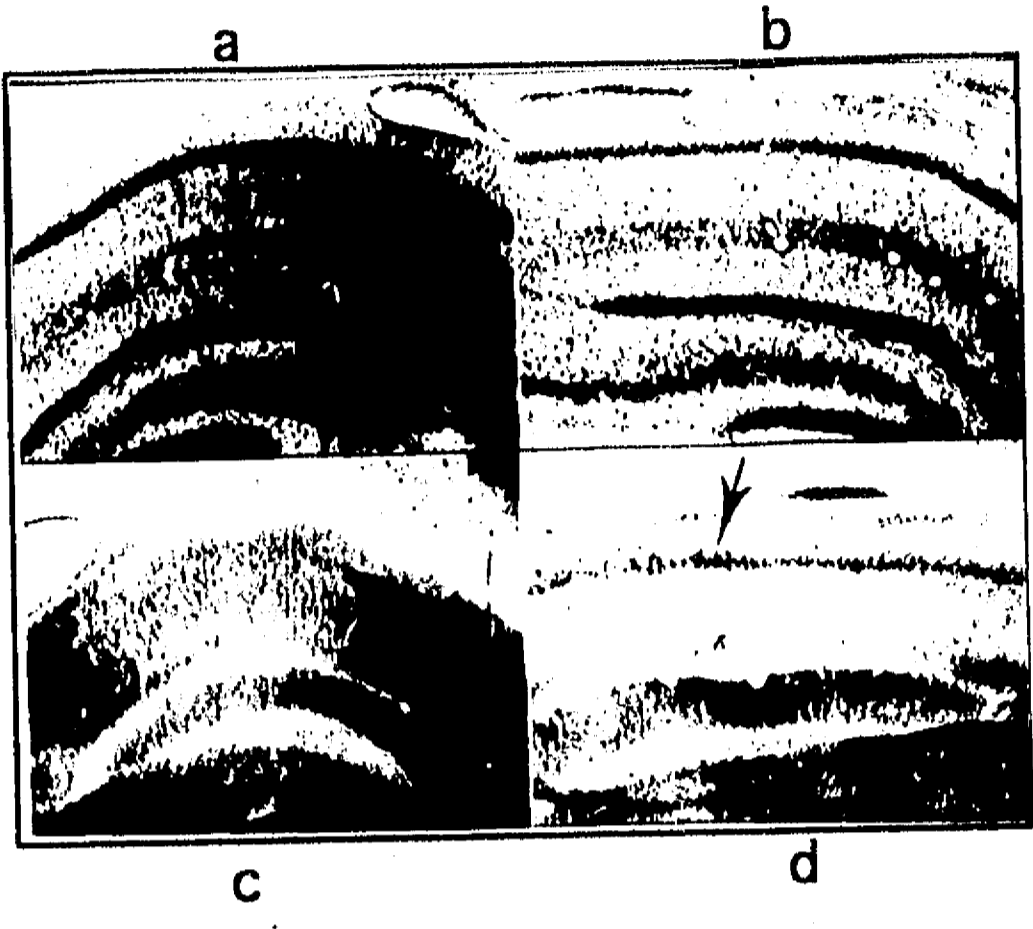
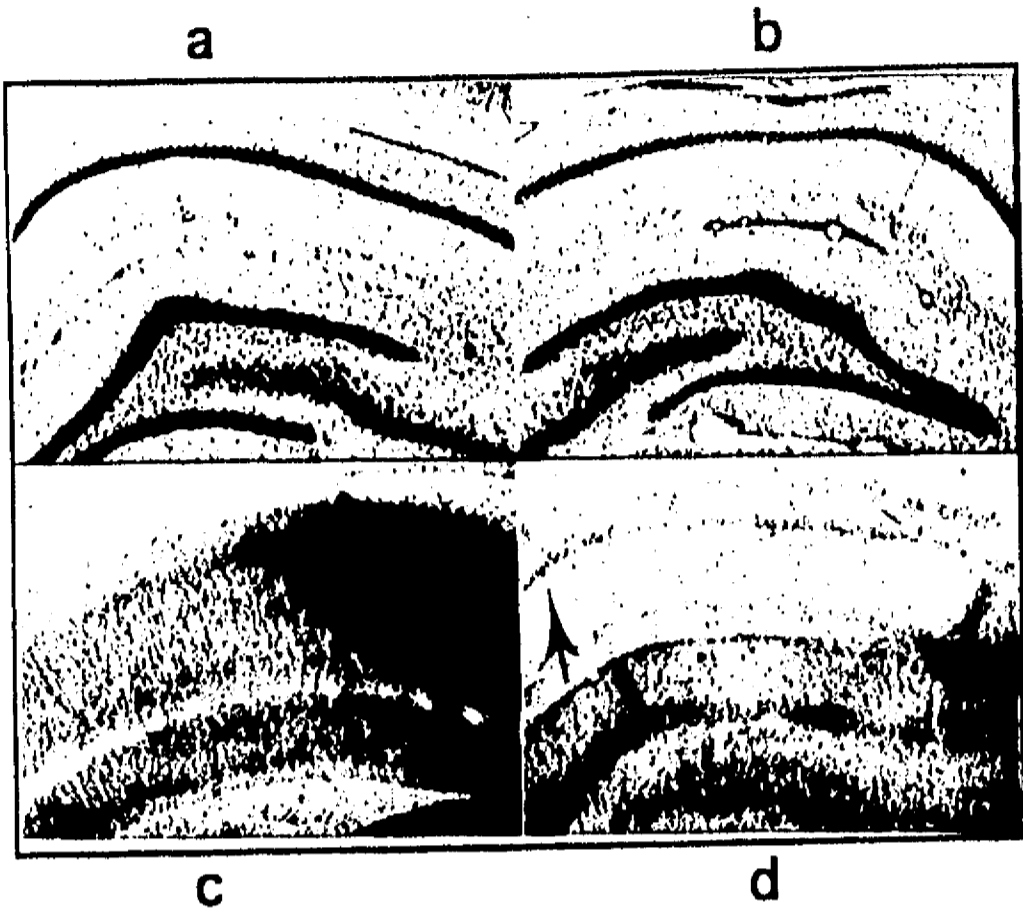


KA + MK 801



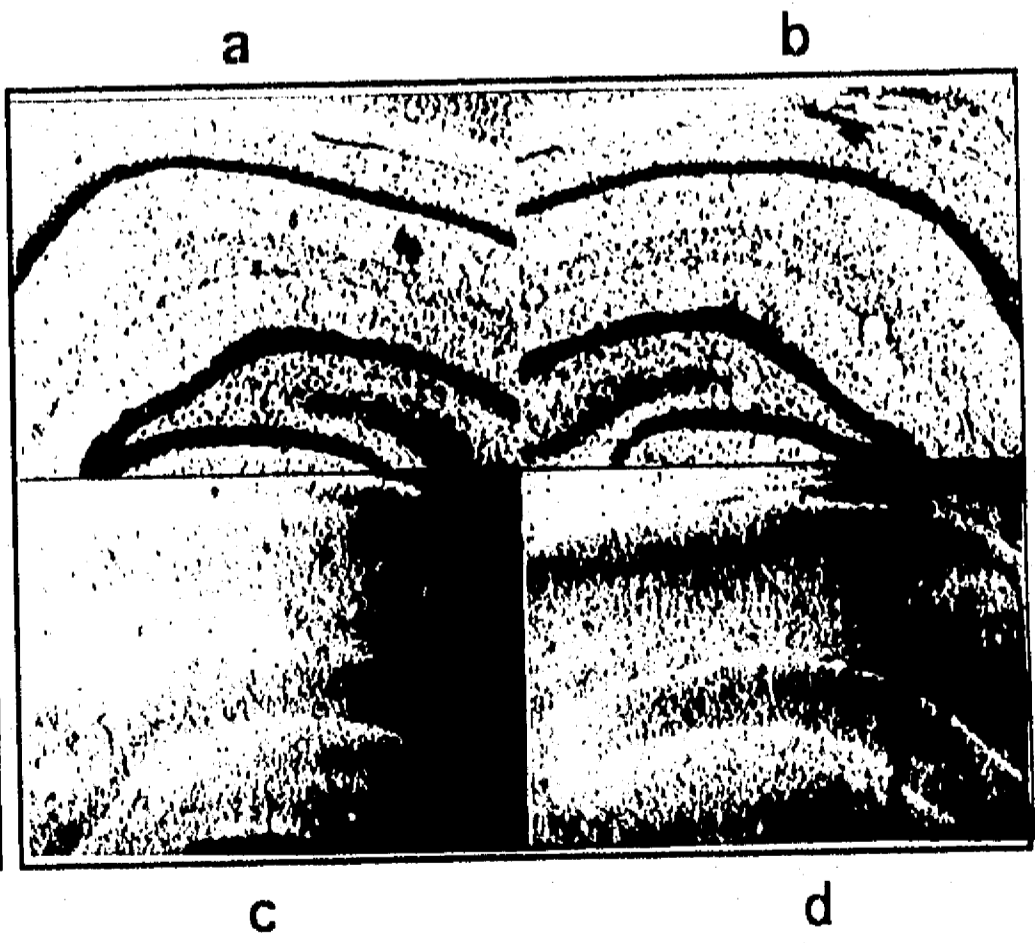
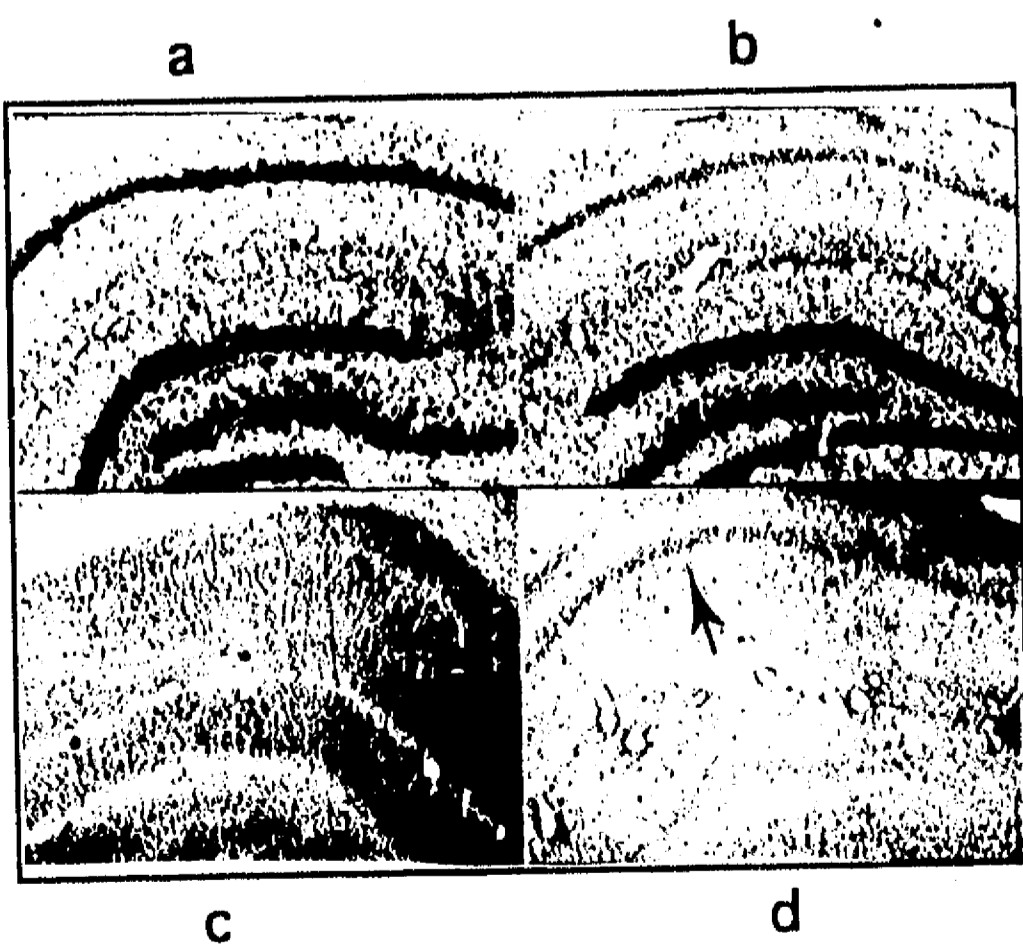
3 h

12 h



24 h

24 h + MK 801



Rapid Communication

β -Amyloid Peptide Fragment 25-35 Potentiates the Calcium-Dependent Release of Excitatory Amino Acids From Depolarized Hippocampal Slices

C. Arias, I. Arrieta, and R. Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

β -Amyloid protein (β AP) has been frequently associated with the neuropathology of Alzheimer's disease (AD), although the mechanisms by which it can induce neurodegeneration are still unknown. Some studies in hippocampal cultured neurons suggest that β AP, particularly its fragment 25-35, may induce neural growth or render neurons more vulnerable to excitotoxic insults by a mechanism involving intracellular Ca^{2+} dyshomeostasis. We have studied the effect of fragment 25-35 on the release of endogenous amino acids from hippocampal slices of young adult (3-3.5-month-old) and aged (23-25-month-old) rats, under basal, K^+ -depolarization, and post-depolarization conditions, in the presence and absence of Ca^{2+} . In both young and aged tissue, the basal release of amino acids was not affected by the peptide. By contrast, 1-hr preincubation of slices from young animals with 10 μ M 25-35 fragment resulted in a 140% increase of glutamate and aspartate release stimulated by K^+ depolarization, compared with the control-stimulated release. These effects were strictly dependent on external Ca^{2+} . Neither the K^+ -stimulated release of γ -amino butyric acid (GABA) nor the release of glycine, glutamine, taurine, or alanine, which was not stimulated by high K^+ , were affected. Substance P and a scrambled sequence of the 25-35 fragment were without any effect per se, but substance P blocked the stimulatory effect of fragment 25-35 on glutamate and aspartate release. In slices from aged rats the basal release of glutamate was significantly higher (260%) than that in young tissue, and the K^+ -induced release of both aspartate and glutamate was also higher. Fragment 25-35 also potentiated the K^+ -induced release of these two amino acids, although to a lesser extent than in young tissue. These results indicate that glutamate is retained less

by the aged hippocampus and that fragment 25-35 is able to augment the release of glutamate and aspartate under excitatory conditions, an effect that could be involved in the mechanisms of neurotoxicity of β -amyloid peptides. © 1995 Wiley-Liss, Inc.

Key words: β -amyloid peptide, excitatory amino acids release, hippocampal slices, Alzheimer's disease

INTRODUCTION

β -Amyloid protein (β AP) deposition is one of the pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) (Braak and Braak, 1994). Although β AP has been considered as a causal factor of AD (Glennner and Wong, 1984; Selkoe, 1991), its role in neurodegeneration has not been clarified. Such a role is strongly supported by the recently developed transgenic mice that overexpress a human mutant β -amyloid precursor protein gene (Games et al., 1995). β AP contains 39-43 amino acid residues and is cleaved from the amyloid precursor protein (Selkoe, 1993). Some of its fragments, particularly peptide 25-35, possess neurotrophic and neurotoxic actions (Yankner et al., 1990; Pike et al., 1991; Loo et al., 1993), and their neurotoxicity can be prevented, both in vitro and in vivo, by the structurally related peptide substance P (Yankner et al., 1990; Frautschy et al., 1991).

Several lines of evidence suggest a potential role of Ca^{2+} in the neuronal actions of β AP. Particularly interesting is the ability of β AP to disrupt intracellular Ca^{2+}

Received March 22, 1995; revised and accepted April 20, 1995.

Address reprint requests to Ricardo Tapia, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510-México, D.F., México.

homeostasis after exposure to the Ca^{2+} ionophore A23187, after high potassium depolarization, or after stimulation by glutamate, with a consequent potentiation of excitotoxic mechanisms of cell death (Mattson et al., 1992, 1993). Furthermore, β AP 1–40 seems to form Ca^{2+} channels when incorporated into artificial phospholipid bilayers (Arispe et al., 1993). Therefore, and in view of the Ca^{2+} dependence of neurotransmitter release, it seems possible that β AP peptides can alter such release. The aim of the present work was to test this hypothesis. We studied the effect of the β AP 25–35 fragment on the release of endogenous amino acids, with a focus on glutamate, in rat hippocampal slices from young and aged rats.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar 3–3.5-month-old and 23–25-month-old rats (Camm Research Lab Animals, Wayne, NJ) were killed by decapitation and the whole brain removed and placed in a vibroslice chamber (Campden Instruments), immersed in cold Krebs-Ringer medium of the composition described below. Coronal cerebral slices (300 μm thick) were obtained, the hippocampal structure was quickly removed, and three hippocampal slices were placed in a multichamber incubator (Stoelting Instruments), in 0.3 ml of an oxygenated Krebs-Ringer medium of the following composition (in mM): NaCl 118, KCl 4.8, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, glucose 10, and NaHCO_3 20, pH 7.4. In some experiments Ca^{2+} was omitted and 0.1 mM EGTA was added to the medium. When a depolarizing K^+ concentration was used, KCl was increased to 50 mM and NaCl was proportionally diminished. β AP peptide fragment 25–35 and substance P (Sigma, St. Louis, MO), as well as a scrambled sequence of fragment 25–35 (NH_2 -IMLKGNGASIG-COOH, obtained from Macromolecular Analysis Lab., Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) were dissolved in the media from water stock solutions.

Hippocampal slices were equilibrated at 37°C for 30 min, followed by a 1 hr preincubation period in the absence (control) or presence of the peptide to be tested. After this period, the incubations for measuring the release were carried out as follows: 1) 5-min period for release in a fresh low K^+ medium (basal fraction); 2) 5-min period in a high K^+ medium (depolarization fraction); and 3) 5-min period in the basal medium (post-depolarization fraction). All media were continuously oxygenated. At the end of each period the total incubation volume was collected and kept at -75°C until analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). At the end of the experiment the slices were sonicated (Branson Sonifier, setting 2) in water for protein analysis (Bradford, 1979). In some experiments

fragment 25–35 was not preincubated with the tissue, but it was added in the high potassium medium. Except for these experiments, in the experimental chambers all media used contained the peptides at the concentrations indicated in Results. Controls were always carried out in parallel using hippocampal slices from the same rat.

Amino acids in the collected fractions were measured by HPLC in a Beckman chromatograph after derivatization with o-phthalaldehyde as previously described (Salazar et al., 1994). The following amino acids were measured: glutamate, aspartate, γ -amino butyric acid (GABA), glutamine, glycine, taurine, and alanine. Amino acid content in each fraction is expressed as nmol/mg tissue protein. One-way ANOVA was used for statistical comparisons.

RESULTS

As shown in Figure 1 and Table I, basal release of glutamate, aspartate, and GABA from young rats was much lower relative to the other amino acids studied, and only the release of these three amino acids was stimulated by K^+ depolarization (90% stimulation for aspartate, 340% for glutamate, and from undetectable values to 1.5 nmol/mg protein for GABA). This effect was short lasting, since amino acid release returned to nearly basal levels in the post-depolarization fraction. The stimulation was clearly Ca^{2+} dependent in the case of aspartate and glutamate, but only partially affected by Ca^{2+} omission in the case of GABA.

When fragment 25–35 was not preincubated but added to the high K^+ medium at a 10 μM concentration, no significant differences were observed in the stimulated release of amino acids, compared with control slices ($n = 4$, results not shown). When the slices were preincubated for 1 hr with 10 μM of fragment 25–35, basal amino acid release was not affected, but a notable potentiation of the K^+ -stimulated release of glutamate (150% overflow) and aspartate (160% overflow) was observed (Fig. 1). This potentiation was strictly dependent on external Ca^{2+} and was not observed in the post-depolarization fraction. None of the other amino acids measured was affected by preincubation with fragment 25–35 (Fig. 1 and Table I).

In other experiments, different concentrations of fragment 25–35, preincubated for 1 hr, were tested. As shown in Table II, a significant potentiation of the K^+ -stimulated release of glutamate, but not aspartate, was observed at 1 μM concentration. Maximum potentiation for both amino acids occurred with 10 μM of fragment 25–35; at 30 and 100 μM the potentiation was considerably lower. In view of this finding, we carried out spectrophotometric analyses of solutions of fragment 25–35. It was found that after 1 hr of incubation at 37°C

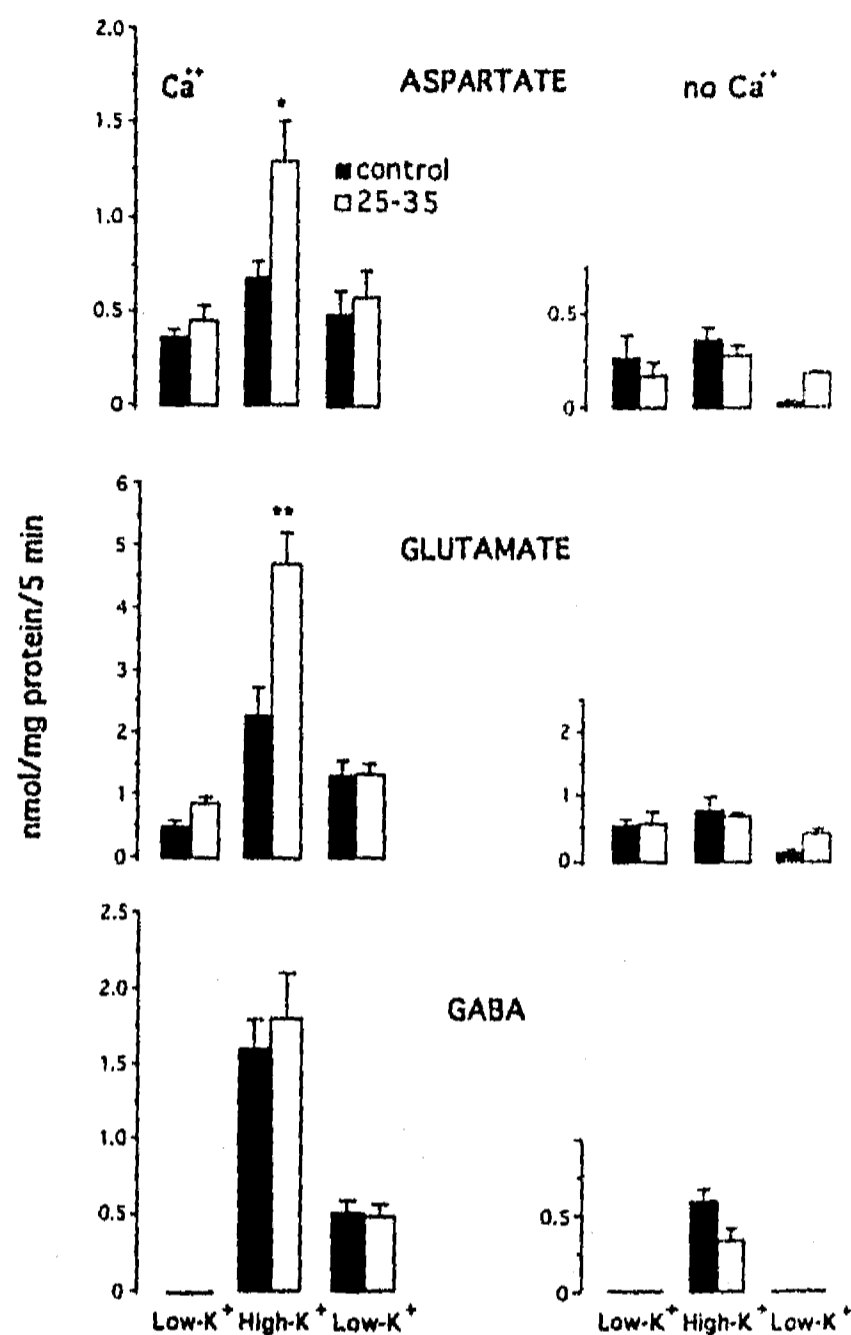


Fig. 1. Effect of 1-hr preincubation with 10 μM fragment 25–35 on aspartate, glutamate, and GABA release, in the absence and presence of Ca²⁺ in the medium, in hippocampal slices from young rats. The first and second low K⁺ bars in each set represent the basal and the post-depolarization fraction, respectively (see Materials and Methods). The results are expressed as nmol/mg protein/fraction. Means ± SEM for 13 (Ca²⁺) and 5 (no Ca²⁺) independent experiments. **P* < 0.05; ***P* < 0.01, compared with control.

under our experimental conditions there was nil absorption in the visible range (340–700 nm) when the concentration of the peptide was 1 μM or 10 μM, whereas at 30 μM and 100 μM a proportionally higher absorption was observed, indicating an increased turbidity (results not shown).

As shown in Figure 2, neither the scrambled peptide 25–35 nor substance P affected glutamate and aspartate release. However, when preincubated with fragment 25–35, substance P completely prevented the stimulatory effect of this peptide.

The release of amino acids in hippocampal slices from aged rats is shown in Table I and Figure 3. The

basal release of the amino acids did not differ significantly from that observed in slices from young rats, with the exception of glutamate release, which was 260% higher in aged tissue (*P* < 0.001; compare Figs. 1 and 3). As in the case of young rats, only glutamate, aspartate, and GABA release was stimulated by K⁺ depolarization. Interestingly, for the three amino acids the amount released by stimulation was two to threefold that observed in young rats, although in terms of percent stimulation no significant differences were observed, due to the high basal release of aspartate and glutamate (Figs. 1, 3).

Preincubation of slices from aged rats with fragment 25–35 did not significantly affect basal amino acid release. Under K⁺ depolarization a 50–100% potentiating effect on glutamate and aspartate release was observed, although this potentiation did not reach statistical significance due to the relatively large variability. As in the case of young rats, the K⁺-stimulated release of GABA was not affected by fragment 25–35 (Fig. 3).

DISCUSSION

The present results demonstrate that βAP fragment 25–35 stimulates the depolarization-induced release of excitatory amino acids, but not the basal release, after 1 hr of preincubation with hippocampal slices. The finding that this effect occurred only under depolarization conditions, which lead to Ca²⁺ entry, and that it was strictly Ca²⁺ dependent, suggests that alterations in the intracellular homeostasis of this cation may be involved in the mechanism of action of fragment 25–35. Consistent with this interpretation is the fact that in human hippocampal neuronal cultures the increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration induced by K⁺ depolarization, excitatory amino acids, or the calcium ionophore A23187 is potentiated and maintained for considerably longer periods when fragment 25–35 has been present in the medium for 24 hr (Mattson et al., 1992, 1993). Furthermore, in freshly dissociated neurons from adult mouse brain, short preincubation with fragment 25–35 at 1–5 μM concentrations produced an amplification of the rapid K⁺-induced increase in intracellular Ca²⁺ that lasted a few minutes (Hartmann et al., 1993), in good correlation with the temporal course of our observations.

It is striking that only the release of aspartate and glutamate was affected by fragment 25–35. Amino acids that do not behave as neurotransmitters in the hippocampus were not released by K⁺ depolarization (glutamine, alanine, glycine, and taurine), and were not affected at all. This selectivity is also in agreement with a Ca²⁺ participation, since the high K⁺-induced release of glutamate and aspartate was Ca²⁺ dependent, as has been described in hippocampal tissue (Ottersen and Storm-

TABLE I. Lack of Effect of Fragment 25–35 on the Release of Glutamine, Glycine, Taurine, and Alanine in Hippocampal Slices From Young and Aged Rats*

	Glutamine		Glycine		Taurine		Alanine	
	Young	Aged	Young	Aged	Young	Aged	Young	Aged
Basal								
Control	4.5 ± 0.5	5.2 ± 1.5	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.6	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2
Fragment 25–35	5.5 ± 0.5	5.3 ± 1.4	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.5	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2
K ⁺ depolarization								
Control	4.0 ± 0.4	4.2 ± 1.3	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.6	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2
Fragment 25–35	4.0 ± 0.3	5.2 ± 1.5	2.1 ± 0.2	3.3 ± 0.6	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	2.6 ± 0.4
Post-depolarization								
Control	3.0 ± 0.3	2.3 ± 0.6	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Fragment 25–35	3.4 ± 0.3	3.8 ± 1.1	2.0 ± 0.3	2.7 ± 0.7	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2

*Values are nmol/mg protein/5 min and were obtained from the same HPLC fractions analyzed in Figures 1 and 3 in the presence of Ca²⁺. Means ± SEM for 13 (young) and 11 (aged) rats.

TABLE II. Potentiation of the K⁺-Stimulated Release of Aspartate and Glutamate by Preincubation With Different Concentrations of Fragment 25–35 in Hippocampal Slices From Young Rats†

Fragment 25–35 concentration (μM)	Aspartate	Glutamate
0	0.82 ± 0.21	1.95 ± 0.16
1	1.19 ± 0.19	3.85 ± 0.65*
10	1.98 ± 0.31*	5.08 ± 0.68**
30	1.03 ± 0.21	3.36 ± 0.65
100	0.98 ± 0.14	3.03 ± 0.44

†Values are nmol/mg protein/5 min released by K⁺ depolarization after subtraction of basal values. Means ± SEM for five to eight rats. *P < 0.05.

**P < 0.01, compared with control.

Mathisen, 1989; Flavin and Seyfried, 1994). By contrast, it is well established (Arias and Tapia, 1986; Adam-Vizi, 1992), and confirmed in the present work (Fig. 1), that GABA release is only partially Ca²⁺ dependent. Therefore, if fragment 25–35 acts through Ca²⁺-dependent mechanisms, their lack of effect on GABA release was to be expected.

The maximum potentiating effect of fragment 25–35 on glutamate release was found at a 10 μM concentration, and a considerably lower effect was observed at 30 and 100 μM. A possible explanation is that at the latter concentrations the peptide forms aggregates that cannot easily penetrate into the hippocampal slices and therefore cannot interact with the involved cellular sites. This interpretation is supported by our spectrophotometric observations, since no absorbance was observed at 1 μM or 10 μM concentration and a linear increase in turbidity was found at 30 μM and 100 μM, indicating aggregation of the peptide at these concentrations. βAP peptide aggregation in aqueous solutions, including that of fragment 25–35, has been previously reported (Burdick et al., 1992; Pike et al., 1995). In neuronal cultures, the effective concentration for the neurotoxic and Ca²⁺-

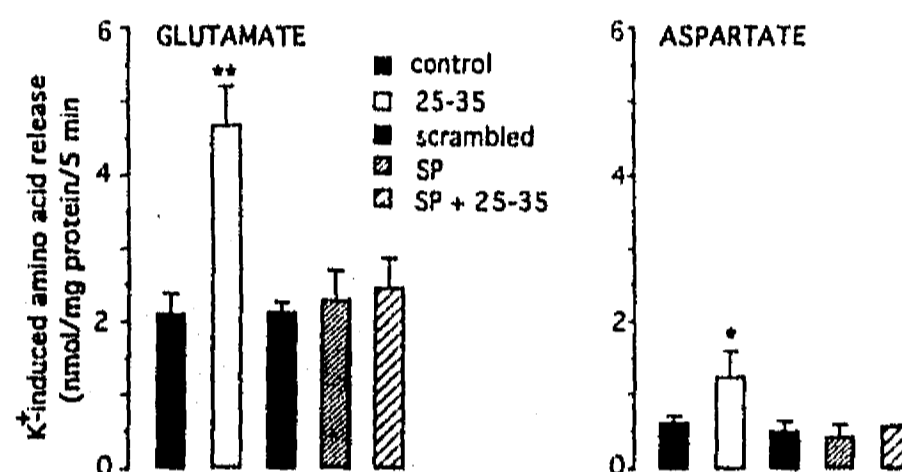


Fig. 2. Effect of βAP peptides and of substance P on the K⁺-depolarization-induced glutamate and aspartate release, in the presence of Ca²⁺, in hippocampal slices from young rats. The different experimental conditions were handled in parallel. Basal release values have been subtracted. All peptides were added at 10 μM concentration. Means ± SEM for six to eight independent experiments. SP, substance P. *P < 0.05; **P < 0.01, compared with control.

disrupting effects of fragment 25–35 is in the 20–40 μM range (Yankner et al., 1990; Mattson et al., 1992; Pike et al., 1993), and the formation of peptide aggregates that occurs in culture media appears to be directly related to their neurotoxic effects (Pike et al., 1993, 1995). The difference between these observations and our present results could occur because the association of the aggregated peptide with the neuronal membrane is not restricted in cultures, whereas in tissue slices its access to the involved membranal sites may be limited.

The lack of effect of substance P on amino acid release suggests that a specific amino acid sequence present in βAP 25–35 is required for the releasing action. This hypothesis is strongly supported by the fact that a scrambled sequence of the 25–35 peptide was also ineffective in modifying the release. The scrambled sequence used was also without neurotoxic effects in neuronal cultures (Mattson et al., 1992). On the other hand,

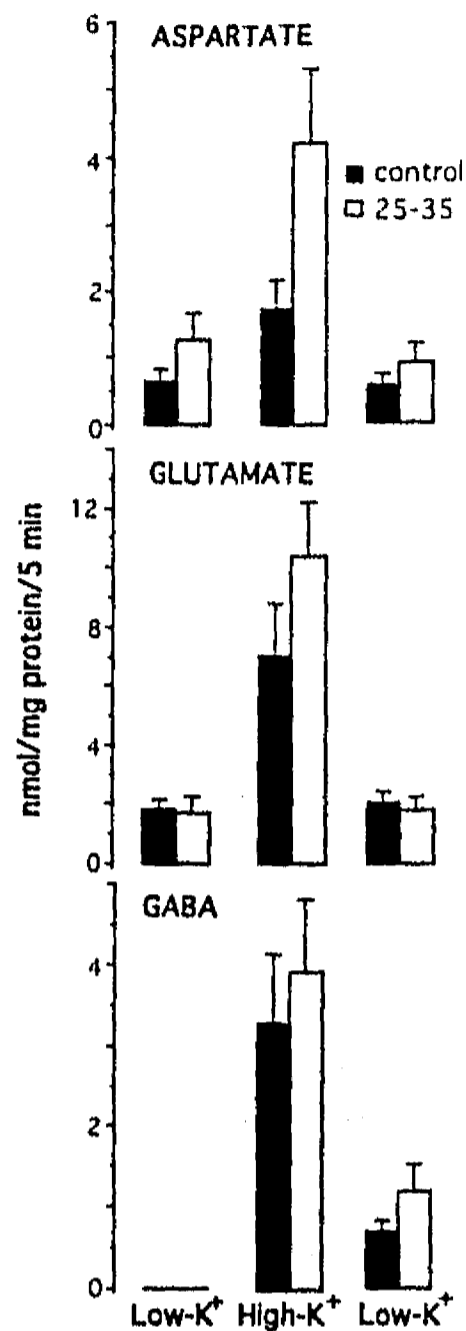


Fig. 3. Effect of 1 hr preincubation with 10 μ M fragment 25-35 on aspartate, glutamate, and GABA release in hippocampal slices from aged rats, in the presence of Ca^{2+} in the medium. Means \pm SEM for 11 independent experiments.

the finding that substance P completely blocked the stimulatory action of fragment 25-35 suggests that the former interferes the interaction of fragment 25-35 with the neuronal membrane. Substance P also prevents the neurotoxic effects of fragment 25-35, both in vivo and in cell cultures (Yankner et al., 1990; Kowal et al., 1991), and it has been reported that the two peptides, which possess a similar amino acid composition, can bind to the same serpin-enzyme complex receptor (Joslin et al., 1991).

Another interesting finding of the present work was that in hippocampal slices from aged rats the basal and the K^+ -induced release of the excitatory transmitters aspartate and glutamate, particularly the latter, were significantly increased with respect to young rats. At present it is not clear whether changes in excitatory neurotransmission occur with age. However, basal glutamate release was reported to be higher in striatal and

hippocampal slices from aged mice compared with young mice (Freeman and Gibson, 1987), and in rat lateral striatum the basal glutamate release in vivo increased with age (Donzanti et al., 1993). Furthermore, the K^+ -stimulated glutamate release from human cortical tissue was enhanced with age (Smith et al., 1983).

Our results support the notion of alterations in glutamate-related mechanisms with aging and with the presence of β AP 25-35. These results are particularly interesting since age is the primary risk factor for AD, and glutamatergic neurotransmission has been repeatedly considered as an important factor in the mechanisms of neuronal death occurring in neurodegenerative diseases (Greenamyre and Young, 1989; Beal, 1992). The stimulation of excitatory amino acid release in the hippocampus reported in this work could be relevant for explaining some of the pathological changes and neuronal loss found in AD. β AP accumulating in amyloid plaques may chronically potentiate the release of excitatory amino acids occurring under normal functioning of excitatory pathways, which are possibly enhanced in aged tissue, and thus may contribute to neurodegeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA (IN200493) and PADEP (030365), UNAM.

REFERENCES

- Adam-Vizi V (1992): External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem* 58:395-405.
- Arias C, Tapia R (1986): Differential calcium dependence of γ -aminobutyric acid and acetylcholine release in mouse brain synaptosomes. *J Neurochem* 47:396-404.
- Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993): Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membrane: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 567-571.
- Beal MF (1992): Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* 2:657-662.
- Braak H, Braak E (1994): Pathology of Alzheimer's disease. In Calne DB (eds): "Neurodegenerative Diseases." Philadelphia: WB Saunders, pp 585-613.
- Bradford M (1979): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Gable C (1992): Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A β amyloid peptides analogs. *J Biol Chem* 267:546-554.
- Donzanti BA, Hite JF, Yamamoto BK (1993): Extracellular glutamate levels increase with age in the lateral striatum: Potential involvement of presynaptic D-2 receptors. *Synapse* 13:376-382.
- Flavin HJ, Seyfried TN (1994): Enhanced aspartate release related to epilepsy in (EL) mice. *J Neurochem* 63:592-595.
- Frautschy SA, Bard A, Cole M (1991): Effects of injected Alzheimer

- β -amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8362-8366.
- Freeman GB, Gibson GE (1987): Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiol Aging* 8:147-152.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guldo T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995): Alzheimer neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Glenner GG, Wong CW (1984): Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Greenamyre J, Young A (1989): Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10:593-602.
- Hartmann H, Eckert A, Müller WE (1993): β -Amyloid protein amplifies calcium signalling in central neurons from the adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1216-1220.
- Joslin G, Krause JE, Hershey AD, Adams SP, Fallon RJ, Perlmutter DH (1991): Amyloid- β peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor. *J Biol Chem* 266: 21897-21902.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA (1991): An in vivo model for the neurodegenerative effects of β -amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7247-7251.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993): Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured CNS neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7951-7955.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992): β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376-389.
- Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE (1993): Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated β -amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res* 621:35-49.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1989): Excitatory and inhibitory amino acids in the hippocampus. In Chan-Palay V, Köhler C (eds): "Neurology and Neurobiology. Vol. 52: The Hippocampus—New Vistas." New York: Alan R. Liss, pp 97-117.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991): In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563:311-314.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993): Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.
- Pike CJ, Walencewicz-Waserman AJ, Kosmonki J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995): Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: Contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64:253-265.
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R (1994): Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem Int* 24:363-368.
- Selkoe DJ (1991): The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.
- Selkoe DJ (1993): Physiological production of the β -amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16:403-409.
- Smith CCT, Bowen PM, Davison AN (1983): The evoked release of endogenous amino acids from tissue prisms of human neocortex. *Brain Res* 269:103-109.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β -protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.

CONCLUSIONES GENERALES

En virtud de que en cada uno de los artículos presentados se discutieron cada uno de los resultados obtenidos, en esta última parte se presentara un panorama general sobre los hallazgos del trabajo de tesis, con énfasis en las aportaciones concretas. Por otro lado, se pretende también integrar los resultados experimentales vertidos en los diferentes artículos en una hipótesis general de trabajo para investigaciones subsiguientes acerca de la muerte neuronal en la Demencia de Alzheimer.

Mecanismos que inducen fosforilación de proteínas del citoesqueleto. Como se ha establecido en la presente tesis, un aspecto importante para entender los mecanismos básicos que conducen a la pérdida neuronal en la EA es el estudio de los cambios metabólicos que inducen fosforilación de las proteínas MAP2 y tau, y cómo la tasa de fosforilación/desfosforilación puede relacionarse con un funcionamiento neuronal normal o alterado. En vista de que se conoce muy poco acerca de cómo se regula esta tasa de fosforilación, en el primer trabajo se utilizó el ácido okadaico (una droga que inhibe específicamente proteínas fosfatasas de serina/treonina), como herramienta útil para inducir fosforilación de proteínas del citoesqueleto y estudiar las consecuencias en la supervivencia neuronal. Estos estudios se realizaron en cultivos primarios de neuronas corticales de rata así como en una línea celular derivada de un neuroblastoma humano y en cultivos de astrocitos.

El ácido okadaico, a concentraciones que, *in vitro*, inhiben preferentemente a la proteína fosfatasa 2A, indujo rápidamente la fosforilación de las proteínas MAP2 y tau. Este efecto temprano de fosforilación de proteínas del citoesqueleto se asoció con una

rápida retracción neurítica y con muerte neuronal tardía (24 horas después de una exposición a 250 nM de ácido okadaico por 5, 10 o 15 min), sugiriendo que el citoesqueleto es un blanco sensible de alteraciones que pueden conducir a la neurodegeneración.

Como ya ha sido discutido a lo largo de varios capítulos de la tesis, el grado de fosforilación de MAP2 y tau determina su afinidad por los microtúbulos y de esta manera, su estabilización. En los experimentos realizados en neuronas cultivadas, el aumento en la fosforilación de MAP2 y tau se asoció con alteraciones dramáticas de la red que conforma el neuroesqueleto. Estas alteraciones se manifestaron principalmente como retracción de las dendritas neuronales y cambios de morfología del soma.

Dado que una de las funciones vitales de la neurona es el transporte de materiales desde el soma a las terminales nerviosas y viceversa, y que esta función depende del citoesqueleto y sus diferentes componentes, el desarreglo del sistema microtubular puede ser un factor importante capaz de inducir muerte neuronal.

De esta manera, una de las aportaciones importantes del primer trabajo presentado en la tesis fue el demostrar la participación de las proteínas fosfatasas 1 y/o 2A en la remoción de fosfatos a las moléculas de MAP2 y tau en neuronas cultivadas, y el papel de la hiperfosforilación de proteínas del citoesqueleto en la degeneración neuronal. Existen muchos datos que indican que la hiperfosforilación de la proteína tau juega un papel muy importante en la neurodegeneración en la EA. Nuestro trabajo demuestra que la hiperfosforilación no sólo de la tau sino de la MAP2 se asocia con muerte neuronal. Es plausible pensar que en la EA, los cambios en el equilibrio

fosforilación/desfosforilación de muchas otras proteínas celulares puedan estar alterados y sean la manifestación bioquímica de un defecto metabólico generalizado que puedan originar señales que conduzcan a la muerte neuronal.

Neurotransmisión excitadora y muerte neuronal in vivo En el segundo trabajo se realizó un estudio en el cual se analizó papel de la neurotransmisión excitadora en la muerte neuronal. Para esto se siguió el curso temporal de la neurodegeneración en el hipocampo de la rata (visualizada con tinción de Nissl) y los cambios asociados del citoesqueleto (con el inmunoteñido para MAP2). Para estudiar estos efectos se utilizaron el ácido kaínico, como activador de receptores para AMPA/kainato, y del ácido dihidrokaínico, el cual es un inhibidor de la recaptura de glutamato. Con el uso de los anticuerpos monoclonales para MAP2, pudimos analizar cambios tempranos en esta proteína del citoesqueleto en respuesta a los efectos excitotóxicos de las drogas utilizadas. El análisis inmunohistoquímico reveló que la MAP2 sufre cambios muy tempranos en su redistribución celular y posteriormente en su desaparición, que apoyan su papel como un marcador muy sensible de la muerte neuronal. Nuestro trabajo demuestra que, previamente a la neurodegeneración, existe una retracción de los procesos neuríticos a tiempos tan cortos como 3 horas después de la exposición a las neurotoxinas. La desaparición temprana en el inmunoteñido para MAP2 fue interpretada como retracción neurítica inicial, ya que a tiempos cortos no se observa pérdida neuronal y, además, es muy similar a la observada en los cultivos neuronales tratados con el ácido okadaico. Existe evidencia de otros grupos (como ya se mencionó en la discusión del trabajo en preparación), que señala la posibilidad de estimular proteína cinasas

dependientes de Ca^{2+} como resultado de la activación de receptores para aminoácidos excitadores. Lo anterior sugiere que, dentro del repertorio de cambios metabólicos que induce el glutamato o sus agonistas, se deben considerar alteraciones en el equilibrio de fosforilación/desfosforilación de proteínas de citoesqueleto. Esta posibilidad abre una línea de investigación interesante que no ha sido suficientemente explorada.

Por otro lado, ha sido demostrado por otros grupos de investigación y en otros modelos, que conforme avanza el curso de la neurodegeneración, la proteína MAP2 se va acumulando en el soma de las neuronas afectadas para posteriormente desaparecer. En nuestro estudio observamos un curso temporal que demuestra que, 3 h después de la exposición del hipocampo a las neurotoxinas, existe desaparición del inmunoteñido para MAP2, lo cual puede significar retracción del árbol dendrítico por hidrólisis de la proteína (lo cual ha sido demostrado en otros modelos en los que, aplicando ácido kaínico se activa calpaína I y se induce proteólisis de espectrina y de MAP2), o por cambios metabólicos que disminuyan su afinidad a los microtúbulos (como podría ser el incremento en la fosforilación de esta proteína). Como la MAP2 es una proteína que se concentra principalmente en las dendritas, su ulterior acumulación en el soma neuronal apoya el mecanismo de la desestabilización de los microtúbulos como un suceso temprano asociado con la neurotoxicidad. En apoyo a lo anterior se observó a las 12 horas, incremento de la inmunorreactividad en el cuerpo de las células piramidales y a las 24 horas desaparición de la inmunorreactividad de esta proteína asociado con pérdida neuronal visualizada con la tinción de Nissl. Un aspecto importante estudiado en este trabajo, es la participación de los diferentes receptores de aminoácidos excitadores en

dependientes de Ca^{2+} como resultado de la activación de receptores para aminoácidos excitadores. Lo anterior sugiere que, dentro del repertorio de cambios metabólicos que induce el glutamato o sus agonistas, se deben considerar alteraciones en el equilibrio de fosforilación/desfosforilación de proteínas de citoesqueleto. Esta posibilidad abre una línea de investigación interesante que no ha sido suficientemente explorada.

Por otro lado, ha sido demostrado por otros grupos de investigación y en otros modelos, que conforme avanza el curso de la neurodegeneración, la proteína MAP2 se va acumulando en el soma de las neuronas afectadas para posteriormente desaparecer. En nuestro estudio observamos un curso temporal que demuestra que, 3 h después de la exposición del hipocampo a las neurotoxinas, existe desaparición del inmunoteñido para MAP2, lo cual puede significar retracción del árbol dendrítico por hidrólisis de la proteína (lo cual ha sido demostrado en otros modelos en los que, aplicando ácido kaínico se activa calpaína I y se induce proteólisis de espectrina y de MAP2), o por cambios metabólicos que disminuyan su afinidad a los microtúbulos (como podría ser el incremento en la fosforilación de esta proteína). Como la MAP2 es una proteína que se concentra principalmente en las dendritas, su ulterior acumulación en el soma neuronal apoya el mecanismo de la desestabilización de los microtúbulos como un suceso temprano asociado con la neurotoxicidad. En apoyo a lo anterior se observó a las 12 horas, incremento de la inmunorreactividad en el cuerpo de las células piramidales y a las 24 horas desaparición de la inmunorreactividad de esta proteína asociado con pérdida neuronal visualizada con la tinción de Nissl. Un aspecto importante estudiado en este trabajo, es la participación de los diferentes receptores de aminoácidos excitadores en

la muerte neuronal. La neurotoxicidad inducida por el ácido kaínico mostró un patrón selectivo que afectó a las regiones de CA1 y CA3-4 del hipocampo, mientras que la región de CA2 no se afectó. Estas lesiones fueron parcialmente revertidas por la administración del antagonista NBQX. Como este antagonista tiene una mayor selectividad para antagonizar los receptores para AMPA que los de ácido kaínico, y en vista de que la protección obtenida se observó sólo en la región de CA1, se puede concluir que la muerte neuronal en esta zona del hipocampo es mediada por la activación de receptores para AMPA, mientras que en las regiones de CA3-4 es mediada por los receptores para ácido kaínico de alta afinidad. En el trabajo original se discutió la participación de los diferentes receptores para aminoácidos excitadores a la luz del conocimiento que se tiene sobre la distribución de éstos en las diferentes subregiones del hipocampo.

Estos hallazgos señalan la importancia de la proteína MAP2 en el mantenimiento de la integridad neuronal y su participación como una proteína blanco en la muerte neuronal por excitotoxicidad.

Por otro lado, en este trabajo se presenta evidencia de la neurotoxicidad de un antagonista del transporte de glutamato, el dihidrokainato. Este compuesto eleva la concentración endógena de glutamato en varias condiciones experimentales (se mencionaron resultados experimentales de otros investigadores) e indujo en nuestros experimentos, neurodegeneración selectiva de las neuronas de CA1. Es importante señalar que la muerte neuronal observada con este compuesto fue antagonizada por el MK-801, que es un antagonista de receptores para NMDA. Los resultados obtenidos

pueden indicar que la elevación de glutamato endógeno en el hipocampo, activa preferentemente receptores de NMDA los cuales serían los responsables de la muerte neuronal y del patrón de cambios en la proteína MAP2, lo cual es una aportación importante de esta tesis. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad (no explorada aún), de que el dihidrokaínico ejerza su acción neurotóxica activando directamente los receptores de NMDA. Esta posibilidad es importante de analizar en vista de que experimentos realizados en el laboratorio demuestran que otro inhibidor de la recaptura del glutamato, el pirrolidín dicarboxilato (PDC), eleva el glutamato endógeno y no induce neurodegeneración (Massieu, trabajo en preparación).

La proteína β -amiloide, la neurotransmisión excitadora y la muerte neuronal

Existe discusión acerca de si la presencia de depósitos insolubles de la β AP es capaz de inducir muerte neuronal o al menos de incrementar la vulnerabilidad de las neuronas ante otros agentes agresores exógenos o endógenos. Hay evidencia que señala los efectos neurotóxicos de la β AP y de algunos de sus péptidos activos en cultivos primarios de neuronas y en el animal vivo. En el último trabajo de la presente tesis se analiza el papel del péptido activo 25-35 en la liberación de neurotransmisores en rebanadas de hipocampo de ratas jóvenes y de ratas viejas. En este trabajo el péptido activo 25-35 incrementó la liberación de aminoácidos excitadores (glutámico y aspártico) en condiciones de despolarización neuronal. Este hallazgo abre la posibilidad de estudiar el papel neurotóxico de la β AP al aumentar la vulnerabilidad neuronal incrementando de manera crónica la neurotransmisión excitadora cerebral. Estos hallazgos cobran mayor interés por el hecho, también demostrado en este trabajo, que en ratas viejas existe un

tono basal incrementado de liberación de glutámico y aspártico. Dado que uno de los principales factores de riesgo reconocidos para presentar la EA es la edad, este hallazgo puede ser importante para apoyar la hipótesis excitotóxica de este padecimiento.

Comentario final

Son muchas las preguntas que quedan por contestar en cuanto a la pérdida de neuronas cerebrales, los tipos de lesiones morfológicas que consistentemente se encuentran en la EA y la disminución progresiva e inexorable de las capacidades intelectuales de un sujeto con este tipo de demencia.

Hasta la fecha, ninguno de los estudios neuroquímicos o inmunocitoquímicos de las alteraciones neuronales encontradas en la EA parecen señalar el defecto primario o causal de este tipo de enfermedad, además, no existe evidencia de que un factor común pueda explicar los dos tipos de lesiones que se consideran patognomónicas de este padecimiento. En la presente tesis queremos presentar una hipótesis tentativa de asociación de mecanismos capaces de actuar de manera concertada e incidir negativamente en la viabilidad neuronal (Fig. 9).

En esta hipótesis se señala el papel de la neurotransmisión excitadora como uno de los factores desencadenantes de la muerte neuronal en la EA. Nosotros encontramos que en ratas viejas, la liberación de glutamato endógeno parece estar incrementada como resultado de la edad. Además los péptidos activos de la proteína β -amiloide pueden potenciar la liberación Ca^{2+} -dependiente de glutamato y aspartato. La sobreactivación de receptores para aminoácidos excitadores induce neurodegeneración (como ya ha sido ampliamente demostrado por muchos grupos de investigación) y, en

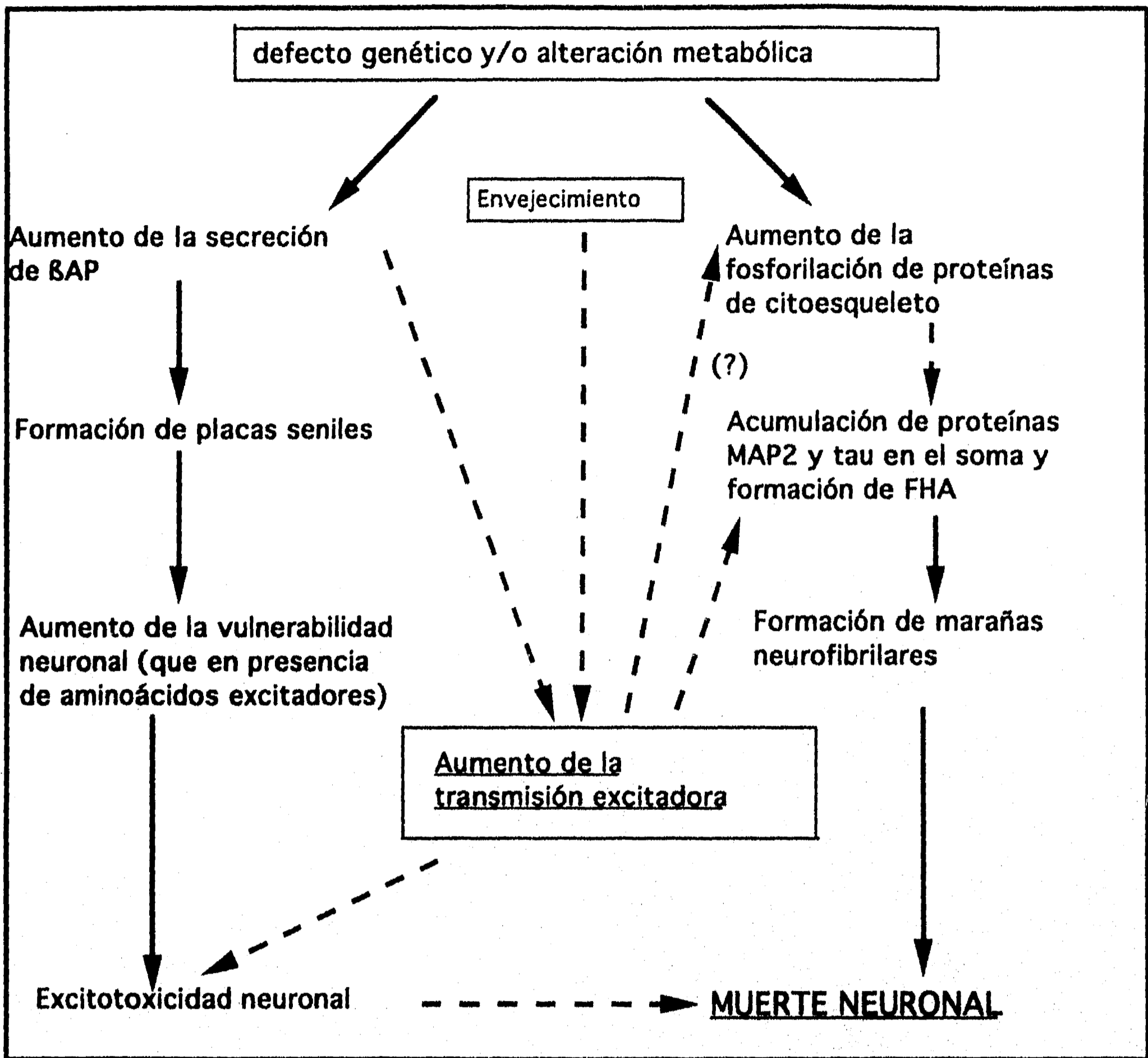


Fig 9 Esquema de alteraciones propuestas para explicar la formación de las placas seniles, los filamentos helicoidales apareados (FHA) y la participación de la neurotransmisión excitadora. Las flechas discontinuas muestran las conclusiones de algunos de los experimentos de la tesis. La interrogación señala una vía no demostrada aún.

nuestro modelo de inyección intrahipocámpica de ácidos kaínico y dihidrokaínico se reproduce el patrón de acumulación de proteína MAP2 en el soma de las neuronas afectadas, antes de la muerte celular. Este patrón de lesión celular y de redistribución somática de una proteína asociada a los microtúbulos de las dendritas es muy similar a los efectos producidos por la administración del ácido okadaico (usado como agente inductor de fosforilación de proteínas) en cultivos de neuronas. De esta manera, es plausible pensar que, entre los efectos neuronales de los aminoácidos excitadores, la fosforilación de proteínas del citoesqueleto es una posibilidad interesante para analizar y que podría explicar la serie de sucesos metabólicos que, en condiciones de estimulación excitadora crónica, desencadenaría la formación de los filamentos apareados helicoidales y las marañas neurofibrilares.

Aunque resulta claro que la hipótesis anterior tiene el defecto de enfocar la muerte neuronal en la EA desde un punto de vista monocausal y que no explica todas las anomalías neuronales encontradas, puede abrir la posibilidad de explorar algunos de los factores que, de manera concertada, actúan y alteran el equilibrio metabólico de las neuronas que finalmente mueren en este devastador padecimiento. En el campo de la neurodegeneración en la EA quedan muchas preguntas sin resolver. Otro aspecto fundamental es el que se refiere al grado de alteración del tejido cerebral para que la demencia se manifieste. Datos que provienen de varios grupos de investigación parecen apoyar la hipótesis de que múltiples anomalías neuronales ocurren concomitantemente con el desarrollo de los síntomas clínicos. El conocimiento de la secuencia de estos cambios neuronales y su impacto en las manifestaciones clínicas

pueden ayudar a conocer mejor el origen causal de la EA y sobre todo, a brindar mejores opciones terapéuticas para los ancianos en riesgo de padecerla.

BIBLIOGRAFIA

- Ala T, Romero S, Knight F, Feldt K y Frey IIW (1990): GM-1 treatment of Alzheimer's disease. Arch Neurol 47:1126.
- Arends MJ, Morris RG y Wyllie AH (1990): Apoptosis. The role of endonuclease. Am J Pathol 136:593.
- Aronson MK, Ooi WL, Geva DL, Masur D, Blau A y Frishman W (1991): Dementia. Age-dependent incidence, prevalence and mortality in the old old. Arch Int Med 151:989.
- Baudier J y Cole DR (1987): Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. J Biol Chem 262:17577.
- Beal MF, Clevens RA, Chattha GK, MacGarvey Mu, Mazurek MF y Gabriel SM (1988): Galanin-like immunoreactivity is unchanged in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. J Neurochem 51:1935.
- Ben-Shachar D y Youdim MBH (1991): Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "Parkinsonism" in rats. J Neurochem 57:2133
- Black MM y Greene LA (1982): Changes in the colchicine susceptibility of microtubules associated proteins with neurite outgrowth: studies with nerve growth factor responsive PC12 pheochromocytoma cells. J Cell Biol 95:379.
- Blessed G, Tomlinson B y Roth M (1968): The association between quantitative measures of dementia and of senile changes in the cerebral grey matter of elderly subjects. Br J Psychiatry 114:797.

- Bloq P y Marinesco G (1892): Sur les lésions et la pathogénie de le 'épilepsie dite essentielle. Semaine Med 12:445.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ y Lee V-YM (1993): Abnormal tau phosphorylation of Ser³⁹⁶ in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 10:1089.
- Breitner JC, Silverman JM, Mohs RC y Davis KL (1988): Familial aggregation in Alzheimer disease: comparison of risk among relatives of early- and late-onset cases, and among male and female relatives in successive generations. Neurology 38:207.
- Brown WT (1992): Progeria: a human disease model of accelerating aging. Am J Clin Nutr 55:1222S.
- Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G y Schulte-Hermann (1990): Determination of the length of of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. Carcinogenesis 11:847.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, y cols (1994): Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. Science 265:1464.
- Butner K y Kirschner M (1991): Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. J Cell Biol 115:717.
- Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE y Greengard P (1992): Cholinergic agonists and interleukin I regulate processing and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. Proc Natl Acad Sci U S A 89:10075.

- Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV y Greengard P (1992): Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA 89:3055.
- Ciechanover A. (1994): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Cell 79:13.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue C, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I y Selkoe DJ (1992): Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer disease increases β -protein production. Nature 360:672.
- Chartier-Harlin M-C, Crawford F, Holden H y cols (1991): Early onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of β -amyloid gene. Nature 353:844.
- Clarke y cols (1993): Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature 362:849.
- Cleveland DW, Hwo SY y Kirschner MW (1977): Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubuline. J Mol Biol 116:207.
- Daniels MP (1972): Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro. J Cell Biol 53:164.
- Davies P, Katzman R y Terry RD (1980): Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer's disease and Alzheimer senile dementia. Nature 288:279.
- Davies P (1993): Neuronal abnormalities, not amyloid, are the cause of dementia in Alzheimer disease. In Alzheimer Disease (Terry RD, Katzman R y Bick KL ed) Raven Press, New York, 1993. p. 327.

- Delacourte A y Defossez A (1986): Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurosci* 76:173.
- Dickson DW, Wertkin A, Mattiace LA, Fier E, Kress Y, Davies P y Yen S-H (1990): Ubiquitin immunoelectron microscopy of dystrophic neurites in cerebellar senile plaques of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 79:486.
- Dinsmore JH y Solomon F (1991): Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neural differentiation. *Cell* 64:817.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag F, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M y Mandelkow E (1992): Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* 11:2131.
- Ellis RE y Horvitz HR (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell* 44:817.
- Ellis RE, Yuan J y Horvitz HR (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 63:663.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D y Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122.
- Fesus LV, Thomazy V y Falus A (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 224:104.
- Francon J, Lennon AM, Fellous A, Mareck A, Pierre M y Nunez J (1982): Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *Eur J Biochem* 129:465.

- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C y cols (1995): Alzheimer neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373:523.
- Geula C y Mesulam M-M. (1994): Cholinergic systems and related neuropathological prediction patterns in Alzheimer disease. In *Alzheimer disease* (Terry RD, Katzman R y Bick KL ed) Raven Press, New York. p. 263.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE y Klug A (1988): Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filaments of Alzheimer disease: identification as a microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4051.
- Gong Ch-X, Singh TJ, Grundke-Iqbal I y Iqbal K (1993): Phosphoprote in phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61:921.
- Gottfries CG, Adolfsson R, Aquilonius SM y cols (1983): Biochemical changes in dementia disorders of Alzheimer type (AD/SDAT). *Neurobiol Aging* 4:261.
- Greenberg SG y Davies P (1990): A preparation of Alzheimer paired helical filaments amenable to conventional biochemical analysis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87:5827.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung Y-C, Zaidi MS y Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084.
- Haass C, Hung AY y Selkoe DJ (1991): Processing of β -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 11:3783.

- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY y Selkoe DJ (1992): Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 367:500.
- Hendricks M, van Duijn CM, Cras P y cols (1992): Presenile dementia and cerebral hemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature Genetics* 1:218.
- Hengartner MO, Ellis RE y Horvitz HR (1992): *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494.
- Himmler A (1989): Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389.
- Horsburgh K y Saitoh T (1994): Altered signal transduction in Alzheimer disease. In *Alzheimer disease* (Terry RD, Katzman R, Bick KL ed) Raven Press, New York. p. 387.
- Hyman BT, Van Hoesen GW y Damasio AR (1987): Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol* 22:37.
- Iqbal K y Grundke-Iqbal (1991): Alzheimer's disease: from cytoskeletal protein pathology to neuronal degeneration. In *Alzheimer's disease: basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies*. (Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B Wisniewski HM ed) Wiley, England. p. 173.
- Jenner O, Dexter DT, Sian J, Shapira AHV y Marsden CD (1992): Oxidative stress a a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 32:S82.

- Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K y Muller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R y cols. (1988): Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23:138.
- Kerr JFR (1971): Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105:13.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S y Ito H (1988): Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331:530.
- Koo EH, Abraham CR, Potter H, Cork LC y Price DL (1991): Developmental expression of α 1-antichymotripsin in brain may be related to astrogliosis. *Neurobiol Aging* 12:495.
- Kowall NW y Kosik KS (1987): Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 22:639.
- Kowal NW y Beal MF (1991): Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 29:162.
- Kwo-On-Yuen PF, Mandel R, Chen AD y Thal LJ (1990): Tetrahydroaminoacridine improves the spatial acquisition deficit produced by nucleus basalis lesions in rats. *Exp Neurol* 108:221.
- Lee VM-Y, Balin BJ, Otvos L y Trojanowski JQ (1991): A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251:675.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingell W, Yu Ch-en, y cols. (1995): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973.
- Lipton SA y Rosenberg PA (1994): Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *New Engl J Med* 330:613.
- Lowe SL, Francis PT, Procter AW, Palmer AM, Davison AN y Bowen DM (1988): Gamma-aminobutyric acid concentration in brain tissue at two stages of Alzheimer's disease. *Brain* 111:785.
- McConkey DJ. y Orrenius S. (1994): Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol.* 4:370.
- McLaughlin M, Ross MB, Milligan G, McCulloch J y Knowler JT (1991): Robutness of G-proteins in Alzheimer's disease: an immunoblot study. *J Neurochem* 57:9.
- Mahley RW (1988): Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622.
- Mann DMA, Jones D, Snowden JS, Neary D y Hardy J (1992): Pathological changes in the brain of a patient with familial Alzheimer's disease having a missense mutation at codon 717 in the amyloid precursor gene. *Neurosci Lett* 137:225.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, Mc-Donald BL y Beyreuther K (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4245.
- Matsumaya SS y Jarvik LF (1989): Hypothesis: microtubules, a key of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8152.

- Matter A (1979): Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 36:179.
- Mattson MP (1990): Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and calcium influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 4:105.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I y Rydel RE (1992): β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:379.
- Mattson MP (1995): Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 738:50.
- Matus A (1988): Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann Rev Neurosci* 11:29.
- Matus A (1990): Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84:134.
- Mayer, RJ, Arnold J, Laszlo L, Landon M y Lowe J (1991): Ubiquitin in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1089:141.
- Mayer RJ, Laszlo L, Landon M, Hope J y Lowe J (1992): Ubiquitin, lysosomes, and neurodegenerative diseases. In *Proteases and proteases inhibitor, in Alzheimer's disease pathogenesis* (Banner CDB y Nixon RA ed) *Ann NY Acad Sci* 674:149.
- Meldrum BS (1988): Excitatory amino acids in epilepsy and in acute and chronic neuronal degenerative disorders. In *amino acids availability and brain function in health and disease*. (Meldrum BS ed) Springer-Verlang, Berlin. p. 325.

- Michel PH, Commenges D, Dartigues JF y Gagnon M (1990): Study of the relationship between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Neurobiol Aging* 11:264
- Miller DI, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K y Iqbal K (1993): Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 301:41.
- Mori H, Kondo J y Ihara Y (1987): Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235:1641.
- Morrison JH (1993): Differential vulnerability, connectivity, and cell typology. *Neurobiol Aging* 14:51.
- Mouradian MM, Blin J, Giuffra M y cols (1991): Somatostatin replacement therapy of Alzheimer dementia. *Ann Neurol* 30:610.
- Mufson EJ, Kher AD, Wainer BH y Mesulam M-M (1987): Cortical effects of neurotoxic damage to the nucleus basalis in rats: persistent loss of extrinsic input and lack of transsynaptic effect upon the number of somatostatin-containing cholinesterase-positive, and cholinergic neurons. *Brain Res* 417:385.
- Nieto-Sampedro M y Mora F (1994): Active microglia, sick astroglia and Alzheimer type dementias. *NeuroReport* 5:375.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ y Growdon JH (1992): Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258:304.
- Nixon RA, Cataldo AM, Paskevich PA, Hamilton DJ, Wheelock TR y Kanaley-Andrews

- L (1992): The lysosomal system in neurons. Involvement at multiple stages of Alzheimer's disease pathogenesis. In *Proteases and proteases inhibitors, in Alzheimer's disease pathogenesis* (Banner CDB y Nixon RA ed) Ann NY Acad Sci 676:65.
- Novak M, Wischik CM, Edwards PC, Pannell R y Miltein C (1989): *Progr Clin Biol Res* 317:755.
- Novak M, Kabat J y Wischik CM (1993): Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 12:365.
- Ohm TG, Bohl J y Lemmer B (1991): Reduced basal and stimulated adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease correlated with histopathological changes. *Brain Res* 540:229.
- Palmer AM, Stratmann GC, Procter AW y Bowen DM (1988): Possible neurotransmitter basis of behavioural changes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 23:616.
- Panchalingam K, Pettegrew JW, Strychor S y Tretta M (1990): Effect of normal aging on membrane phospholipid metabolism by ^{31}P in vivo NMR spectroscopy (abstract). *Soc Neurosci Abstr* 16:843.
- Parker WD, Filley CM, y Parks JK (1990): Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40:1302.
- Pearce BR, Palmer AM, Bowen DM, Wilcock GK, Esiri MM y Davison AN. (1984): Neurotransmitter dysfunction and atrophy of the caudate nucleus in Alzheimer's disease. *Neurochem Pathol* 2:221.

- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG y Tschopp J (1993): Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 12:371.
- Pericak-Vance MA, Bedout JL, Gaskell PC y Roses AD (1991): linkage studies in familial Alzheimer's disease-evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Genet* 48:1034.
- Pettegrew JW, McClure RJ, Kanfer JN, Preston R, Panchalingam K y Klunk WE (1994): The role of membranes and energetics in Alzheimer Disease. In *Alzheimer disease* (Terry RD, Katzman R y Bick KL). Raven Press, New York. p. 369.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D y Mahley RW (1987): Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 917:148.
- Procter AW, Palmer AM, Francis PT y cols (1988): Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 50:790.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G y Wisniewski HM (1987): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque core amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4190.
- Rocca WA, Amaducci LA y Schoenberg BS (1986): Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 19:415.
- Rose RM (1991): *Evolutionary biology of aging*. Oxford university Press, England.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo L y White K (1989): A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 86:2478.

Rosen DR, Siddique T, Patterson E y cols (1993): Mutation y Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59.

Rossor MN, Rehfel JF, Emson PC, Mountjoy CQ, Roth M y Iversen LL (1991): Normal cortical concentration of cholecystinin-like immunoreactivity with reduced choline acetyltransferase activity in senile dementia of Alzheimer type. *Life Sci* 29:405.

Rothman SM y Olney JW (1987): Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 10:299.

Rusell SW, Rosenau W y Lee JC (1972): Cytolysis induced by human lymphotoxin. Cinemicrographic and electron microscopic observations. *Am J Pathol* 69:103.

Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Pappolla MA y Robakis NK (1992): Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J Neurosci Res* 33:319.

Sapolsky RM (1986): Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid. *Neuroendocrinol* 43:440.

Schmidley JW (1990): Free radicals in central nervous system ischemia *Stroke* 21:1086

Schubert D, Jin L-W, Saitoh T y Cole G (1989): The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3:689.

Schwartz JH (1985): Synthesis and distribution of neuronal proteins. In *Principles of Neural Science* (Kandel ER y Schwartz JH ed) Elsevier, New York. p. 37.

Schwartz LM, Smith SW, Jones MEE y Osborne BA (1993): Do all programmed cell

- deaths occur via apoptosis? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:980.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ y cols. (1993): Increased amyloid β -peptide deposition as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci (USA).
- Selkoe DJ (1989): Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. Annu Rev. Neurosci 12:463.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H y cols (1992): Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptides from biological fluids. Nature 359:325.
- Shapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P y Marsden CD (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem 54:823.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C y cols. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375:754.
- Shivers BD y cols. (1988). EMBO J 7:1365.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A y Price DL (1990): Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. Science 248:492.
- Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ y Freeman JA (1986): Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. Proc Natl Acad Sci USA 83:1130.
- Spagnoli A, Lucca U, Menasce G, Bandera L y cols (1991): Long-term acetyl-1-carnitine

- treatment in Alzheimer's disease. *Neurology* 41:1726.
- St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Conneally PM y Gusella J (1987): The genetic defect causing familial Alzheimer disease maps on chromosome 21. *Science* 235:885.
- St George-Hyslop PH, Haines J, Rogaev E y cols (1992): Genetic evidence for a novel familial Alzheimer disease gene on chromosome 14. *Nature Genetics* 2:330.
- Stopa EG, González A, Chorsky R y cols (1990): Basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Res Commun* 171:690.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS y Roses AD (1993): High avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977.
- Strittmatter W, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D y cols (1994): Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 125:163.
- Subbarao KV, Richardson JS y Ang LC (1990): Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 55:342.
- Tanner CM (1989): The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2:49.
- Trump BF, Berezsky IK y Osornio-Vargas (1981): Cell death and the disease process. The role of calcium. In *Cell death in biology and pathology* (Bowen ID y Lockshin

- RA ed) Chapman and Hall, London. p. 209.
- Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E y Croce CM (1985): The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining. *Science* 229:1390.
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL y Tator CH (1993): Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neuron. *J Neurosci* 13:2085.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y y Tomonaga M (1991): The growth inhibitory factor that is deficient in Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7:337.
- Umansky SR (1982): The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol* 97:591.
- Vale RD, Reese TS y Sheetz MP (1985): Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Haan J, Bakker E y Roos RA (1992): Alzheimer's disease and hereditary hemorrhage with amyloidosis-ducht type share a decrease in cerebrospinal fluid levels of amyloid beta-protein precursor. *Ann Neurol* 32:215.
- Vaux DL, Haecker G y Strasser A (1994): An evolutionary perspective of apoptosis. *Cell* 76:777.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W y Crowther RA (1988): Structure and characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4884.
- Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW y Davies P (1986): A neuronal antigen in the brain

of Alzheimer patients. *Science* 232:648.

Wyllie AH (1980): Glucocorticoid-induced lymphocyte apoptosis is associated with endonuclease activation. *Nature* 284:555.

Wyllie AH, Kerr JFR y Currie AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251.

Yamamoto H, Saitoh Y, Fukunaga K, Nishimura H y Miyamoto E (1988): Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effects on microtubule assembly. *J Neurochem* 50:1614.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR (1993): The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641.