



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL PEPTIDO
25-35 DE LA PROTEINA β -AMILOIDE EN
SINAPTOSOMAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA

XAVIER FERNANDO MUNGARRO MENCHACA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION H. SOLAR

2000
280915



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL PEPTIDO 25-35 DE LA PROTEINA
B-AMILOIDE EN SINAPTOSOMAS."

realizado por XAVIER FERNANDO MUNGARRO MENCHACA

Con número de cuenta 9455532-3 , pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
Propietario

DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ

Propietario

DRA. MARIA DE LUORDES MASSIEU TRICO

Propietario

BIOL. OCTAVIO CESAR GARCIA CONZALEZ

Suplente

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Suplente

BIOL. JOSE FERNANDO PEÑA ORTEGA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNAM

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

Gracias por el apoyo brindado para la óptima realización de este proyecto a:

Clorinda, a Patty, a Rosy, a Andrea, al joven Ricardo y a Octavio.

A la Lourdes, a Fernando, a Octavio, y Ignacio por las asesorías en esta tesis.

A mi padres por el apoyo brindado a lo largo de mis estudios, a mis hermanos Jorge, a Ricardo y Adriana.

A Mylene y al Dr. Gutiérrez, por el apoyo técnico y logístico.

A los amigos:

A Agustina, al Dr. Limón, al Metal (René), a la señorita Bonilla, a Emilio, a los integrantes de la B,N.: José el soñador, el capitán Ariel, el Suffus,

Y especialmente al camarada Juanito.

INDICE

I.	RESUMEN	4
II.	INTRODUCCIÓN	6
III.	LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	8
	III.1 Alteraciones del citoesqueleto.	9
	III.2 Proteína β -amiloide (β A).	10
IV.	FACTORES INVOLUCRADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN.	18
	IV.1 Deficiencia Energética.	19
	IV.2 Teoría excitotóxica del glutamato.	19
	IV.3 Elevación intraneuronal del calcio.	20
	IV.4 Radicales libres.	21
	IV.5 Neurotoxicidad de el β A.	22
V.	ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL β A EN SINAPTOSOMAS	24
	V.1 Sinaptosomas como modelo de daño sináptico	25
VI.	OBJETIVO	27
VII.	HIPÓTESIS	27
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
	VIII.1 Obtención de sinaptosomas	30
	VIII.2 Evaluación de la actividad mitocondrial de sinaptosomas por la técnica de reducción de MTT	30
	VIII.3 Electroforesis de proteínas e inmunoblot	31
	VIII.4 Estadística	32
IX.	RESULTADOS	33
X.	DISCUSIÓN	46
	X.1 Reducción del MTT como parámetro de funcionalidad en los sinaptosomas	47
	X.2 Efectos basales del β A	48
	X.3 Efecto de la despolarización sobre la toxicidad del β AP	49
	X.4 Efecto de la disminución de la glucosa en la toxicidad del β AP	49
	X.5 Efecto de la rianodina sobre la toxicidad del β AP	50
	X.6 Efecto de la cafeína y toxicidad del β AP	51
	X.7 Alteraciones estructurales	52
	• Análisis de la proteína sinaptofisina	52
	• Perdida de actina en presencia de cafeína y β A	52
	• Residuos fosforilados de tirosina	53
XI.	CONCLUSIONES	54
XII.	REFERENCIAS	56



I



RESUMEN

I. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza histopatológicamente por la presencia de marañas neurofibrilares y depósitos insolubles del péptido β -amiloide (β A), los cuales se han involucrado en la pérdida neuronal y sináptica ya que pueden ocasionar estrés oxidativo y alterar la homeostasis del Ca^{2+} . En la EA la pérdida sináptica alcanza hasta un 75% de las terminales nerviosas del hipocampo y correlaciona de forma importante con la deficiencia cognoscitiva de los pacientes. En vista del papel potencial de la β A en el daño a las terminales nerviosas, el objetivo del presente trabajo es estudiar el daño sináptico inducido por el fragmento activo 25-35 del β A en un modelo de terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) de la corteza cerebral de la rata. Se utilizaron ratas Wistar machos de 250 g y los sinaptosomas se aislaron por el método de Löscher. 30 μg de proteína se incubaron en 200 μl de medio Krebs-Ringer con HEPES pH 7.2, a 37°C durante 2, 3, y 4 h en diferentes condiciones: despolarización con K^+ elevado, baja concentración de glucosa (0.5 mM), rianodina y cafeína 5mM y cafeína 5 μM en presencia o ausencia de Ca^{2+} externo. En cada condición se valoró el efecto de 50 μM del péptido 25-35. La viabilidad sinaptosomal se evaluó por medio de la capacidad de la actividad mitocondrial para reducir el compuesto MTT y la consecuente producción de sales de formazán las cuales se cuantificaron espectrofotométricamente. Nuestros resultados demuestran una escasa toxicidad del péptido 25-35 en condiciones basales o elevando el K^+ externo a 50 mM. Sin embargo esta toxicidad se incrementó notablemente a las 2, 3 y 4 h en condiciones de baja concentración de glucosa externa o en presencia de cafeína 5 mM y 5 μM . De manera muy interesante la rianodina a concentraciones que activan el canal, produce por si misma una disminución importante en la reducción del MTT que ya no pudo ser potenciada en presencia del péptido 25-35. En otro tipo de experimentos valoramos por Western-blot la desaparición de la proteína sinaptofisina, la cual se ha utilizado como marcador para detectar la pérdida sináptica en la EA. La presencia de esta proteína se modificó ligeramente en presencia de cafeína 5 μM mas el péptido 25-35 después de 60 minutos de incubación. De la misma manera en esta última condición se observo un ligero incremento en la incorporación a proteínas de residuos fosforilados en tirosina. Con respecto a la proteína actina se observo una importante desaparición de este marcador del citoesqueleto en presencia de cafeína 5 μM más el péptido 25-35 de la β A. Hasta el momento nuestros resultados sugieren los efectos tóxicos del péptido 25-35 sobre terminales nerviosas aisladas en condiciones de compromiso metabólico previo, particularmente por un mecanismo dependiente de la movilización del calcio interno o por alteraciones en los niveles de AMPc.

II

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

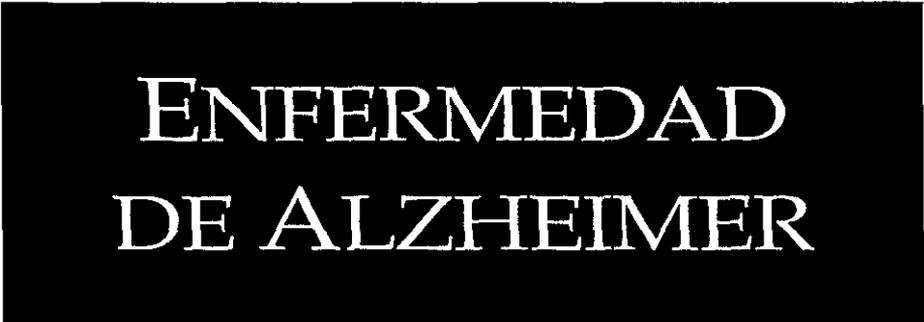
La muerte celular es uno de los fenómenos biológicos que ha merecido una parte importante de la reflexión científica. Durante los últimos años se han desarrollado muchos trabajos enfocados a tratar de explicar las causas que la producen y a proponer estrategias terapéuticas, con el objeto de retardar o controlar su aparición.

Algunos investigadores consideran el problema de la muerte celular como el resultado final de un proceso de desarrollo y maduración anatomofuncional, genéticamente programado. Otros estudios se enfocan a los acontecimientos que determinan la muerte selectiva de poblaciones celulares: mecanismos de estrés externo o desajuste en los mecanismos de homeostasis interna.

Uno de los temas de mayor interés para la neurociencia básica y clínica es el de la pérdida neuronal selectiva que ocurre en algunos padecimientos neurológicos hereditarios y/o esporádicos como la corea de Huntington, la demencia de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y algunas degeneraciones espinocerebrales, entre otros. Estos procesos patológicos comparten dos aspectos comunes, el primero es que la degeneración neuronal se inicia después de un periodo de diferenciación y función normales y el segundo que solo se afectan poblaciones selectivas de neuronas.



III



ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER

— III. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER —

A principios del siglo XX el médico alemán Alois Alzheimer, describió la Enfermedad de Alzheimer (Berrios y Freeman, 1991) a partir de los estudios histopatológicos que realizó en el cerebro de una mujer de 50 años fallecida después de cuatro años de evolución en un cuadro demencial. Cuando murió en 1906, el análisis anatomopatológico por medio de métodos de impregnación argéntica, reveló densos depósitos, hoy llamados placas neuríticas o placas seniles, afuera y alrededor de las neuronas. Dentro las neuronas se encontraron fibras entrelazadas de proteínas o marañas neurofibrilares. Hoy el diagnóstico definitivo de la EA es solo posible cuando la autopsia revela estas dos alteraciones bioquímicas.

La EA es una de las causas más comunes de demencia en personas de edad avanzada. De hecho del 40% al 60% de las personas de mas de 60 años que presentan demencia, padecen la EA. Las manifestaciones clínicas más evidentes son la profunda pérdida de la memoria, disminución de la capacidad de elaborar tareas rutinarias, alteración del juicio, cambios en la personalidad, dificultad para aprender y alteraciones en los patrones del habla. (Arias, 1999).

Estos síntomas se pueden dividir a grandes rasgos en tres etapas. La primera se inicia con la pérdida de la memoria a corto plazo, pérdida de la memoria topográfica y desorientación espacio-temporal. En la segunda existe un deterioro de todos los aspectos de la memoria, disfasias, (daño del lóbulo parietal) y deterioro de la personalidad, manifestándose primeramente con la pérdida del juicio y la capacidad de pensamiento abstracto, pudiendo terminar en un franco estado psicótico. En esta etapa se han reportado algunos episodios epilépticos. En la tercera etapa el deterioro intelectual es severo y el paciente pierde todo contacto consciente con el mundo que lo rodea, no reconociendo a sus propios familiares e incluso no reconociendo su propia imagen en el espejo. Hay un aumento en el tono muscular e incontinencia de esfínteres. En esta etapa el paciente se encuentra en un estado crítico y la muerte se presenta de 6 a12 años a partir de que se inicia la enfermedad (para revisión ver Arias, 1999).

III.1 Alteraciones del citoesqueleto

El citoesqueleto neuronal está formado por una densa red de proteínas fibrilares que proporciona una trama molecular a las neuronas para darle soporte y definir su forma. Por sus características el citoesqueleto permite a las neuronas experimentar cambios dramáticos ante una gran variedad de estímulos y se relacionan estrechamente con procesos de desarrollo, plasticidad, envejecimiento y muerte

(Daniels,1972; Black y Green, 1982). Una gran variedad de proteínas se encuentran formando parte de esta red, permitiendo el arreglo de tres tipos de estructuras principales: los microfilamentos, los neurofilamentos y los microtúbulos.

Los microtúbulos parecen ser estructuras del citoesqueleto cuya alteración bioquímica lleva a la muerte de la célula en la EA (Delacourete y Defossez, 1986), aunque también se han reportado cambios en las proteínas que componen los neurofilamentos.

En el cerebro de pacientes con EA el citoesqueleto de un gran número de neuronas se desagrega progresivamente y se reemplaza por haces de filamentos helicoidales apareados (FHA). Estos FHA se asocian, produciendo las llamadas marañas neurofibrilares que se localizan principalmente en el cuerpo neuronal y llenan casi todo el citoplasma de las células afectadas (Iqbal y Grundke-Iqbal, 1991).

Una de las proteínas asociadas a los microtúbulos, que permite una mayor estabilización de ellos, es la proteína *tau*. Esta proteína se considera un marcador importante en la EA, en virtud de que es el componente bioquímico más abundante que se encuentra en los FHA. La *tau* que normalmente contiene 2-3 moles de fosfato aparece hiperfosforilada, con 5-9 moles de fosfato por mol de *tau*. La porción de proteína *tau* modificada disminuye enormemente su capacidad de unirse a los microtúbulos, precisamente en aquellas regiones del cerebro que contienen niveles altos de *tau* modificada y numerosas lesiones neurofibrilares (Dickson y Yen, 1989). La fosforilación anormal de la proteína *tau* contribuye a su ensamblaje defectuoso en los microtúbulos lo que, consecuentemente puede impedir el flujo axoplásmico normal y conducir a la neurodegeneración. Los cambios en las proteínas del citoesqueleto son solo uno de los indicios de anomalías y manifestaciones metabólicas generales que pueden afectar el comportamiento neuronal y por ende, ser causa de muerte neuronal en la EA (Davies,1994).

III.2 Proteína β -amiloide

Como ya se mencionó, los dos marcadores histopatológicos clásicos de la EA son las placas seniles y las marañas neurofibrilares.

La acumulación de fibrillas insolubles de proteína β -amiloide (β A), constituye principalmente las llamadas placas seniles que se localizan particularmente en el parénquima y en las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro y de las meninges.

Depósitos similares son observados en los individuos que padecen el Síndrome de Down, usualmente en aquellos mayores de 40 años (Reaume et al., 1996).

Las placas seniles están formadas por grupos de neuritas distróficas y procesos celulares gliales que rodean un núcleo de β A y que se localizan principalmente en áreas de neocorteza, el hipocampo y la amígdala. Alrededor del 25% del peso seco de la placa consiste en material proteínico del cual, los péptidos amiloides forman el 70% (Miller et al., 1993). Muchas otras proteínas han sido identificadas en las placas seniles incluyendo a la alfa-antiquimotripsina, la apolipoproteína E, algunas proteasas lisosomales (Cataldo y Nixon, 1990) y algunas enzimas antioxidantes (Pappolla et al., 1992). No se sabe, hasta el momento, si estas proteínas asociadas coadyuvan a formar las placas o solo son absorbidas por la formación amiloide.

Amiloide es el término genérico de una clase de péptidos que usualmente derivan de una proteína precursora llamada proteína precursora del amiloide (PPA), los cuales, bajo condiciones fisiológicas se agregan para formar filamentos insolubles de alrededor de 7-9 nm de ancho (fibras amiloideas). Estas fibras se acumulan en depósitos esféricos en el tejido cerebral (placas seniles) y la microvasculatura meníngea. Varios estudios han demostrado que el amiloide vascular en la EA contiene un péptido de alrededor de 4 kD (Glenner y Wong, 1984). Una secuencia peptídica similar ha sido aislada del centro de las placas neuríticas y se le conoce como péptido A4 o β A (Masters et al., 1985). El péptido de β A más largo que se ha aislado de las placas seniles contiene de 42-43 aminoácidos comenzando con Asp-1 y terminando con Ala-42 o Thr-43 (Miller et al., 1993).

El análisis bioquímico de los depósitos amiloides revela la presencia de formaciones antiparalelas de tipo β -planar lo que le da un carácter hidrofóbico (Glenner y Wong, 1984). El β A se puede encontrar en su forma no agregada o en forma agregada. Cuando éste se deposita en su forma no agregada se denomina depósito inmaduro o difuso y se suele localizar sobre el cuerpo de las neuronas y/o en los procesos neurales. Estas están libres de cualquier proceso neurítico, no se tiñen con el Rojo Congo (que es un colorante utilizado para la tinción de estructura β -planar), y son considerados como péptidos monoméricos del β A (Arias, 1999). No es claro, si los depósitos inmaduros de β A maduran en fibras amiloides que eventualmente se convierten en placas seniles (forma agregada). Por su parte los depósitos agregados o placas seniles como se menciona anteriormente, se componen de neuritas y glia reactiva dispuestas sobre un material positivo a la tinción con tioflavina y Rojo Congo y se observan más frecuentemente en amígdala, hipocampo y neocorteza.

Un hecho interesante es que en el cerebelo de pacientes con EA se han observado altos niveles de estos depósitos inmaduros, acompañados de bajos niveles de las clásicas placas seniles. Lo anterior ha permitido sugerir la posibilidad de que los depósitos difusos posteriormente formen placas maduras o, que la especificidad de ciertos factores de la corteza cerebral jueguen un papel crítico en la formación de las placas seniles a partir de depósitos difusos de βA (Burdick et al., 1992). Aparentemente las placas seniles en la EA están formadas por agregados que derivan de varias fuentes y se ha sugerido que el péptido 1-41 y el 1-42 presentan una mayor tendencia a agregarse que el péptido 1-40 (Robakis, 1994).

Como ya se ha mencionado, el βA es parte de una larga proteína precursora, la PPA, de la cual se conocen al menos tres isoformas de 695, 751 y 770 aminoácidos (Kang et al., 1987 y Tanzi et al., 1988). Estas isoformas derivan del pro-cesamiento alternativo del ARNm, y se codifican por un gen en el cromosoma 21 (Robakis et al., 1987). Las isoformas PPA₇₅₁ y PPA₇₇₀ tienen insertado un aminoácido homólogo a la familia Kunitz de los inhibidores de proteasas de serina (KPI) (Tanzi et al., 1988). La PPA es una glicoproteína integral de la membrana que contienen un largo dominio extracitoplasmático una región transmembranal y una corta secuencia citoplasmática (Robakis et al., 1987).

La PPA es una proteína ubicua, sintetizada en la glía, en neuronas y en prácticamente todos los tejidos y líneas celulares y tienen un alto grado de conservación evolutiva (Robakis et al., 1987). Sin embargo, nadie conoce claramente la función de esta proteína, de cuyo metabolismo se pueden originar fragmentos de secreción amiloidogénicos y fragmentos no amiloidogénicos. Las proteínas derivadas del PPA pueden modificarse postransduccional por: glucosilación (Refolo et al., 1989), fosforilación (Oltersdorf et al., 1990), sulfatación (Weidemann et al., 1989), proteólisis y secreción de su región extramembranal (Refolo et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Además el KPI contenido en la PPA funciona como el centro proteico del proteoglicano sulfatado de condroitina (Shioi et al., 1992), que son un tipo de moléculas involucradas en funciones de adhesión celular y pueden participar en el fenómeno de la metástasis cancerosa.

La mayoría de las proteínas secretadas a partir de la PPA se producen después de que esta se procesan por un grupo de enzimas hipotéticas llamadas "secretasas" entre los aminoácidos Lys 16 y Leu 17 de la secuencia del βA , previniendo de esta forma la producción del βA (Esch et al., 1990). Se sabe que la modulación en la actividad de estas secretasas debe jugar un papel importante en la amiliodosis

típica de la EA. En cultivos de células la actividad de las secretasas son reguladas por diversos agentes incluyendo ésteres de forbol (Caporaso et al., 1992), agonistas colinérgicos, particularmente del tipo muscarínicos (Buxbaum et al., 1992).

La secreción de la PPA se inicia en el trans-Golgi donde se forman vesículas que contienen a la proteína y en donde se continúa su maduración hacia la superficie de la célula secretándose por exocitosis (Sambamurti et al., 1992). De acuerdo con esto, la nexina II, la forma secretada del KPI contenido en la PPA se ha detectado en extractos celulares y en vesículas. La secreción de la PPA de la superficie celular es inhibida por agentes que impiden la exocitosis (Sambamurti et al., 1996), lo que sugiere que las moléculas de la PPA se procesa por secretasas intracelulares. Con respecto a la remoción de la PPA contienen se ha demostrado que esta proteína tiene una señal internalizadora en el dominio citoplasmático y se ha detectado en vesículas (Nordstedt et al., 1993). La reinternalización y degradación de la PPA probablemente involucra a los lisosomas. Justamente en este proceso de degradación puede ser el responsable de la producción de el β A (Haass et al, 1992).

Por otro lado no resulta claro hasta el momento que el β A se genere justamente en la membrana plasmática pues el β A cuya terminación C-terminal se localiza dentro de una secuencia transmembranal de PPA y esta secuencia debería de ser inaccesible para la proteólisis. Una posibilidad es que la fracción de PPA sea soluble además de que sirva de sustrato para las proteasas involucrada en la producción del péptido β A. Aunque existan algunas ideas sobre la producción del β A como se han descrito anteriormente el β A no ha sido aún detectado intracelularmente. Este, puede ser secretado antes de su acumulación en las células a niveles detectables, o sus depósitos pueden formarse extracelularmente a partir de precursores amiloidogénicos secretados. (Hass et al., 1992). Una pregunta importante es si el β A es incorporado en fibras amiloides derivadas de esta secreción normal del péptido β A o si se genera por diferentes rutas metabólicas. Por supuesto que el mejor camino para resolver la pregunta sería encontrar agentes capaces de inhibir la producción o la secreción del β A para entonces probar sus efectos en la formación y mantenimiento de los depósitos amiloides.

La composición de los péptidos β A encontrados en las fibras amilodeas parecen ser diferentes a la composición de los péptidos secretados normalmente. Por ejemplo, ninguno de los péptidos de las placas seniles inicia en la posición del β A 6, 3 u 11 como se ha detectado en el amiloide vascular y ninguno de estos péptidos inicia con una Ala 2 (Miller et al., 1993), como se ha encontrado en los péptidos secretados.

La diferencia en la composición entre el β A soluble secretado y los fragmentos más pequeños de β A que se encuentra en las placas, hace pensar que el origen de estos dos tipos de péptidos sea diferente y que provengan de fuentes diferentes (Lorenzo et al., 2000). Esta posibilidad se apoya en evidencia que proviene de estudios de inmunocitoquímica, que muestra que en las placas difusas la reactividad del β A se concentra alrededor de los cuerpos neuronales y en las membranas neuronales (Probst et al., 1991) lo que sugiere que el β A se produce localmente a partir de la PPA neuronal. Por otro lado, y en apoyo a lo anterior, no se han detectado niveles circulantes de β A en la EA mayores a los detectados en los individuos que no presentan algún padecimiento (Shoji et al., 1992), lo que sugiere que el incremento en la producción de este péptido no es necesario en la formación de depósitos amiloides en el cerebro de los pacientes con EA. La alta heterogeneidad encontrada tanto en los péptidos solubles normalmente secretados como en los depósitos de las fibras amiloides sugiere que estas moléculas pueden provenir de vías diferentes de procesamiento del PPA y de procesos proteolíticos no específicos (Salinero et al., 1999). Esta observación impone limitaciones centrales en cuanto a la posibilidad de bloquear la formación de depósitos amiloides utilizando inhibidores específicos de proteasas, pues para esto probablemente se necesitaría inhibir la totalidad de las diferentes proteasas involucradas en la producción de péptidos del β A. Por otro lado no es concebible pensar que todos los péptidos encontrados en depósitos amiloides deriven de un procesamiento común del PPA a través de una vía de proteólisis específica.

No es claro aún por qué los péptidos del β A que se secretan normalmente no se agreguen en cultivos celulares para formar fibrillas. El péptido 1-40 que se produce como resultado del metabolismo celular normal y el amiloide vascular son claramente capaces de formar fibras amiloides estables, pero el rango de agregación de este péptido para formar estructuras β -plegadas es un proceso muy lento en ausencia de agentes que favorezcan la nucleación del depósito (Jarret et al., 1992). Por el contrario la presencia de residuos Ile 41 y Ala 42 de la secuencia de β A incrementa el rango de agregación de los péptidos amiloides. Ésto sugiere que la adición de las fracciones in vivo incluye proteoglicanos (Snow et al., 1990) o bajos niveles de residuos de 42 aminoácidos al final de los péptidos β A, lo que puede incrementar el rango de formación de depósitos amiloides, al jugar el papel de agentes de nucleación. Adicionalmente factores como el pH local (Burdick et al., 1992) y fluctuaciones en la concentración de iones extracelulares, pueden también tener un papel determinante en la agregación de los péptidos amiloides para formar fibrillas.

A pesar de que la PPA es una proteína ubicua se han reportado algunas funciones biológicas posibles. Los estudios *in vivo* han mostrado que la secreción del KPI contenido en el PPA funciona como un inhibidor de proteasas de serina. Las mismas isoformas pueden actuar también como inhibidores del factor de coagulación XIa (Smith et al., 1990).

La PPA puede actuar como un agente promotor del crecimiento en cultivos celulares y este efecto parece depender de los residuos 296-335 del PPA₆₉₅ que pertenecen a la región distintiva para la inserción de KPI (Saitoh et al., 1989). Otra función más que se ha detectado para el PPA es su papel como inhibidor de metalo-proteinasa que se ha detectado en el dominio extracitoplásmico del PPA (Miyazaki et al., 1993).

Evidencias que derivan de estudios *in vitro* sugieren que el dominio citoplasmático de tamaño completo de la PPA interactúa con proteínas G_v, una clase de moléculas de unión de guanosil trifosfato (GTP), lo que sugiere la posibilidad de que la PPA participe en la transducción de señales (Nishimoto et al., 1993). Sin embargo como las proteínas G₀ también participan en el tráfico intracelular de proteínas, las interacciones PPA-G₀ pueden modular la regulación intracelular de PPA a través de diferentes compartimentos membranales.

Se ha propuesto que la PPA tiene un papel neuroprotector contra el daño en la hipoglucemia regulando los niveles de calcio (Mann et al., 1990). Por otro lado se ha observado que la PPA se puede asociar con ciertos elementos del citoesqueleto y que esta asociación está mediada por los microtúbulos intactos y por fosforilación de proteínas. Esta observación combinada con la localización vesicular de la PPA hace sugerir la posibilidad de que estas proteínas puedan estar involucradas en el tráfico de vesículas intracelulares (Refolo et al., 1991).

La PPA se ha involucrado también en el transporte axonal rápido de los sitios sinápticos (Koo et al., 1990) y epitopes de la PPA se han detectado en la unión neuromuscular, llevando a la posibilidad de que la PPA tenga la función de mantener la estabilidad, configuración y función de las sinapsis.

La actividad biológica mejor caracterizada para la PPA parece ser la adhesión celular. La PPA secretada estimula la adhesión de células PC12 al sustrato (Schuber et al., 1989), y el anticuerpo anti-PPA inhibe la adhesión célula-célula y célula-matriz.

La evidencia clara de la participación de PPA en el desarrollo de la EA resulta de estudios genéticos de familias con Alzheimer de tipo familiar (AF). En Algunos de estos casos la identificación de mutaciones en los codones PPA_{670/671,692,713,717} co-segregado con la enfermedad provee una evidencia fuerte en el sentido de que las mutaciones son patogénicas para la EA (Goate et al., 1991). En células in vitro se ha demostrado que las mutaciones para el AF en el codón 770 de la PPA causan un incremento significativo en los niveles de los péptidos β A secretados (Citron et al., 1996), sin embargo no es claro que esta mutación se asocie con incrementos en los niveles de β A en el suero del líquido cefalorraquídeo (Reaume et al., 1996).

Se han observado depósitos de β A en numerosos individuos envejecidos sin signos aparentes de demencia, indicando que los depósitos amiloides solos, no son causa suficiente para el desarrollo de la demencia. Una explicación alternativa de que las mutaciones en el gen de la PPA causen demencia puede deberse a que una alteración de la biología funcional normal de las proteínas PPA es la causa de que la PPA adquiera el papel aberrante en las funciones celulares. Estas mutaciones pueden afectar la interacción de PPA con las proteínas G_0 (Nishimoto et al., 1993) alterando sistemas de transducción de señales o alterando las propiedades de adhesión celular de la PPA. Una posible secuencia de eventos que llevaría a la formación de depósitos de β A relacionados con una alteración genética o con cambios en el ambiente celular normal iniciaría con ciertas alteraciones en el metabolismo de la PPA lo que llevaría a un incremento en la producción de la β A el cual, al polimerizarse en fibras amiloides formarían las placas seniles. Varias líneas de evidencia sugieren que señales ambientales incrementan la expresión y el metabolismo de la PPA. Esto lleva a sugerir la heterogeneidad etiológica de la EA sugiriendo que por varias situaciones y posiblemente por la intervención de otros genes se puede desencadenar este padecimiento.

En apoyo a lo anterior se tienen hallazgos recientes de que un alto porcentaje del AF esta ligado a alteraciones de un gen en el cromosoma 19 que también puede modificar la función o procesamiento de la PPA. Este gen se sabe que codifica para un tipo de apolipoproteína llamada APOE₄ (Yankner, 1996).

Otros genes que recientemente se asocian con la EA han sido localizados en los cromosomas 14 y 1, que codifican para las llamadas presenilina 1 y presenilina 2, respectivamente (Arias, 1999).

Todavía no resulta clara la relación entre la amiloidosis y la demencia. Además esta relación parece más clara entre el grado de demencia y la pérdida sináptica con los depósitos amiloideos (Arriagada et al., 1992).

Estudios en cerebros de individuos con el Síndrome de Down menores de 40 años (Giaccone et al., 1989) muestran la presencia de numerosas placas difusas corticales teñidas con anti- β A en ausencia de alguna otra lesión patológica. Estos estudios sugieren que las MNF pudieran involucrarse de manera tardía en el daño neuronal. Por analogía con estos hallazgos, se ha sugerido que una situación similar puede ocurrir en el desarrollo de la EA, con depósitos de β A que preceden a las alteraciones neuríticas. Sin embargo hasta el momento no es claro que los depósitos corticales difusos de β A sean neurotóxicos, de forma que induzcan la neuropatología de la EA, pero sí como una señal temprana de un daño específico neuronal (Salinero et al., 1999).



IV

FACTORES
INVOLUCRADOS EN LA
NEURODEGENERACIÓN

IV. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN

Hasta el momento se desconoce exactamente cuales son las causas de la EA, pero sabemos que hay dos formas típicas: la de origen genético y las de origen esporádico (con mucho la más frecuente). Esta segunda implica factores comunmente asociados a otros padecimientos o enfermedades neurodegenerativas. Estos factores que se han estudiado ampliamente incluyen:

IV.1 *Deficiencia Energética*

Las neuronas poseen una alta tasa de consumo de oxígeno y poca capacidad de almacenamiento de energía, lo cual puede explicar su gran susceptibilidad al daño ante condiciones de compromiso metabólico. Las situaciones más características de inducción de muerte por privación energética son aquellas que se originan por la falta de riego sanguíneo o isquemia y por la hipoglucemia (Shi et al., 1997). Algunos casos de neurotoxicidad por hormonas glucocorticoides también se pueden explicar por la falta de suministro adecuado de glucosa a las células del sistema nervioso. Además se ha encontrado relación entre un evento isquémico y el inicio de cambios citotóxicos que se observen en la EA (Rosen et al., 1979). En otros padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, se ha observado reducción en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Shapira et al., 1990), así como se ha reportado en la EA la disminución de la actividad mitocondrial de la citocromo-oxidasa (Keller et al., 1997). Aunque es algo dudoso que estos cambios sean lo suficientemente importantes para causar severas pérdidas neuronales, la disminución de la energía, si puede aumentar la vulnerabilidad de las células ante otros agentes de citotóxicos.

IV.2 *Teoría excitotóxica del glutamato*

Aunque en la EA 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 aferencias colinérgicas a la corteza cerebral y las áreas corticales que presentan placas seniles y marañas neurofibrilares (Mesulam, 1999). Por otro lado la observación del deterioro severo de los procesos de memoria y aprendizaje que se observan en los pacientes con EA, 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 N-metil-D-aspartato (NMDA) en neocorteza (Ikonomovic et al., 1999). La disminución más importante se

observa en las láminas corticales externas y en las regiones del hipocampo CA1 y CA2. En corteza cerebral, el total de la unión de glutamato se encuentra disminuido entre el 35 y el 40% y la densidad de receptores para NMDA se reduce aproximadamente un 60%. Esta reducción parece confinarse al sistema de transmisión glutamatérgico, y no parece estar relacionado con un efecto generalizado debido a la atrofia cortical, ya que ni el receptor colinérgico muscarínico ni el GABA/benzodiazepínico se alteran (Ikonomovic et al., 1999). Los síntomas de desconexión cortical, que representan un aspecto prominente de la EA, pueden explicarse por una desaferentación glutamatérgica. Las placas seniles y las marañas neurofibrilares se concentran en las zonas de terminales glutamatérgicas, así como en las zonas donde se encuentran los cuerpos celulares que las originan (Bridges et al., 1999 y Farber et al., 1998). Estudios histopatológicos en la corteza cerebral y en el hipocampo, utilizando tinción de Golgi, sugieren la existencia de un edema terminal dendrítico de neuronas piramidales que se inicia en las espinas dendríticas (Scheibel et al., 1989). Estos hallazgos junto con otra línea de evidencias que muestran inmunoreactividad para el glutamato en las neuronas piramidales que contienen las marañas neurofibrilares (Maragos et al., 1987), han llevado al planteamiento de una secuencia de sucesos que pueden ocurrir en la EA y en donde la transmisión excitadora puede desempeñar un papel importante (Arias et al., 1998).

El daño cerebral excitotóxico característico es de naturaleza postsináptica. En su forma aguda, este daño se caracteriza por edema focal de dendritas y cambios citopatológicos agudos como el edema mitocondrial y del retículo endoplásmico. En el tipo crónico existe pérdida de interneuronas con preservación de elementos presinápticos y de axones de paso (Arias, 1999).

IV.3 Elevación intraneuronal de calcio

El calcio es un segundo mensajero mediador de cambios adaptativos en la neuroarquitectura en respuesta a las señales del ambiente, a neurotransmisores y a factores neurotróficos (Aruffo et al., 1987; Ascher et al., 1988, Kater et al., 1988). El papel del calcio intracelular en la regulación del crecimiento del cono neuronal se ha demostrado en estudios en invertebrados y en neuronas de mamíferos (Blake et al., 1988). El calcio regula la plasticidad de las neuronas por su efecto directo sobre proteínas del citoesqueleto y proteínas asociadas a éste. Por ejemplo la motilidad de la base de los microfilamentos en el crecimiento del cono neuronal y la elongación de la base de los microtúbulos de las neuritas son diferencialmente sensibles al calcio (Kater et al., 1998).

Dentro de un rango óptimo de la concentración de calcio intracelular, la neuroarquitectura es adaptativamente regulable, pero cuando la concentración del calcio interno se vuelve demasiado alta por un largo período, ocurre la degradación de los componentes celulares por activación de proteasas dependientes de calcio. Cuando se pierde la homeostasis del calcio interno, se crean condiciones que favorecen el daño neuronal como sucede en los episodios epilépticos continuos y crónicos (Bridges et al., 1999).

El papel del calcio en el daño neuronal crónico como en la demencia de Alzheimer, se ha propuesto en algunos casos (Asche y Nowak, 1988 y Khachaturian, 1989). La elevación del Ca^{2+} activa gran número de enzimas proteolíticas (Siman y Nosek, 1996, Begley et al, 1999), puede generar radicales libres e incrementar la salida de neurotransmisores excitotóxicos, además puede activar otras enzimas como las fosfolipasas A y C, la oxido nítrico sintasa e incrementar la peroxidación lipídica (Braughler, 1992). Por otro lado, el Ca^{2+} elevado puede causar disfunción mitocondrial, lo cual, a su vez, puede aumentar más la producción de radicales libres, producir incapacidad para mantener la propia homeostasis del Ca^{2+} y comprometer aún más la producción energética (Siesjo et al., 1989 y Pappolla et al., 1992). Al parecer la muerte neuronal retrasada que se observa en la isquemia cerebral depende de un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Este incremento puede estar dado por la activación del receptor NMDA, por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje por la despolarización de la membrana al entrar Na^+ a través de los receptores AMPA/Kainato o por su liberación de pozas intracelulares.

IV.4 Radicales libres

La formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno es una causa común del daño celular y probablemente involucra la pérdida de neuronas asociada a condiciones patológicas.

Los radicales libres se forman como consecuencia del funcionamiento metabólico celular normal, pero la excesiva producción o las fallas en los mecanismos endógenos de su eliminación pueden incrementar su concentración a niveles tóxicos. Existen evidencias de que tasas anormales de formación de radicales libres o de sus productos, como peróxidos lipídicos o malondialdehído, se producen después de ciertos periodos de hipoxia o isquemia (Schmidley, 1990 y Braughler, 1992); en la sustancia nigra de pacientes con Parkinson (Jenner, 1992) y en el cerebro de pacientes con EA (Subbarao, 1990).

Los principales radicales libres son el superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo (OH^\cdot). Estas especies reactivas pueden atacar químicamente a diferentes moléculas y alterar sus funciones normales, pudiendo oxidar el ADN y causar mutaciones, u oxidar lípidos, dañar la membrana y aumentar la liberación de aminoácidos excitotóxicos (Pappolla et al., 1992)

IV.5 Neurotoxicidad de la βA

Aunque ya se mencionó ampliamente, todavía existe controversia sobre el papel de la βA en el mecanismo de la muerte neuronal en la EA, varios estudios indican que esta proteína puede iniciar una serie de eventos bioquímicos que pueden culminar con la pérdida de las neuronas (Pike et al 1993). Parte de estos mecanismos aparentemente implican la producción de radicales libres en las neuronas, la alteración de los mecanismos reguladores del Ca^{2+} intracelular, y un incremento en la susceptibilidad a la toxicidad por aminoácidos excitadores (Keller et al, 1997). La exposición de cultivos de neuronas cerebrocorticales de humanos o de hipocampo de rata al βA resulta en una progresiva elevación de la concentración de Ca^{2+} , el curso temporal y la magnitud depende del grado de agregación del βA en el tiempo que se expone a las neuronas. Esto es, el Ca^{2+} se acumula más rápidamente en neuronas expuestas al βA preagregado que en neuronas expuestas a βA no agregado (Selkoe DJ 1989). Es importante mencionar que las neuronas expuestas al βA exhiben un aumento en la concentración interna de Ca^{2+} basal y en respuesta a los estímulos excitadores como el glutamato o durante la despolarización con K^+ elevado. Este aumento en la sensibilidad a la excitación está correlacionado con un aumento en la vulnerabilidad para la exitotoxicidad. Además el βA vuelve a las neuronas más sensibles al daño por hipoglucemia. Por otro lado, la desestabilización del Ca^{2+} producida por el βA no se limita solo a las neuronas. Se demostró que el fragmento 25-35 del βA causa una gran conductancia del calcio en ovocitos que expresan receptores para glutamato (NMDAR1 oGluR1) y el receptor para sustancia P (Kimura et al 1993).

El βA puede perturbar la regulación del Ca^{2+} de los canales del receptor de glutamato resultando en un aumento en el influjo de este catión, o el βA puede impedir la remoción de Ca^{2+} de la célula alterando la bomba de Ca^{2+} o el intercambio Na^+/Ca^{2+} (Khachaturian, 1989 y Mattson et al., 1992).

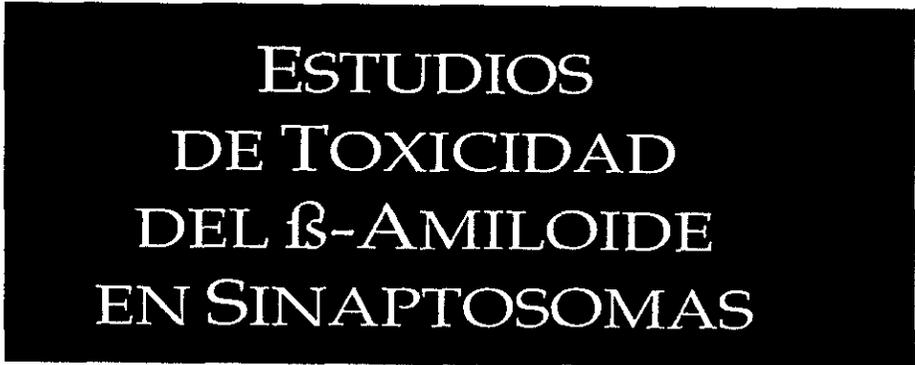
Se ha observado que durante el proceso de agregación en soluciones acuosas de fragmentos de βA induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno en

neuronas. Esto se acompañó de pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} . Además de estos efectos, a concentraciones neurotóxicas, el βA inactiva a las enzimas citoplasmáticas glutamino sintetasa y creatín fosfocinasa y compromete la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática. El βA también puede alterar la homeostasis del Ca^{2+} por la formación de canales para este catión en la membrana como lo ha sugerido Arispe et al (1993).

Los estudios de la actividad biológica y los mecanismos de acción de fragmentos activos del βA sugieren que alteraciones de la regulación del Ca^{2+} juegan un papel muy importante en la toxicidad y muerte neuronal



V



ESTUDIOS
DE TOXICIDAD
DEL β -AMILOIDE
EN SINAPTOSOMAS

V. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL β -AMILOIDE EN SINAPTOSOMAS

V.1 *Sinaptosomas como modelo de daño sináptico*

Las terminales nerviosas aisladas son estructuras mejor conocidas como sinaptosomas y fueron aisladas por primera vez en 1957 por Catherine Hedd utilizando al neurotransmisor acetilcolina y a la enzima acetilcolina transferasa como marcadores. En 1960 George Gray aportó datos significativos para el conocimiento de la estructura fina de la sinapsis, de los cuales se derivaron los siguientes criterios morfológicos útiles para la identificación funcional de los sinaptosomas:

1. La membrana plasmática debe estar sellada.
2. Presentar una o más mitocondrias.
3. Tener una concentración local de vesículas semejante en número y tamaño a las vesículas sinápticas vistas en las terminales nerviosas in situ.
4. La presencia de la zona electrodensa en la membrana similar a la presente en las membranas sinápticas.

Los sinaptosomas son generados a partir de terminales nerviosas al someter al tejido cerebral a la homogenización en un medio isosmótico (sacarosa 0.32M). Originalmente y hasta la fecha una combinación del límite de movilidad y la centrifugación en gradientes de sacarosa, ficol o percoll se utiliza para separar los sinaptosomas de otras partículas subcelulares.

El desarrollo de la técnica de obtención de sinaptosomas es históricamente importante no solo por el ímpetu en el estudio de las bases moleculares y celulares de la función sináptica, sino también porque amplió nuestra idea del alcance y poder de las técnicas de fraccionamiento de tejidos.

Los sinaptosomas contienen todos los componentes involucrados en la formación y consolidación de los contactos sinápticos, almacenamiento de transmisores, liberación y regulación de las funciones sinápticas.

La pérdida sináptica que como ya se ha mencionado está estrechamente relacionada con el impedimento cognoscitivo en la EA, sugiere que las sinapsis pueden ser el sitio en el cual los mecanismos de degeneración neuronal se originan y se propaguen al soma neuronal. Respecto a esto se conoce que las regiones postsinápticas de las dendritas están sujetas a altos niveles de influjos de calcio y a estrés oxidativo como resultado de una activación local del receptor al glutamato. Estos factores pudieran estar implicados en el proceso de neurodegeneración en la EA (Mattson et al., 1998). Otros hallazgos sugieren que las neuronas pueden morir en la EA por un proceso

llamado apoptosis que involucra una serie típica de eventos bioquímicos que culminan con la fragmentación nuclear y celular y se han encontrado evidencias de que la β A puede jugar un papel importante para iniciar el fenómeno de la apoptosis en las sinapsis. De hecho se han reportado cambios bioquímicos relacionados con apoptosis en sinaptosomas corticales cuando se exponen a agentes oxidantes como el Fe^{2+} , o exponiéndolos a la β A. Después de los tratamientos anteriores se ha observado pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana, activación de caspasas y alteraciones mitocondriales características de la apoptosis que se pueden revertir al prevenir la activación de ciertas caspasas con inhibidores específicos (Mattson et al., 1998).

El uso de los sinaptosomas como modelo para estudiar cambios importantes que pudieran tener impacto en el conocimiento de los mecanismos que participan en la muerte neuronal de la EA está bien documentado. Ciertos experimentos han demostrado la participación del estrés oxidativo en diferentes enfermedades neurodegenerativas y en un trabajo se ha reportado que la exposición al 4-hidroxinonal, un producto de la peroxidación lipídica o a algún otro agente que induzca peroxidación como el FeSO_4 o la misma β A produce un bloqueo en el transporte de glutamato y de la función mitocondrial en la sinapsis (Keller et al., 1997). En este mismo estudio se determinó que agentes antioxidantes como el glutatión previenen los daños causados por el FeSO_4 y la β A.

Un dato que también se desprende de experimentos realizados en sinaptosomas y que resulta interesante es que la despolarización de terminales nerviosas aisladas de ratón permite la liberación de neurotransmisores y modifica factores que regulan los niveles de actina del citoesqueleto pudiendo estar relacionados con sistemas de proteínas dependientes de Ca^{2+} unidos a la actina (Bernstein y Bamberg 1997) lo cual sugiere que en los sinaptosomas también se pueden explorar ciertas alteraciones del citoesqueleto que pudieran ser relevantes para la EA.

Con base en los estudios anteriores, resulta muy interesante el explorar directamente en los sinaptosomas algunos de los posibles mecanismos por los cuales la β A pudiera ejercer algunos efectos tóxicos y comprometer, de esta manera, la integridad de las terminales nerviosas en el cerebro.

VI Y VII

OBJETIVO
E HIPÓTESIS

VI. OBJETIVO

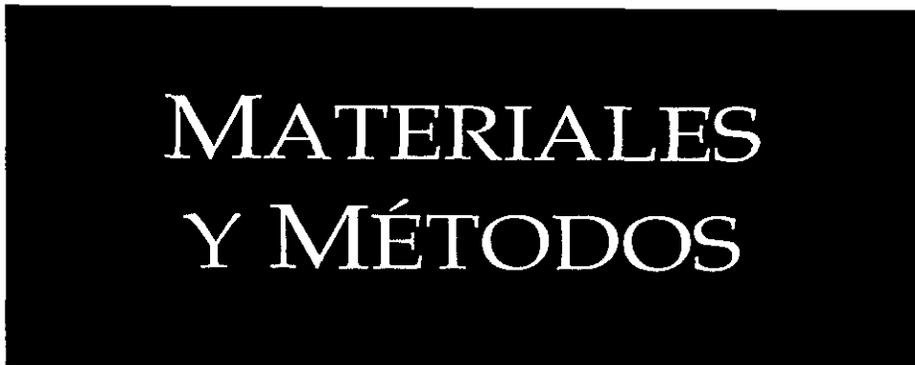
Estudiar algunos de los mecanismos que contribuyen a la toxicidad del fragmento activo 25-35 del β A en terminales nerviosas aisladas.

VII. HIPÓTESIS

La pérdida de las terminales nerviosas que ocurre en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer, puede deberse a la presencia excesiva de la proteína β A aunada a varios factores como son la deficiencia energética y las alteraciones de la homeostasis de Ca^{2+} .



VIII



MATERIALES
Y MÉTODOS

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1 *Obtención de sinaptosomas*

Se utilizaron ratas Wistar machos de 250 gr en todo este estudio siguiendo las Reglas para Investigación en Materia de Salud (Secretaría de Salud, México), con aprobación del Comité Local de Etica para el Manejo de Animales y se siguió el método descrito por Löscher et al., 1985 para la obtención de los sinaptosomas que consistió en:

Las ratas se sacrificaron por decapitación y el cerebro fue rápidamente removido y la corteza cerebral se disecó en frío (4°C). Inmediatamente después de la disección el tejido se homogenizó en sacarosa 0.32M (10% p/v) pH 7 con HEPES 5mM.

El homogenado se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min al término de los cuales se separó el pellet y el sobrenadante. Éste se colocó sobre 1 ml de sacarosa 1.2M en tubos para ultracentrifuga y la centrifugación se hizo en un rotor de ángulo fijo modelo 80Ti a 50000 rpm durante 15 min. Al final de esta centrifugación se obtuvo un pellet, que contiene mitocondrias el cual se desechó y una interfase donde están los sinaptosomas, mielina y microsomas. Esta interfase fue cuidadosamente colectada y diluida en sacarosa 0.32 M para tener un volumen final de 2 ml. Esta fracción diluida se colocó sobre 1ml de sacarosa 0.8 M para centrifugar a 50000 rpm durante 15 minutos. El pellet que se obtuvo, corresponde a la fracción sinaptosomal la cual se resuspendió en 2 ml de buffer de Locke cuya composición iónica es la siguiente: NaCl 154mM, KCl 5.6mM, CaCl₂ 2.3mM, MgCL₂ 1.0mM, NaHCO₃ 3.6 mM, glucosa 5.0 mM, HEPES 5.0mM pH 7.2.

Los sinaptosomas obtenidos se sometieron a diferentes condiciones experimentales con el fin de evaluar el efecto del péptido 25-35 de la β A en la viabilidad de las terminales nerviosas aisladas.

VIII.2 *Evaluación de la actividad mitocondrial de sinaptosomas por la técnica de reducción del MTT*

La evaluación de la funcionalidad sinaptosomal se basa en una técnica colorimétrica que mide la transformación de MTT (3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio) a sales de formazán (Mossman, 1983). Por medio de esta técnica se evalúa la actividad de la cadena respiratoria de las mitocondrias en los sinaptosomas. El MTT se incorpora a las mitocondrias de las terminales sinápticas y allí se reduce por deshidrogenasas en presencia de NADH, transformándose en un producto colorido e insoluble de color morado, las sales de formazán. Durante el experimento se

utilizaron tubos ependorf de 500 μ l y a cada tubo con 200 μ l de sinaptosomas, (aproximadamente 60 mg de proteína), se les agregó 4 μ l de MTT para obtener una concentración final de 10 mM después de la incubación a 37° C durante 2, 3 y 4 horas. Al final de los tiempos señalados los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por un lapso de 3 minutos y a el sedimento con sinaptosomas se le agregó 500 μ l de isopropanol ácido (mezcla de 2-isopropanol y HCl 1N). Esta muestra que toma el color morado (sales de formazán) se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda 570 nm.

VIII.3 Electroforesis de proteínas e inmunoblot

• Electroforesis

Se colocan los sinaptosomas previamente incubados a los diferentes tiempos y después de retirar el medio fisiológico se agregó un buffer de lisis con la siguiente composición: tris-HCl pH 7.5, 50 mM, NaCl, 150 mM, NP-40, 1% desoxicolato, 0.5%, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete™, Boehringer Mannheim). La proteína se cuantificó por el método de Lowry modificado (kit para ensayo de proteína BioRad).

La electroforesis de 10 μ g de proteína sinaptosomal en las diferentes condiciones se realizó en un gel al 10% de acrilamida-SDS, las muestras se disuelven en buffer de muestra en condiciones de reducción con mercaptoetanol y azul de bromofenol y se hierven 3 minutos a 92°C, para su posterior colocación en el gel. El gel se corre a 25 mA, voltaje constante, en un buffer de tris, glicina, SDS.

• Transferencia

Para realizar la electrotransferencia el gel se equilibró en el buffer de transferencia (tris, glicina y metanol 20%) durante 10 minutos al igual que el papel de nitrocelulosa (poro 20m). La transferencia se llevó a cabo durante 1 h 15 min a 200-250 mA. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se procesó con los diferentes anticuerpos previo bloqueo en PBS-albúmina al 5% por lo menos durante 2 horas.

• Inmunoblots

Posterior a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo primario a las siguientes diluciones: antisinaptofisina 1:500, anti-actina 1:500, anti-

residuos de fosfotirosinas 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, diluidos en PBS-albúmina al 5% durante 24 h a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min con PBS-albúmina-tween 20 al 0.1% se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios. El segundo anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado se incubó en la solución bloqueadora durante 2h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente 3 veces por 5 min y se hizo una incubación con la mezcla AB (avidina-estreptovidina). La membrana de nitrocelulosa se reveló por el método de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham, Arlington Heights, IL) y detectado en un film Kodax X-Omat, o con diaminobencidina (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

VIII.4 Estadística

Los resultados presentados representan el promedio de 6-12 experimentos independientes \pm error standard (ES). Las diferencias significativas se obtuvieron procesando los datos por la prueba de *t* de student de manera no pareada en el programa Origin 4.10.



IX

RESULTADOS

IX. RESULTADOS

Con el objeto de determinar si el fragmento activo 25-35 del β A tiene efecto en la viabilidad sinaptosomal se desarrolló la primera serie experimental, en la cual los sinaptosomas se incubaron durante 2, 3 y 4 horas en dos condiciones diferentes: la primera fue la condición control (sinaptosomas en medio basal) y la segunda, sinaptosomas incubados con el fragmento 25-35 del β A (50 μ M). La incubación de sinaptosomas con el β A no indujo cambios importantes en la reducción del MTT a los tiempos de 2, 3 y 4 horas (7%, 3% y 2% de inhibición en la reducción del MTT respectivamente) y estadísticamente no significativos (figura 1).

Por otro lado, se incubaron sinaptosomas en condiciones despolarizantes a los mismos tiempos experimentales con KCl a una concentración 50 mM en ausencia y presencia del fragmento 25-35 del β A, con el fin de estudiar si la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización era un estímulo suficiente para incrementar la vulnerabilidad de los sinaptosomas al péptido 25-35. Los resultados se presentan en la figura 2 y muestran que, al contrario de lo esperado, la reducción del MTT se incrementa 26, 30 y 28% a las 2, 3 y 4 horas respectivamente y fue estadísticamente significativo. Mientras que en la condición despolarizante en presencia del péptido se ve un decremento en la reducción del MTT respecto a la condición de despolarización de un 12, 13 y 15 % a las 2, 3 y 4 horas respectivamente. En esta condición el péptido 25-35 no mostró efectos tóxicos y no fueron estadísticamente significativos con respecto a la condición despolarizante.

Otra situación experimental relacionada con un posible evento capaz de aumentar la toxicidad *in vitro* de la β A es una disminución crítica en una fuente energética importante para los sinaptosomas como es la glucosa. Para esta condición incubamos sinaptosomas en un medio con una concentración de glucosa 10 veces menor (de 5mM a 0.5 mM). Los resultados se muestran en la figura 3, y podemos apreciar una diferencia importante en la reducción del MTT al disminuir la concentración de glucosa con respecto al control, aproximadamente en un 20, 17 y 27% a las 2, 3 y 4 h respectivamente. Llama la atención que la disminución en la concentración de la glucosa en presencia del péptido 25-35 potenció de manera importante la inhibición en la reducción del MTT con respecto al control (36, 48 y 48% respectivamente).

En vista del papel que se ha adjudicado al β A con respecto a sus posibles efectos tóxicos en relación con una desestabilización en la homeostasis del Ca^{2+} interno, decidimos valorar la participación de la liberación de Ca^{2+} de pozas endógenas activando el canal de rianodina con la misma rianodina 100 nM y con cafeína a concentración 5 mM. Los resultados obtenidos en presencia de cafeína 5mM (figura

4) muestran un decremento en la reducción de MTT 24, 12 y 19% a las 2, 3 y 4 horas, respectivamente. En esta misma condición pero en presencia del péptido 25-35 del β A se inhibió de manera mucho más importante la reducción del MTT (33, 40 y 27% a las 2, 3 y 4 horas respectivamente).

Los efectos de la rianodina sobre la funcionalidad de las terminales nerviosas se representan en la figura 5. En esta condición encontramos una disminución en la reducción del MTT (26, 19 y 21 %) estadísticamente diferente con respecto al control. Referente al efecto en la reducción de MTT en presencia de rianodina más el péptido 25-35 simultáneos, no observamos una potenciación en la toxicidad a las 2 y 3 h y solo a las 4 horas se observa un ligero decremento en la reducción del MTT que no fue estadísticamente significativo.

En otra serie experimental decidimos explorar si concentraciones más bajas de cafeína podían inducir inhibición en la reducción del MTT y se podía seguir observando la potenciación por el péptido 25-35. Para ello se utilizó la cafeína a una concentración de 5 μ M. Cabe recordar que a esta concentración la cafeína puede ejercer otros efectos biológicos como son: inhibición de la fosfodiesterasa y aumento en el AMPc e inhibición de los receptores para adenosina. En la figura 6A, se observa que la cafeína 5 μ M disminuye la reducción del MTT en relación con el control (15, 9 y 14 % a las 2, 3 y 4 horas). Esta última condición en presencia del péptido 25-35 produjo una potenciación importante en la disminución de la reducción del MTT (28, 22, y 28% a las 2, 3 y 4 h respectivamente) estadísticamente muy significativa. En la figura 6B se muestra que la ausencia del Ca^{2+} externo no afecta la inhibición de la reducción del MTT tanto en presencia de cafeína 5 μ M como en presencia del fragmento 25-35 del β A.

Los últimos resultados de este trabajo (fig. 7 y 8) corresponden al análisis por electroforesis de algunas proteínas que nos pueden hablar de la integridad estructural de los sinaptosomas, en la condición que indujo los cambios más importantes en la inhibición de la reducción del MTT. Las proteínas analizadas por Western-Blot fueron: la sinaptofisina (la cual se ha utilizado como un marcador para detectar la pérdida sináptica en pacientes con enfermedad de Alzheimer), la proteína del citoesqueleto actina (presente en grandes cantidades en los sinaptosomas y cuya pérdida se asocia con la activación de proteasas de cisteína o caspasas) y proteínas conteniendo residuos fosforilados en tirosina (cuya aparición habla de la activación específica de cinasas de tirosina, involucradas en varios trabajos en la toxicidad del β A (Luo et al, 1996).

Los resultados obtenidos para la proteína sinaptofisina se muestran en la figura 7, en ésta vemos los cambios en la cantidad de esta proteína después de 30 y 60 minutos de incubación. En el carril 1 se muestran sinaptosomas controles, en el carril 2 sinaptosomas incubados con cafeína 5 μ M, en el carril 3 sinaptosomas incubados con cafeína 5 μ M + 50 μ M del péptido 25-35 después de 30 min. En la misma figura en los carriles 4, 5 y 6 son las condiciones mencionadas en el mismo orden pero después de 60 min de incubación. En estas condiciones y a los tiempos mencionados se observa una ligera pérdida de sinaptofisina mayor en la condición de cafeína 5 μ M + péptido 25-35.

El análisis por Western-blot para la proteína actina se muestra en la figura 8, para las condiciones anteriormente mencionadas a las 2 horas de incubación. Llama la atención que en la condición con cafeína 5 μ M + el péptido 25-35 se observó la desaparición casi completa de la actina.

Por último, en la figura 9 se muestra el efecto de la cafeína 5 μ M en ausencia y presencia del péptido 25-35 en la incorporación de residuos fosforilados en tirosina de dos proteínas, una de aproximadamente 120 kDa y otra de aproximadamente 70 kDa. En el carril 1 se muestran sinaptosomas controles, en el 2 en presencia de cafeína 5 μ M y en el 3 cafeína 5 μ M + péptido 25-35 después de 30 min de incubación, los carriles 4, 5 y 6 son las condiciones anteriores en el mismo orden pero después de 60 min de incubación. Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que existe un ligero incremento en la incorporación de fosfatos en residuos de tirosinas que se detecta desde tiempos cortos y que es más claramente observable en la condición de cafeína + el péptido 25-35 de la β A.

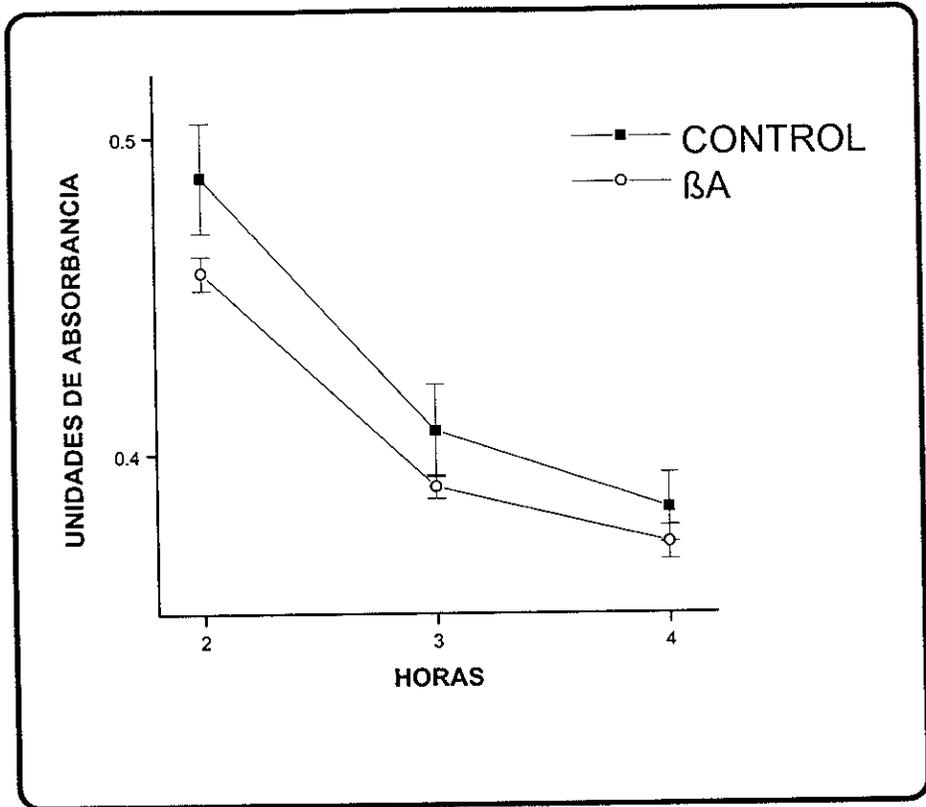


FIGURA 1.

Efecto del péptido 25-53, $50\mu\text{M}$ sobre la viabilidad sinaptosomal. Se muestran las unidades de absorbancia relativas a la cantidad MTT reducido en sinaptosomas incubados durante 2, 3 y 4 horas. Como se observa no existe una diferencia significativa en la viabilidad sinaptosomal al comparar al control con la condición en presencia del βA . Los resultados se expresan como promedio de 6 experimentos independientes \pm E.S.

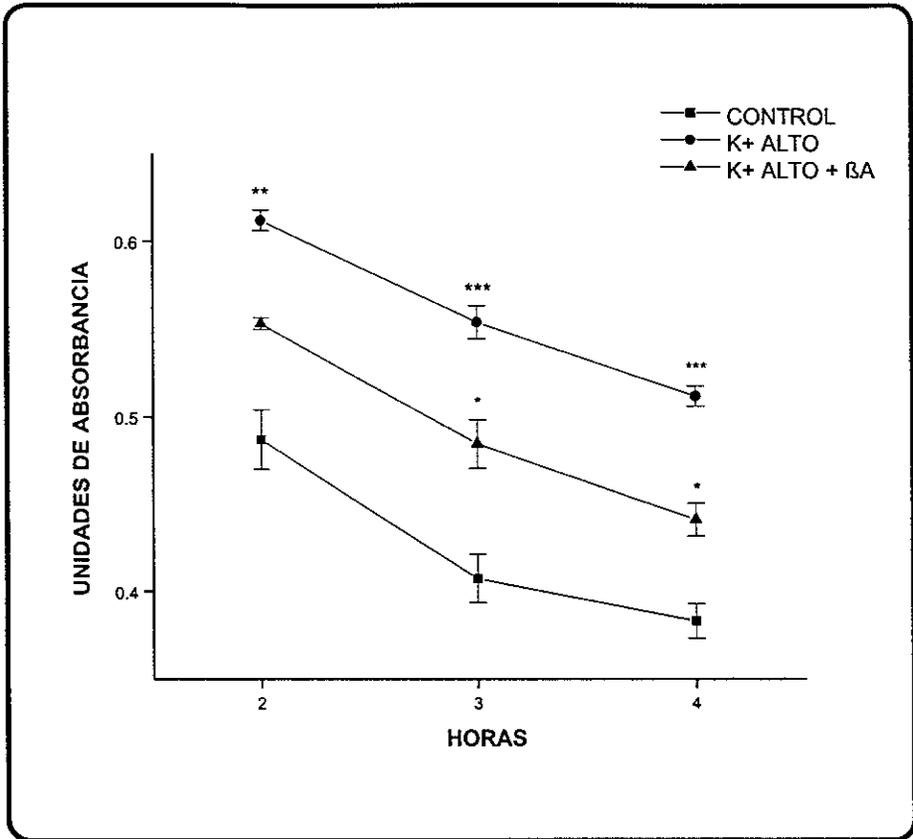


FIGURA 2.

Efecto del péptido 25-35, 50 μ M sobre la viabilidad sinaptosomal en una condición despolarizante. Se observa el efecto de una despolarización sostenida con KCl 50 mM sobre la reducción del MTT que corresponde a un aumento en la reducción del MTT, por otro lado se detecta un ligero decremento de este efecto en presencia del péptido 25-35 de la β A. Los resultados son el promedio de 6 experimentos independientes \pm E.S., * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

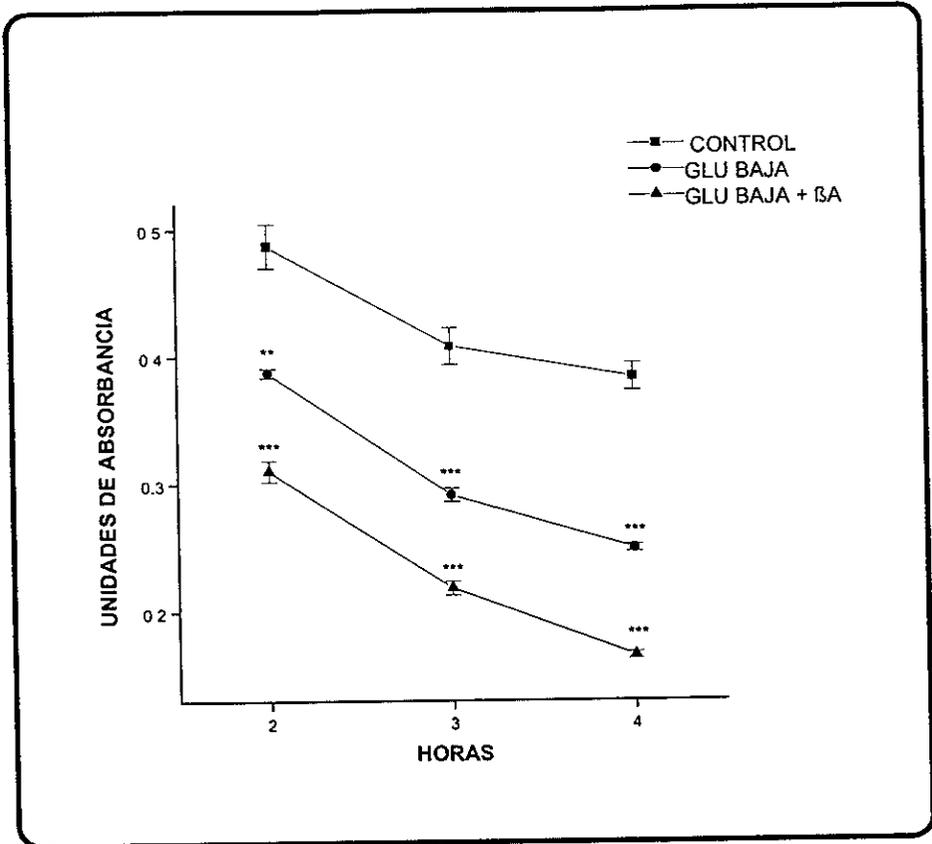


FIGURA 3.

Efecto del péptido 25-35 del β A sobre la viabilidad sinaptosomal en condiciones de glucosa normal (5mM) y de glucosa baja (0.5mM) en ausencia y presencia del péptido 25-35. Como se muestra existe una diferencia significativa en la inhibición de la reducción del MTT en condiciones de glucosa baja a las 2, 3 y 4 h con respecto al control. Este efecto de inhibición en la reducción del MTT se potencia de manera importante en presencia del péptido 25-35. Los resultados son el promedio de 6 experimentos independientes \pm E.S., * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

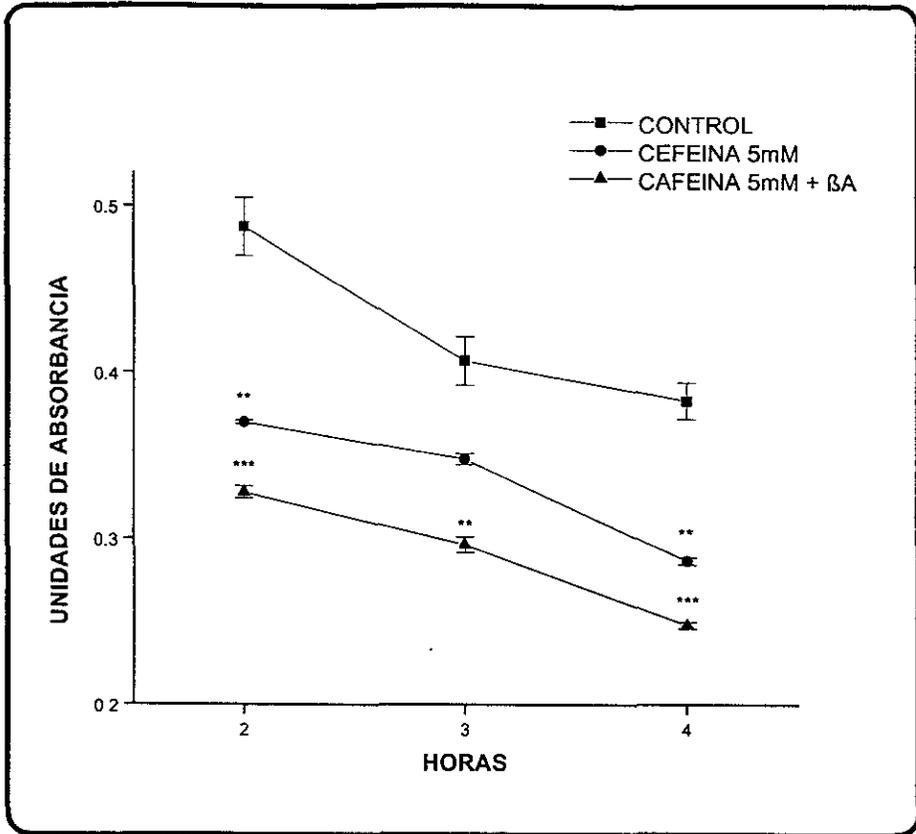


FIGURA 4.

Efecto sobre la reducción de MTT del péptido 25-35 (50 *M) en presencia de cafeína 5mM. Se observa una disminución en la reducción del MTT en presencia de cafeína 5 mM que se potenció de manera importante cuando se adicionó el péptido 25-35 del βA en los tres tiempos estudiados. Los resultados son el promedio de 6 experimentos independientes ± E.S., ** p < 0.05, *** p < 0.0005.

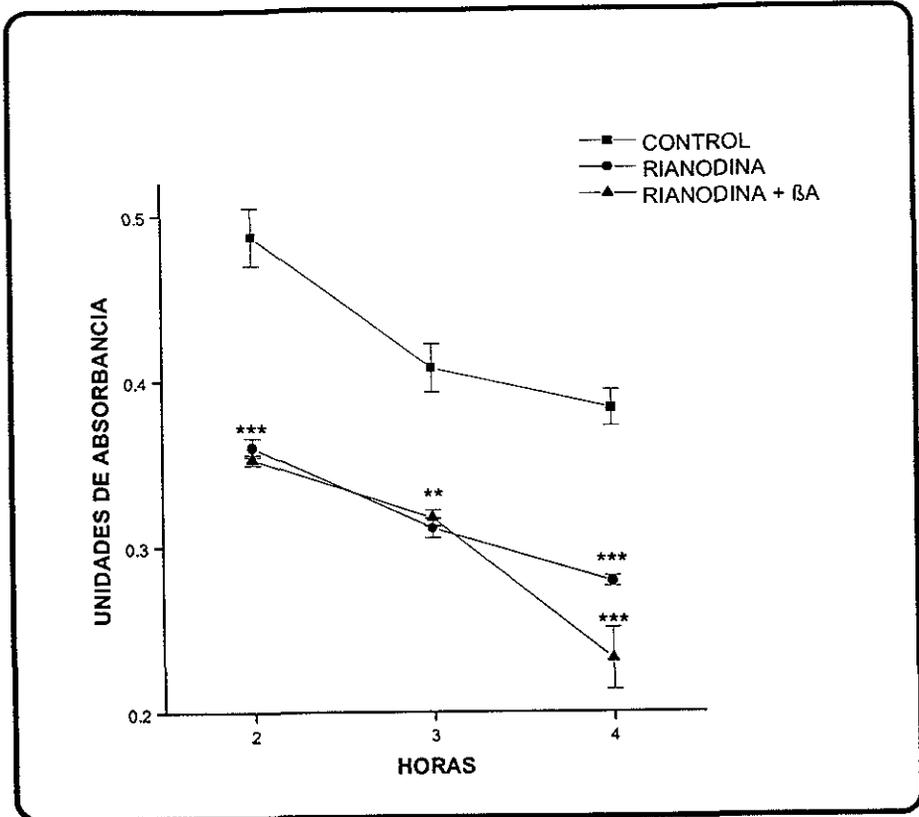


FIGURA 5.

Efecto del βA en presencia de rianodina a una concentración 100nM. El efecto de la rianodina sobre la viabilidad sinaptosomal es estadísticamente significativa en los tiempos 1 y 3 con respecto al control. Al colocar de forma simultanea la rianodina y el péptido 25-35 no se logra un mayor efecto con respecto a la viabilidad de las terminales aisladas en comparación con el efecto que produce la rianodina. Los resultados son el promedio de 6 experimentos \pm E.S. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

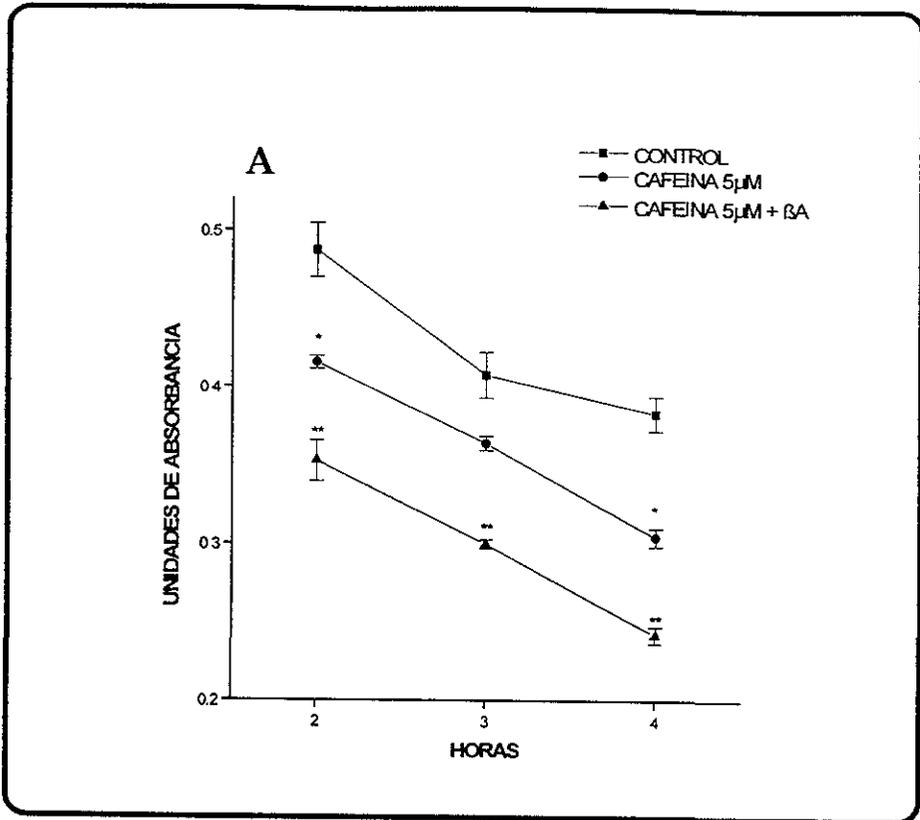


FIGURA 6.

Efecto del péptido 25-35 en la viabilidad sinaptosomal en presencia de cafeína 5µM con y sin Ca²⁺. En A se muestran los efectos de cafeína 5µM sobre la reducción del MTT y la presencia del péptido 25-35 potencia este efecto. En B se muestran estos mismos efectos en ausencia de Ca²⁺ externo y en presencia de EGTA 20 µM. Los resultados son el promedio de 6 experimentos ± E.S., * p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005*.

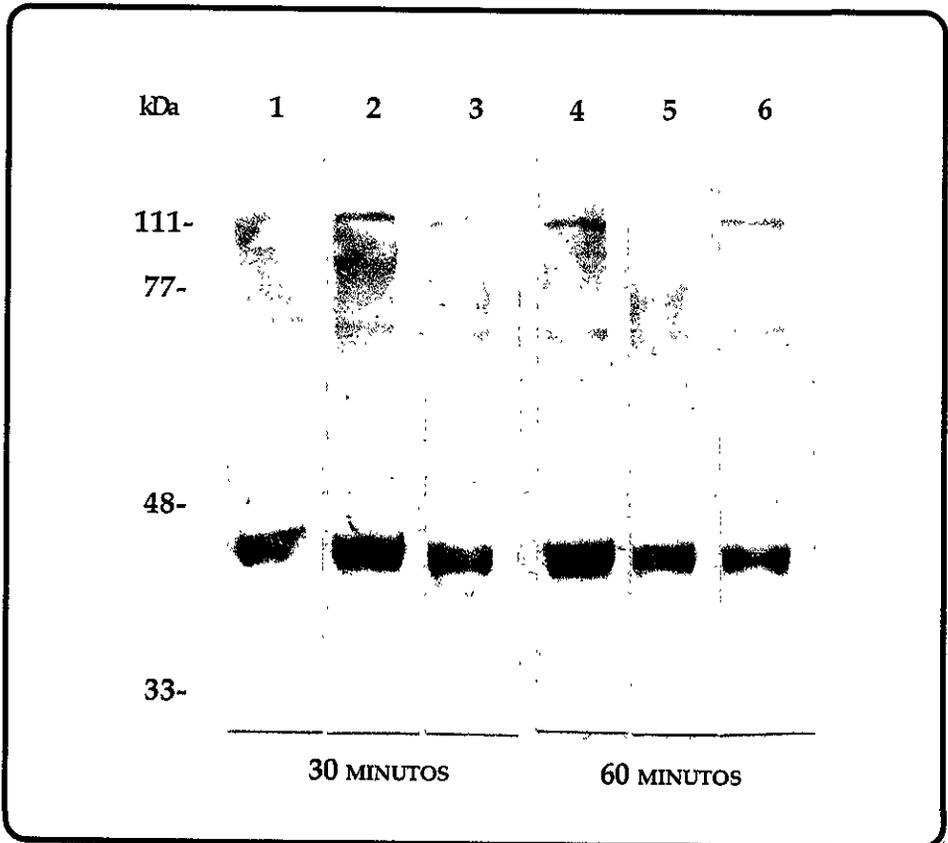


FIGURA 7.

Análisis por Western-blot de la presencia de sinaptofisina después de 30 y 60 min de exposición de los sinaptosomas a cafeína $5 \mu\text{M}$ y cafeína + βA 25-35 ($50 \mu\text{M}$). Cada línea se cargó con $10 \mu\text{g}$ de proteína sinaptosomal incubada durante 30 min (líneas 1, 2 y 3) y 60 min (líneas 4, 5 y 6). Sinaptosomas controles (líneas 1 y 4), cafeína $5 \mu\text{M}$ (líneas 2 y 5) y cafeína $5 \mu\text{M}$ + péptido 25-35, $50 \mu\text{M}$ (líneas 3 y 6). Aquí, podemos observar que existe un ligero decremento. La figura es representativa de 4 experimentos.

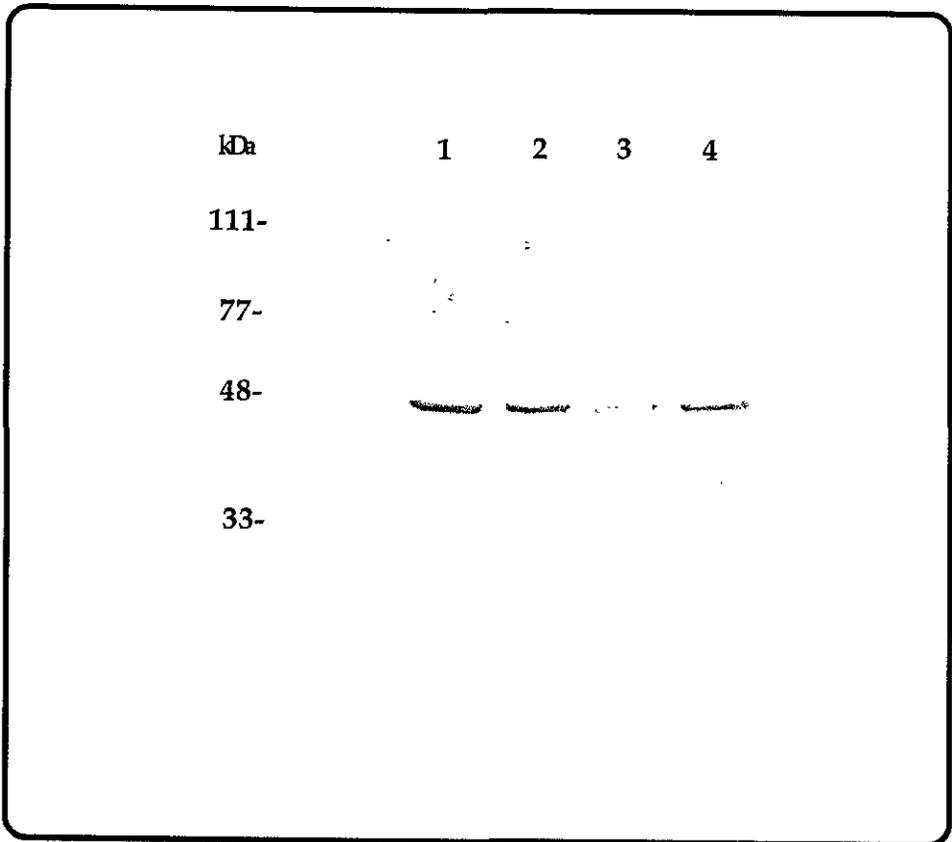


FIGURA 8.

Análisis por Western-blot donde se muestra la proteína actina de sinaptosomas después de 2 horas de incubación en las siguientes condiciones: controles (1), incubados con cafeína 5 μM (2), cafeína 5 μM + βA 25-35, 50 μM (3) y el βA (4)

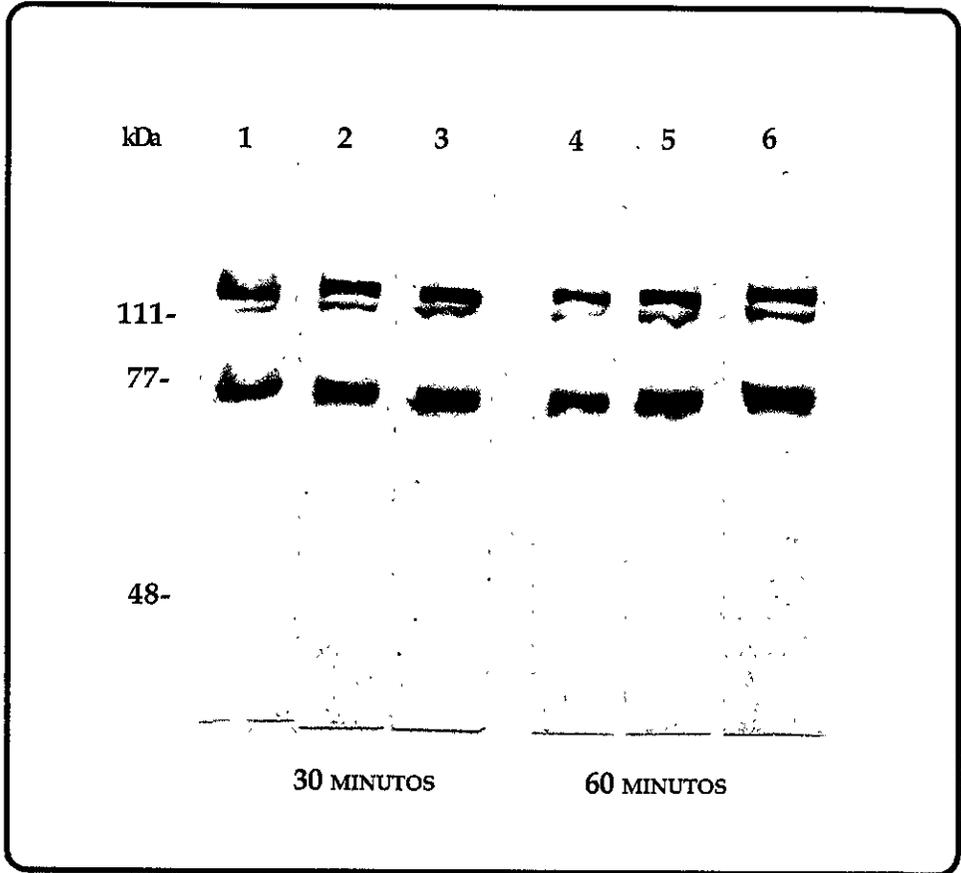


FIGURA 9.

Análisis por Western-blot de la presencia de residuos fosforilados en tirosinas después de la incubación durante 30 min (líneas 1, 2 y 3) y 60 min (líneas 4, 5 y 6) de sinaptosomas controles (líneas 1 y 4), sinaptosomas incubados con cafeína 5 μ M (líneas 2 y 5) y sinaptosomas incubados con cafeína 5 μ M + péptido 25-35, 50 μ M (líneas 3 y 6). La figura es representativa de 4 experimentos.

X. DISCUSIÓN

El estudio de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal y en particular de la pérdida de neuronas que ocurre en la EA es de gran interés puesto que los estudios epidemiológicos revelan que la enfermedad se presenta en un número importante de individuos, y además la tendencia va creciendo. Con respecto a lo anterior, algunos datos mencionan que del 40 al 60% de las personas mayores de 60 años que presentan algún tipo de demencia, precisamente es del tipo Alzheimer.

Los resultados presentados en este trabajo están enfocados a la caracterización de los efectos tóxicos del β A en terminales nerviosas aisladas, con el fin de aportar información que contribuya a entender algunos mecanismos por los cuales la acumulación de esta proteína puede ser tóxica y en particular si las terminales nerviosas aisladas pueden ser un blanco importante de esa toxicidad.

X.1 Reducción del MTT como parámetro de funcionalidad en los sinaptosomas

La técnica de reducción del MTT se ha utilizada ampliamente como un sistema capaz de cuantificar la viabilidad celular en diferentes modelos y fue descrita originalmente por Mossman en 1983. Esta técnica consiste en medir la viabilidad celular evaluando la actividad de la cadena respiratoria de las mitocondrias en las células. En vista del importante papel de las mitocondrias y de su abundancia en las terminales nerviosas aisladas consideramos que el uso de esta técnica nos permitiría evaluar la función respiratoria de los sinaptosomas, lo cual, si bien no es un parámetro de viabilidad puesto que se trata de una preparación totalmente *in vitro* y carente del resto de los elementos neuronales, sí puede ser un buen índice de funcionalidad sinaptosomal.

Una vez caracterizado la concentración de MTT adecuada para la cantidad de sinaptosomas utilizados en cada uno de nuestros ensayos, esto es, que hubiera linealidad entre el tiempo de incubación transcurrido y la cantidad de compuesto reducido, (datos no mostrados) también realizamos diferentes tiempos de incubación para escoger aquellos en los que los cambios en la reducción del MTT control no fueran muy grandes con el fin de estudiar los cambios aditivos de los diferentes tratamientos (datos no mostrados).

Con las caracterizaciones anteriores encontramos que los tiempos adecuados para valorar alteraciones en la reducción del MTT bajo las diferentes condiciones experimentales fueron durante las primeras 4 horas, ya que después de este tiempo,

las alteraciones en la reducción del MTT en sinaptosomas controles son tan grandes que no sirven para explorar los efectos aditivos de las diferentes drogas.

Es importante recalcar el hecho de que, si bien la técnica se ha utilizado para medir muerte celular, en nuestro paradigma podemos solamente decir si los diferentes tratamientos utilizados producen alteraciones en la capacidad respiratoria de las mitocondrias las cuales, sin duda, pueden correlacionar con la presencia de efectos tóxicos de los diferentes tratamientos. Por lo anterior a lo largo de esta discusión se hablará de “viabilidad sinaptosomal” con la salvedad antes mencionada.

X.2 Efectos basales del βA

Respecto al efecto sobre la viabilidad sinaptosomal del péptido 25-35 del βA , a diferentes tiempos 2, 3 y 4 horas y en condiciones basales se observó que la disminución en la reducción del MTT es tan solo del 7, 3, 2% con respecto al control, lo cual concuerda con antecedentes que mencionan que el βA por si solo no es capaz de producir un gran daño neuronal a tiempos cortos de exposición. Con respecto a este punto, se sabe que el βA se encuentra de forma circulante en personas de edad avanzada que no presentan síntomas de algún tipo de demencia. Una explicación posible es que la agregación del péptido puede ser un factor altamente determinante en la toxicidad del βA . Al respecto podemos decir que en experimentos diseñados para detectar la toxicidad del péptido, éste se ha dejado en una temperatura de preincubación a 37° C, (condiciones propias para la agregación del péptido) y los efectos de toxicidad se ven aumentados después de la preincubación. También se conoce que la presencia de la Apo E o de los glucosaminoglucanos puede fungir como núcleos de atracción para el βA que una vez agregado parece ser más tóxico. Además también es importante tomar en cuenta que las condiciones que se presentan en el medio interneuronal en los pacientes con EA como el pH, la concentración de diferentes iones o la presencia de algunas otras proteínas pueden ser factores que determinen la toxicidad del βA . Al respecto diseñamos algunas maniobras experimentales basándonos en algunos hechos que se han relacionado con la EA. Estas condiciones que las hemos llamado como condiciones de “estrés metabólico” son las siguientes: despolarización sostenida con KCl 50mM, deficiencia energética disminuyendo la concentración de glucosa, y alteración de la homeostasis del Ca^{2+} de pozas endógenas a través del canal de rianodina del retículo endoplasmático, con rianodina y con cafeína a dos concentraciones.

X.3 Efecto de la despolarización sobre la toxicidad del β A

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos sobre la viabilidad producido por el péptido 25-35 del β A en una condición despolarizante. De manera interesante se observa que durante la despolarización sostenida de los sinaptosomas, existe un aumento en la reducción del MTT muy probablemente causado por la elevación en la actividad de la cadena respiratoria producto por la entrada de Ca^{2+} . En esta condición el péptido 25-35 logra disminuir la reducción del MTT en un 15% con respecto a la condición despolarizante, aunque esta reducción sigue siendo mayor que en la situación control. Nuestros resultados sugieren que, a pesar del papel reconocido del Ca^{2+} en la toxicidad neuronal, parecería que el o los sitios de entrada de Ca^{2+} que condicionan su elevación intraneuronal o intrasinaptosomal son muy importantes para producir o no efectos tóxicos. A este respecto ha sido reportado que efectivamente no todo el Ca^{2+} que entra de manera masiva es capaz de inducir toxicidad. Sattler et al., (1998) han concluido que la neurotoxicidad por Ca^{2+} depende más de la ruta de entrada que del contenido total del Ca^{2+} que halla penetrado a una neurona.

X.4 Efecto de la disminución de la glucosa en la toxicidad de la β A

Se puede observar claramente que al disminuir la concentración de glucosa del medio 10 veces, de 5mM a 0.5mM, existe un efecto notable en la disminución de la reducción del MTT en los sinaptosomas. De manera muy interesante, este efecto inhibitor se potenció en presencia del fragmento 25-35 del β A. Es bien conocido que las células neuronales son muy susceptibles a la falta del aporte de oxígeno o de glucosa, esto es, que gran parte de la energía que utilizan proviene de la glucólisis aeróbica. En esta condición de bajo aporte energético el péptido 25-35 disminuye importantemente la viabilidad sinaptosomal lo que nos lleva a concluir que un estado de "compromiso metabólico" produce una susceptibilidad para que el β A manifieste sus efectos tóxicos. Un dato interesante con respecto a lo anterior, es que en los análisis realizados en pacientes con EA se han encontrado numerosos focos de isquemia en regiones que presentan poblaciones neuronales afectadas por placas seniles (Rosen et al 1979).

Aunque en los experimentos diseñados no podemos hablar del probable mecanismo de toxicidad del β A, existen múltiples reportes que muestran que el β A puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (Bianca et al., 1999). Un déficit energético también conduce a un incremento de especies reactivas de oxígeno

lo que podría explicar el efecto sumatorio de ambos tratamientos que conduce a una importante disminución en la capacidad mitocondrial para reducir el MTT. Por otro lado se ha demostrado que en condiciones de compromiso energético, la entrada de Ca^{2+} se incrementa al disminuir la energía y bajar la capacidad para mantener los gradientes iónicos. Mattson et al., (1992) demostraron en neuronas de humano que el péptido 25-35 del βA incrementa la toxicidad de los aminoácidos excitadores porque es capaz de alterar la homeostasis del Ca^{2+} . Los posibles mecanismos por los que el βA induce desestabilización de la homeostasis de Ca^{2+} se desconocen, pero existen varias posibilidades. Su efecto puede no ser específico, como la regulación de la energía celular que a su vez altere los mecanismos de regulación de la homeostasis del Ca^{2+} interno o también modificando la entrada de Ca^{2+} a través del receptor para aminoácidos excitadores, a través de canales sensibles a voltaje, o a través de la interacción reportada sobre el receptor de sustancia P que a su vez eleva las concentraciones del inositol trifosfato. Para estudiar este tipo de mecanismos decidimos explorar los efectos del βA sobre sistemas endógenos de regulación del Ca^{2+} y de manera particular, las pozas internas que son sensibles a rianodina y cafeína.

X.5 Efecto de la rianodina sobre toxicidad de la βA

Como se muestra en la gráfica correspondiente pudimos detectar claramente el efecto tóxico de la rianodina en sinaptosomas y que en estas condiciones no se manifiestan de manera importante los efectos tóxicos del βA . La rianodina es una sustancia que actúa de forma específica sobre los receptores del mismo nombre situados sobre el RE y dependiendo de la concentración utilizada se puede abrir, cerrar o dejar inactivo al canal. Parece ser que el βA no tiene un efecto importante de potenciación en esta condición pues probablemente la salida de Ca^{2+} de los sitios sensibles a rianodina es tan grande que provoca una gran disminución en la reducción del MTT lo que pudiera encubrir el efecto escaso de toxicidad correspondiente a el βA .

Aunque existe aún controversia sobre la presencia de RE en sinaptosomas puesto que no se ha podido detectar claramente a través de observaciones de microscopía electrónica, existe evidencia por estudios de autoradiografía de una alta concentración del receptor de rianodina en sinaptosomas y en vesículas sinápticas (Padua et al., 1991) y este compuesto tuvo efectos notables sobre la reducción de MTT por la mitocondria.

X.6 Efectos de cafeína y toxicidad del β A

La cafeína tiene diferentes efectos a diferentes concentraciones sobre varios sistemas celulares. A concentraciones milimolares se sabe que interactúa con los canales de rianodina y es capaz de sacar Ca^{2+} de pozas endógenas. En el presente trabajo nuestros resultados mostraron un efecto importante de la cafeína 5 mM sobre la reducción del MTT, que sin embargo fue de menor magnitud que la causada por la rianodina. En estas condiciones fue interesante el demostrar que el péptido 25-35 del β A tuvo un efecto potenciador en esta inhibición de la reducción del MTT. En nuestros resultados se observa un efecto tóxico de la cafeína. Este efecto se puede explicar por la alteración en la concentración de Ca^{2+} endógeno a través del canal de rianodina, pero nos queda por resolver cuál es el mecanismo por el que se presenta el efecto potenciador del β A. Al respecto podríamos mencionar, a manera de hipótesis y en virtud de que el β A puede estar interactuando con el receptor a sustancia P y que este a su vez promueva un aumento en los niveles de IP_3 con una consecuente liberación de calcio de pozas endógenas. Por otro lado también se puede considerar que, como ya se mencionó, el péptido 25-35 del β A pudiera ejercer sus efectos aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno que a su vez tuvieran un efecto deletéreo sobre los mecanismos que operan para mantener la homeostasis del Ca^{2+} interno. En este sentido se podría mencionar que estos efectos del β A tal vez no son suficientes para que de manera única produzcan toxicidad mitocondrial pero sumados al efecto de la movilización endógena del Ca^{2+} resulten en una potenciación de la inhibición para reducir el MTT.

En otro tipo de experimentos estudiamos los efectos de cafeína pero utilizando una dosis menor de 5 μM . La cafeína a esta concentración puede tener otros efectos celulares como inhibidor de la acción de la fosfodiesterasa la cual se encarga de transformar al AMPc a su forma no cíclica (AMP) y de esta forma regular el sistema de transducción dependiente de este nucleótido cíclico, y por otro lado puede actuar como inhibidor de receptores purinérgicos. En nuestros resultados encontramos claramente que la cafeína a esta concentración 1000 veces menor sigue teniendo un efecto considerable en disminuir la reducción del MTT y el péptido del β A sigue potenciando este efecto. Hasta el momento no podemos concluir si los efectos observados dependen de la acción de la cafeína sobre otros sistemas celulares o si su efecto prevalente sigue siendo a través de la movilización de Ca^{2+} de pozas endógenas. No se puede descartar que la cafeína a esta concentración presente sus efectos por una elevación en los niveles del AMPc y que en esta condición se promueva un estado que aumente la vulnerabilidad de los sinaptosomas a otro

estímulo tóxico como sería la presencia del péptido 25-35. A este respecto existe un reporte en donde se ha descrito que en astrocitos en cultivo el β A puede incrementar los niveles del AMPc.

Aunque no se conoce muy bien si el β A ejerce ciertos efectos tóxicos de manera inespecífica, existen varios reportes que señalan que esta proteína puede interactuar con sitios de pegado específicos en la membrana neuronal. Entre estos sitios se han mencionado los sitios para unión a sustancia P, y el receptor RAGE entre otros (Shi et al., 1997; Kimura y Schubert, 1993; Yan et al., 1995). El receptor a sustancia P se encuentra acoplado a un sistema de proteínas G y segundos mensajeros que aumentan la concentración del inosiltrifosfato (IP3) que a su vez puede movilizar Ca^{2+} de reservas endógenas.

X.7 Alteraciones Estructurales

• Análisis de la proteína sinaptofisina

La sinaptofisina es una proteína estructural que se encuentra en grandes cantidades en las terminales nerviosas y que ha sido un marcador ampliamente utilizado en el análisis de los cerebros de pacientes con EA. En nuestros experimentos decidimos estudiar cambios en esta proteína para tratar de correlacionar pérdida en esta proteína estructural con la toxicidad mitocondrial observada. Nuestra hipótesis es que en las condiciones estudiadas, además de los efectos sobre actividad mitocondrial, ocurran cambios como activación de proteasas (probablemente dependientes del aumento en el Ca^{2+} intrasinaptosomal).

En el presente trabajo se observó una disminución en la cantidad de sinaptofisina en las condiciones que disparan toxicidad mitocondrial. Sin embargo la pérdida de esta proteína no fue muy grande lo que nos puede hacer pensar que para que esta degradación ocurra tiene que transcurrir un tiempo mayor al estudiado por nosotros y en nuestro sistema no es factible hacerlo.

• Pérdida de actina en presencia de cafeína y β A

En los resultados del análisis de la proteína que conforma de manera importante al citoesqueleto encontramos que la actina se ve severamente disminuida en la condición de cafeína $5\mu\text{M}$ en presencia del β A y esto nos permite concluir que la presencia de estos dos agentes que inducen estrés metabólico puede inducir señales

que produzcan alteraciones en proteínas que conforman el citoesqueleto y proteínas asociadas a éste que a la postre pudieran derivar en la formación de marañas neurofibrilares, que es una de las marcas histológicas que caracterizan a la EA o que simplemente contribuyan al deterioro de las sinapsis. Otra de las implicaciones de lo anterior es que en los sistemas de degradación de proteínas se han descrito ampliamente a las caspasas que son proteasas de cisteína que contribuyen importantemente a la llamada muerte celular programada de tal manera, que las señales de estrés aunadas a la presencia del β A pudieran ser capaces de iniciar una serie de eventos que culminen con la activación de estas proteasas y de esta manera relacionarse con el mecanismo de la apoptosis. A este respecto existe evidencia de que en terminales nerviosas aisladas se pueden iniciar las señales que conduzcan a la apoptosis y que en estas terminales hay activación local de caspasas (Mattson y cols., 1998).

• Residuos fosforilados en tirosinas

Con respecto al análisis de aparición de residuos fosforilados en tirosina encontramos que de manera muy interesante en los sinaptosomas solo aparecen dos proteínas que contienen estos residuos: una proteína de aproximadamente 120 kDa y otra de aproximadamente 70 kDa. Posteriormente a la incubación con la condición de cafeína $5\mu\text{M}$ y con la incubación de cafeína $5\mu\text{M}$ + β A 25-35 se incrementa la presencia de estos residuos fosforilados en tirosinas. A este respecto es interesante el mencionar que parte de los mecanismos que se han descrito que se activan por la presencia del β A son a través del receptor de factores de crecimiento que se asocian a proteína cinasas de tirosina (Luo et al., 1994). De esta manera se ha propuesto que bajo condiciones que potencian la actividad de tirosina cinasas, se puede estimular el influjo de Ca^{2+} . En este contexto también es interesante el mencionar que varios receptores ligados a proteína cinasas de tirosina pueden también activar a la enzima MAP cinasa y a pCDC34, las cuales son cinasas involucradas en la conversión de tau hacia filamentos apareados helicoidales. De esta manera, el β A pudiera actuar vía receptores ligados a tirosina cinasas estimulando el influjo de Ca^{2+} y activando cinasas que fosforilen a la proteína tau.



XI

CONCLUSIONES

XI. CONCLUSIONES

- El péptido 25-35 del β A no es tóxico en condiciones basales.
- El péptido 25-35 potencia la toxicidad en sinaptosomas de condiciones de bajo aporte de glucosa o en presencia de cafeína 5 mM o 5 μ M.
- A concentraciones de cafeína 5 μ M es probable que el mecanismo involucrado se relacione con un aumento en la producción de AMPc, dado que a esta concentración, la cafeína se comporta como inhibidor de la fosfodiesterasa, aunque no se excluye que active también al receptor de rianodina.
- A una concentración 5mM de cafeína el mecanismo que puede estar determinando la potenciación en la toxicidad del péptido 25-35 es la salida de calcio de sitios sensibles al canal de rianodina.
- Después de 1 hora de incubación con el péptido 25-35 se observó un ligero incremento en la producción de residuos fosforilados en tirosina lo que sugiere que parte de los efectos observados correlacionan con la activación de cinasas de tirosina.
- Después de 1 hora de incubación con el péptido 25-35 se observa un ligero decremento en la cantidad de proteína sinaptofisina que representa daño estructural de los sinaptosomas.
- Después de 1 hora y 30 minutos de incubación con el péptido 25-35 se observa un claro decremento en la cantidad de proteína actina la cual es un sustrato muy importante de caspasas por lo que estas enzimas pudieran estar activándose en nuestras condiciones experimentales.
- Estos resultados sugieren los efectos tóxicos del fragmento 25-35 del β A sobre terminales nerviosas aisladas en condiciones previas de alteraciones en los niveles de segundos mensajeros.

XII

REFERENCIAS

XII. REFERENCIAS

- Arias C, Becerra-Garcia F y Tapia R. Glutamic acid and Alzheimer's Disease. *Neurobiology*. 1998;6:33-43.
- Arias C, Enfermedad de Alzheimer, en: *Enfermedades Neurodegenerativas, Mecanismos celulares y moleculares*. FCE, Mexico 1999:133-160.
- Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membrane: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:567-571.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte T, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42:631-639.
- Aruffo C, Ferszt R, Hildebrandt AG y Cervos-Navarro J. Low doses of L-monosodium glutamate promote neuronal growth and differentiation in vitro. *Dev. Neurosci*. 1987;9:228-239.
- Ascher P y Nowak L. Quisqualate and Kinate activated channels in mouse centryral neurones in culture. *J. Physiol*. 1988;399:227-245.
- Begley J, Duan W, Chan S, Duff K y Mattson MP. Altered Calcium homeostasis and mitochondrial Disfunction in Cortical Synaptic Compartments of Presenilin-1 Mutant Mice. *J. of Neurochem*. 1999;72:3. 1030-1039.
- Bernstein BW, Bamberg JR. Depolarization of brain synaptosomes activates opposing factors involved in regulating levels of cytoskeletal actin. *Neurochem. Res*. 1997 Oct;15(10):929-35.
- Berrios GE, Freeman HL, Alzheimer and the dementias. London : Royel Society Medical Service. 1991.
- Bianca VD, Dusi S, Biachini E, Dal Para I y Rossi F. Beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes and neurotrophils. A possible inflammatory mecanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem*. 1999;274(22):1593-1599.

- Black MM y Greene LA. Changes in the colchicine susceptibility of microtubules associated proteins with neurite outgrowth: studies with nerve growth factor responsive PC12 Pheochromocytoma cells. *J. Cell. Biol.*1982;95:379-382.
- Blake JF, CNQX blocks acidic amino induced depolarization and synaptic components mediated by non-NMDA receptors in rat hippocampal slicas. *Neurosci.* 1988;89:182-186.
- Braugher JM. Involvement of lipid peroxidation in CSN injury. *J Neurotrauma.* 1992;1:51-57.
- Bridges RJ, Stevens DR, Kahle JS, Nunn PB, Kadri M y Cotman CW. A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity sodium-dependent glutamate transpor in the central nervious system. *Curr. Pharm. Des.*1999;5:363-379.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, et al. Assembly and agregation properties in of synthetic Alzheimer's A4/ β -amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 1992;267:546-554.
- Buxbaum H. Characterization of routes for processing of the Alzheimer's beta/ A4-amyloid precursor protein. Diferential effects of phorbol esters and chloriquine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* .1992;31:203-217.
- Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramadhadran TV, Greengard P. Protein phosphorilatyon regulates secretion of Alzheimer B/a4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:10075-10078.
- Cataldo AM, Nixon RA. Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amiloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:3861-3865.
- Citron M, oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the B-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increasses B- protein production . *Nature.* 1996;360:672-674.
- Daniels MP. Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro, *J. Cell. Biol.* 1972; 53:164.

- Davies M. Strategies for the development of therapeutics for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1994;15:53-54.
- Delacourte A y Defossez A . Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly are major components of paired helical filaments. *J. Neurosci*. 1986; 76:173.
- Dickson DW y Yen S-H. Beta-amyloid deposition and paired helical filament formation: which histopatological feature is more significant in Alzheimer's disease. *Neurobiol. of aging*. 1989;10:402–403.
- Du YS, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D y Schmidt AM. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685-691.
- Esch FS, Kiem PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Clavage of amyloid B-peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 1990;248:1122-1124.
- Farber NB, Newcomer JW, Olney JW. The glutamate synaptic in neuropsychiatric disorders. *Prog. Brain. Res.* 1998;116:421-437.
- Giaccone G, Tagliavini F, Linolo G, Bouras C, Frigerio L, Frabgione B, Bugiani O. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 1989;97:232-238.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;120:885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Guiffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familiar Alzheimer's disease. *Nature* . 1991,349.704-706.
- Greenamyre JT. Pharmacological pallidotomy with glutamate antagonists. *Ann. Neurol.* 1996;39:557-558.

ESTA TESIS NO DEBE
59 SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Trangetig of cell- surface B-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. 1992;357:500-503.
- Hensley KJ, Corney MP, Mattson M, Aksenova M, Harris JF, Wo R, Floy D y Butterfield DA. A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on the free radical generating capacity of the peptide. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. 1994;91:3270-327.
- Ikonovic MD, Mizukami K, Warde D, Sheffield R, Hamilton R, Wenthold RJ, Armstrong DM. Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the brain of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. *Exp. Neurol*. 1999;160:194-204.
- Iqbal K y Grundke-Iqbal. 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) Wile, England.1991. p. 173.
- Jarret JT, Beger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the b amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Biochemistry*. 1993;32:4693-4697.
- Jenner O, Dexter DT, Sain J, Shapira AHV y Marsden CD. Oxidative stress an a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lawy doby disease. *Ann. Neurol*. 1992;32:582.
- Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Mulyhaup G, Beyreuther K, Muller- Hill B. The precursor of purified amyloid A4 protein resambles a cell-surface receptor . *Nature*. 1987;325: 733-736.
- Kater SB, Mattson MP, Cohan CSy Connor JA. Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends. Neuroscience*. 1988;11:315-321.
- Keller NJ, Pang Z, Geddes JW, Begley GJ, Germeyer A, Waer G y Mattson MP. Impairment of Glucose and Glutamate Transport and Induction of Mitochondria Stress and Dysfunction in Synaptosomes by Amyloid β -Peptide: Role of the Lipid Peroxidation Product Hydroxynonenal. *J. of Neurochem*. 1997;69:1 273-279.

- Keller NJ, Mark JR, Bruce JA, Blanc E, Rothstein DJ, Uchida K, Waeg G, Mattson MP. Hydroxynonenal, an Aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience*. 1997;80 (3):685-696.
- Khachaturia ZS. The rol of the calcium regulation in brain aging. *Aging*. 1989;1:17-34.
- Kimura H y Schubert D. Amiloid β -protein activates tachykinin receptors and inositol trisphosphate accumulation by synergy with glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 1993;90:7508-7512.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL, Precursor of amiloid Protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:1561-1565.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechaism in Alzheimer´s disease. *Nat. Neurosci*. 2000;3:460-464.
- Loscher W. Isolation of synaptosomes from brain regions, *J. Neurochem*. 1985;3:878-889.
- Lou YL, Sunderland T y Wolozin B. Physiologic levels of beta-amyloid activate phosphatidylinositol-3 Kinase with the involvement of tyrosine phosphorylation. *J Neurochem* 1996;67:978-987.
- Mann DMA, Brown AMT, Prinja D, Jones D, Davies CA. A morphological analysis of senile plaques in the brains of nondemented persons of different ages using silver, immunocytochemical and lectin histochemical staining techniques. *J. Neurorathol PPAI. Neurobiol*. 1990;16:17-25.
- Maragos WF, Greenamyre JT, Penney JB y Young AB. Loos of hippocampal [3H] TCP binding in Alzheimer´s disease. *Trends. Neuriscience*. 1987;10:65-68.

- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985;82:4245.
- Mattson MP, Partin J y Begley JG. Amyloid beta-peptide induce apoptosis related events in synapsis and dendrites. *Brain. Res.* 1998 Oct 5;807(1-2):167-176.
- Mattson MP, Calcium as aculptor and destroyer of neural circuitry. *Exp. Gerontol.* 1992;27:29-49.
- Mattson MP, Dou P y Kater SB. Outgrowth- regulating acting of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J. Neuroscience.* 1988;8:2087-2100.
- Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res. Rev.* 1989;13:179-212.
- Mesulam, M M. Neuroplastidity failute in Alzheimer's disease bridging the gar between plaque and tangle. *Neuron.* 1999;24:521-529.
- Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Bieman K, Igbal K. Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 301:40-52.
- Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M. A Metaloproteinasa inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature.* 1993;362:839-341.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity. *J. Inmmunol. Methods.* 1983;65:55-63.
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complex with brain GTP-binding protein G0. *Nature.* 1993;362:75-79.
- Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P. Identification of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:608-612.

- Oltersdorf T, Ward P, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Liebergurg J, Fritz LC. The Alzheimer's amyloid protein identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 1990;265:4492-4497.
- Padua RA et al., Subcelular localization of ryaodine receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1996;298:185-189.
- Pappolla MA, Olman RA, Kim KS, Robakis NK. Immunohistochemical evidende of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann. J. Pathol.* 1992;140:621-627.
- Pearson S, Measurement of plasma caffeine concentration by substrate labelled fluoroimmunoassay. *Ann. Clin. Briochem.* 1985;21:208-212.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induce by B-amiloid peptides in vitro: the role of peptide assembly satte. *J. Neurosci.* 1993;13:1676-1687.
- Probst A, Languni D, Ipsen S, Rodakis N, Ulrich J. Deposition of beta/ A4 protein along neuronal plasma membrenes in diffuse senile pleques. *Acta. Neuropathol.* 1991;83:21-2917.
- Reaume AG, Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Lang DM, Greenberg BD, Siman R, Scott RW. Enhances amyloidogenic processing of the bata-amyloid precursor protein in gene-targeted mice bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutations and a humsnizad Abeta sequence. *J. Biol. Chem.* 1996;271:23380-23388.
- Refolo LM, Salton SRJ, Anderson JP, Metha P, Rodakis NK. Nerve and epidermal grow factors induce the release of the Alzheimer amiloid precursor from PC-12 cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;164:664-670.
- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, et al. Chromosome 21q21 sub localization of gene encoding beta-amiloid peptide in cerebral vessels and neuritic(senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet.* 1987;1:384-385.

- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM, Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque core amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:4190-4194.
- Rosen WG, Terry RD, Fold P, Katsman R, Peck A. Pathological verification of ischemic score in differentiation of dementias. *Ann. Neuron.* 1997;7:486-488.
- Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, et al Secreted form of the amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell.* 1989;25:615-622.
- Salinero O, Mireno-Flores MT, Wandosell F. Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease. *J Neurosci. Res.* 1999;60:87-97.
- Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Papolla MA, Rodakis NK. Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 1992;33:319-329.
- Sambamurti K, Reforo LM, Shioi J, Anderson JP, Papolla MA, Robakis NK. The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. In: Banner C, Nixon R, eds. *Proteases and protease inhibitors: emerging roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Ann. N.Y Acad. Sci. 1996;667:118-129.
- Sapolsky RM Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid. *Neuroendocrinol.* 1986; 43:440.
- Sattler R, Charlton MP, Hafner M y Tymianski M. Distinct Influx Pathways, Not Calcium Load, Determine Neural Vulnerability to Calcium Neurotoxicity. *J. of Neurochem.* 1998;6:2349-2364.
- Selkoe DJ, Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 1989;12:463-490.
- Siesjo BK, Bengtsson W, Grampp y Theander. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989;568:234-251.

- Scheibel AB, Duong TH, Jacobs R. Alzheimer's disease as a capillary dementia. *Ann. Med.* 1989;21:103-107.
- Schmidle y JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke.* 1990;3:689.
- Schuber D, Jin L-W, Saitho T, Cole G. The regulation of amyloid B protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron.* 1989;3:689-694.
- Shapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P y Marsden CD : Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 1990;54:823.
- Shi J, Xiang Y y Simpkins JW. Hipoglycemia enhances the expression of mRNA encoding beta-amyloid precursor protein in rat primary cortical astroglial cells. *Brain. Res.* 1997;772:247-251.
- Shioi JS, Anderson JP, Ripellino JA, Robakis NK, Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer β -amyloid precursor. *J. Biol. Chem.* 1992;267:13819-13822.
- Shioi J, Refolo LM, Efthimiopoulus S, Rodakis NK, Chondroitin sulfate proteoglycan form of cellular and cell surface Alzheimer amyloid precursor. *Neurosci.* 1993;154:121-124.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer SG. Production of Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science.* 1992;258:126-129.
- Siman R y Noszek, Strategies to alter the progression of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996;7:601-607.
- Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ Jr. Platelet cuagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science.* 1990;248:1126-1128.
- Snow AD, Henderson M, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wingt TN. Early accumulation of heparan sulfate in the neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann. J. Pathol.* 1990;137:1253-1267.

- Subbarao KV, Richardson JS y Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J. Neurochem.* 1990;55:342
- Suzuki N, Cheung T. An increase percentage of long amyloid β protein secreted by familiar amyloid β protein precursor mutants. *Science.* 264:1336-1340.
- Sur M y Cowey A *Cerebral cortex function and development.* *Neurol.* 1995;15:497-505.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, et al. Amyloid β -protein gene; cDNA. MRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science.* 1988;235:880-883.
- Uxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski TV, Greengard P, Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:3055-3059.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K, Identification, biogenesis, and localization of precursor of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 1989;57:115-126.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al Mohanna F, Cillison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A y Stern D. An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1997;389:689-695.
- Yan SD et al RAGE in Alzheimer's disease: a receptor mediating amyloid- β peptide-induced oxidant stress and neurotoxicity, and microglia activation. *Nature.* 1996;382:685-691.
- Yankner BA. Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 1996 16, 921-932.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 1989;243:65-68.