



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIOS SOBRE LA PÉRDIDA SINÁPTICA Y LA MUERTE
NEURONAL QUE OCURRE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. PAPEL
DE LA PROTEÍNA β -AMILOIDE, ALTERACIONES DEL CICLO CELULAR Y
APOPTOSIS.**

QUE PARA OBTENEREL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. XAVIER FERNANDO MUNGARRO MENCHACA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ



COMITÉ TUTORAL:

DRA. MA. LOURDES MASSIEU TRIGO

DRA. PATRICIA OSTROSKI SHEJET



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a mi familia, a mis padres el Sr. Evaristo Mercado Cruz y la Sra. Gertrudis Gómez de Mercado, a mis hermanas Laura Angélica Mercado y Aida Bernstein y a mis sobrinos Dan y Laura Fernanda por todo ese cariño y apoyo recibido todo este tiempo, ya que ustedes fueron mi motor para llegar hasta donde estoy, los quiero mucho familia!!!

Agradezco a la Dra. Clorinda Arias Álvarez por haberme recibido en su laboratorio hace 9 años, por el apoyo recibido tanto en lo académico como en los recursos materiales para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Jesús Chimal y Dr. Julio Morán por todas las aportaciones académicas durante los “Tutorales” que tuve en el doctorado.

A mis sinodales, la Dra. Magda Giordano, Dra. Gloria Benítez King, Dra. Lourdes Massieu Trigo y Dr. Raúl Mena por todas sus sugerencias y comentarios que enriquecieron esta tesis doctoral.

A los compañeros del laboratorio tanto del presente: QFB Patricia Ferrera, Ricardo, Karina, Diana, Perla, David, Pamela como del pasado, Brenda, Michael, Rigoberto por aguantarme todos estos años de locura, en especial al “Comandante” Xavier Mungarro y Rosa María Rodríguez por todos esos años de buenos momentos, por las borracheras, los viajes y las aventuras que vivimos.

A mis alumnas Alexa, Susana Gabriela y Paulette por tener la oportunidad de transmitir un poco de mis conocimientos aunque de una manera poco ortodoxa (lo siento por no ser un buen profesor).

A esa grandiosa facultad de donde soy egresado, la triple H. Facultad de Ciencias cuyo lema es “Tierra Libre y Rebelde” por todas esas ideas subversivas y porque tuve la oportunidad de conocer a los que hoy son mi camaradas: Alfredo (alias el Gordo, Marrano, Sexoso), Arturo (alias Mente, Dr. Cerebro), Pavka, Tonatiuh (alias el Dubois), Alejandro (Kalusha), Ángeles, Chucho (Doctor), Roberto (Trompas), Gustavo, Miriam, en fin, a toda la banda borracha de Ciencias donde pasamos buenos momentos.

A mis compas de Biomédicas: a los Rojos: Pablo, Martín, Naum, Brenda, Paola, Vicente, a los Monteros: Víctor, Luis, Javier, a los Espinoza, Ana, Conny, Sandra, a los Chimal, René (alias el Metal), Marcia, Carlos, Rodrigo, Hindira, en fin a toda esa pandilla que conocí durante mi estancia en ese instituto.

A mis comaradas del Instituto de Fisiología Celular, los Drs. Alberto Camacho y Juan Carlos Corona, Ana Estrada, a la Biol. Tere Montiel, Blanca, Luis, Ilse, Alicia por todos esos buenos momentos.

A mi jefa y amigos de la Facultad de Medicina: Dra. Rosalinda Guzmán por darme trabajo, a Vicky, Carmen, Adriana, Carlos, Elena, Enrique, Ximena, Xochil, otra vez el Alfredo, Rebeca, a las Anas, a don Robert y don Humbert, a todos gracias por su apoyo y amistad.

A un amigo de la secundaria, Javier que ya es todo un padre de familia.

Y sobre todo gracias a ese equipo de futbol, los gloriosos campeones Pumas de la Universidad Nacional Autónoma de México por esas alegrías y tristezas. Pumas hasta la Muerte. “El día que yo me muera yo quiero mi cajón, pintado Azul y Oro, como mi corazón”. México PUMAS, Universidad “Gooya Gooya, Cachún Cachún ra ra, Cachún Cachún ra ra, Gooya Universidad Pública y Gratuita”

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	7
II.- LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, CARACTERÍSTICAS Y MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS	8
II.1.- ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO	9
II.2.- PROTEÍNA β ETA AMILOIDE	11
III.- PRINCIPALES FACTORES INVOLUCRADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN	16
III.1.- EL ESTRÉS OXIDANTE Y LA DISFUNCIÓN ENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO	16
III.2.- MODELO EXCITOTÓXICO DE NEURODEGENERACIÓN	20
III.3.- LA HIPÓTESIS DEL AMILOIDE COMO MECANISMO DE NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	21
IV.- EL CICLO CELULAR, COMO ELEMENTO DESENCADENANTE DE LA MUERTE NEURONAL	23
V.- ANTECEDENTES	34
V.1.- PÉRDIDA SINÁPTICA	34
V.2.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL A β EN SINAPTOSOMAS	36
V.3.- CORTEZA ENTORRINAL	38
VI.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
VII.- OBJETIVOS	41
VIII.- HIPÓTESIS	42

IX.- MODELO EXPERIMENTAL: SINAPTOSOMAS	43
X.- DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DESAFERENTACIÓN DE LA VÍA CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO	62
XI.- CONCLUSIONES	78
XII.- REFERENCIAS	81
XIII.- APÈNDICE	94

Clorinda Arias y Xavier Mungarro. 2001. Capitulo: Alteraciones Bioquímicas de la enfermedad de Alzheimer, en: Mensaje Bioquímico Volumen XXV, XXIX Taller de Actualización Bioquímica. Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Morán J, y Arias C. 2002. β -amyloid Peptide Induces Ultrastructural Changes in Synaptosomes and Potentiates Mitochondrial Dysfunction in the Presence of Ryanodine. Journal of Neuroscience Research 68(1): 89-96.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las formas más comunes de demencia que se presenta en la vejez, siendo esta, el resultado de una pérdida significativa de contactos sinápticos y células neuronales, en regiones del cerebro que son importantes en los procesos superiores del cerebro. Aunado a la pérdida sináptica y neuronal se presentan dos características histopatológicas: las placas seniles y la marañas neurofibrilares, las cuales tienen una disposición diferencial a lo largo de la enfermedad como lo muestra el análisis de Braak y Braak, en el cual es claro que la corteza trans-entorrinal es la primera zona alterada. Esto trae como consecuencia la pérdida de la inervación hacia el giro dentado, siendo este, el primer punto de pérdida sináptica masiva que coincide con los síntomas asociados al déficit cognitivo, la memoria espacial y en general a la afectación de la memoria declarativa. Por su parte, los depósitos de β -amiloide principal componente proteico de las placas seniles, se encuentra en las áreas escasamente mielinizadas de la neocorteza basal, desde este punto se extienden a las áreas adyacentes y hacia el hipocampo. Muchas líneas de investigación han demostrado la eficacia neurotóxica la proteína β -amiloide. Este péptido al interactuar con neuronas es capaz de inducir la muerte neuronal. Pero a pesar de esto la etiología de la enfermedad no ha sido esclarecida, por lo que no existe hasta el momento un diagnóstico eficaz ni tratamiento alguno. El propósito de este trabajo es desarrollar modelos experimentales que contribuyan al conocimiento de la toxicidad que produce el fragmento activo de la proteína β -amiloide sobre las terminales nerviosas aisladas, así como, explorar el efecto de la desaferentación del giro dentado en la expresión de marcadores del ciclo celular, después de lesionar la corteza entorrinal en el cerebro de la rata. Los resultados de este trabajo indican que la alteración de la homeostasis de calcio interno en las terminales nerviosas al aplicar rianodina, es una condición que promueve la toxicidad del fragmento activo 25-35 de la proteína β -amiloide. Por otro lado, se ha desarrollado el modelo in vivo de desaferentación del giro dentado que ha arrojado información referente a la activación de moléculas relacionadas con el ciclo celular, cuyo significado funcional no podemos explicar por el carácter explorativo de este modelo experimental.

Abstract

Alzheimer disease, is one of the most common forms of dementia that appears with old age, being the result of a significant loss of synaptic contacts and neuronal cells in regions of the brain that are important in the top processes of the brain. Together with the synaptic and neuronal loss two histopathologic characteristics are present: the senile plaques and the neurofibrillary tangles, which have a distinguishing disposition along the illness like it is showed by the analysis of Braak and Braak. From this analysis it is clear that the entorhinal cortex is the first zone to become irregular, taking the loss of the innervation as a consequence towards the dentate gyrus, being this the first point of massive synaptic loss that coincides with the symptoms associated with the cognitive deficit, the spatial memory, and in general to the affectation of the declarative memory.

For its part, the deposits of β -amiloyd, principal protein component of the senile plaqueses, is in the scanty myelinic areas of the basal neocortex; from this point, they spread to the adjacent areas and towards the hyppocampus. Many lines of investigation have demonstrated the neurotoxic efficacy of the β -amiloyd protein. On having interacted with neurons, this peptide can induce neuronal death. But despite the etiology of the illness, it has not yet been clarified the precise diagnosis neither exists any treatment.

The aim of this work was developed experimental models that contribute to the knowledge of the toxicity that produces the active fragment 25-35 of the protein β -amiloyd on isolated nerver terminals (synaptosomes), as well as to explore the desafereation effect of the dentate gyrus on expression of markers of the cell cycle reactivation, after injuring the entorhinal cortex in the brain of the rat.

The results of this work indicated that the alteration of the internal calcium homeostasis in the rat nerve terminals on having applied ryanodin, is a condition that potentiates the toxicity of the active fragment 25-35 of the β -amiloyd protein.

On the other hand, the in vivo model of desafereation of the detate gyrus has provided information regarding the activation of molecules related to the cellular cycle

Hoja de abreviaturas

A β .- Proteína β -amiloide
ADNm.- Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
ADNn.- Ácido desoxiribonucleico nuclear
AF.- Alzheimer de tipo familiar
Ala.- Alanina
APOE₄.- Apolipoproteína E₄
ARN.- Ácido ribonucleico
ARN_m.- Ácido ribonucleico mensajero
ARNm.- Ácido ribonucleico mensajero
Asp.- Ácido aspártico
cdc2.- Cinasas de división celular 2
cdk_s.- Cinasas dependientes de ciclina
COX.- Citocromo c oxidasa
EA.- Enfermedad de Alzheimer
EGTA.- Ácido etilenediaminotetraacético
FHA.- Filamentos helicoidales apareados
GTP.-Guanosil trifosfato
H₂O₂.- Peróxido de hidrógeno
Ile.-Isoleucina
K⁺.- Ion potasio
kD.- Kilo daltones
KPI.- Inhibidor de proteinasa de tipo Kazal
LDH.-Deshidrogenasa láctica
Leu.- Leucina
LTP.- Potenciación a largo plazo
Lys.- Lisina
MAPK.- Proteína cinasa activada por mitógeno
MT.- Microtúbulos
MTT.- 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio
PCNA.- Antígeno nuclear de proliferación celular
PPA.- Proteína precursora del amiloide
pRb.- Proteína del retinoblastoma
SNC.- Sistema Nervioso Central
tau.- Proteína tau

I.- INTRODUCCIÓN

Las características propias de los grupos celulares que conforman los diferentes órganos, tejidos y sistemas les confieren funciones particulares. La pérdida de la función atribuida a cada uno de los sistemas conocidos depende de un gran número de factores que se pueden relacionar directamente con la pérdida de elementos celulares o subcelulares. La identificación puntual de alteraciones en los organismos ha llevado a caracterizar patologías, sin embargo, en algunas patologías como en la enfermedad de Alzheimer (EA), los síntomas típicos del padecimiento se asocian con alteraciones multifactoriales y multiregionales, lo que ha complicado la comprensión del origen de este padecimiento. A pesar de esto, en términos generales, esta enfermedad resulta de la pérdida sináptica y neuronal, de tal suerte que durante los últimos años se han desarrollado muchos trabajos enfocados a tratar de investigar las condiciones en las cuales se favorecen alteraciones sinápticas que tienen como consecuencia el déficit funcional y el remodelamiento de las conexiones neuronales, así como, la pérdida de elementos celulares interconectados.

Alrededor de esto, algunos investigadores consideran el problema de la muerte celular como el resultado final de un proceso de desarrollo y maduración anatomofuncional, genéticamente programado, mientras que otros estudios se enfocan a los acontecimientos que determinan la muerte selectiva de poblaciones celulares o elementos subcelulares expuestos a condiciones de estrés externo o desajuste en los mecanismos de homeostasis interna.

Cualquiera que sea el mecanismo involucrado, la neurociencia básica y clínica ha determinado que 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.

El trabajo que se presenta a continuación tiene como objetivo el analizar algunas condiciones que pueden ser relevantes para la integridad sináptica en un modelo *in vitro* de terminales nerviosas aisladas expuestas al fragmento activo 25-35 de la proteína β A que es el principal componente de las placas seniles en la EA y por otro lado valorar el efecto de alterar la citoarquitectura de

la corteza entorrinal en la expresión de marcadores del ciclo celular en la neuronas blanco del hipocampo de la rata.

II.- LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD Y MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

La EA es una de las enfermedades neurodegenerativas más devastadoras que afecta a varios millones de pacientes en todo el mundo. Hasta el momento no hay ninguna prueba definitiva para el diagnóstico en vida del paciente ni tampoco existe un tratamiento efectivo. Se calcula que hacia el año 2025, el número de personas con Alzheimer será de 22 millones.

A principios del siglo XX el médico alemán Alois Alzheimer, describió la EA (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, tinción con rojo congo y tioflavina, reveló densos depósitos, hoy llamados placas neuríticas o placas seniles, afuera y alrededor de las neuronas. A la vez dentro las neuronas se encontraron fibras entrelazadas de proteína, hoy conocidas como marañas neurofibrilares. Estos hallazgos son muy importantes puesto que en la actualidad el diagnóstico definitivo de la EA es solo posible cuando la autopsia revela estas dos alteraciones celulares.

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 Alzheimer. 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 (para revisión ver: Arias, 1999; Selkoe 2002).

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 sicótico. 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 a 12 años a partir de que se inicia la enfermedad (para revisión ver: Arias, 1999).

De alguna manera la investigación básica para tratar de entender la EA se ha enfocado en la búsqueda de la posible etiología de las características histopatológicas, que se han considerado por algunos autores como la consecuencia y no la causa de la degeneración. A continuación se menciona algunas de las particularidades de las marcas histopatológicas de la EA.

II.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 aparecen 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 axonales, 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 un 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 anormalidades y manifestaciones metabólicas generales que pueden afectar el comportamiento neuronal y por ende, ser la causa de la muerte neuronal en la EA (Davies., 1994).

Cabe mencionar que la distribución de las marañas neurofibrilares en la EA tiene un orden espacio temporal diferencial, apareciendo en primer lugar en la corteza trans-entorrinal extendiéndose posteriormente a áreas meencefálicas y corticales. De hecho la presencia de FHA en la corteza trans-entorrinal coincide con la primera etapa de la sintomatología clínica descrita anteriormente referente a la deficiencia cognitiva.

Algunos investigadores han tratado de comprender el mecanismo de fosforilación de la proteína tau, de lo cual se ha encontrado que algunas cinasas como Cdk5 y GSK3 pueden ser, al menos *in vitro*, responsables de la fosforilación de tau. Por otro lado, la presencia de la ciclina D que al estar involucrada e la división celular, ha hecho pensar que algunos defectos en el control del ciclo celular (arresto celular) pudieren ser la causa de la fosforilación anormal de tau.

II.2.- PROTEÍNA BETA 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 ($A\beta$) forman parte de 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.

Las placas seniles están formadas por grupos de neuritas distróficas y procesos celulares gliales que rodean un núcleo de proteína $A\beta$ 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. Algunos estudios han demostrado que el amiloide vascular en la EA contiene un péptido de alrededor de 4 kD (Glennner y Wong, 1984). La secuencia peptídica de éste, ha sido aislada del centro de las placas neuríticas y se le conoce como péptido A4 o $A\beta$ (Masters et al., 1985). El péptido de $A\beta$ 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). Además el análisis bioquímico de los depósitos amiloides revela que el $A\beta$ presenta una estructura secundaria antiparalela de tipo β -planar lo que le da un carácter hidrofóbico (Glennner y Wong, 1984).

El $A\beta$ 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, éstas están libres de cualquier proceso neurítico y son considerados como péptidos monoméricos del A β (Arias, 1999). No es claro, si los depósitos inmaduros de A β 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 A β (Burdick et al., 1992). Aparentemente las placas seniles en la EA están formadas por agregados que derivan de varias fuentes de lo cual se ha sugerido que el péptido 1-41 y el 1-42 presentan una mayor tendencia a agregarse que el péptido 1-40 (Robakis, 1987).

Como ya se ha mencionado, el A β 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; Robakis et al., 1987; Tanzi et al., 1988). Estas isoformas derivan un gen en el cromosoma 21 (Robakis et al., 1987). La PPA es una glicoproteína integral de la membrana que contiene un largo dominio extracitoplasmático, una región transmembranal y una corta secuencia citoplasmática (Robakis et al., 1987). Además 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: glicosilación (Refolo et al., 1989), fosforilación (Oltersdorf et al., 1990), sulfatación (Weidemann et al., 1989) y proteólisis (Refolo et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Las funciones reportadas para la PPA la destacan la siguientes: promotor de la adhesión

celular (Schuber et al., 1989), es un Inhibidores del factor de coagulación XIa (Smith et al., 1990), funciona como agente promotor del crecimiento en cultivos celulares (Saitoh et al., 1989), participa en los sistemas de transducción de señales (Nishimoto et al., 1993), además, puede tener un papel neuroprotector contra el daño en la hipoglucemia regulando los niveles de calcio (Mann et al., 1990) y se ha detectado su papel en el tráfico de vesículas intracelulares (Refolo et al., 1991).

La evidencia 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 codón 770 de la PPA causan un incremento significativo en los niveles de los péptidos A β secretados (Citron et al., 1996).

La mayoría de las proteínas secretadas a partir de la PPA se producen después de que éstas se procesan por un grupo de enzimas llamadas “secretasas” entre los aminoácidos Lys 16 y Leu 17 de la secuencia del A β , previniendo de esta forma la producción del A β (Esch et al., 1990), por lo que la modulación en la actividad de estas secretasas deben jugar un papel importante en la amiloidosis 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 por activación de receptores 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 (Sambamurti et al., 1992). Con respecto a la remoción de la PPA 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 este proceso de degradación puede ser el responsable de la producción de el A β (Haass et al., 1992) .Sin embargo, no resulta claro hasta el momento que el A β se genere justamente en la membrana plasmática pues el A β cuyo extremo C-terminal

se localiza dentro de una secuencia transmembranal de PPA debería de ser inaccesible para la proteólisis.

Una pregunta importante es: ¿Si el A β es incorporado en fibras amiloideas derivadas de la secreción normal del péptido A β 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 A β para entonces probar sus efectos en la formación y mantenimiento de los depósitos amiloideos.

Con respecto de la anterior podemos mencionar que ninguno de los péptidos de las placas seniles inicia en la posición del A β 6, 3 u 11 como lo que se ha detectado en el amiloide vascular (Miller et al., 1993). La diferencia en la composición entre el A β que no se encuentra en las placas seniles y los fragmentos más pequeños de A β 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). La alta heterogeneidad encontrada tanto en los péptidos solubles normalmente secretados como en los depósitos de las fibras amiloideas 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 amiloideos 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 A β . Por otro lado, no es concebible pensar que todos los péptidos encontrados en depósitos amiloideos deriven de un procesamiento común del PPA a través de una vía de proteólisis específica.

De tal manera que la explicación acerca del origen de los depósitos amiloideo no es claro aún ya que los péptidos del A β que se secretan normalmente, no se agreguen en cultivos celulares para formar fibras amiloideas. El péptido 1-40, que se produce como resultado del metabolismo celular normal y el amiloide vascular son claramente capaces de formar fibras amiloideas estables, pero el rango de agregación de estos péptidos para formar estructuras β -plegadas es un proceso muy lento en ausencia de agentes que favorezcan la nucleación del depósito (Jarret et al., 1992) y resulta

que la presencia de residuos Ile 41 y Ala 42 de la secuencia de A β incrementa el rango de agregación de los péptidos amiloideos. Esta observación 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 A β , 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 amiloideos para formar fibrillas.

Se han observado depósitos de A β en numerosos individuos envejecidos sin signos aparentes de demencia, indicando que los depósitos amiloideos solos, no son causa suficiente para el desarrollo de la demencia.

En apoyo a lo anterior se tienen hallazgos recientes de que un alto porcentaje de pacientes que padecieron de Alzheimer de tipo familiar 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, y codifican para las llamadas presenilina 1 y presenilina 2, respectivamente (Arias 1999).

Tanto en la EA como en modelos experimentales que pretenden recrear las condiciones que se presentan en éste padecimiento, el deterioro sináptico se acompaña frecuentemente de pérdida de proteínas sinápticas como sinaptofisina (Hsia et al., 1999; Mucke et al., 2000; Masliah et al., 2001), actina (Rossiter et al, 2000) y la proteína de unión a actina, debrina (Zhao et al., 2006). Aunque el papel del A β en estos cambios se ha reconocido en las últimas décadas (para revisión ver Walsh y Selkoe, 2004), hasta ahora no se conoce claramente la unión a nivel de mecanismos moleculares entre la degradación de proteínas intrasinápticas y la toxicidad del A β , lo cual es uno de los objetivos del presente trabajo.

III.- PRINCIPALES 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). Mientras que para la primera se conocen mutaciones, la segunda implica factores comúnmente asociados a otros padecimientos o enfermedades neurodegenerativas.

III.1.- EL ESTRÉS OXIDANTE Y LA DISFUNCIÓN ENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas como lo demuestran infinidad de estudios en los cuales se puede detectar claramente la asociación entre la edad y la frecuencia de

padecimientos debidos a anomalías en el sistema nervioso. Parece ser claro que a medida que los organismos cumplen con las funciones que sustentan al metabolismo, se generan especies reactivas pro-oxidantes que de alguna forma interactúan con los elementos celulares. Estos elementos celulares oxidados de forma sutil se van acumulando de tal manera que las células envejecidas presentan una proporción importante de elementos oxidados o dicho de otra forma , una célula oxidada, es una célula vieja, la cual es un candidato a no poder sustentar las funciones celulares.

La formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno son 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. Los principales factores que favorecen el estrés oxidativo en el cerebro incluyen: 1) el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados, 2) la alta tasa de consumo de oxígeno, 3) la vida media corta del ADNmt y 4) la relativa baja concentración de defensas antioxidantes. 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 ($\cdot\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). 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)

A su vez las alteraciones de la función mitocondrial aunadas a un incremento significativo del estrés oxidativo son hallazgos comunes en este grupo de padecimientos (Papolla et al., 1992). En la EA se han encontrado patrones de expresión reducida de genes tanto del ADN mitocondrial (ADNmt) como del ADN nuclear. Energéticamente un aspecto patológico temprano y prominente en la EA es la presencia de un metabolismo energético alterado que incluye una disminución del consumo de oxígeno y glucosa. Este déficit es particularmente notable en aquellas regiones cerebrales con alta densidad de acumulaciones extracelulares de A β , lo que podría aumentar la toxicidad de esta proteína. Del análisis de mitocondrias aisladas en cerebros de 9 pacientes con EA se describieron disminuciones de un 40% en la actividad del complejo I y un 53% en la actividad de la citocromo c oxidasa (Cox) (Maurer I., 2000) Una pregunta interesante con respecto a la etiología de la EA es, ¿sí algunas alteraciones del metabolismo energético pueden predisponer a la muerte neuronal asociada a la presencia de una de las proteínas cuyos depósitos extracelulares son abundantes en este padecimiento?

En relación a lo anterior, se sabe que en otros padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, se ha observado reducción en la actividad del complejo 1 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 citotóxicos.

Pero no solo la presencia de especies pro-oxidantes y la disfunción mitocondrial están involucradas en la muerte neuronal, debemos tomar en cuenta que 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). Además se ha encontrado

relación entre un evento isquémico y el inicio de cambios citotóxicos que se observen en la EA (Rosen WG et al 1979)

A lo largo del trabajo experimental que sustenta ésta tesis, se ha podido observar claramente que al disminuir 10 veces la concentración de glucosa del (de 5mM a 0.5mM), existe un efecto notable en la disminución en la actividad mitocondrial de sinaptosomas. De manera muy interesante, este efecto inhibitor se potenció en presencia del fragmento 25-35 del A β . 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 A β manifieste sus efectos tóxicos. Aunque en los experimentos diseñados no podemos hablar del probable mecanismo de toxicidad del A β , existen múltiples reportes que muestran que el A β 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 compuesto MTT. Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones de compromiso energético, la entrada de Ca²⁺ se incrementa al disminuir la energía y bajar la capacidad para mantener los gradientes iónicos. Mattson et al., (1992). Mas aun, se ha demostraron en neuronas de humano que el péptido 25-35 del A β incrementa la toxicidad de los aminoácidos excitadores porque es capaz de alterar la homeostasis del Ca²⁺. Los posibles mecanismos por los que el A β induce

desestabilización de la homeostasis de Ca^{2+} se desconocen, pero existe la posibilidad de que altere 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.

III.2.- MODELO EXCITOTÓXICO DE NEURODEGENERACIÓN

Otro mecanismo involucrado en el daño neuronal, es el daño cerebral excitotóxico característico por su 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 mientras que en la forma crónica existe pérdida de interneuronas con preservación de elementos presinápticos y de axones de paso (Arias, 1998). De alguna forma el daño excitotóxico se ha relacionado con el calcio y la presencia de radicales libres. Por su parte el calcio, el cual es un segundo mensajero mediador de cambios adaptativos en la neuroarquitectura en respuesta a las señales del ambiente (Aruffo et al., 1987; Ascher et al., 1988, Kater et al., 1988). y que además regula el crecimiento del cono neuronal entre otras funciones (Blake et al., 1988), puede también tener un rol preponderante en los fenómenos neurodegenerativos.

Recordemos que dentro de un rango óptimo, la concentración de calcio intracelular regula la neuroarquitectura, 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 EA, 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), y

puede generar radicales libres incrementando 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 (Braugher, 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 al 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 pozos intracelulares.

III.3.- LA HIPÓTESIS DEL AMILIOIDE COMO MECANISMO DE NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Varios estudios indican que la proteína A β puede iniciar una serie de eventos bioquímicos que derivarían en 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) como se relata a continuación:

1) La exposición de cultivos de neuronas cerebrocorticales de humanos o de hipocampo de rata al A β resulta en una progresiva elevación de la concentración de Ca^{2+} . El curso temporal y la magnitud depende del grado de agregación del A β en el tiempo que se expone a las neuronas. Esto es, el Ca^{2+} se acumula más rápidamente en neuronas expuestas al A β pre-agregado que en neuronas expuestas a A β no agregado (Selkoe, 1989).

2) El A β 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 excitotoxicidad. Además, la desestabilización del Ca^{2+} producida por el A β no

se limita solo a las neuronas. Se demostró que el fragmento 25-35 del A β causa una gran conductancia del calcio en ovocitos que expresan receptores para glutamato (NMDAR1 o GluR1) y el receptor para sustancia P (Kimura et al 1993).

3) Se ha observado que durante el proceso de agregación en soluciones acuosas de fragmentos de A β induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno en neuronas.

De esta manera la llamada “hipótesis del amiloide” propone que la acumulación gradual de oligómeros solubles del A β inician una cascada de eventos que lenta, pero inexorablemente produce efectos adversos a la función sináptica lo que causa un daño sináptico asociado con el fallo cognitivo de la EA (Hardy y Higgins, 1992; Haass y Selkoe, 2007).

IV.- EL CICLO CELULAR, COMO ELEMENTO DESENCADENANTE DE LA MUERTE NEURONAL

Los grupos neuronales implicados en lo que se ha nombrado como funciones superiores del cerebro presentan una gran cantidad de moléculas y mecanismos asociados a los procesos plásticos, de tal suerte que se ha

llegado entender a estos grupos celulares como zonas que realizan sus funciones en gran medida gracias a su alta plasticidad. De lo cual se puede desprender que un grado lábil de conectividad coloca a algunos grupos neuronales como células que pueden presentar elementos que se sabe son determinantes en el proceso normal de división celular y diferenciación. En estas neuronas podemos encontrar: las cinasas dependientes de ciclinas (cdks), las ciclinas, las rutas de transducción de señales y los factores de transcripción que regulan la proliferación, diferenciación, sinaptogenesis y apoptosis (Nagy et al., 1998; Nagy, 2005) De forma interesante la desregulación de los mecanismos antes mencionados sucede en varios desordenes neurológicos como Alzheimer (Herrup et al., 2002) Síndrome de Down, Enfermedad de Pick (Nagy et al., 1996), Parkinson (Stefanis., 1997), Esclerosis Lateral Amiotrófica, Enfermedad Cerebro vascular e incluso en alguno modelo de lobectomía para controlar la epilepsia del lóbulo temporal (Nagy y Esiri., 1997). De todos los estudios se podría inferir de forma general que la reentrada al ciclo celular puede ser resultado de la desaferentación que se refleja en el comportamiento típicamente asociado a cada neuropatología.

IV.1.- LAS ETAPAS DEL CICLO CELULAR Y SU RELACIÓN CON LA APOPTOSIS

Durante los eventos tempranos en la activación del ciclo celular se inducen la transición de la fase G1 a S, la cual es regulada por la activación de la proteína del retinoblastoma (pRb) y los genes reguladores de la transcripción de la familia E2F. La hiperfosforilación de la pRb induce la activación de proteínas E2F en la transición de G1 a S (Ross., 1996). Por otra parte es claro que las moléculas como Cdk2, Cdk4 y Cdk6 participan en las vías de muerte apoptótica por la desrepresión transcripcional dependiente de pRb para E2F-1/Rb en el punto de chequeo G1/S (Julien., 2002). La expresión de estas moléculas asociadas al ciclo celular en el cerebro de sujetos con Alzheimer es una clave importante para explicar la pérdida neuronal por apoptosis. Ya que en la EA se ha detectado el incremento en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Esto es importante puesto que la represión activa de los factores de transcripción E2F por miembros de la familia del pRb se requiere

para la sobrevivencia de las neuronas. (Liu y Greene., 2001), Además se ha detectado un aumento en la distribución subcelular de factores de transcripción del tipo E2F-1, sugiriendo que la activación y redistribución de factores transcripcionales están asociados a los marcadores del ciclo celular en la EA como lo es la ciclina D, además de que estas proteínas induce en algunos casos la muerte celular acompañada con marcas de apoptosis (Boussier., 1994).

Un modelo claramente demostrado que ejemplifica e incluye a los elementos antes mencionado, es el modelo in vitro de apoptosis neuronal mediado por elementos del ciclo, en el cual la muerte se desencadena por la privación de un factor neurotrófico, los niveles de RNAm de la ciclina D1, pero no de otras proteínas asociadas clásicamente con el ciclo celular se incrementan cuando se privan del factor de crecimiento neuronal (NGF) a cultivos ganglionares cervicales (Davis., 1997). La participación directa del ciclina D en la muerte de tipo apoptótico está por ser comprobado. Lo que si se sabe es que la participación de la ciclina D que se expresa en la parte media de la fase G1 en combinación con cdk4 y cdk6 fosforila e inactiva a la proteína pRb promoviendo la progresión de la fase G1 a la fase S pudiendo morir como resultado de la derrepresión de E2F (Nguyen, 2002). La activación del complejo CDK4/6 parece ser esencial para la ejecución de la muerte celular programada, al menos en cultivos neuronales privados de señales neurotróficas (Copani., 2001). Ya que al colocar un inhibidor específico del complejo CDK4/6 se previene la muerte neuronal. (Agah et al., 1997, DeGregori et al., 1997 y Liu y Greene 2001). De forma interesante se logró determinar que la proteína típicamente asociada a las placas seniles la proteína A β induce la muerte celular por apoptosis mediada por la activación de los elementos transcripcionales de la familia E2F que a su vez activan la vía de apoptosis mediada por Bax-caspasa 3 (Robertson., 1000). Se han presentado evidencias farmacológicas y moleculares que las cinasas dependientes de ciclinas, en particular la cdk4/6 es requerida para la muerte inducida por A β . Además se ha demostrado que el sustrato de la cdk4/6, pRb/p107, es fosforilado durante el tratamiento con A β y que la derrepresión de pRb/p107 hacia el complejo E2FDP, es requerido para la muerte que involucra a el A β (Giovanni., 1999).

No solo estos factores transcripcionales han llamado la atención. También los factores NF-Kappa B podrían modular las respuestas apoptóticas por su relación con p53 y la activación de la caspasa 3. Esos factores han sido muy estudiados debido a que el uso terapéutico de antiinflamatorios no esteroideos como el flurbiprofen para el tratamiento de cáncer demuestran tener efectos inhibidores del crecimiento celular sin inducción de apoptosis (Fratelli et al., 2003). El uso antiinflamatorio y antiproliferativo se ha estudiado en células de la línea L929 y ha confirmado que la acción de inhibición del crecimiento no se debe a la inducción de apoptosis sino más bien por el efecto en retardar el tiempo de duración de las etapas del ciclo celular. Los inhibidores de NF-KappaB (Fratelli et al., 2003) como el flurbiprofen ha llamado mucho la atención por las posibilidades de uso terapéutico.

IV.1.1.- DIASIOLOGANGLIOSIDO GD3 Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Otro mecanismo involucrado en la transducción de señales asociado a la presencia de la proteína A β y el ciclo celular se ha demostrado en las neuronas corticales tratadas con concentraciones tóxicas de A β . Estas neuronas alcanzaron la fase S del ciclo celular antes de morir por apoptosis (Copani., 2002). Buscando en las señales moleculares que sitúan a las células en el borde de la proliferación y la muerte neuronal ha llamado la atención el estudio del disialogangliosido GD3 ya que se ha confirmado su participación en la división celular (Percy et al., 1991). La exposición al A β resulta en un aumento importante en los niveles intracelulares de GD3 al mismo tiempo que preside la reentrada de las células a la fase S. Del estudio por microscopía confocal se ha demostrado la síntesis de GD3 en respuesta al A β colocaliza con la cromatina. Mas aún el incremento de GD3 se ve asociado con la disminución en la esfingomielina (fuente principal de las ceramidas precursora de gangliósidos) y con la inducción de la alfa-2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) la enzima que forma GD3 a partir de el monosialilgangliósido (GM3). La relación causal entre GD3, la activación del ciclo celular y la apoptosis se demostró con el tratamiento de los cultivos con oligonucleótidos antisentido dirigidos para la sintasa de GD3. Este tratamiento reduce la formación de GD3

en presencia de A β , abole la reentrada al ciclo celular y la muerte celular por apoptosis (Copan et al., 2002).

IV.1.2.- LA P53 Y LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La p53 es una proteína determinante para inducir la muerte por activadores del ciclo celular y apoptosis, pues se sabe que en las células proliferativas que presentan daños en el ADN, se inducen o activan factores específicos de sobrevivencia que promueven el arresto al ciclo celular o la reparación del ADN (Copan et al., 2001), pero si el daño es de tal magnitud que no pueda ser reparado entonces los mismos factores disparan la muerte por apoptosis. Esta acción requiere de la participación p53 y algunos conjugados como p63 y p73. La ruptura del ADN señala a p53 por la fosforilación de su dominio transactivador, un proceso que permite el incremento en la estabilidad y actividad transcripcional de p53 (Oren., 1999). La p53 puede mediar el arresto del ciclo celular, promover la reparación del ADN (Evan y Littlewood., 1998) o determinar la expresión de ciclinas típicamente asociadas al ciclo celular como la ciclina G (Smith et al., 1997) y la ciclina D (Del Sal et al., 1996). De manera interesante p53 también induce un aumento en la expresión de Bax, IGFBP-3 y otros factores proapoptóticos (Evan y Littlewood., 1998). Esta serie de datos indica que existe una relación íntima entre el daño y reparación del ADN con la activación del ciclo celular y la muerte celular. La síntesis anormal del ADN en las células que activan P53 es una fuente de errores replicativos que son eficientemente corregidos por algunas formas intrínsecas de la polimerasa, pero en el caso de las neuronas diferenciadas los errores producto de la incorrecta progresión en el ciclo celular pueden ser muy abundantes. Teniendo una repercusión de consecuencias relacionadas con la muerte celular (Copani., 2001; Copani et al., 2008).

IV.1.3.- LA FAMILIA BCL-2 Y SU RELACIÓN CON LAS MARCAS HISTOPATOLÓGICAS EN LA EA

Ya que se sabe que las moléculas efectoras de la apoptosis se encuentran constitutivamente presentes en las células. La participación de los

miembros de la subfamilia Bcl-2 tiene importancia para tratar de entender los mecanismos de muerte celular involucrados en la EA (Passer., 1999 y Stefanis et al., 1997). Al evaluado el rol de elementos apoptóticos de la familia bcl-2 en la EA se ha demostrando que existe un incremento significativo en los niveles de BCL2 en glía y neuronas cercanas a las placas seniles (Satou et al., 1995 y Nagy., 1998). Además Bax aparece como un marcador temprano de la hiperfosforilación de neurofilamentos que sugiera que Bax también participa en la patofisiología del citoesqueleto asociada a la EA (Su et al., 1997). Sin embargo tanto la caracterización de las marcas histopatológicas como la evidencia de la muerte apoptótica en la EA no esclarecen la patofisiología asociada a este mal.

Aun así, algunos estudios pretenden asociar la aparición de moléculas proapoptóticas con las alteraciones del citoesqueleto, examinando la expresión de Bax y su relación con las marañas neurofibrilares en la patología de EA se ha determinado que la expresión de Bax esta restringida a áreas que no están afectadas por la patología neurofibrilar como CA2, CA3, CA4 y el giro dentado mientras que en la región CA1 que presenta marañas neurofibrilares la expresión de Bax es escasa. El experimento de doble marcaje indica que la expresión de un anticuerpo que reconoce un epitopo fosforilado de la proteína tau y Bax son mutuamente excluyentes (Nagy., 1998) no solo en las neuronas sino también en los procesos neuríticos o en las placas seniles. Mostrando por una parte que la muerte por apoptosis es responsable de la perdida celular en la EA y por otra: es claro que existen dos poblaciones neuronales identificables en los sujetos con EA; los que mueren por apoptosis y los que exhiben características neurofibrilares que pudieran ser la consecuencia de la progresión en el las etapas del ciclo celular.

IV.2.- ALTERACIONES DEL CICLO CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las zonas de degeneración primaria el cerebro adulto con enfermedad de Alzheimer mantienen un alto grado de plasticidad estructural y están asociadas con la activación de señales mitogénicas, la activación del ciclo celular e incluso la generación de nuevas neuronas (Arent., 1998y Engert 1999).

Estas áreas afectadas que determinan en gran medida las funciones superiores del cerebro han llegado a aumentar su volumen y especialización funcional en el proceso evolutivo de encefalización (Arent., 2001). Los procesos que se llevan a cabo en estas áreas requieren una adaptación y readaptación de la conectividad neuronal a largo plazo, al incrementada los procesos de estabilización dinámica y desestabilización han llegado a ser mas importante para mantener las funciones superiores, (Trojan y Pokorny., 1999) pero puede también proveer la base para el incremento en el riesgo de presentar errores relevantes para el funcionamiento neuronal, de tal magnitud que pudieran manifestarse en forma de un padecimiento neurodegenerativo como la EA (Arent., 2001). Esta hipótesis pone de manifiesto que un grado “lábil de diferenciación” de un grupo de neuronas en el cerebro adulto que les permite sufrir procesos morforegulatorios, pero al mismo tiempo posiciona a estas neuronas, como células vulnerables. Al respecto algunos autores han mencionado la idea referente a que el interferir con el control de la diferenciación neuronal, puede ser una estrategia para prevenir enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Arent., 2002)

La aparición de marcadores del ciclo celular en el cerebro pacientes con enfermedad de Alzheimer ha sido confirmada por diferentes estudios. En algunos estudios como el de Herrup (Herrup K y Arendt T. 2002) se confirma la expresión de ciclina D, Ciclina B1, la cinasa dependiente de ciclina cdk4 y el Antígeno Nuclear de la Proliferación Celular (PCNA) en diferentes regiones como: el hipocampo, el subiculum, el locus coeruleus y el Núcleo Dorsal del Rafe. La inmunoreactividad no solo se ha detectado en los individuos con Alzheimer pues al analizar sujetos denominados como sujetos control, los cuales no presentaron síntomas de demencia, también existe inmunoreactividad positiva, siendo marcadamente mayor en los sujetos dementes (Charles et al 1997 y Nagy y Yesiri.,1998)

La investigadora Zsuzsanna Nagy en sus estudios referentes a las alteraciones de ciclo celular en individuos con EA muestran que proteínas nucleares relacionadas con el ciclo celular pero no específicas de ninguna etapa como: P105 y la Ki 67 están asociadas con la patología del citoesqueleto en la EA (Nagy., 1997). Para probar esta hipótesis se estudio la expresión de las proteínas relacionadas con el ciclo celular Ki-67, PCNA y p53 en el

hipocampo de 33 sujetos, incluyendo algunos pacientes con EA, encontrando que de las moléculas analizadas solo el Ki-67 presentó expresión nuclear en todas las subregiones del hipocampo, destacando la mayor reactividad a nivel del giro dentado. Cabe destacar que la expresión de ki-67 en CA2, CA3 y CA4 aumentan conforme progresa el padecimiento y en estas regiones no se presentan patologías asociadas al desarreglo de los elementos del citoesqueleto, sugiriendo que estas proteínas además de su función reguladora en el ciclo célula, pueden tener funciones más especializadas en el sistema nervioso del adulto, mientras que la inmunoreactividad para la Ki-67 en CA1 y el subiculum donde sí se presenta patología asociada al citoesqueleto decrece conforme avanza el padecimiento. Además con respecto a estos resultados se indica que tanto las neuronas como los elementos gliales expresan la proteína Ki-67. La presencia de ki-67 nuclear indica que algunas de las células de la hipocámpal no se encuentran en la fase G0 del ciclo celular y que las células han reentrado al ciclo celular y la ausencia de PCNA y p53 sugieren que el ciclo pudiera estar arrestado en G1 (Nagy., 1998).

Otro estudio del mismo autor pero con mayor especificidad, refiere a la expresión de las ciclinas A, B1, D1 y E en el núcleo neuronal en el hipocampo de individuos normales y personas con EA. De manera particular se observó que la expresión de la ciclina B1 y ciclina E fue detectada en neuronas de hipocampo de todos los sujetos. La ciclina E se expresa en controles y EA teniendo diferencias en el nivel de expresión en las regiones afectadas en las etapas avanzadas de la patología CA2, CA4 y giro dentado (Nagy., 1997). Por su parte la expresión de la ciclina B solo fue detectada en los pacientes con EA y su expresión fue más pronunciada en el giro dentado, aunque también se encontró en subiculum y CA1, regiones del hipocampo que muestran un incremento a través de la enfermedad. Finalmente Nagy muestra por medio del doble marcaje con AT8 (anticuerpo que reconoce un fosfoepitopo de tau) y la ciclina B que las neuronas piramidales que expresan ciclina B no tienen totalmente desarrolladas las marañas neurofibrilares mientras que las neuronas con marañas no muestran reactividad para la ciclina B y por otro lado apoya las aseveraciones antes mencionada respecto a la forma en la cual los grupos neuronales se ven afectados de forma diferente (Goedert., 1993). Otro estudio complementarios a la idea antes postulada derivado del análisis en

otras áreas que se ve afectada en la EA como el Núcleo Dorsal del Rafe y el Locus ceruleus en las cuales se da una pérdida neuronal importante en la EA no existe marca de desorden neurofibrilar pero si la aparición de marcadores del ciclo que pudieran estar mas bien asociados a la muerte celular apoptótica (Copani et al., 2002).

La evidencia antes mencionada plantea la hipótesis en la cual se establece que las poblaciones celulares en el cerebro de la gente sana reentran al ciclo celular permitiendo la muerte celular por la edad sin que esta expresión tenga repercusiones conductuales al eliminar elementos que pudieran predisponer a presentar alteraciones para el área afectada y en general para el organismo. Pero en condiciones patológicas el arresto del ciclo celular puede generar el cuadro demencial relacionado con la EA. Es decir, así como algunas poblaciones de neuronas mueren, otras, expresan marcadores del ciclo celular que no mueren en un balance proapoptótico sino que cursan las etapas inconclusas del ciclo celular que pueden repercutir en el mal funcionamiento celular como lo indica la fosforilación de elementos determinantes en el mantenimiento de la adecuada vida celular.

Este fenómeno de reactivación del ciclo celular afecta áreas que se conoce que muestran pérdida sináptica relacionada con la edad debida al remodelamiento de la corteza entorrinal. (Senut, 1991). Parece que en los sujetos controles (no demenciados) el ciclo celular no progresa mas alla de la fase G1 ya que no existe expresión de ciclina A (factor determinante en la transición G1-S) en ninguno de los controles y se cree que las células en la fase G1 del ciclo son capaces de rediferenciarse sin la necesidad de tomar un camino apoptótico iniciado por el arresto en la fase G1. Por otra parte el futuro de las células que expresan ciclina B es diferente. Puesto que en estas células que han alcanzado la fase G2 del ciclo celular sin evidencia de replicación de DNA (no se detecta ciclina A ni PCNA) se abre la posibilidad de que exista una desregulación de los mecanismos que controlan la transición de G2 a S que resultaría en la generación de una bifase S y hace la rediferenciación imposible. En este contexto, la progresión hacia la mitosis es probablemente inhibida por la carencia en la replicación del DNA, que actúa como un regulador en la

transición de la fase G2 a S y el arresto en este punto tardío de la transición de una fase a otra resulta en la entrada hacia un camino apoptótico. Se cree que esto sucede en las células que expresan Bax pues esta hace posible la apoptosis. Sin embargo las células que no expresan Bax pero si expresan ciclina B (como en CA1) están envueltas en un tipo de neuropatología como la EA. Esto indica que las células que están arrestadas en la fase G2 probablemente no entran a la apoptosis en un periodo indefinido de tiempo surgiendo la siguiente posibilidad como consecuencia: Que en la fase G2 los microtúbulos se desestabilizan como resultado de la acción de la ciclina B y que la cinasas envueltas el la fosforilación de tau estén activadas.(Nagy., 1998) Como lo ha demostrado Vincent et al en 1997 al reporta la evidencia inmunológica de la asociación entre la hiperfosforilación de tau y la presencia de cdc2/ciclina B1 pudiendo ser este complejo el responsable al menos en una parte de la patología neurofibrilar.

Un estudio reciente ha determinado que existe un patrón de expresión de moléculas relacionadas con la progresión en las diferentes etapas del ciclo celular en sujetos ligeramente demenciados con un comportamiento similar al que desarrollan los individuos que padecen de EA denominados como: MILD (Yang et al., 2003). Este análisis toma en cuenta la presencia de tres proteínas relacionadas con el ciclo celular: (PCNA), ciclina D y ciclina B en preparaciones del hipocampo el Núcleo Basalis de Meynert y la corteza entorrinal. Los resultados de individuos ligeramente demenciados indican que estos presentan una mayor inmunoreactividad que los individuos con EA, tanto en hipocampo como en núcleo Basalis. Además al analizar la corteza entorrinal el porcentaje de expresión es mayor para estos marcadores para los ligeramente demenciados que para los que padecían la EA. Esta idea sugiere de forma general que el desequilibrio celular en un modelo que intenta representar el inicio del padecimiento parece ser mayor con respecto la maquinaria de control del ciclo celular que en los estados finales en los cuales las células no contienen elementos funcionales que puedan ser responsables de seguir generando alteraciones patológicas. Planteando un escenario en el cual la maquinaria asociada la división celular tendría un papel muy importante en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas.

Los escenarios descritos hasta este punto muestran que la activación de la maquinaria del ciclo celular participan en la patología asociada a la EA y la relación entre la inflamación que representar a la enfermedad puede marcar el camino hacia el intento de aplicar una terapia. Muchos estudios muestran que los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) pueden modular la progresión en el ciclo celular, especialmente de G0/G1. El blanco principal de NSAIDs es la enzima ciclo-oxigenase (COX), que se presenta en dos isoformas COX-1 y COX-2. En EA y sujetos no demenciados, COX-2 se expresa en células nerviosa. Del estudio por inmunocitoquímica para COX-2, ciclina D y ciclina E se detectó inmunoreactividad positiva para EA en estados tempranos así como en sujetos controles en la corteza temporal, así como la colocalización de los tres marcadores. Además se observa una correlación inversa entre el la clasificación de Braak y Braak para la proteína A β y la expresión de los marcadores (Hoozemans et al., 2002)

La hipótesis también contempla una explicación de las observaciones hechas en pacientes con EA como una enfermedad inflamatoria. Debido a que los pacientes que utilizaron tratamientos antiinflamatorios para controlar la artritis tienen un menor riesgo de desarrollar EA. (Breitner., 1996). Un estudio reciente encuentra que la aspirina y la indometacina, dos antiinflamatorios no esteroideos utilizados en la artritis como factores que arresta la progresión del ciclo celular (Shiff et al., 1996). Aunque la realidad de los esfuerzos para proponer estrategias de prevención requiere de mucha más información no solo referente a la patología, sino en general de los procesos que hacen posible la vida.

V.- ANTECEDENTES

V.1.- PÉRDIDA SINÁPTICA

Además de la existencia de placas seniles y marañas neurofibrilares la disminución en la densidad sináptica y neuronal que sucede en el hipocampo y la neocorteza en algunos individuos durante el envejecimiento parece ser responsable y correlaciona con la deficiencia cognoscitiva que tipifica a la primera etapa de la EA (Carter y Lippa, 2001; Masliah y cols., 1991). La disminución en la densidad sináptica se refleja con la pérdida de la mayoría de los componentes de las vesículas sinápticas y la mayoría de los péptidos almacenados en vesículas (Arendt, 2001). Esta pérdida sináptica puede llegar a ser de hasta un 75% en el hipocampo, y parece ser un evento previo a la muerte neuronal (Terry et al., 1991). De hecho la pérdida de la proteína sinaptofisina, la cual está asociada a las terminales sinápticas, es un evento temprano en la EA (Shimohama et al., 1997). Estas alteraciones en los sitios de comunicación neuronal no son exclusivos de la EA, en la mayoría de las neuropatologías la pérdida sináptica parecería ser una condición previa a la degeneración celular, mas aún, durante el envejecimiento el número promedio de sinapsis en el cerebro de humanos se encuentra disminuido con respecto al número de neuronas en individuos jóvenes (Terry y Katzman, 2000). En relación a estos eventos algunos autores consideran que al envejecer, el número de contactos sinápticos disminuye de tal manera que sería posible pensar; que si la esperanza de vida de los humanos fuera cercana a los 105 años la gran mayoría presentaría un cuadro demencial de tipo Alzheimer (Tapia et al., 1999). Esto nos hace pensar que si, además de la pérdida sináptica aparentemente inevitable en el envejecimiento, existen algunas otras condiciones que pueden influir de manera no favorable en el funcionamiento sináptico o neuronal, se generaría entonces un escenario muy propicio para la rápida degeneración sináptica que conduciría a la muerte neuronal. Entre los principales factores que parecen influir en el daño sináptico destaca la presencia de la proteína A β en el parénquima de los

pacientes con Alzheimer. Respecto a lo anterior se ha podido demostrar que en animales transgénicos, los cuales sobreexpresan la proteína precursora del péptido amiloide (PPA) con alguna de las mutaciones presentes en los humanos que favorece la formación secreción de A β , existe disminución de la proteína actina, la cual también se encuentra en las terminales nerviosas y se puede considerar como marcador de pérdida sináptica. (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Cole et al., 1999).

El trabajo desarrollado por algunos investigadores apunta a que algunos eventos que desencadenan la muerte neuronal en la EA pueden ser iniciados por la activación local de caspasas en las terminales sinápticas e incluso se ha acuñado el término “sinapoptosis”, el cual se ha usado para describir la activación de proteasas relacionadas con la muerte celular programada de tipo apoptótico dentro de la sinapsis, (Mattson et al., 1998; Cole et al., 1999) estas proteasa se han encontradas asociadas funcional y espacialmente al retículo endoplasmático (RE) como pasa con la caspasa 12 . Por otro lado, algunas evidencias indican que el RE tiene gran importancia en la EA por su posible participación en la generación de A β en las neuronas (Mattson et al., 1998; Cook et al., 1997; Hartaman et al., 1998). Resulta de gran interés el hallazgo en el cual los ratones deficientes en caspasa-12 son resistentes al estrés inducido por el RE que provoca la muerte neuronal de tipo apoptótico y a la apoptosis inducida por la proteína A β . (Nakagawa et al., 2000). Además un número importante de proteínas que regulan la recaptura y la liberación de calcio del RE como el canal de rianodina que interaccionan con los receptores a presenilina 1 y 2 y juegan un papel importante en la EA (Mattson et al., 1998; Pak-Chung et al., 2000). De manera interesante, en sinaptosomas y subfracciones de sinaptosomas, se han encontrado niveles altos del receptor a rianodina (Martínez-Serrano y Satrustegul, 1989; Sharp et al., 1993; Padua et al., 1996) que parece participar en el control de la homeostasis intraneuronal del calcio, que muy posiblemente module eventos plásticos como la potenciación a largo plazo (LTP). En la EA se han encontrado alteraciones en el receptor de rianodina en estados tempranos de la patología que pueden ser fundamentales para la progresión en la formación de las placas seniles y las marañas neurofibrilares (Kelliher et al., 1999). Con respecto al daño sináptico debido a los efectos neurotóxicos de la A β , estos pueden ser mediados por especies reactivas de oxígeno, daño membranal y disfunción de las ATPasas implicadas en el movimiento de los iones (Mark et al., 1995) permitiendo un aumento en la vulnerabilidad neuronal asociada a despolarización y a la excitotoxicidad mediada por aminoácidos excitadores (Koh et al., 1990; Mattson 1992; 1995, Arias et al., 1995).

V.2.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL A β EN SINAPTOSOMAS

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 oxidante 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 A β 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 Fe²⁺, o exponiéndolos al A β . 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 oxidante 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 FeSO₄ o la misma A β 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 FeSO₄ y la A β .

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 el A β pudiera ejercer algunos efectos tóxicos y comprometer, de esta manera, la integridad de las terminales nerviosas en el cerebro.

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, ficoll 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.

V.3 CORTEZA ENTORRINAL

Dentro del cerebro de los pacientes con EA el grado de pérdida sináptica y neuronal asociada a las dos marcas histopatológicas mencionadas anteriormente es desigual, de tal forma que la reducción en el número de sinapsis sucede en las partes externas del giro dentado, en la capa molecular, posiblemente reflejando la destrucción de las neuronas localizadas en la capa 2 de la corteza entorrinal (Carter y Lippa, 2001). Por medio de la vía perforante, la corteza entorrinal suministra la mayor inervación cortical hacia el hipocampo. (Witter, 1989) Ramón y Cajal describió por primera vez las fibras que se generan en la corteza entorrinal y que proyectan al fascia dentata y propiamente al hipocampo Corno Ammonis (Ramón y Cajal, 1901). Mas recientemente estudios con trazadores modernos, han confirmado que la corteza entorrinal proyecta por la vía perforante al giro dentado y al hipocampo (Dolorfo y Amaral, 1998; Hjorth-Simonsen et al., 1972; Steward, 1976; Wyss, 1981). Las proyecciones a la formación hipocampal se originan principalmente de las capas superficiales (II y III) de la corteza entorrinal (Dolorfo y Amaral, 1998 y Steward, 1976). Los axones que se originan de la parte lateral de la corteza entorrinal terminan en el nivel septal del giro dentado, mientras que la parte medial de la corteza proyecta a la parte temporal del giro dentado

La búsqueda de los factores responsables de la formación de marañas neurofibrilares y depósitos de A β en estas regiones cerebrales apuntan a la participación de moléculas involucradas en la regulación del ciclo celular y la acumulación de factores que potencian el crecimiento y la mitosis (EGF y bFGF). Entre estos factores figuran los depósitos difusos de A β que puede ser el disparador para que las neuronas reentren al ciclo celular. Otro factor que puede facilitar la reentrada al ciclo celular es la pérdida de contactos sinápticos entre neuronas (Arendt, 2001) que, como se ha mencionado, es uno de los eventos tempranos en la EA.

VII.- OBJETIVOS

VI.1.- OBJETIVO GENERAL

Establecer modelos *in vivo* e *in vitro* de daño sináptico y muerte neuronal asociados a la EA. El propósito es contribuir al conocimiento de la posible secuencia de eventos que se asocian con la pérdida sináptica y su progresión hacia la muerte neuronal.

VI.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

A) Estudiar algunos de los mecanismos que contribuyen a la toxicidad del fragmento activo 25-35 del A β en terminales nerviosas aisladas valorando la función mitocondrial, el contenido de elementos proteicos (actina y sinaptofisina), así como, estudiar la ultraestructura de los sinaptosomas.

B) Detectar marcadores de ciclo celular en el giro dentado de la rata (cdk5, cdk6, cdk2 y PCNA) después de lesionar la corteza entorrinal, provocando la interrupción en la comunicación mediada por la vía perforante con el objeto de contribuir al conocimiento referente a la disrupción en la comunicación sináptica y sus consecuencias en los cambios celulares relativos a la alteración del estado de diferenciación neuronal.

VIII.- HIPÓTESIS

A) La alteración de la integridad sinaptosomal puede deberse a la presencia de la proteína A β que, aunada a alteraciones de la homeostasis de Ca²⁺ a partir de pozas intrasinápticas, puede inducir disfunción mitocondrial y daño estructural.

B) La pérdida sináptica de regiones interconectadas activará moléculas relacionadas con ciclo celular y mecanismos apoptóticos o de división celular.

IX.1.- MATERIALES Y MÉTODOS, EFECTOS TÓXICOS DE LA A β EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS

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 Ética para el Manejo de Animales y se siguió el método descrito por Löscher et al.,1988 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. El sobrenadante 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 obtiene un pellet, que contiene mitocondrias el cual se desecha y una interfase donde están los sinaptosomas, mielina y microsomas. Esta interfase fue cuidadosamente colectada y diluída en sacarosa 0.32 M para tener un volumen final de 2 ml. Esta fracción diluída se coloca sobre 1ml de sacarosa 0.8 M para centrifugar a 50000 rpm durante 15 minutos. El pellet que se obtiene, corresponde a la fracción sinaptosomal la cual se resuspende 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 someten a diferentes condiciones experimentales con el fin de evaluar el efecto del péptido 25-35 de la A β en la viabilidad de las terminales nerviosas aisladas.

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 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 μ g de proteína), se les agregó 4 μ l de MTT a una concentración final de 10 mM y se incubaron a 37° C durante 2, 3 y 4 horas. Al final de los tiempos señalados los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 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 se lee en el espectrofotómetro a 570 nm.

Electroforesis de proteínas e inmunoblot

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 (Completetm, 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 20 μ). 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 $\mu\text{g/ml}$, 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).

Análisis de microscopía electrónica

200 μg de proteína sinaptosomal tratados con rianodina y la proteína A β se fijaron durante 30 minutos en glutaraldehído al 3%, pH 7.4. después de enjuagarse con buffer de fosfatos el pellet se postfijó con tetraóxido de osmio al 1%. Las secciones se embebieron en resina (Epon) y se cortaron con una cuchilla de diamante. Para cada condición experimental se repitieron tres experimentos de forma independiente y para cada experimento se tomaron ocho micrografías de cada condición experimental.

Estadística

Los resultados presentados representan el promedio de 6-12 experimentos independientes \pm error standard (SE). 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.

X.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

Inyecciones estereotáxicas

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (250grs), las cuales se inyectaron en la corteza entorrinal con diferentes ácido kaínico, tomando las siguientes coordenadas: AP -3.6, L -2.0, V -2.5. Las ratas se anestesiaron con una mezcla de halotano 1% en 95% O₂/5% CO₂. El ácido kaínico se inyectó por medio de una bomba a la velocidad de 0.5 µl/min. Las ratas fueron sacrificadas por medio de una sobre dosis de pentobarbital i.p., y perfundidas transcardiacamente con 250 ml de solución salina (0.9%) seguido por 200 ml de una solución de paraformaldehído (4%) en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y transferidos a sacarosa al 20% por 24 h y 30% por 48 horas. Posteriormente se cortaron secciones coronales de 40 µm en un crióstato y se tiñeron con violeta de cresilo para su posterior análisis. Para el caso de la dosis respuesta, se realizó el mismo procedimiento y la perfusión se llevó a cabo 24 hrs, 1 día o una semana posteriores a la inyección con todas las dosis estudiadas.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó para observar la presencia de cdk5, cdk6, GFAP y PCNA y PHF-1. Los cortes de cerebro de 40µm de espesor fueron permeabilizados con una solución de 0.25% Tritón X-100 y 0.3% H₂O₂ por 30 min y bloqueadas con una solución de 5% de albumina-PBS durante toda la noche a 4°C. Después de ese tiempo, los cortes se incubaron con los anticuerpo primario para las moléculas mencionadas anteriormente en solución de bloqueo toda la noche a 4°C, lavados 3 veces con PBS por 5 min e inmediatamente incubados con un anticuerpo anti-ratón biotinilado (1:4000) por 1 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las células fueron procesadas con el kit de ABC-avidina-peroxidasa (Vector Laboratories), para su posterior revelado con tetrahidrocloreuro de diaminobenzidina como sustrato.

IX.2.- RESULTADOS, EFECTOS TÓXICOS DE LA A β EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS

En función de tratar de probar si nuestra hipótesis de trabajo se cumple y tomando en cuenta que la proteína A β es un péptido involucrado en la EA asociado a la pérdida sináptica, se aislaron las terminales nerviosas con la finalidad de exponerlas al fragmento activo de la A β , así como, a algunas condiciones que nos pudieran aportar elementos referentes al mecanismo de acción de la A β .

Nuestros resultados indican una escasa toxicidad del péptido 25-35 de la A β en el modelo de terminales nerviosas aisladas en condiciones basales (Fig. 1). Por otro lado cuando los sinaptosomas se someten a condiciones en las cuales se altera la homeostasis del calcio interno, como lo es la presencia de rianodina a una concentración 100nM (concentración a la cual se abre el canal), encontramos una potenciación de la toxicidad del péptido 25-35 de la A β , esta potenciación en la toxicidad es independiente del calcio extracelular pues en ausencia de Ca²⁺ se sigue observando el efecto tóxico de la rianodina y la potenciación por A β (Fig. 2). El mecanismo involucrado en la toxicidad provocada por la rianodina 100nM se debe probablemente a la salida de Ca²⁺ de pozas endógenas sensibles a rianodina puesto que al utilizar una concentración de rianodina 100 μ M, la cual cierra el canal sensible a esta o en presencia de dantroleno que bloquea la salida de calcio de pozas endógenas, no se detectó un aumento en la toxicidad del A β (Fig. 2). En una maniobra de especificidad de los efectos tóxicos de la proteína A β se encontró que la secuencia a azar de la proteína A β no tiene efectos sobre la reducción del MTT, ni aplicándola sola ni al incubarla simultáneamente con la rianodina 100nM (Fig 3). También hemos encontrado que la sustancia P puede estar funcionando como un bloqueador de la actividad tóxica de la A β tal vez por actuar compitiendo por su sitio de pegado a la membrana. Además al aplicar el compuesto MK801 no se encontró diferencia en la reducción del compuesto MTT que produce la rianodina y la A β , lo que sugiere que la toxicidad que causan estos compuestos no implica la activación de receptores a glutamato.

Al realizar el análisis por microscopía electrónica de los sinaptosomas incubados en condiciones basales, en presencia de rianodina y con la proteína A β , encontramos la existencia de cambios morfológicos importantes. De estos cambios llama la atención lo siguiente: los sinaptosomas control incubados durante tres horas presentan una morfología típica con la presencia de un número considerable de vesículas pequeñas de centro claro y una o más mitocondrias (Fig. 4). Después de tres horas de incubación los sinaptosomas con rianodina muestran un número reducido de vesículas de centro claro. Estos cambios están ligados a un aumento en el perímetro de la membrana sinaptosomal. En algunos casos fue posible observar que las vesículas sinápticas se reclutan en la zona activa de los sinaptosomas (Fig. 4). En los sinaptosomas incubados con A β se puede detectar solo un número reducido de vesículas, similar a lo encontrado en la condición con rianodina, reclutamiento y pegado de vesículas a la zona activa y aparición de vesículas pleomórficas. De igual manera a lo observado en la condición con rianodina, en presencia de A β se detectó un aumento en el perímetro de la membrana sináptica (Tabla 1). Cuando los sinaptosomas se incubaron con rianodina y A β algunos de los cambios mencionados se potenciaron. En todos los casos, a pesar de los cambios estructurales observados en los sinaptosomas la membrana de estos se mantiene sellada como lo muestra el análisis de liberación de LDH (Fig. 4).

Para determinar si los cambios morfológicos y en la reducción del MTT se asocian con la disrupción de proteínas del citoesqueleto y si esta disrupción pudiera estar mediada por la activación de caspasas, examinamos los efectos de la rianodina y la proteína A β sobre el nivel de sinaptofisina y actina (Fig. 5 y 6).

La pérdida de la proteína asociada a las vesículas, sinaptofisina ha sido utilizada como un marcador en la enfermedad de Alzheimer. Determinando los niveles de sinaptofisina por inmunoblot después de tres horas de incubación en homogenados de sinaptosomas, observamos una disminución en la densidad de sinaptofisina que, en presencia de la rianodina fue del 20%, en presencia del A β de 35% y para el caso en el cual se colocan ambos tratamientos la reducción fue de 25% comparando con el nivel de sinaptofisina en el control (Fig 6).

La actina es una de las proteínas más abundantes del citoesqueleto de terminales nerviosas y es un sustrato conocido de caspasas. Los niveles de actina disminuyen al ser incubados con rianodina, con A β o cuando se colocan ambos compuestos al mismo tiempo comparados con la condición control. Resulta interesante que cuando se utiliza un inhibidor general de caspasas, el ZVAD, se puede revertir el efecto de pérdida de actina en todas las condiciones (Fig. 5).

Podemos decir hasta este punto, que los efectos tóxicos del fragmento 25-35 de la proteína A β sobre terminales nerviosas aisladas se observan en condiciones relacionadas con la alteración de la homeostasis del calcio, capaces de alterar la función mitocondrial, activar el ciclo de liberación vesicular y generar la pérdida de proteínas estructurales sin que se altere la integridad de la membrana externa. Además este daño estructural parece ser revertido por un inhibidor general de caspasas.

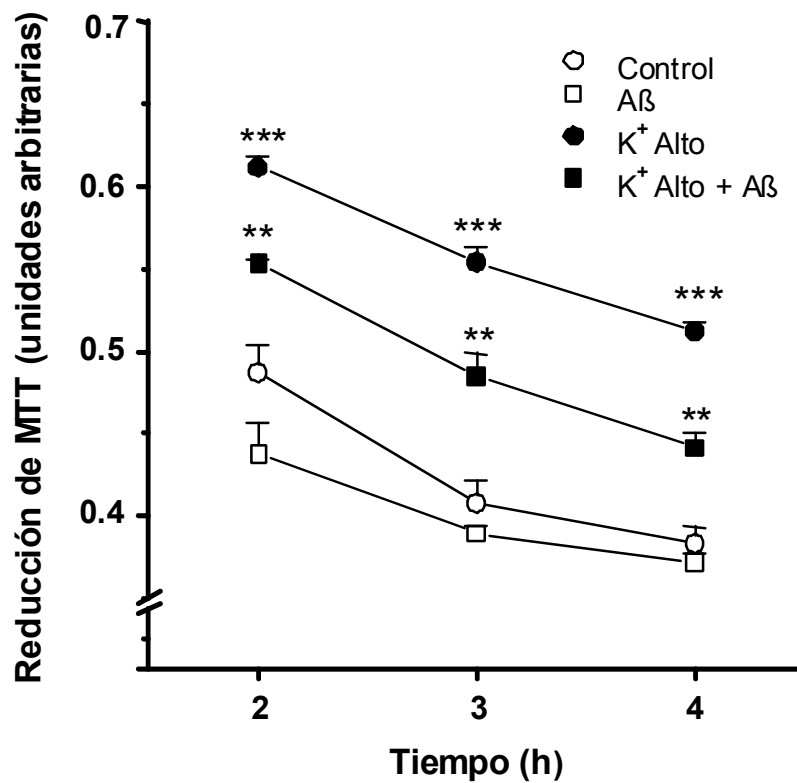


Fig. 1 Gráfica que representa la reducción del compuesto MTT en presencia de sinaptosomas para diferentes condiciones experimentales y a diferentes tiempos de incubación (2,3 y 4 hrs.). La línea denotada con los círculos (○) muestra el curso temporal del efecto de la proteína Aβ en la reducción de MTT en condiciones basales. En contraste con este primer trazo se puede observar que al incubar los sinaptosomas con Aβ (□) no se inducen cambios significativos en la reducción del MTT comparando con el control. Además, en esta gráfica se muestra el efecto de la entrada de Ca²⁺ inducida por la despolarización con K⁺ a una concentración 50mM en la reducción de MTT (●) de lo cual se puede detectar que la despolarización inducida por calcio causa un incremento en la reducción del MTT. Finalmente, al incubar simultáneamente los sinaptosomas en condiciones de K⁺ alto y la proteína Aβ (■) la preparación disminuye el nivel de reducción del MTT comparado con la despolarización, pero este valor no es menor que la reducción de la condición control. Los datos refieren a las unidades relativas de absorbancia y representan la media ± SEM de seis experimentos por duplicado. ***P* < 0.005; ****P* < 0.0005.

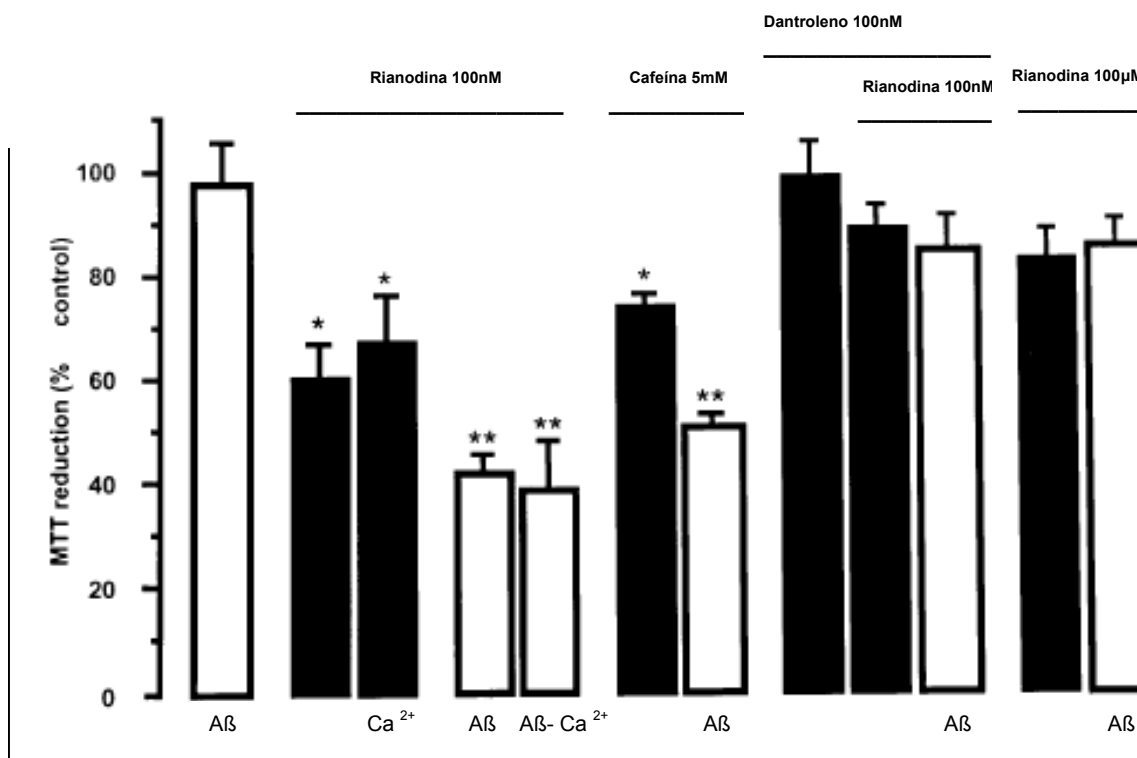


Fig. 2. Gráfica que muestra el efecto de la Aβ 25–35 y la rianodina en la actividad redox mitocondrial después de la incubación durante de 3 horas. Los sinaptosomas se expusieron a una concentración de rianodina que es capaz de abrir el canal (100nM) en presencia y ausencia de calcio extracelular Ca²⁺ (con 100μM de EGTA) y en presencia y ausencia de Aβ 25–35 (50μM). Además se muestra el efecto de la cafeína (5mM) por sí misma y en presencia de Aβ 25–35. Por último, la especificidad de los efectos inducidos por la rianodina se demostró al usar la concentración de rianodina que cierra el canal o lo inactiva (100μM respectivamente), así como al utilizar dantroleno (100nM). Los datos se obtuvieron en base a las unidades relativas de absorbancia y representan la media ± SEM de seis o diez experimentos por duplicado. *P < 0.05; **P < 0.005.

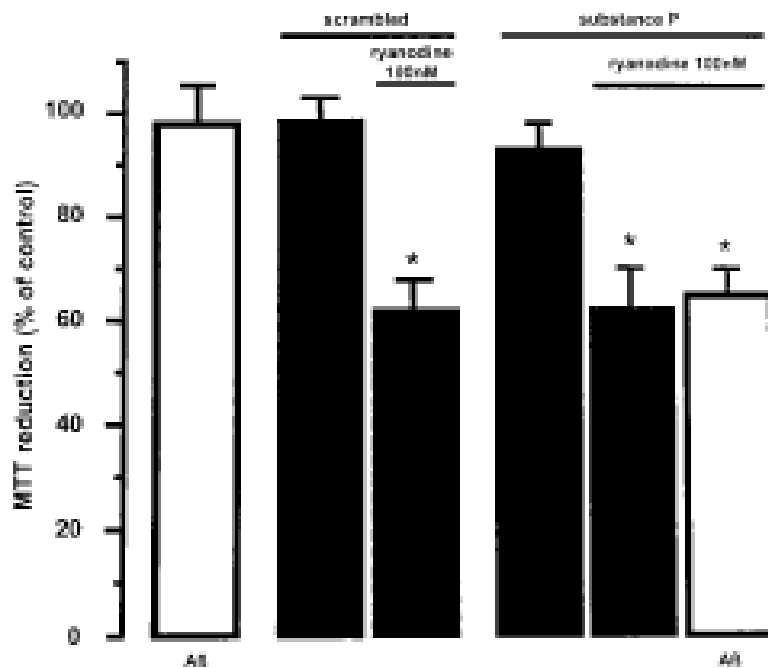


Fig 3.- Efecto de la secuencia al azar de la A β 25–35 y la sustancia P en la actividad redox mitocondrial. La secuencia revuelta de la A β no tiene efecto en la reducción de MTT y no potencia los efectos de la rianodina. Además los efectos de la A β en combinación con la rianodina se bloquearon al colocar la sustancia P pero no los efectos en la reducción del MTT debidos a la rianodina. Los datos se obtuvieron en base las unidades relativas de absorbancia y representan la media \pm SEM de cuatro o seis experimentos por duplicado. * P < 0.05.

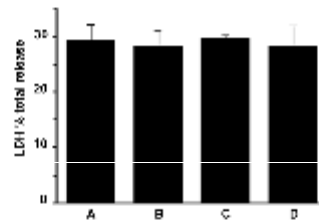
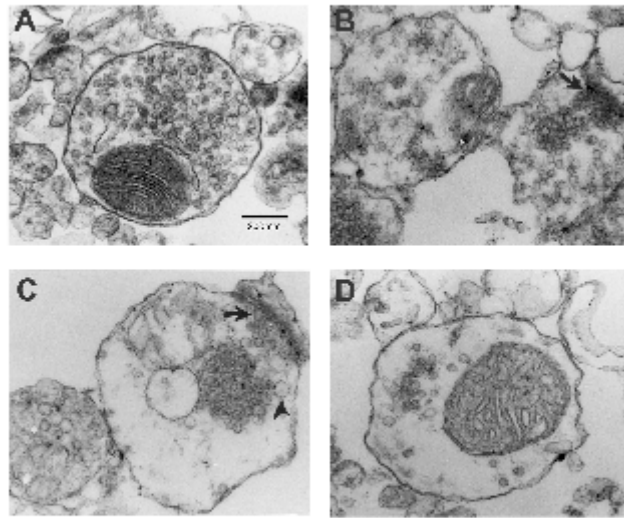


Fig. 4.- Micrografías electrónicas donde se muestran las terminales nerviosas aisladas en la condición control (A) y los cambios estructurales en los sinaptosomas en diferentes condiciones: rianodina (B), A β (C) y A β + rianodina (D). También se muestran en la grafica los valores de LDH liberada. De éstas micrografías se puede observar que el número de vesículas disminuye de forma importante cuando se coloca rianodina y la A β y por otro lado, la integridad de la membrana no se ve afectada en ninguna de las condiciones. Cada una de la barras representa la media \pm SEM de los cuatro experimentos realizados para cada una de las condiciones.

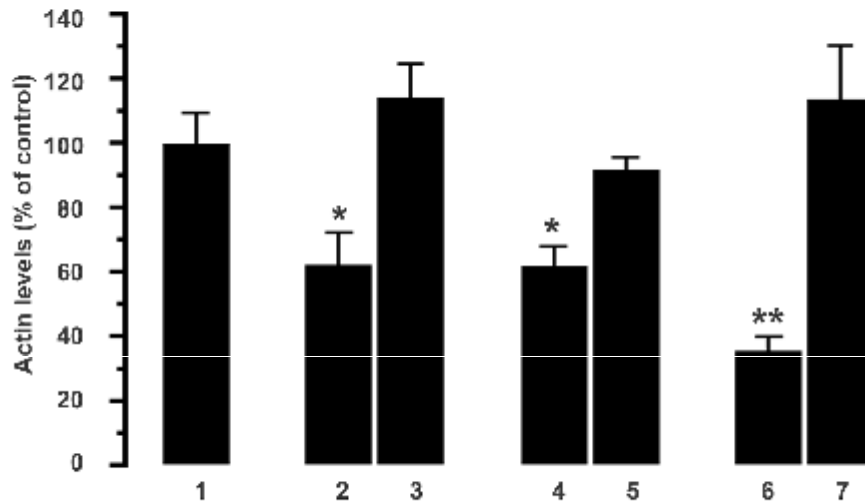
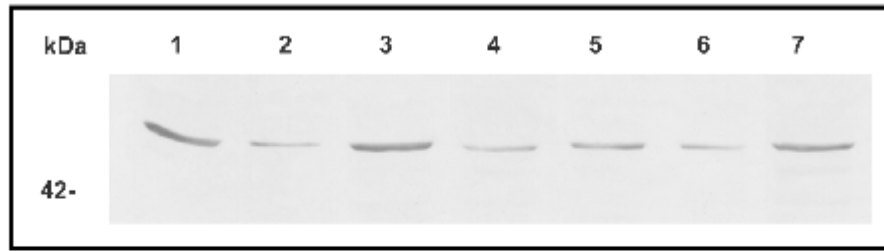


Fig. 5.- Imagen que representa el análisis por Western-blot y los valores densitométricos para la proteína actina extraída de sinaptosomas después de 3 horas. Las condiciones representadas son las siguientes: sinaptosomas controles (1), incubados con rianodina a una concentración de 100nM (2), rianodina + ZVAD (3) incubados en presencia de A β (4), A β + ZVAD (5) con rianodina 100nM + A β 25-35, 50 μ M (6), rianodina + A β + inhibidor de caspasas (7). Se puede ver que la desaparición de actina que se observó en presencia de rianodina y A β se logró revertir utilizando un inhibidor de caspasas ZVAD. Cada barra representa la media \pm SEM obtenida después de cinco experimentos. * P \leq 0.05; ** P \leq 0.005.

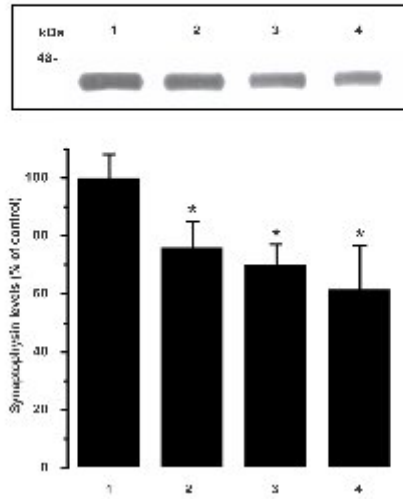


Fig 6.- Valoración de la desaparición de la proteína sinaptofisina utilizando la técnica Western-blot. La presencia de esta proteína se modificó a las tres horas de incubación observándose una disminución de la proteína al colocar A β , rianodina a la concentración 100nM , así como cuando se incubaron ambas sustancias simultáneamente. Además se incluye el análisis densitométrico. Líneas: control (1), rianodina (2), A β (3) y rianodina + A β (4). Cada barra representa la media \pm SEM obtenida después de siete experimentos. * P < 0.05.

Tabla 1.- Cuantificación de diversos parámetros de cambio estructurales en los sinaptosomas tratados con rianodina y el fragmento 25-35 de la proteína A β .

	Control	Rianodina	Aβ25-35	Rianodina + Aβ25-35
<i>n</i> =	(37)	(26)	(24)	19)
Vesículas sinápticas (numero total)	38 \pm 2	22 \pm 2*	17 \pm 2**	22 \pm 4*
Sinaptosomas con reclutamiento vesicular	0	21 + 1**	15 + 1**	22 + 1**
Perímetro sináptico (μ m)	2.92 \pm 0.12	3.48 \pm 0.14*	4.17 \pm 0.18*	4.59 \pm 0.15*

Los resultados son la media \pm SEM del numero total de sinaptosomas contados (*n* = en paréntesis), para tres experimentos diferentes de cada condición en nueve campos de 7 x 9 μ m² * *P* < 0.05, ** *P* < 0.005 (los experimentos se compararon con el control).

X.2.- RESULTADOS, EFECTO DE LA DESAFERENTACIÓN DE LA VÍA PERFORANTE EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE CICLO CELULAR

Como lo hemos señalado la pérdida de las células de la capa 2 en la corteza entorrinal en la EA afecta la comunicación con las regiones medio-septales y temporales de la formación hipocampal. La perdida de los elementos sinápticos en estas regiones del cerebro correlaciona con la aparición de marañas neurofibrilares, así como con la deficiencia cognoscitiva. El entendimiento de la subsiguiente perdida neuronal en las áreas de la formación hipocampal es importante para contribuir a la comprensión de la progresión en la demencia de Alzheimer. En este proyecto hemos considerado el estudio

in vivo de los efectos que tiene la destrucción de los somas de la corteza entorrinal en la aparición de marcadores del ciclo celular en las regiones dorsales del hipocampo, fenómeno que como algunos autores indican puede contribuir a la degeneración neuronal. La lesión de la corteza entorrinal se realizó por medio de la inyección estereotáxica de ácido kaínico a una concentración 1 nm/ 1 μ l y 3 nm/ μ l. La figura 7B muestra una imagen representativa del efecto del ácido kaínico en la corteza entorrinal de la rata después de 24 horas de la inyección estereotáxica. Utilizando la tinción de Nissl, se puede apreciar que existe un número importante de núcleos picnóticos alrededor del tracto de la inyección (fig 7B), y la disposición de la capa 2 de la corteza entorrinal se encuentra alterada con respecto a lado no inyectado (fig 7A), en este caso se observa un patrón celular similar al reportado por Paxinos. Al igual que con la concentración de 1nm/ μ l las 3 nm de ácido kaínico por 1 μ l en la corteza entorrinal, tienen efecto el desarreglo general de la capa 2 de la corteza entorrinal exponiendo un gran número de núcleos pignóticos (datos no mostrados). La inmunohistoquímica para la proteína glial ácido fibrilar (GFAP) en la corteza entorrinal muestra desde las 24 horas un aumento en el número de elementos gliales (datos no mostrados) Por otro lado al analizar el corte coronal a nivel septal de la formación hipocampal (FIG 7), se observa que el patrón de distribución celular no presenta alteraciones evidentes después de 24 de la lesión en la corteza entorrinal ni en el lado ipsilateral a la lesión (FIG 7D) ni en el corresponde al lado contralateral (FIG 7C).

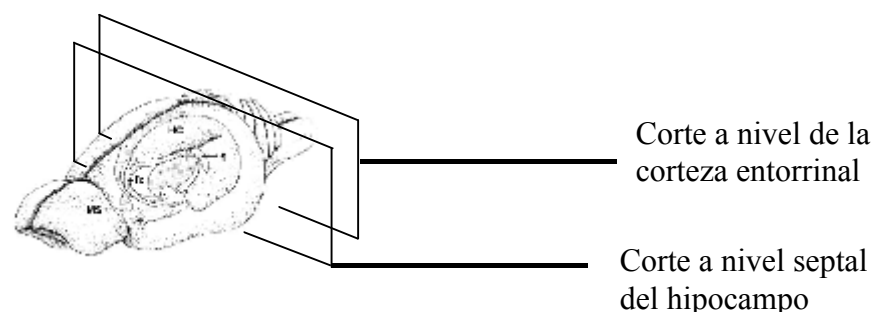
Con la finalidad de determinar si se la expresión de las proteínas del ciclo celular disminuye en el tiempo, se observo el efecto de la desaferentación a las 24 horas de lo cual, la figura 8 muestra como a las 24 horas de la maniobra estereotáxica, también se detecta inmunorreactividad para la proteína cdk5, cdk6, PCNA y GFAP en el nivel septal de la formación hipocampal siendo esta mayor en el lado ipsilateral a la lesión

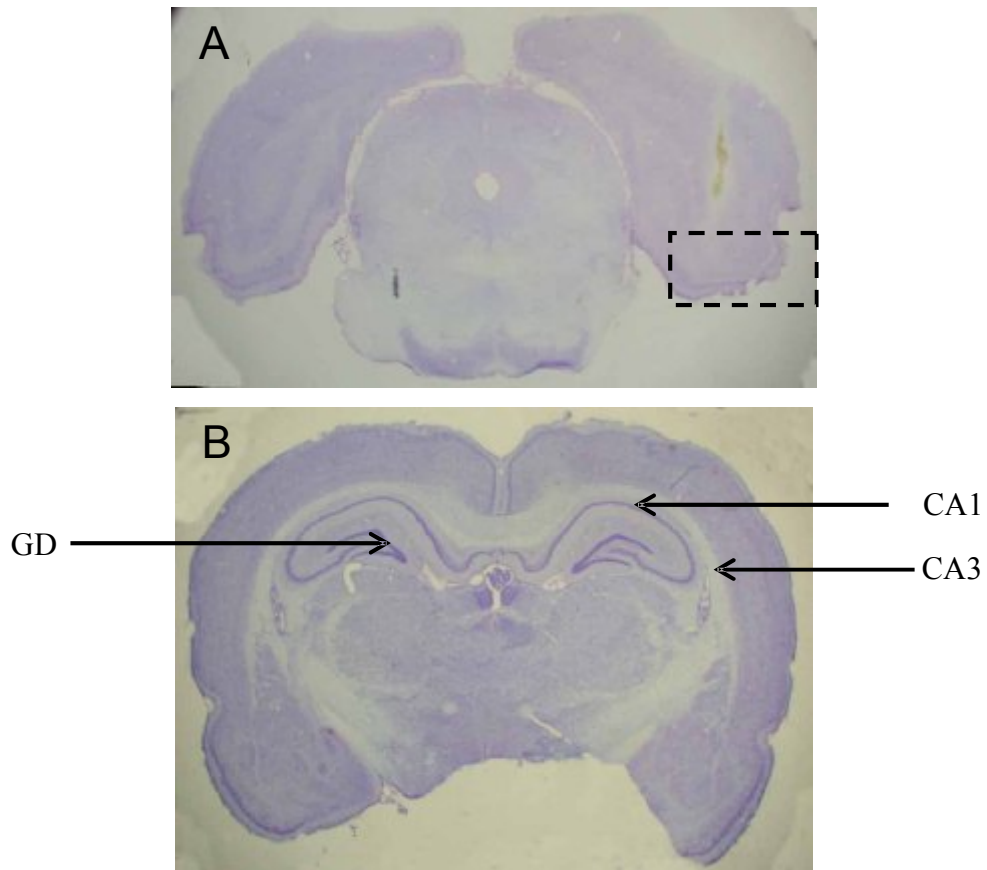
(FIG 8A, 8C, 8E y 8G) que en el lado contralateral (8B, 8D, 8E y 8G). Además de lo anterior, vale la pena mencionar que en el lado contralateral a la inyección con kaínico se observa una inmunoreactividad mayor que la observada en la condición control en donde la reactividad es casi nula (datos no mostrados), El control se inyectó solo con el vehículo en el que se disuelve el ácido kaínico. Es importante mencionar que aunque en la figura 8 no se muestra, también se detectó inmunoreactividad para esta proteína en la corteza y la amígdala. Complementario al análisis de las moléculas ya mencionadas, la figura 9 muestra el efecto que tiene la lesión de la corteza entorrinal después de 1 semana en la inmunoreactividad para la proteína cdk5 en el giro dentado y en el área CA3 de la formación hipocampal. De manera general la reactividad a una semana de la inyección estereotáxica en la corteza entorrinal se observa que la reactividad en el giro dentado disminuye al tiempo de que aparece en la región CA3 (patrón que se repite para las diferentes inmunohistoquímicas: cdk6, cdk2 y PCNA). El objetivo de mostrar esta imagen es enfatizar que además de la reactividad presente en el giro dentado (9A) la reactividad aparece en la región CA3 (9B). Éste aumento en la reactividad para cdk5 en CA3 coincide con el aumento en la reactividad de PHF-1 en CA3 (9C y 9D) que es mayor del lado ipsilateral (9D) a la lesión. La figura 9 presenta en el panel inferior como al mes de la lesión la reactividad para los diferentes anticuerpos, en este caso para cdk5 se ha perdido en el giro dentado así como en CA3 de ambos lados con respecto a la inyección (9E y 9F), pero llama la atención como la reactividad para PHF-1 permanece elevada en las fibras musgosas de CA3 del lado ipsilateral a la inyección de ácido kaínico (9G y 9H).

La figura 10 muestra el efecto que tiene una dosis mayor de ácido kaínico 3nm/μl en la expresión de los diferentes marcadores del ciclo celular que se ha utilizado hasta este momento. Como se puede observar de la figura 10A a la 10D después de 24 horas existe expresión de cdk5 tanto en el giro dentado

como en la región CA3 diferente a lo que sucede 1 nanomola en donde solo se logra expresión en el giro dentado, otra diferencia importante con esta concentración es la reactividad exacerbada en la región CA3 para PHF-1 (10E y 10 F) que para la dosis de 1 nanomolas μl aparece a partir de una semana. Complementario a la figura 10 la figura 11 muestra el efecto después de 1 mes de la inyección de 3 nanomolas/ μl de ácido kaínico en la expresión de marcadores del ciclo celular. Al igual que lo sucedido con la dosis de 1 nanomola de ácido kaínico la inmunoreactividad tiende a desaparecer al transcurrir del tiempo en el giro dentado (dato no mostrado) y se mantiene en la región CA3 del lado ipsilateral como en el contralateral (11A a 11D) de forma paralela a lo anterior la reactividad para PHF-1 se mantiene de forma claramente superior del lado inyectado en CA3 (11E y 11F)

Además del análisis por inmunohistoquímica de la expresión de algunas proteínas involucradas en el ciclo celular, en este proyecto se trata de profundizar sobre el significado funcional de la expresión de los marcadores del ciclo celular. Como se muestra en la figura 12 de manera representativa la expresión de los marcadores no se encuentran relacionados con la fragmentación del núcleo por lo menos para la prueba de TUNEL ni en el giro dentado ni en CA3 (12A a 12B) por otro lado en la figura 12E y 12F se puede observar que la expresión de la proteína Bax se da en el giro dentado lo que podría explicar la desaparición de la marca inmunoreactiva de los marcadores en el tiempo. Finalmente como se muestra en la figura 12C y 12D el fenómeno de división celular evaluado por la incorporación de BrdU no tiene un correlato con la expresión de los distintos marcadores del ciclo celular posterior a la lesión en la corteza entorrinal.





Imágenes que muestra en cerero de la rata (parte superior), el corte coronal a nivel de la corteza entorrinal (A) y el corte coronal a nivel septal del hipocampo (B). En A, se muestra la ubicación de la corteza entorrinal (recuadro ----) del lado ipsilateral a la inyección estereotáxica. En B se muestra las regiones del hipocampo (GD=giro dentado).

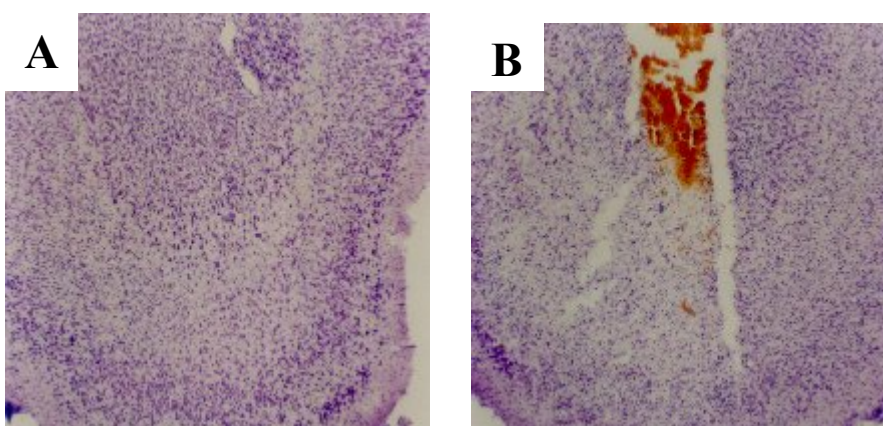
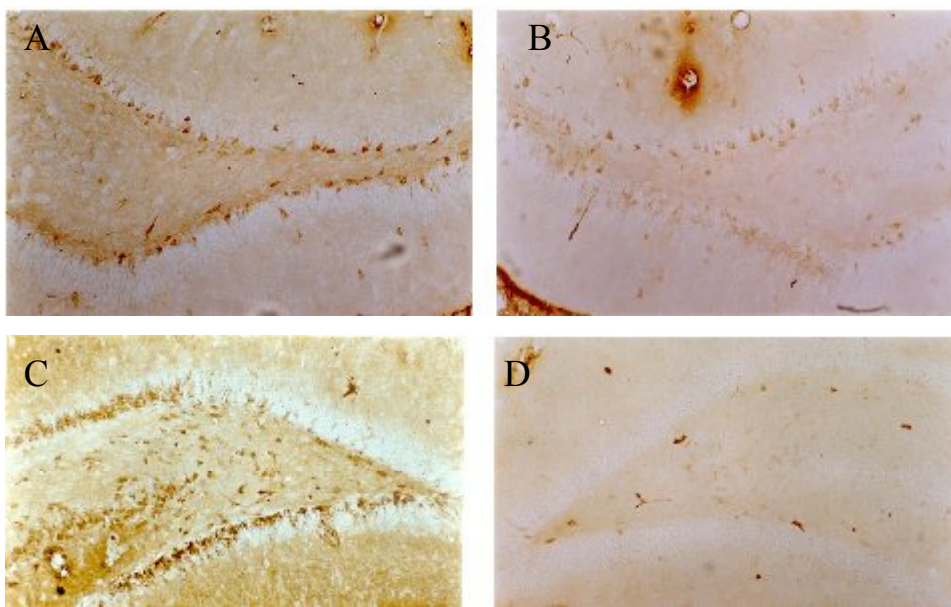


Fig 7.- Cortes histológicos obtenidos del cerebro de la rata teñidos con la técnica de Nissl. Las imágenes muestran la corteza entorrinal (A y B) y la formación hipocampal (C y D). En la figura A se observa la citoarquitectura convencional para la corteza entorrinal, mientras que en B se puede apreciar la alteración de la corteza entorrinal, en esta se observa un número importante de núcleos picnóticos alrededor del tracto de la inyección estereotáctica y la disposición la capa 2 de la corteza entorrinal se encuentra alterada con respecto a lado contralateral o lado no inyectado (A). También se muestra la Tinción de Nissl para un corte coronal a nivel septal de la formación hipocampal (C (contralateral a la lesión) y D (ipsilateral a la lesión)). En ambas imágenes se muestra que el patrón de distribución celular no presenta alteraciones después de 24 de la lesión en la corteza entorrinal.

Cdk5



Cdk6

PCNA

Fig 8 Imágenes que muestran la inmunoreactividad obtenida al realizar la técnica de inmunohistoquímica para diferentes proteínas y marcadores moleculares a nivel de la formación hipocampal, tanto para el lado ipsilateral a la lesión en la corteza entorrinal (A,C y E), como para el lado contralateral a la inyección estereotáxica (B,D y F). Se muestra la Inmunoreactividad para cdk5 (A,B), cdk6 (C,D) y PCNA (E;F) en un corte a nivel septal de la formación hipocampal de la rata. Como se puede observar después de 24 horas de lesionar con 1nanomola de ácido kainico existe un marcado reconocimiento para todos los anticuerpos probados del lado ipsilateral a la inyección estereotáxica. Además se muestra la inmunoreactividad en el lado contralateral a la lesión aunque en menor proporción.

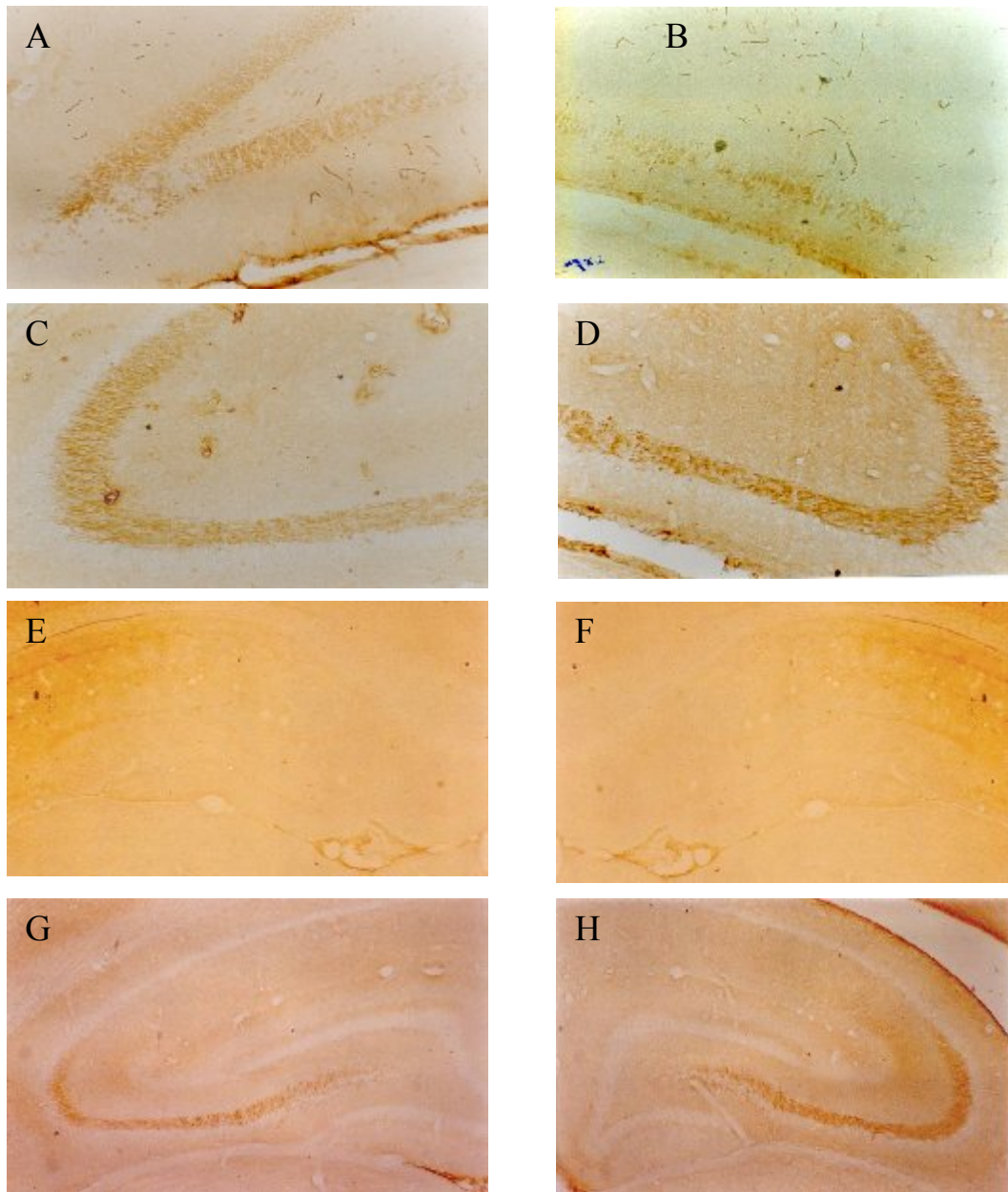


Fig 9.- Imágenes que muestran la inmunoreactividad obtenida al realizar la técnica de inmunohistoquímica para la proteína PHF-1 a nivel de la formación hipocámpal, tanto para el lado ipsilateral a la lesión en la corteza entorrinal (A, C, E y G) como en el lado contralateral a la lesión (B, D, F y H). En estas imágenes se representa el curso temporal con respecto a la expresión de PHF-1 en la región hipocámpal de la rata. En la parte superior se puede observar que después de 1 semana de la inyección existe inmunoreactividad para PHF-1 a nivel del giro dentado (A y B) y de CA3 (C y D) de ambos hipocámpos. Por otra parte se puede observar que después de un mes, la inmunoreactividad ha disminuido en las capas celulares del giro dentado (E y F) mientras que en la región CA3 permanece (G y H).

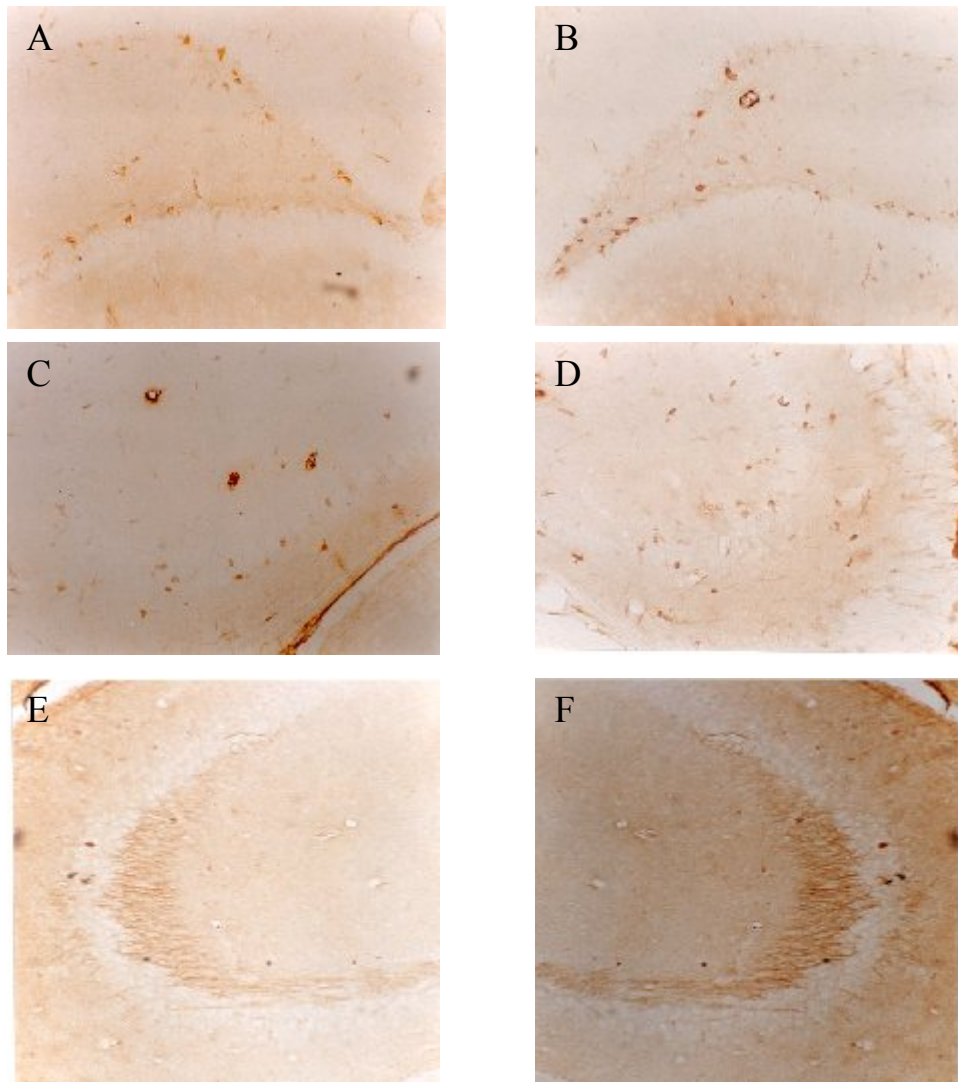


Fig 10.- Imágenes que muestran la inmunoreactividad obtenida al realizar la técnica de inmunohistoquímica para la cdk5 y la proteína PHF-1 a nivel de la formación hipocampal, tanto para el lado ipsilateral a la lesión en la corteza entorrinal (A, C y E) como en el lado contralateral a la lesión estereotáxica (B, D y F). Las imágenes muestran que al lesionar la corteza entorrinal con una concentración de ácido Kainico de 3 nanomolas, a las 24 horas se detecta inmunoreactividad en el giro dentado (A y B) y la región CA3 (C y D) para la cdk5. Diferente a lo que sucede con una dosis menor en la cual la inmunoreactividad solo se presentó en el giro dentado. Llama la atención que con esta concentración, en la región CA3 también se detecta la inmunoreactividad para PHF-1 diferente a lo que se observó con 1 nanomola en donde no se detectó inmunoreactividad para esta proteína a las 24 horas de la lesión estereotáxica.

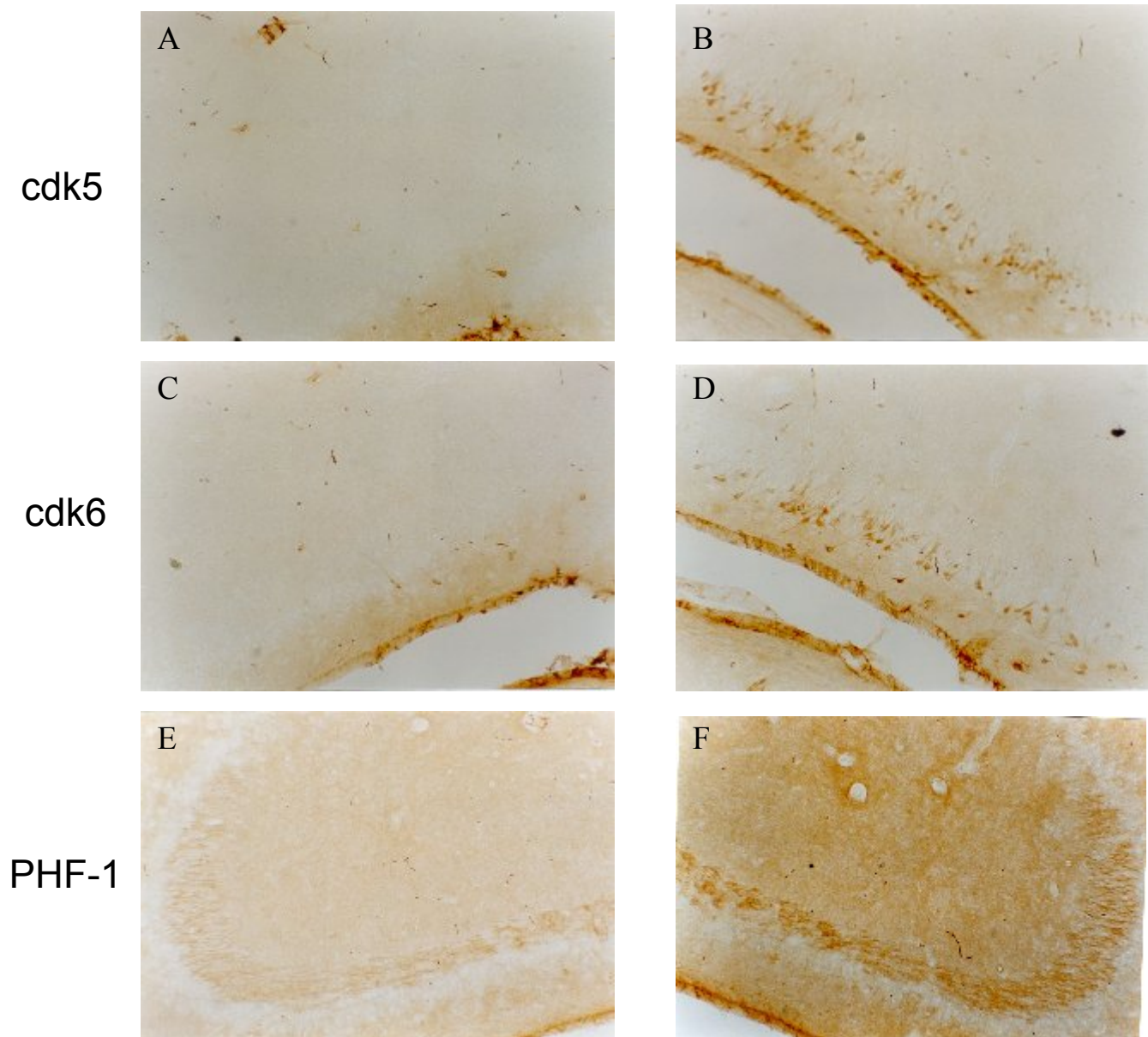


Fig 11.- Imágenes que muestran la inmunoreactividad obtenida al realizar la técnica de inmunohistoquímica para diferentes marcadores moleculares a nivel de la formación hipocampal. En esta figura se muestra el efecto después de 1 mes de la inyección de 3 nanomolas/ μ l de ácido kaínico en la expresión de marcadores del ciclo celular. La inmunoreactividad ha desaparecido al transcurrir del tiempo en el giro dentado (dato no mostrado) y se mantiene en la región CA3 del lado ipsilateral (B y D), como en el contralateral (A y B), de forma paralela a lo anterior la reactividad para PHF-1 se mantiene en CA3 de ambos hipocampos (E y F).

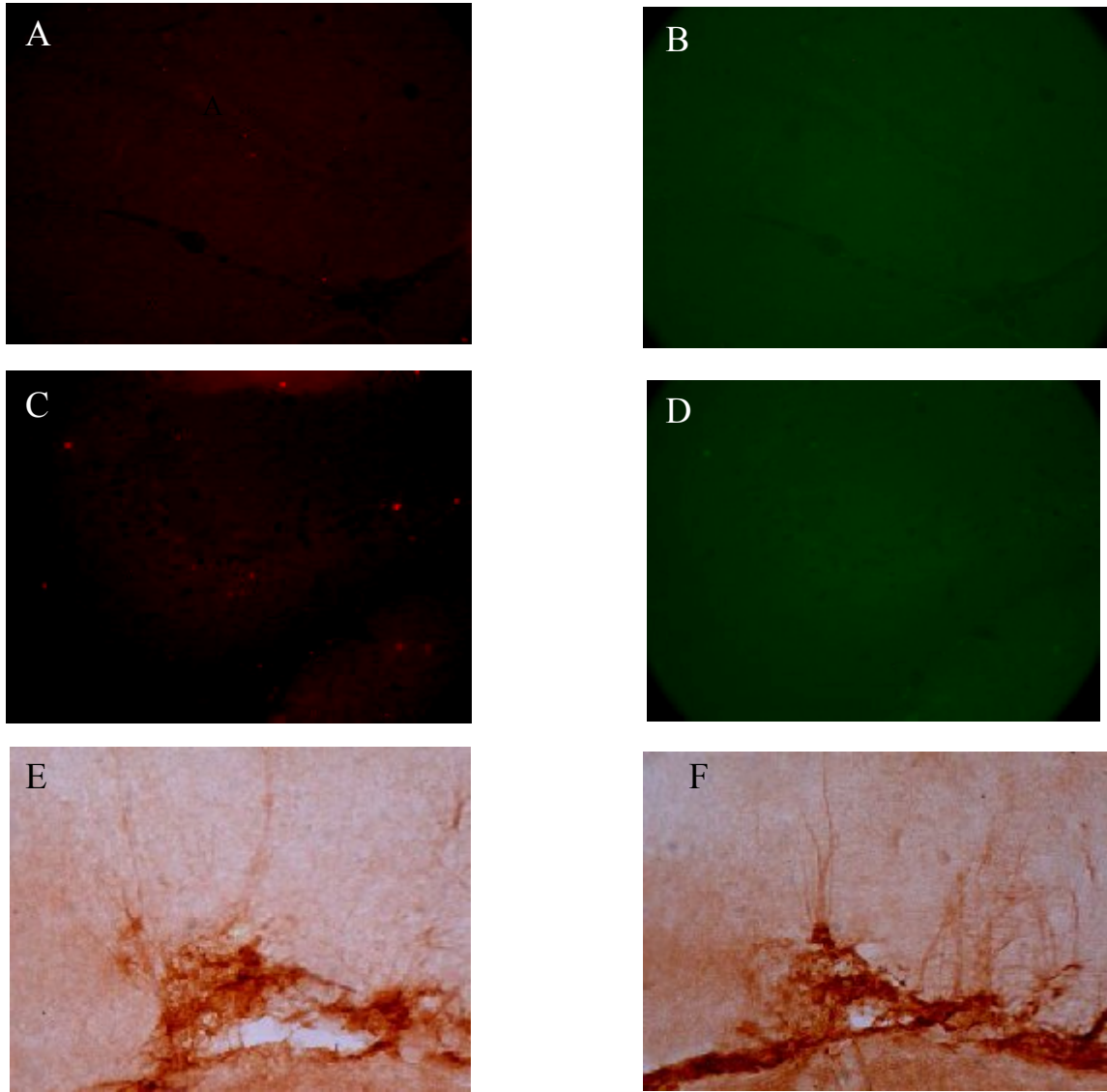


Fig 12.- En esta figura se muestra la imagen representativa a nivel de la formación hipocampal de la técnica de TUNEL (A y B) y la inmunofluorescencia para Brdu (C y D). Llama la atención que los recuadros inferiores (E y F) se muestra la inmunoreactividad para la molécula Bax, la marca de esta se restringe a las zonas del giro dentado lo cual puede tener relevancia para explicar el porque en el giro dentado la expresión de moléculas del ciclo celular se silencian por lo menos a partir de la semana.

IX.3.- DISCUSIÓN, EFECTOS TÓXICOS DE LA A β EN TERMINALES NERVIOSAS AISLADAS

Los resultados mostrados anteriormente indican que el fragmento 25-35 de la A β en combinación con la rianodina potencia la disfunción mitocondrial y altera la morfología sináptica acompañada por la pérdida de las proteínas sinápticas actina y sinaptofisina.

La preparación de sinaptosomas controles muestra un decaimiento en la reducción del MTT en el tiempo como se puede esperar al ser una preparación in vitro y el A β produce solo una ligera disminución en esta reducción a 2 y 3 horas similar a lo que se ha reportado por otros autores (Pereira et al., 2000). Muchas evidencias indican que el A β contribuye a la pérdida de la homeostasis interna de calcio (Hartmann et al., Mattson et al., 1993) pero el mecanismo preciso involucrado en tal acción no se ha clarificado. Para comparar los efectos en la reducción del MTT por los sinaptosomas al movilizar calcio por diferentes rutas y la contribución del A β en tales efectos, exploramos el papel de la entrada de calcio durante la despolarización por K⁺ y la activación de la poza interna modulada por los receptores de rianodina. En el presente trabajo encontramos que en la condición de alto K⁺ se incrementó la actividad redox mitocondrial valorada como reducción de MTT, mientras que los sinaptosomas incubados con una concentración de rianodina que activa el canal disminuyó esta actividad redox. Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que la relación entre la carga de calcio y la neurotoxicidad depende primariamente de la ruta de entrada de este catión y no solo de su contenido total en una célula (Sattler et al., 1998). La despolarización por K⁺ alto permite la entrada de calcio a través de la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje. Teniendo en cuenta que la mayoría de los iones de calcio que entran a la neurona en condiciones fisiológicas son amortiguados por la mitocondria (Zhou y Neher, 1993), se puede esperar un incremento en la utilización de la glucosa por los sinaptosomas. De hecho la adición de potasio a los sinaptosomas estimula el consumo de oxígeno y la producción de energía en las mitocondrias (Erecinska et al., 1991). Esta situación metabólica puede aumentar la reducción de MTT por la mitocondria y por otras rutas. Por ejemplo, se supone que la reducción del MTT se lleva a cabo primordialmente por la mitocondria, pero existen

algunas evidencias de la reducción en el citoplasma de este compuesto (Liu et al., 1997; Altman, 1976). Por otro lado, las alteraciones en la homeostasis del calcio del RE son suficientes para inducir apoptosis en muchos tipos celulares incluyendo las neuronas y los agentes que suprimen la liberación de calcio de RE (por ejemplo el dantroleno) pueden proteger a las neuronas de entrar al proceso de muerte celular programada (Guo et al., 1997). Además un número importante de proteínas que regulan la liberación de calcio del RE se encuentran en las terminales nerviosas, en específico, el canal de rianodina (Padua et al., 1996) lo cual sugiere la participación en la mediación de procesos presinápticos que requieren de calcio (Bonanno et al., 2000). En la EA la alteración en la unión y función del receptor rianodina parece ser un evento temprano que puede contribuir a la formación de marañas neurofibrilares y de placas seniles (Kelliher et al., 1999). Mas aún, las mutaciones en la presenilina-1 incrementa los niveles de calcio liberado a través del receptor a rianodina en el RE en células de tipo PC-12 (Chan et al., 2000). En condiciones de reposo la concentración de calcio en el lumen del retículo es considerablemente mas alta (10-100 μM) que la concentración en el citoplasma (100-300 nM). Este gradiente de calcio se puede revertir cuando la rianodina interactúa con su receptor provocando la elevación en el calcio intrasinaptosomal. Nuestros resultados muestran que la rianodina disminuye la reducción de MTT lo cual apoya la idea referente a que la alteración metabólica que el calcio pueda disparar, depende en gran medida de la ruta que el calcio tome para entrar a una célula. En apoyo a esta conclusión, encontramos que: 1) la concentración que modula los efectos en el receptor a rianodina está de acuerdo con la movilización interna de calcio (Meissner, 1986) 2) a la concentración de rianodina que abre el canal, los efectos de la rianodina son totalmente independientes del calcio externo 3) la inhibición en la reducción del MTT se bloquea por dantroleno.

Se ha descrito que en las neuronas, las mitocondrias suelen estar cerca del RE y que son capaces de capturar el calcio que se libera del RE. Esto puede provocar que el incremento en la concentración de calcio en la hendidura formada entre estos organelos que sea mayor a la del citoplasma lo cual puede ser crucial para modificar la función redox mitocondrial. De forma interesante, cuando la rianodina se co-incuba con la $A\beta$ la disfunción

mitocondrial aumenta. Estos hallazgos indican que los efectos de la A β en la reducción del MTT ocurren solo bajo la despolarización o al incubarse con rianodina lo cual sugiere que la alteración en la homeostasis intrasinaptosomal del calcio debe estar involucrada en los efectos de la A β . De forma consistente con esta interpretación está el hecho de que los sinaptosomas corticales y en cultivos neuronales, el incremento en el calcio citoplasmático inducido por la despolarización por calcio, aminoácidos excitadores o el ionóforo A23187, es potenciado y mantenido por un tiempo considerable cuando el péptido A β está en el medio de incubación (Mattson et al., 1992, 1993, Hartmann et al., 1993; MacManus et al., 2000)

De cualquier forma el mecanismo por el cual la A β induce la pérdida de la homeostasis de calcio no está del todo establecido, nuestros resultados apoyan la posibilidad de que en los sinaptosomas la A β pueda ejercer sus efectos directamente en las pozas de calcio internas por el hecho de que aun en ausencia de calcio externo el fragmento 25-35 de la A β potencia la inhibición producida por la rianodina en la reducción de MTT. Apoyando esta hipótesis, se ha demostrado que la A β estimula la actividad de la fosfolipasa C e incrementa los niveles de IP3 en cultivo de neuronas (Singh et al., 1997). Las evidencias antes mencionadas sugieren que la A β aumenta la liberación de calcio a través de un mecanismo que puede involucrar al receptor de IP3. Bajo estas condiciones y de acuerdo con Hernández-Cruz et al (1977) la función del receptor a rianodina puede amplificar la señal de calcio que emana del receptor a IP3, lo cual induciría la inhibición observada en la reducción del MTT. Recientemente se ha mostrado que algunas formas de estrés sobre RE pueden alterar la homeostasis de calcio y activar algunas de las enzimas relacionadas con la apoptosis, como es la caspasa 12, ya que ratones deficientes en caspasa 12 son resistentes a la apoptosis inducida por A β (Nakagawa et al., 2000).

La falta del efecto de la sustancia P en la reducción de MTT por sí sola o en combinación con rianodina y A β sugiere que una secuencia específica de aminoácidos se presente en el fragmento 25-35 de la A β que se requiere para que se den los efectos en la reducción del MTT. Esta hipótesis es razonable si se toma en cuenta que la secuencia revuelta de la proteína A β es de igual forma inefectiva en modificar la disfunción mitocondrial. Por otro lado, el

hallazgo de que la sustancia P bloquea completamente los efectos de la A β en la reducción de MTT sugiere la interferencia de la interacción de la A β con la membrana. La sustancia P también previene los efectos neurotóxicos de la A β en vivo e in vitro. (Yankner et al., 1990, Kowall et al 19991); inhibe los efectos del A β en la liberación de aminoácidos excitadores por la despolarización de rebanadas de hipocampo (Arias et al., 1995) y, los dos péptidos tienen un grado de identidad alto por lo que se pueden unir al mismo complejo de serpinas (Joslin et al., 1991)

En comparación con los escasos efectos de la A β en la reducción de MTT, este péptido afecta profundamente la morfología de los sinaptosomas así como los niveles de proteína actina y sinaptofisina solo o en combinación con la rianodina.

El análisis de microscopia electrónica de los sinaptosomas incubados con A β muestra una disminución en el número de vesículas así como el reclutamiento en la zona de arresto y en la zona activa y la aparición de vesículas pleomórficas, sugiriendo que la A β es capaz de activar el mecanismo de exocitosis vesicular.

Los sinaptosomas incubados con rianodina y rianodina más A β mostraron cambios similares, además de un incremento en el perímetro de la membrana, la edema mitocondrial y la preservación de la integridad membranal lo cual se confirmó con la cuantificación en la liberación de LDH. Estos cambios son consistentes con el incremento del calcio intrasinaptosomal que puede activar el mecanismo de exocitosis vesicular y finalmente participar en la toxicidad sináptica. Hasta nuestro conocimiento, ésta es la primera demostración de que la A β y la rianodina inducen cambios estructurales similares a los observados después de períodos de intensa estimulación en la maquinaria involucrada en la liberación de neurotransmisores en terminales nerviosas aisladas del sistema nervioso central. (Leenders et al., 1999)

Los cambios estructurales antes mencionados se acompañaron de alteraciones bioquímicas en el contenido total de proteínas sinaptosomales como lo es la actina y la sinaptofisina. El análisis por inmunoblot mostró la reducción de la sinaptofisina en todas las condiciones experimentales. Esta pérdida puede estar asociada con la intensa depleción de vesículas inducida

por la activación del receptor a rianodina y por el péptido A β y/o por la activación de proteasas dependientes de calcio.

La proteína de citoesqueleto actina que también está implicada en el mecanismo de la neurotransmisión (Perrin y Aunis, 1985) y sus niveles están controlados durante la despolarización sinaptosomal. En esta última condición se facilita la liberación y polimerización de la actina. (Bernstein y Amburg, 1985). Los cambios en el estado de polimerización de la actina la pueden hacer más susceptible a alteraciones bioquímicas y/o incrementar su proteólisis. Esta proteólisis puede deberse a la activación de caspasas (resultado de la depleción de calcio de reservas endógenas) ya que como observamos en sinaptosomas incubados con A β solo o en combinación con rianodina, la presencia del inhibidor general de caspasas ZVAD, revierte la pérdida de la actina.

En vista de que los sinaptosomas de la corteza cerebral de la rata se ha usado como un modelo de presinapsis centrales, los resultados indican que la proteína A β en conjunción con la rianodina inducen cambios ultraestructurales y bioquímicos que pueden ser relevantes para entender algunos de los eventos patológicos que pudieran ser responsables de la pérdida sináptica en la EA.

X.3.- DISCUSIÓN, DESAFERENTACIÓN DE LA VÍA CORTEZA ENTORRINAL-HIPOCAMPO

Las alteraciones patológicas en la EA son la pérdida sináptica, la pérdida neuronal, la existencia de placas seniles y de marañas neurofibrilares. Del análisis de estas marcas histopatológicas en el parénquima de los sujetos con EA, se ha llegado a sugerir que existe un orden progresivo en el deterioro de algunas áreas. Lo anterior se apoya por la presencia de un daño inicial que sufre la corteza entorrinal seguido del deterioro en otras áreas de la formación hipocámpal como son, el giro dentado, el área CA3 y el área CA1. En particular, el deterioro de las células de la capa 2 de la corteza entorrinal resulta en la pérdida de la vía perforante lo que lleva a una desaferentación del giro dentado. Es de llamar la atención que la alteración más importante en estos sitios desaferentados, es la presencia de marañas neurofibrilares, acumulación de β A y la expresión de diferentes marcadores del ciclo celular

que sitúan a las células posmitóticas de estas áreas (Nagy, 1996; Nagy et al., 1998; Nagy, 2000 y Ross, 1996), en un estado de compromiso celular que resulta a su vez, por lo que indican algunos estudios, en la muerte celular apoptótica (Nagy, 2000).

Los resultados que se muestran en este trabajo indican que una lesión excitotóxica en la corteza entorrinal de la rata tiene un efecto importante capaz de incrementar la inmunoreactividad para las proteínas cdk5, cdk6 y PCNA en las células granulares, en la capa polimórfica y en las células de la capa molecular del giro dentado (FIG 8,9 y 10) con respecto a lo observado en el control (datos no mostrados). Esto sugiere que en efecto; la destrucción de las células de la capa 2 de la corteza entorrinal y por tanto sus proyecciones y contactos sinápticos hacia el giro dentado (vía perforante), promueve la expresión de moléculas que participan en el ciclo celular.

Como se ha mencionado se conoce que la Cdk5 se expresa en neuronas postmitóticas y participa en la elongación neurítica durante el desarrollo. Esta cinasa también se ha postulado que participa en la apoptosis en muchas células incluyendo las neuronas (Knockaert et al., 2002). En relación con esto, en algunos experimentos la expresión de los activadores conocidos para cdk5; como p35, p39 y p67 en la sustancia nigra después de la apoptosis inducida en las neuronas del estriado, se logró demostrar que la expresión y formación del complejo activado, cdk5/p35, es un efecto general de la muerte neuronal inducida por la desaferenciación en el modelo reportado por Neystat et al. (2001). Esta información puede sugerirnos que el aumento en la expresión de cdk5 en el giro dentado, del lado ipsilateral a la lesión de corteza entorrinal, puede representar el inicio de la muerte apoptótica o la participación de la cdk5 en fenómenos plásticos que intentaran compensar la pérdida de las aferencias provenientes de la corteza entorrinal. Llama la atención que los modelos referentes a los eventos asociados a la degeneración de áreas cerebrales relacionados con la EA demuestran que lesionar unilateralmente la corteza entorrinal con ácido iboténico en ratones adultos transgénicos que expresan el gen de la presenilina 1 se induce un aumento en la reorganización sináptica asociada con la expresión de la proteína sinaptofisina en el del giro dentado en comparación con los animales control, sugiriendo que el estado de plasticidad en los organismos transgénicos para esta proteína relacionada con

la EA, está exacerbada (Kadish et al., 2001). Es importante también mencionar que la expresión de cdk5 pudiera tener algún papel en la fosforilación de la proteína tau, que conforma a las marañas neurofibrilares. Para demostrar lo anterior se han realizando experimentos con el anticuerpo PHF1 (donado por P. Davies), que reconoce formas anormales de tau de cerebros de pacientes con EA. De estos experimentos podemos comentar que las células del giro dentado que expresan los marcadores del ciclo celular antes mencionados no presentan inmunoreactividad positiva para el anticuerpo contra PHF-1, sin embargo en las células de la región CA3 la inmunoreactividad para este anticuerpo coincide con la marca para los marcadores del ciclo celular incluido cdk5.

Los resultados presentados anteriormente respecto al incremento en cdk6 pueden ser complementarios a otros estudios como el análisis por inmunohistoquímica para explorar la expresión de ciclinas A, B, D y E (Nagy et al., 1998 y Nagy, 2000) y la proteína asociada a la apoptosis Bax en subregiones del hipocampo de individuos con epilepsia del lóbulo temporal, en donde se utilizó lobectomía para controlar la epilepsia. En estas condiciones se ha visto la expresión neuronal de estas proteínas, lo que sugiere que las neuronas han reentrado al ciclo de división celular o por lo menos expresan elementos que no se presentan normalmente en la fase G0 y además esto se acompañada de la expresión de la proteína Bax. Esto apunta a que la expresión de estas proteínas en neuronas postmitóticas se presenta debido un desajuste en el control del ciclo celular y puede estar relacionado con la activación de fenómenos de muerte celular de tipo apoptótico (Nagy et al., 1998) En nuestro modelo la expresión de cdk6 por un lado puede representar la entrada a la fase G1 del ciclo celular y llama la atención que ésta se ve simultánea a la expresión de Bax en las primeras horas posterior a la lesión. Como se mencionó anteriormente en el giro dentado no existe incremento en la reactividad para PHF-1 a pesar de que se detecta cdk5 y cdk6. una explicación de este fenómeno puede estar dada por los observaciones de Nagy en sujetos que padecieron de Alzheimer en los cuales se detectó la pérdida de las aferencias colinérgicas a la formación hipocampal con presencia de marcadores por apoptóticas (Bax) y sin marcas de fosforilación anormal de tau, de lo cual se puede desprender la idea general en la cual las áreas cerebrales

que tienen la capacidad de expresar moléculas proapoptóticas al detectar un desajuste en el estado de quiescencia no progresan en el ciclo celular mientras que las que no expresan moléculas como Bax sostienen un estado de senescencia en el cual la anomalía en el control de los elementos regulatorios del ciclo celular pueden ser la causa de la fosforilación anormal de la proteína tau. Situación que podría ser similar en nuestro modelo en el cual a tiempos largos la expresión de cdk5 y cdk6 se mantiene en CA3 y coincide con la inmunoreactividad exacerbada para PHF-1 y no se detecta expresión de Bax.

Por otro lado, es importante mencionar que la distribución y la inmunoreactividad de la proteína GFAP parece ser mayor en la capa polimórfica del giro dentado en el lado ipsilateral a la lesión de la corteza entorrinal en comparación con el lado contralateral (FIG 8) y con el control. La publicación de Wolfgang Schroder et al (1999), plantea una explicación en un modelo de reorganización de la circuitos en el giro dentado en el adulto después de una lesión electrolítica en la parte lateral de la corteza entorrinal (que induce, al igual que en nuestro modelo, la deafferentación de la capa molecular del giro), y que se acompaña de una fuerte reacción astrogliótica cuyos elementos celulares presentan una alta resistencia para la entrada de K^+ al reducir la corriente entrante rectificadora. Este tipo de respuesta glial se piensa que contribuye a un proceso de reparación y remodelamiento del circuito neuronal de la formación hipocampal además de que puede ser la representación del fenómeno de gliosis suponiendo que la desaferentación promueva la pérdida de elementos celulares en el giro dentado.

ANÁLISIS DEL CURSO TEMPORAL Y LA DOSIS DE ÁCIDO KAÍNICO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DEL CICLO CELULAR POSTERIOR A LA LESIÓN ESTEROTÁXICA.

De manera general podemos decir que efecto en la dosis 1nM/ μ l de ácido kaínico es la aparición a las 24 horas de los diferentes marcadores del ciclo celular en el giro dentado; representados en la tabla 2. A los 7 días de la lesión lo que hemos observado determina como en el giro dentado se mantiene la expresión, pero además se observa en la región CA3. finalmente al mes de la maniobra estereotaxica la marca inmunoreactiva se mantiene solo en la

región CA3. La explicación de este fenómeno puede ser un efecto de comunicación transináptica en las subregiones de la formación hipocampal. Como es conocido la corteza entorrinal proyecta tanto al giro dentado como a la región CA3. De alguna forma que en este trabajo no se esclarece esta comunicación hacia el giro dentado deja de inducir la expresión de los marcadores analizados o las células del giro ya no permitan la expresión por existir algún tipo de autorregulación. Sin embargo en la región CA3 en la cual la expresión es tardía la marca persiste hasta un mes después de la inyección de ácido kainico. Esta observación a manera de hipótesis puede tener relevancia con la fosforilación de tau en las fibras musgosas lo cual puede colocar a la región CA3 como un sitio de mayor plasticidad dendrítica que el giro dentado en el cual la plasticidad puede ser mas bien el resultado de un evento neurogénico. Que por lo menos con las pruebas que hemos efectuado (incorporación de BrdU) no es el caso.

Por otra parte el efecto de aumentar la dosis de 1 a 3 nanomolas/ μ l muestra que la expresión de los marcadores se da desde las 24 horas en las regiones analizadas (giro dentado y CA3), y de alguna forma conforme transcurre el tiempo se puede detectar un comportamiento similar a lo observado con una dosis de 1 nanomola/ μ l, es decir, la marca inmunoreactiva tiende a desaparecer en el giro dentado, mientras se sostiene en la región CA3 que coincide con el aumento en la inmunoreactividad para PHF-1.

SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA LESIÓN CON ÁCIDO KAÍNICO EN LA CORTEZA ENTORRINAL DE LA RATA

El significado funcional de la expresión de los diferentes marcadores del ciclo celular en el giro dentado apuntarían en primer lugar a la división celular en la zona subgranular, lo cual por el análisis de la incorporación de BrdU no parece ser el fenómeno asociado a esta expresión pues el nivel de incorporación es similar al que muestra el control de tal manera que se descarta a la lesión en la corteza entorrinal como un promotor de la neurogénesis en el giro dentado por lo menos en las condiciones experimentales de nuestro modelo. Una observación que podría contrastar con lo anterior es la presencia del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

en el giro dentado y en la región CA3. Esta molécula al ser parte del complejo de la polimerasa del ADN podría pensarse que tiene una función directamente asociada a la duplicación y por tanto posicionar a la célula en la fase S de ciclo celular, aunque de igual forma podría tener funciones tan solo de reparación del ADN o alguna participación relacionadas con la plasticidad, la activación de factores de transcripción y/o la reconexión de los circuitos neuronales.

Con respecto a la participación de los elementos del ciclo celular y su correlato con la muerte celular de tipo apoptótico en este trabajo se han utilizado 2 técnicas: la técnica de TUNEL y la inmunohistoquímica para Bax. De la técnica de TUNEL se desprende que no existe fragmentación que coincida con la expresión de moléculas del ciclo celular posterior a la lesión ni en el giro dentado ni en CA3. Por otra parte los resultados de la expresión de Bax indican que la reactividad para esta proteína coincide con la inmunoreactividad detectada para los marcadores del ciclo celular en el giro dentado. Esta marca de Bax como hemos mencionado anteriormente puede tener que ver con algún mecanismo que favorezca la quiescencia, la rediferenciación o la muerte celular en las células del giro dentado similar a lo que ha reportado Nagy con respecto de la pérdida selectiva de regiones, la expresión de distintos marcadores del ciclo celular que coinciden con el desorden neurofibrilar, mientras que en las zonas que presentan marcadores proapoptóticos en enfermos de Alzheimer no se acompañan con alteraciones relacionadas a la proteína tau.

Podemos decir que hasta el momento hemos podido reproducir de manera experimental, una situación observada en pacientes con EA, es decir, la pérdida de aferencias al giro dentado. Estos resultados apuntan a que la pérdida de la comunicación neuronal, blanco inicial en la EA, induce la expresión en marcadores de ciclo celular que pudieran representar en intento de remodelamiento de circuitos neuronales y/o que pueden conducir a la expresión de marcadores relacionados con la EA como puede ser la hiperfosforilación de tau.

XI.- CONCLUSIONES

Es estudio de los diferentes aspectos referentes al entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas nos brinda la posibilidad planear estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento adecuado para los individuos que sufren de algún desorden neuronal. En trabajo desarrollado en esta tesis tiene la finalidad de hacer una revisión de los aspectos mas importantes de la enfermedad de Alzheimer, que a su vez sirven de base para plantear algunos experimentos que pretenden resolver algunas preguntas que de alguna contribuyen al conocimiento de fenómenos celulares y bioquímicos relacionados con las lesiones que se presentan en la enfermedad de Alzheimer. El trabajo experimental desarrollado en este trabajo se divide en dos partes: En la primera parte se ha desarrollado un modelo para el estudio de la toxicidad de la proteína B-amiloide sobre terminales nerviosas aisladas, el cual se evaluó por medio del estudio estructural y funcional. Después de analizar los resultados podemos concluir que el fragmento activo 25-35 de la proteína A β inhibe tenuemente la transformación del MTT en los sinaptosomas controles. Sin embargo es de llamar la atención, que cuando los sinaptosomas son expuestos a una condición de despolarización, si se presenta toxicidad del A β sobre las terminales nerviosas aisladas. De igual forma cuando a nuestra preparación in Vitro se le añade rianodina a una concentración de 100nM el fragmento de la proteína A β ejerce un efecto toxico. Planteándose la posibilidad de que el mecanismo por el cual la rianodina induce toxicidad del A β sea debido a la liberación de Ca $^{2+}$ de los reservorios de Ca $^{2+}$ sensibles a rianodina. En concordancia con lo anterior, el análisis de microscopía electrónica en los sinaptosomas incubados con A β y rianodina muestran cambios morfológicos consistentes en la reducción de pequeñas vesículas sinápticas así como el reclutamiento de vesículas en la zona de liberación o zona activa. Finalmente, podemos mencionar que estos cambios estructurales y funcionales se acompañan con la reducción en los niveles de las proteínas: actina y sinaptofisina. Estos hallazgos en conjunto indican que la proteína A β y la activación del canal de rianodina inducen cambios ultraestructurales y bioquímicos los cuales pueden ser relevantes para el entendimiento de algunos eventos patológicos asociados a la pérdida sináptica como en la EA.

En segundo lugar se desarrollo un modelo in vivo referente a explorar los efectos de la desaferentación de giro dentado, en la activación de moléculas relacionadas con el ciclo celular. De los experimentos realizados para explorar esta idea podemos mencionar que la lesión con ácido kaínico en la corteza entorrinal promueve la expresión de marcadores del ciclo celular en el giro dentado y en el área CA3 del giro dentado. Teniendo que la dosis utilizada para producir la lesión afecta de manera diferencial la expresión de marcadores del ciclo celular puesto que: la concentración de 1 nanomola por 1 μ l de ácido kaínico promueve la expresión de los marcadores de ciclo celular a las células del giro dentado, mientras que la dosis de 3 nanomolas por 1 μ l afecta la expresión tanto en el giro dentado como en la región CA3. Es de llamar la atención que posterior a la lesión estereotáxica, la inmunoreactividad en el giro dentado tiene a desaparecer para las dos dosis utilizadas en la microinyección estereotáxica. Finalmente el significado funcional de la aparición de las distintas moléculas del ciclo celular abre una ruta de estudio importante para el desarrollo de nuevas hipótesis sobre los mecanismos que conducen a la pérdida neuronal en la EA.

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.

Arendt T., Dysregulation of neuronal differentiation and cell cycle control in Alzheimer's Disease, *J. Neural Transm. Suppl*, 2002; (62):77-85.

Arendt T., Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain, *Neurobiol. Aging*, 2000; Nov-Dec; 21(6):783-96.

Ascher P. y Nowak L., Quisqualate and Kinate activated channels in mouse centryal neurones in culture, *J. Physiol*, 1988; 399:227-245.

Baumann K., Mandelkow EM., Biernat J., Piwnica-Worms H., Mandelkow E., Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependentkinases cdk2 and cdk5, *FEBS Lett*, 1993; Dec 28;336(3):417-24.

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., Bamburg 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. y 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.

Bibb JA., Nishi A., O'Callaghan JP., Ule J., Lan M., Snyder GL., Horiuchi A., Saito T., Hisanaga S., Czernik AJ., Nairn AC y Greengard P., Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5, *J. Biol. Chem.*, Apr 27;276(17):14490-7. Epub 2001 Jan 29.

Birecree E., Whetsell WO., Stoscheck C., King LE., Nanney LB., Immunoreactive epidermal growth factor receptors in neuritic plaques from patients with Alzheimer's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1988; Sep; 47(5):549-60.

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 slices, *Neurosci.*, 1988; 89:182-186.

Blennow K., Increased frequency of a new polymorphism in the cell division cycle 2 (cdc2) gene in patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, *Neurosci. Lett.*, 2003; Apr 3; 340(1):69-73.

Braak H., Braak E., Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 1997; Jul-Aug; 18(4 Suppl):S85-8

Braugher JM., Involvement of lipid peroxidation in CSN injury, *J. Neurotrauma*, 1992; 1:51-57.

Breitner JC., The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Med.*, 1996; 47:401-11.

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 transport in the central nervous system, *Curr. Pharm. Des.*, 1999; 5:363-379.

Burdick D., Soreghan B y Kwon M., Assembly and aggregation properties in of synthetic Alzheimer's A4/ β amyloid peptide analogs, *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:546-554.

Busser J., Geldmacher DS., Herrup K., Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain, *J. Neurosci.*, 1998; Apr 15; 18(8):2801-7.

Buxbaum H., Characterization of routes for processing of the Alzheimer's beta/A4-amyloid precursor protein. Differential effects of phorbol esters and chloroquine, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992; 31:203-217.

Caporaso GL., Gandy SE., Buxbaum JD., Ramadhadran TV. y Greengard P, Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer B/a4 amyloid precursor protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992; 89:10075-10078.

Caricasole A., Copani A., Caruso A., Caraci F., Iacovelli L., Sortino MA., Terstappen GC, y Nicoletti F., The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel

therapeutic strategies in Alzheimer's disease?, Trends Pharmacol. Sci., 2003; May; 24(5):233-8.

Cataldo AM., Nixon RA., Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990; 87:3861-3865.

Cisek LJ., Corden JL., Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2, Nature, 1989; Jun 29; 339(6227):679-84.

Citron M., Oltersdorf T. y Haass C., Mutation of the B-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases B- protein production, Nature, 1996; 360:672-674.

Copani A., Condorelli F., Canonico PL., Nicoletti F. y Sortino MA, Cell cycle progression towards Alzheimer's disease, Funct Neurol, 2001; 16(4 Suppl):11-5.

Copani A., Guccione S., Giurato L., Caraci F., Calafiore M., Sortino MA. y Nicoletti F., The cell cycle molecules behind neurodegeneration in Alzheimer's disease: perspectives for drug development, Curr. Med. Chem., 2008; 15:2420-32.

Cosgaya JM., Latasa MJ. y Pascual A., Nerve growth factor and ras regulate beta-amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells, J. Neurochem., 1996; Jul; 67(1):98-104.

Dahmus ME., Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II, J Biol Chem., 1996; Aug 9; 271(32):19009-12.

Daniels MP., Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro, J. Cell. Biol., 1972; 53:164.

Davis PK., Dudek SM. y Johnson GV. Select alterations in protein kinases and phosphatases during apoptosis of differentiated PC12 cells, J. Neurochem., 1997; Jun; 68(6):2338-47.

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.

De Jonghe C., Esselens C., Kumar-Singh S., Craessaerts K., Serneels S., Checler F., Annaert W., Van Broeckhoven C. y De Strooper B., Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability, Hum. Mol. Genet., 2001; Aug 1; 10(16):1665-71.

Dickson DW. y Yen SH., Beta-amyloid deposition and paired helical filament formation: which histopathological feature is more significant in Alzheimer's disease?, Neurobiol. of aging, 1989; 10:402-403.

Drapkin R., Le Roy G., Cho H., Akoulitchev S. y Reinberg D., Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; Jun 25; 93(13):6488-93.

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.

Engert F. y Bonhoeffer T., Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity, *Nature*. 1999; May 6; 399(6731):66-70.

Esch FS., Kiem PS., Beattie EC., Blacher RW., Culwell AR., Oltersdorf T., McClure D. y Ward PJ., Clavage of amyloid Bpeptide during constitutive processing of its precursor, *Science*, 1990; 248:1122-1124.

Evan G. y Littlewood T., A matter of life and cell death, *Science*, 1998; Aug 28; 281(5381):1317-22.

Farber NB., Newcomer JW. y Olney JW., The glutamate synaptic in neuropsychiatric disorders, *Prog. Brain. Res.*, 1998; 116:421-437.

Ferrer I., Blanco R., Carmona M. y Puig B., Phosphorylated c-MYC expression in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *Neuropathol Appl. Neurobiol.*, 2001; Oct; 27(5):343-51.

Fratelli M., Minto M., Crespi A., Erba E., Vandenabeele P., Del Soldato P. y Ghezzi P., Inhibition of nuclear factor-kappaB by a nitro-derivative of flurbiprofen: a possible mechanism for antiinflammatory and antiproliferative effect, *Antioxid. Redox Signal*, 2003; Apr; 5(2):229-35.

Garrett S., Barton WA., Knights R., Jin P., Morgan DO. y Fisher RP., Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop, *Mol. Cell. Biol.*, 2001; Jan; 21(1):88-99.

Giovanni A., Keramaris E., Morris EJ., Hou ST., O'Hare M., Dyson N., Robertson GS., Slack RS. y Park DS., E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3, *J. Biol. Chem.*, 2000 275(16):11553-60.

Giaccone G., Tagliavini F., Linolo G., Bouras C., Frigerio L., Frabgione B. y Bugiani O., Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques, *Neurosci. Lett.*, 1989; 97:232-238.

Glennner GG. y 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

Goedert M., Jakes R., Crowther RA., Six J., Lubke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski JQ. y Lee VM.. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in

Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993; Jun 1; 90(11):5066-70.

Gomez-Pinilla F., Cummings BJ. y Cotman CW, Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology, *Neuroreport*, 1990; Nov-Dec; 1(3-4):211-4.

Greenamyre JT., Pharmacological pallidotomy with glutamate antagonists, *Ann. Neurol.*, 1996; 39:557-558.

Hardy J. y Gwinn-Hardy K., Genetic classification of primary neurodegenerative disease, *Science*, 1998; Nov 6; 282(5391):1075-9.

Haass C., Koo EH., Mellon A., Hung AY. y Selkoe DJ., Trangetig of cell- surface B-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments, *Nature*, 1992; 357:500-503.

Haass C. y Selkoe DJ., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007; 8: 101-12.

Hardy JA. y Higgins, GA., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, 1992; 256:184-185.

Hesse L., Behr D., Masters CL., y Multhaup G., The β A4 amyloid precursor protein binding to copper, *FEBS Lett.*, 1994; 349, 109–116.

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; 91:3270-3274.

Herrup K. y Arendt T., Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, 2002; Jun; 4(3):243-7.

Hisanaga S., Uchiyama M., Hosoi T., Yamada K., Honma N., Ishiguro K., Uchida T., Dahl D., Ohsumi K. y Kishimoto T., Porcine brain neurofilament-H tail domain kinase: its identification as cdk5/p26 complex and comparison with cdc2/cyclin B kinase. *Cell. Motil. Cytoskeleton.*, 1995; 31(4):283-97.

Hoozemans JJ., Bruckner MK., Rozemuller AJ., Veerhuis R., Eikelenboom P. y Arendt T., Graduate Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002; Aug; 61(8):678-88.

Hsia AY., Masliah E., McConlogue L., Yu GQ., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Malenka RC., Nicoll RA. y Mucke L., Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999; 96:3228-3233.

Ikonomovic MD., Mizukami K., Warde D., Sheffield R., Hamilton R., Wenthold RJ. y Armstrong DM., Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the brain of normal elderly and patients with Alzheimer's disease, *Esp. Neurol.*, 1999; 160:194-204.

Iqbal K. y Grundke-Ikbal., 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, pag:173.

Jarret JT., Beger EP. y 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 Lewy body disease, *Ann. Neurol.*, 1992; 32:582.

Johansson A., Hampel H., Faltraco F., Buerger K., Minthon L., Bogdanovic N., Sjogren M., Zetterberg H., Forsell L., Lilius L., Wahlund LO., Rymo L., Prince JA. y Blennow K., Increased frequency of a new polymorphism in the cell division cycle 2 (cdc2) gene in patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, *Neurosci. Lett.* 2003; Apr 3; 340(1):69-73.

Kang J., Lemaire HG., Unterbeck A., Salbaum JM., Masters CL., Grzeschik KH., Mulyhaup G., Beyreuther K. y Muller-Hill B., The precursor of purified amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, 1987; 325: 733-736.

Kater SB., Mattson MP., Cohan CS. y 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 Mitochondrial 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. y 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 role of the calcium regulation in brain aging, *Aging.*, 1989; 1:17-34.

Kimura H. y Schubert D., Amyloid β -protein activates tachykinin receptors and inositol trisphosphate accumulation by synergy with glutamate, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:7508-7512.

Koo EH., Sisodia SS., Archer DR., Martin LJ., Weidemann A., Beyreuther K., Fischer P., Masters CL. y Price DL., Precursor of amyloid Protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990; 87:1561-1565.

Lau LF., Seymour PA., Sanner MA., Schachter JB., Cdk5 as a drug target for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.*, 2002; Dec; 19(3):267-73.

Lavoie JN., L'Allemain G., Brunet A., Muller R. y Pouyssegur J., Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway, *Biol. Chem.*, 1996; Aug 23; 271(34):20608-16.

Li BS., Sun MK., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Vinade L., Kulkarni AB., Brady RO. y Pant HC., Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001; Oct 23; 98(22):12742-7.

Lorenzo A., Yuan M., Zhang Z., Paganetti PA., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Mautino J., Vigo FS., Sommer B. y Yankner BA., Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease, *Nat. Neurosci.*, 2000; 3:460-464.

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.

Maldonado E., Drapkin R. y Reinberg D., Purification of human RNA polymerase II and general transcription factors, *Methods Enzymol.*, 1996; 274:72-100.

Maccioni RB., Munoz JP. y Barbeito L., The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders, *Arch. Med. Res.*, 2001; Sep-Oct; 32(5):367-81.

Mann DMA., Brown AMT., Prinja D., Jones D. y 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. Neurobiol.*, 1990; 16:17-25.

Maragos WF., Greenamyre JT., Penney JB. y Young AB., Loss of hippocampal [3H] TCP binding in Alzheimer's disease, *Trends Neuroscience*, 1987; 10:65-68.

Masliah E., Mallory M., Alford M., DeTeresa R., Hansen LA., McKeel DW. y Morris JC., Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease, *Neurology*, 2001; 56:127-129.

Masters CL., Simms G., Weinman NA., Multhaup G., Mc-Donald BL. y Beyreuther K., Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985; 82:4245.

Mattson MP., Partin J. y Begley JG., Amyloid beta-peptide induce apoptosis related events in synapses and dendrites, *Brain Res.*, 1998; Oct 5; 807(1-2):167-176.

Mattson MP., Calcium as a sculptor and destroyer of neural circuitry, *Exp. Gerontol.*, 1992; 27:29-49.

Mattson MP., Dou P. y Kater SB., Outgrowth-regulating action 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.

Maurer I., Zierz S. y Möller HJ., A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients, *Neurobiol. Aging*, 2000; May-Jun; 21(3):455-62.

McShea A., Zelasko DA., Gerst JL., Smith MA., Signal transduction abnormalities in Alzheimer's disease: evidence of apathogenic stimuli, *Brain. Res.*, 1999; Jan 9; 815(2):237-42.

Mesulam MM., Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease bridging the gap between plaque and tangle. *Neuron*, 1999; 24:521-529.

Miller DL., Papayannopoulos IA., Styles J., Bobin SA., Lin YY., Bieman K. e Iqbal 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. y 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. Immunol. Methods.*, 1983; 65:55-63.

Mucke L., Masliah E., Yu GQ., Mallory M., Rockenstein EM., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K. y McConlogue L., High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J. Neurosci.*, 2000; 20:4050-4058.

Munoz JP., Sanchez JR. y Maccioni RB., Regulation of p27 in the process of neuroblastoma N2A differentiation, *J Cell Biochem.*, 2003; Jun 1; 89(3):539-49.

Nagy Z., The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med.*, 2005; 9:531-41.

Nagy Z., Esiri MM. y Smith AD., The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease *Neuroscience*, 1998; Dec; 87(4):731-9.

Nagy Z. y Esiri MM. Apoptosis-related protein expression in the hippocampus in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 1997; Nov-Dec; 18(6):565-71.

Nguyen MD., Mushynski WE. y Julien JP., Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration, *Cell. Death Differ.*, 2002; Dec 9(12):1294-306.

Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y. 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. y 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.

Ogawa O., Zhu X., Lee HG., Raina A., Obrenovich ME., Bowser R., Ghanbari HA., Castellani RJ., Perry G. y Smith MA., Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe?, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 2003; May; 105(5):524-8.

Oltersdorf T., Ward P., Henriksson T., Beattie EC., Neve R., Liebergurg I. y Fritz LC., The Alzheimer's amyloid protein identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway, *J. Biol. Chem.*, 1990; 265:4492-4497.

Oren M., Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.*, 1999; Dec 17; 274(51):36031-4.

Padua RA., Subcelular localization of ryadine receptors in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.*, 1996; 298:185-189.

Pappolla MA., Oltman RA., Kim KS. y Robakis NK., Immunohistochemical evidende of oxidative stress in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.*, 1992; 140:621-627.

Passer BJ., Pellegrini L., Vito P., Ganjei JK. y D'Adamio L, Interaction of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 with Bcl-X(L), A potential role in modulating the threshold of cell death. *J. Biol. Chem.*, 1999; Aug 20; 274(34):24007-13.

Pearson S., Measurement of plasma caffeine concentration by substrate labelled fluoroimmunoassay, *Ann. Clin. Briochem.* 1985; 21:208-212.

Percy AK., Gottfries J., Vilbergsson G., Mansson JE. y Svennerholm L., Glycosphingolipid glycosyltransferases in human fetal brain, *J. Neurochem.*, 1991; May;56(5):1461-5.

Pike CJ., Burdick D., Walencewicz AJ., Glabe CG. y 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. y Ulrich J., Deposition of beta/A4 protein along neuronal plasma membrenes in diffuse senile pleques, *Acta Neuropathol.*, 1991; 83:21-2917.

Prusiner SB., Scrapie prions, brain amyloid, and senile dementia, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 1985; 26:79-95.

Ranganathan S., Scudiere S. y Bowser R., Hyperphosphorylation of the retinoblastoma gene product and altered subcellular distribution of E2F-1 during Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, *J. Alzheimers Dis.*, 2001; Aug; 3(4):377-385.

Reaume AG., Howland DS., Trusko SP., Savage MJ., Lang DM., Greenberg BD., Siman R. y Scott RW., Enhances amyloidogenic processing of the bata-amiloid precursor protein in gene-targeted mice bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutations and a humsnizad A beta sequence, *J. Biol. Chem.*, 1996; 271:23380-23388.

Refolo LM., Salton SRJ., Anderson JP., Metha P. y 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. y Jenkins EC., 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. y Wisniewski HM., Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrevascular and the neuritic plaque core amyloid peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987; 84:4190-4194.

Roberson ED., Scarce-Levie K., Palop JJ., Yan F., Cheng IH., Wu T., Gerstein H., Yu GQ. y Mucke L., Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model, *Science*, 2007; May 4; 316(5825):750-4.

Rosen WG., Terry RD., Fold P., Katsman R. y Peck A., Pathological verification of ischemic score in differentiation of dementias, *Ann. Neuron.*, 1997; 7:486-488.

Rossiter JP., Anderson LL., Yang F. y Cole GM., Caspase-cleaved actin (fractin) immunolabelling of Hirano bodies, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2000; 26:342-346.

Ross ME., Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death, *Trends Neurosci.*, 1996; Feb; 19(2):62-8.

Saitoh T., Sundsmo M. y Roch JM., 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. y 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., Paolla MA. y Rodakis NK, Evidence for intracellular cleavage of th Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells, *J. Neurosci. Res.*, 1992; 33:319-329.

Sambamurti K., Reforo LM., Shioi J., Anderson JP, Paolla MA. y 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.

Satou T., Cummings BJ. y Cotman CW., Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity, *Brain Res.*, 1995; Oct 30; 697(1-2):35-43.

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; (71); 6:2349-2364.

Scheibel AB., Duong TH. y Jacobs R., Alzheimer's disease as a capillary dementia, *Ann. Med.*, 1989; 21:103-107.

Schmechel A., Zentgraf H., Scheuermann S., Fritz G., Pipkorn R., Reed, J., Beyreuther K., Bayer TA. y Multhaup G., Alzheimer β -amyloid homodimers facilitate AE fibrillization and the generation of conformational antibodies, *J. Biol. Chem.*, 2003; 278, 35317-35324,

- Schmidley 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
- Selkoe DJ., Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease, *Ann. Rev. Neurosci.*, 1989; 12:463-490.
- Selkoe DJ., Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science*, 2002; 298, 789-791.
- Senut MC., Roudier M., Davous P., Fallet-Bianco C. y Lamour Y., Senile dementia of the Alzheimer type: is there a correlation between entorhinal cortex and dentate gyrus lesions?, *Acta Neuropathol (Berl.)*, 1991; 82(4):306-15.
- Shiff SJ., Koutsos MI., Qiao L. y Rigas B., Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis, 1996.
- 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., Hypoglycemia 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. y Robakis NK., Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer β -amyloid precursor, *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:13819-13822.
- Shankar GM., Li S., Mehta TH., Garcia-Munoz A., Shepardson NE., Smith I., Brett FM., Farrell MA., Rowan MJ., Lemere CA., Regan CM., Walsh DM., Sabatini BL. y Selkoe DJ., Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory, *Nat. Med.*, 2008; 14:837-842.
- Shioi J., Refolo LM., Efthimiopoulos S. y 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. y 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.
- Siesjo BK., Bengtsson W., Grampp y Theander, Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1989; 568:234-251.
- Smith ML., Kontny HU., Bortnick R. y Fornace AJ., The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity, *Exp. Cell. Res.*, 1997; Jan 10; 230(1):61-8.

Smith RP., Higuchi DA. y Broze GJ., 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. y Wight 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, Am. J. Pathol., 1990; 137:1253-1267.

Sorbi S., Nacmias B. y Forleo P., Molecular genetics of Alzheimer's disease, Aging (Milano), 1998; Apr;10(2):157.

Stefanis L., Burke RE. y Greene LA., Apoptosis in neurodegenerative disorders, Curr. Opin. Neurol., 1997; Aug; 10(4):299-305.

Suzuki T., Oishi M., Marshak DR., Czernik AJ., Nairn AC. y Greengard P., Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein, EMBO J., 1994; Mar 1; 13(5):1114-22.

Subbarao KV., Richardson JS. y Ang LC., Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro, J. Neurochem., 1990; 55:342.

Sur M. y Cowey A., Cerebral cortex function and development, Neurol, 1995; 15:497-505.

Suzuki N. y Cheung T., An increase percentage of long amyloid β protein secreted by familiar amyloid β protein precursor mutants, Science, 264; 1336-1340.

Tanzi RE., Gusella JF. y Watkins PC., Amyloid β -protein gene; cDNA. MRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus, Science, 1988; 235:880-883.

Trojan S. y Pokorny J., Theoretical aspects of neuroplasticity, Physiol. Res., 1999; 48(2):87-97.

Tsai LH., Lee MS. y Cruz J., Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?, Biochim. Biophys. Acta., 2004; Mar 11; 1697(1-2):137-42.

Uxbaum JD., Oishi M., Chen H., Pinkas-Kramarski TV. y Greengard P., Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89:3055-3059.

Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. J Neurosci. 1997 May 15;17(10):3588-98.

Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum JM., Masters CL. y Beyreuther K., Identification, biogenesis, and localization of precursor of Alzheimer's disease A4 amyloid protein, Cell, 1989;57:115-126.

Weishaupt JH., Neusch C. y Bahr M., Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and neuronal cell death, Cell Tissue Res., 2003; Apr;312(1):1-8.

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 aniloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease, *Nature*, 1997; 389:689-695.

Yan SD., 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 neuritoxic effects of amiloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides, *Science*, 1989; 243:65-68.

Zhao L., Ma QL., Calon F., Harris-White ME., Yang F., Lim GP., Morihara T., Ubeda OJ., Ambegaokar S., Hansen JE., Weisbart RH., Teter B., Frautschy SA. y Cole GM.. Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease, *Nat. Neurosci.*, 2006; 9:234-242.

XIII. APÉNDICE

β -amyloid Peptide Induces Ultrastructural Changes in Synaptosomes and Potentiates Mitochondrial Dysfunction in the Presence of Ryanodine

Xavier Mungarro-Menchaca,¹ Patricia Ferrera,¹ Julio Morán,² and Clorinda Arias^{1*}

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

²Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

In Alzheimer's disease (AD), loss of synapses exceeds neuronal loss and some evidence suggests a role of β -amyloid protein (A β) in synaptic degeneration through a mechanism which may involve intraneuronal Ca²⁺ dys-homeostasis. Emerging evidence points to the participation of the internal Ca²⁺ stores in the pathophysiology of neurodegeneration in AD. To test the involvement of intrasynaptic Ca²⁺ mobilization in A β toxicity, we explored the role of ryanodine receptor activation in rat cortical synaptosomes taken as a model system for the central presynapses. Evaluation of synaptosomal mitochondrial redox capacity was assessed by the MTT reduction technique, and ultrastructural changes of synaptosomes after exposure to A β and ryanodine were evaluated by electron microscopy. Our results show that A β potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine and induces morphological changes consisting of mitochondrial swelling and intense small synaptic vesicles depletion. These changes were accompanied by a reduction in the content of synaptophysin and actin proteins. The reduction of actin immunoreactivity was reversed in the presence of a wide range caspase inhibitors, suggesting the activation of synaptic apoptotic mechanisms. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: synaptosomes; β -amyloid protein; ryanodine; calcium

Loss of synapses exceeds neuronal loss in Alzheimer's disease (AD) and seems to underlie the cognitive deficits that characterize this degenerative dementia (DeKosky et al., 1996). Some data suggest that synapses may be sites where neurodegenerative cascade may initiate, and in fact, the loss of the synaptic-associated protein synaptophysin has been taken as an early marker of neurodegeneration (Masliah et al., 1991). Moreover, in plaque-forming amyloid precursor protein transgenic mice, the developed

markers of active loss of synapses have been observed (Cole et al., 1999). Some evidence supports the notion that certain events that trigger neuronal death in AD can initiate with the local activation of caspases into the synaptic regions, and actually the term synaptic apoptosis has been used to describe some events of the apoptotic biochemical cascade locally activated in synapses and dendrites (Mattson et al., 1998a, b). Emerging evidence suggests the involvement of the internal Ca²⁺ stores in the pathophysiology of neurodegeneration in AD (Mattson et al., 2000). Among a complex array of proteins that regulate the uptake and release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum (ER), the ryanodine receptors (RyRs) may have a role in the pathogenesis of AD (Chan et al., 2000). Alterations in RyR binding and function have been found in early stages of AD that could be fundamental to the progression of both neurofibrillary and β -amyloid protein (A β) pathologies (Kelliber et al., 1999). On the other hand, high levels of RyRs are associated with synaptosomes and synaptosomal subfractions containing synaptic vesicles (Martinez-Serrano and Satrustegui, 1989; Padua et al., 1996) and these receptors may play a role in short- and long-term synaptic plasticity (Emptage et al., 2001).

Several lines of evidence suggest a potential role of Ca²⁺ in the neuronal actions of A β , which leads to a

Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 27512M; Contract grant sponsor: PAPIIT; Contract grant number: IN205700, UNAM.

*Correspondence to: Clorinda Arias, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510- México, D.F., México. E-mail: carias@servidor.unam.mx

Received 12 October 2001; Revised 7 December 2001; Accepted 18 December 2001

potentiation of, or vulnerability to, depolarization- and cytotoxic amino acid-induced Ca^{2+} influx (Mattson et al., 1992). However, at present it has not been clarified whether $\text{A}\beta$ induces its toxic effects through a mechanism which involves the ER-related Ca^{2+} stores located into presynaptic terminals and whether activation of RyRs could potentiate $\text{A}\beta$ toxicity. To study this hypothesis, we explored the actions of ryanodine on the toxicity of $\text{A}\beta$ fragment 25–35 in synaptosomes isolated from the rat cerebral cortex. In addition, we related the potentiation of $\text{A}\beta$ toxicity by ryanodine with ultrastructural changes in synaptosomes and with the degradation of the synaptic proteins synaptophysin and actin, which are a well-known substrate of caspases.

MATERIALS AND METHODS

Synaptosomal Preparation

Male Wistar rats (220–250 g) were killed by decapitation, and a purified synaptosomal fraction was obtained by the procedure described by Löscher et al. (1985), slightly modified. In brief, the cerebral cortex from both hemispheres was dissected on ice, homogenized in a solution containing 0.32 M sucrose and 5 mM HEPES, pH 7, and centrifuged at 3,500 for 10 min (4°C). The supernatant was layered onto 1 ml of 1.2 M sucrose and centrifuged at 50,000 rpm (4°C) 20 min. The gradient interphase was carefully collected and diluted with 0.32 M sucrose to a final volume of 2 ml. The diluted suspension was then layered onto 1 ml 0.8 M sucrose and centrifuged for 20 min at 50,000 rpm. This yielded a synaptosomal pellet which was resuspended in 2 ml of a Locke's solution, containing (in mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2.3 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 3.6 NaHCO_3 , 5 glucose, and 5 HEPES, pH 7.2. Aliquots of 200 μl containing 200 μg synaptosomal protein were incubated during 2, 3, or 4 hr at 37°C in different conditions: high K^+ (50 mM); $\text{A}\beta$ protein fragment 25–35 (50 μM , Sigma St. Louis, MO) and its scramble sequence (NH₂-IMLKNGASIG-COOH, obtained from Macromolecular Analysis Lab., Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) in the presence or absence of ryanodine (10 μM and 100 nM), dantrolene (100 nM), and substance P (50 μM ; Sigma, St. Louis, MO). For the experiments in the absence of extracellular Ca^{2+} , 100 μM EGTA was added to the synaptosome suspension.

Evaluation of the Mitochondrial Function in Synaptosomes

The method employed in the present study is similar to those previously described in cultured cells to evaluate metabolic activity through the conversion of the tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions (Mosmann, 1983). In brief, MTT was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) to a concentration of 5 mg/ml and was added to synaptosomes 1/10 (vol/vol) after 2, 3, or 4 hr of incubation with the different treatments and allowed to incubate for 1 more hr. Then synaptosomes were centrifuged and the pellet solubilized with 2-isopropanol acid (0.5 ml). The absorbance of each sample was quantified at 570 nm using a spectro-

photometer (Pharmacia Biotech, Gaithersburg, MD). Results are expressed as relative units of MTT reduction or as percentages of control values. Values are means \pm S.E.M. of six to 10 independent determinations made in duplicate. Statistical significance was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test.

Electrophoresis and Immunoblot

The total amount of synaptosomal protein was determined by a Bio-Rad (Richmond, CA) analytical procedure. Ten μg of protein were loaded in a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel and subsequently transferred to nitrocellulose paper. After 1 hr incubation in PBS solution containing 5% albumin, the blots were incubated with the actin polyclonal antibody (1:500, Dako, Carpinteria, CA, clone AC-74) which recognized an epitope located on the N-terminal end of the β isoform of actin (42 kD) or with the synaptophysin monoclonal antibody (1:500, BioRad, Richmond, CA). The antibodies were left overnight at 4°C , and washed three times with PBS (5 min each). Then the blots were processed using an anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:500) and the ABC-biotin-avidin-peroxidase kit (Vector, Burlingame, CA), with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative control consisted of eliminating the primary antibody from the procedure. In experiments to explore the protective effects of the caspase inhibitor Z-VAD(OMe)FMK-O-methylated (ZVAD, Enzyme Systems Products, Livermore, CA), synaptosomes were incubated in the presence of ryanodine, $\text{A}\beta$ 25–35, or ryanodine plus $\text{A}\beta$ 25–35 with 100 μM of ZVAD during 3 hr. Western blots were densitometrically analyzed by using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard, Corvallis, OR). The data were analyzed with a ANOVA followed by Student's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, San Diego, CA) was used for calculating probability values.

Lactate Dehydrogenase Assay

Lactate dehydrogenase (LDH) activity release into the extrasynaptosomal media was determined using the spectrophotometric method based on the measurement of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) oxidation in a pyruvate-containing medium (Bergmeyer et al., 1963). Results are expressed as the percentage of maximal releasable LDH by control synaptosomes lysis freshly obtained (5 min), using 0.5% Triton X-100.

Electron Microscopic Analysis

Two hundred μg of synaptosomal protein were pelleted and fixed for 30 min in 3% glutaraldehyde, pH 7.4. After rinsing in phosphate buffer, the pellet was postfixated in 1% osmium tetroxide. Sections were embedded in resin (Epon) and cut with a diamond knife stained with uranyl acetate. For each experimental condition, three separate experiments were conducted and from each individual experiment eight micrographs (8,000 \times and 25,000 \times), showing 10 synaptosomal sections from each experimental condition, were randomly taken and the number of small synaptic vesicles (SSV), number of synaptosomes with clustered vesicles, as well as the total perimeter per synaptosome were analyzed.

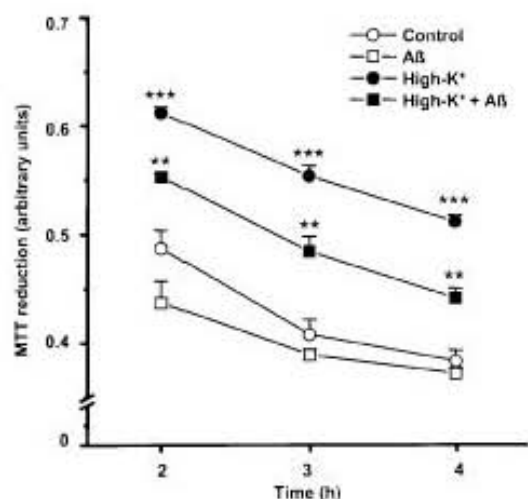


Fig. 1. Temporal course of effects of high K^+ (50 mM) and β -amyloid fragment 25–35 (A β 25–35; 50 μ M) on the redox activity of synaptosomes isolated from cerebral cortex. Synaptosomes were incubated during 2, 3, and 4 hr according to the protocol described in Materials and Methods. After incubation, the synaptosomal redox activity was evaluated by the MTT assay. Data are expressed as relative units of absorbance, and are the mean \pm S.E.M. of duplicate determinations of six to eight different experiments. ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.

RESULTS

A β 25–35 Potentiates Mitochondrial Dysfunction Induced by Ryanodine

To assess the effects of A β fragment 25–35 in synaptosomes and the role of depolarization-induced Ca^{2+} entry into the nerve terminals, we incubated synaptosomes in different conditions: control medium, medium containing 50 μ M of A β , high K^+ (50 mM), and high K^+ plus A β conditions during 2, 3, and 4 hr. Figure 1 shows the temporal course of relative MTT reduction in the aforementioned conditions. In the high K^+ condition, a significant increase in MTT reduction up to 40% at all times studied was observed. While A β alone reduced mitochondrial redox activity at 2 and at 3 hr (10% and 8%, respectively, compared to the control), when coincubated with high K^+ , the MTT reduction was diminished at 2, 3, and 4 hr, up to 12% (compared to the high K^+ condition), although it continued above the control values.

In order to study the effect of internal Ca^{2+} mobilization on mitochondrial redox function, in the next experiments we explored the role of RyRs activation in the presence and absence of A β . Figure 2 shows the effect of different ryanodine concentrations on MTT reduction after 3 hr of incubation, a time when we previously observed the maximum inhibitory effects of ryanodine on MTT reduction. At an open-channel concentration

(100 nM), ryanodine diminished MTT reduction nearly to 40% and in the presence of A β 25–35, up to 60%. Higher ryanodine concentration (100 μ M), a condition to close the RyRs, had no effect on MTT transformation either alone or in combination with A β . Synaptosomes treated with 5 mM of caffeine (which induces Ca^{2+} release from ryanodine-sensitive stores) showed similar changes on MTT transformation to those induced by ryanodine by itself or in combination with A β 25–35 (Fig. 2).

To determine whether A β peptide may potentiate the ryanodine effects by a mechanism related to internal Ca^{2+} mobilization, the next experiments were done in the absence of external Ca^{2+} (plus 100 μ M of EGTA) or in the presence of the ryanodine receptor blocker, dantrolene (100 nM). Ryanodine-induced inhibition of MTT reduction was totally independent of external Ca^{2+} , and dantrolene, which did not have any effect by itself, was capable to reverse the effects of ryanodine and ryanodine plus A β (Fig. 2). The effects of A β peptide on ryanodine-induced mitochondrial dysfunction were not observed when scrambled sequence of the peptide was used (Fig. 3), which points to the specificity of their biological effects. Interestingly, the toxic effects of A β in combination with ryanodine were completely reversed in the presence of the tachykinin agonist, substance P (Fig. 3). In order to explore the contribution of endogenous glutamate release on the synaptic toxicity induced by A β and ryanodine, we incubated synaptosomes with the N-methyl D-aspartate receptor blocker MK-801 (5 μ M). This compound did not reverse the inhibition of MTT reduction (results not shown).

A β 25–35 and Ryanodine Induced Ultrastructural Changes in Synaptosomes

Electron microscopic analyses of control synaptosomes and synaptosomes incubated with ryanodine and A β are shown in Figure 4. Control synaptosomes incubated for 3 hr in basal medium showed characteristic morphological features consisting of a well-sealed membrane containing numerous SSV (38 \pm 2) and one or more mitochondria (Fig. 4A). After 3 hr, synaptosomes incubated with ryanodine (Fig. 4B), A β (Fig. 4C) and ryanodine plus A β (Fig. 4D) showed reduced number of SSV (22 \pm 2, 17 \pm 2, and 22 \pm 4, respectively, Table I) as well as the appearance of pleomorphic vesicles (Fig. 4). In many cases, it was possible to observe clustering of SSV and docking to the active zone of the synapsis (Fig. 4 and Table I). Another morphological feature observed after ryanodine and A β incubation was a slight increase of the total synaptosomal membrane perimeter (2,920 \pm 120 nm from control compared to 3,479 \pm 140 nm, 4,172 \pm 180 nm, 4,585 \pm 150 nm after ryanodine, A β , and A β plus ryanodine, respectively, Table I). When synaptosomes were incubated with ryanodine plus A β , mitochondrial swelling was more apparent (Fig. 4D). In all cases, albeit the profound ultrastructural changes observed, the synaptosomal external membrane was maintained sealed as demonstrated by the lack of LDH efflux (see inset in Fig. 4).

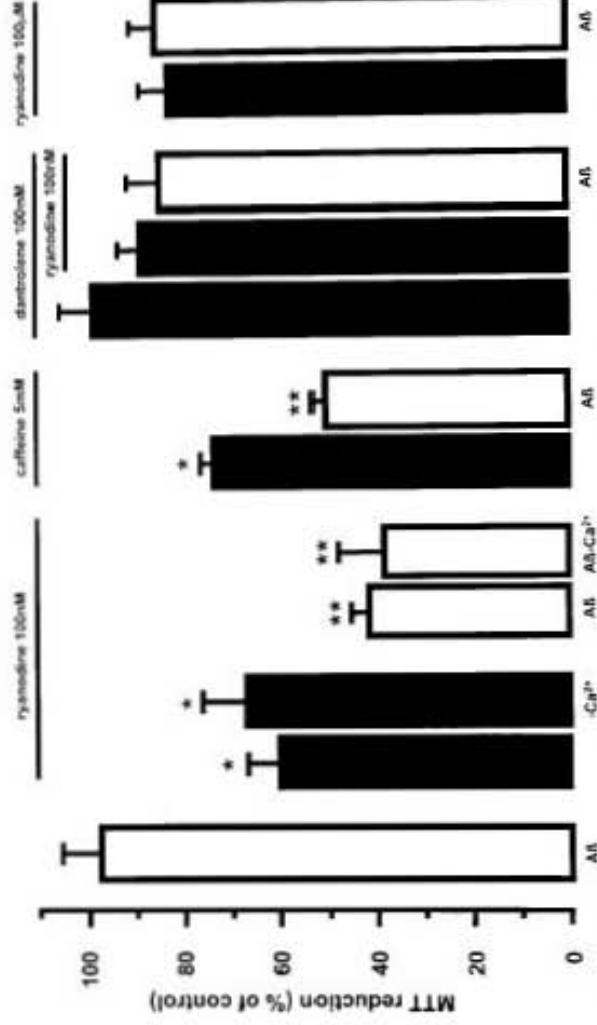


Fig. 2. Effect of A β 25–35 and ryanodine on mitochondrial redox activity after 3 hr of incubation. Synaptosomes were exposed to ryanodine at an open channel concentration (100 nM) in the presence or absence of external Ca²⁺ (with 100 μ M of EGTA) and in the presence or absence of A β 25–35 (50 μ M). Caffeine (5 nM) was also tested with

and without A β 25–35. The specificity of ryanodine effects was assessed using ryanodine at a closed channel concentration (100 μ M) and dantrolene (100 nM). The data expressed as the percentage of control values are the mean \pm S.E.M. of duplicate determinations of six to 10 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Synaptophysin and Actin Levels

Loss of the vesicle-associated protein synaptophysin has been used as a mark of synaptic loss in AD. We therefore determined synaptophysin levels by immunoblot after 3 hr incubation on synaptosomal homogenates using a monoclonal antibody. In Figure 5, we observed synaptophysin levels from control (Fig. 5, lane 1), ryanodine (Fig. 5, lane 2) A β (Fig. 5, lane 3), and ryanodine plus A β (Fig. 5, lane 4), and densitometric analysis of the bands showed significantly reduced levels up to 20%, 25%, and 35%, respectively, as compared to the control. The loss of synaptophysin immunoreactivity was not reverted in the presence of ZVAD (results not shown).

In order to determine whether changes in MTT were associated with cytoskeletal protein disruption and the role of activated caspases in this process, we examined the effects of ryanodine and A β on actin levels. Homogenates of purified synaptosomal fraction contained a 42-kDa band which corresponds to actin protein. Levels of actin were diminished in synaptosomes incubated with ryanodine, A β , and ryanodine plus A β (Fig. 6, lanes 2, 4, and 6, respectively), compared to the control (Fig. 6, lane 1). Interestingly, the wide range caspase-inhibitor ZVAD significantly reversed the reduction of actin immunoreactivity in all cases (Fig. 6, lanes 3, 5, and 7).

DISCUSSION

A β Diminished Mitochondrial Redox Function in the Presence of Ryanodine

Present results demonstrate that the A β fragment 25–35 in combination with ryanodine potentiated mitochondrial dysfunction and altered synaptic morphology accompanied with a loss of the synaptic proteins synaptophysin and actin.

Control synaptosomes showed a diminished mitochondrial redox function (measured as MTT reduction) over time, as can be expected for an *in vitro* aging preparation, and incubation with A β peptide produced a slight inhibition of this reduction at 2 and 3 hr (10% and 8%, respectively), similar to that reported by others (Pereira et al., 2000).

Some evidence indicates that A β contributes to the loss of internal Ca²⁺ homeostasis (Hartmann et al., 1993; Mattson et al., 1993) but the precise mechanism involved in such action has not been clarified. To compare the effects on synaptosomal MTT reduction by Ca²⁺ mobilization from different routes and the contribution of A β to such effects, we compared the role of K⁺ depolarization to the activation of RyRs. While high K⁺ enhanced MTT reduction, synaptosomes incubated with an open-channel

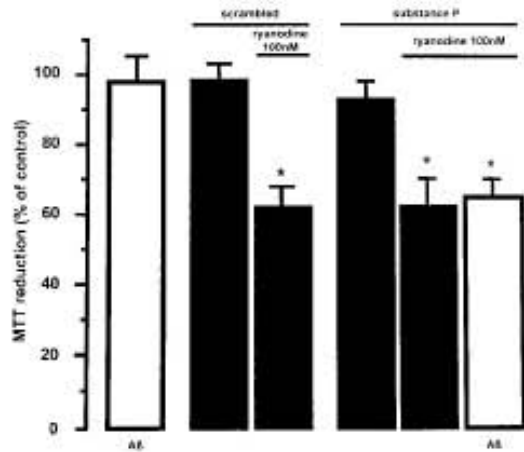


Fig. 3. Effect of scrambled sequence of A β 25–35 and substance P on mitochondrial redox activity. The scrambled sequence of A β did not have effects on MTT reduction and did not potentiate the effects of ryanodine. The effect of A β 25–35 in combination with ryanodine was blocked by substance P but not the effect of ryanodine itself. The data expressed as the percentage of control values are the mean \pm S.E.M. of duplicate determinations of four to six independent experiments. * $P < 0.05$.

concentration of ryanodine diminished mitochondrial function. It has been proposed that, contrary to the Ca $^{2+}$ hypothesis, the relationships between Ca $^{2+}$ load and neurotoxicity depend primarily on the route of Ca $^{2+}$ influx, but not the Ca $^{2+}$ load (Sattler et al., 1998). High K $^{+}$ depolarization leads to Ca $^{2+}$ loads incurred through voltage-sensitive Ca $^{2+}$ channels. Given that most Ca $^{2+}$ ions that enter into a neuron under physiological conditions are buffered, an activation of glucose utilization by synaptosomes can be expected. In fact, addition of high K $^{+}$ to synaptosomes stimulates oxygen consumption and mitochondrial energy production (Erecinska et al., 1991). This metabolic situation can enhance MTT reduction by mitochondria.

The presence of smooth endoplasmic reticulum in presynaptic nerve terminals has been demonstrated, which is often found in close apposition to mitochondria and plasma membrane (McGraw et al., 1980), as well as in high levels of RyRs (Padua et al., 1996). This evidence suggests an important role of ryanodine-sensitive Ca $^{2+}$ pools in determining the Ca $^{2+}$ -mediated process in presynaptic physiology.

Our results showed that ryanodine diminished MTT reduction, which supports the role of ryanodine-sensitive Ca $^{2+}$ pools in mitochondrial dysfunction. To support this conclusion we found: (1) the concentration- and use-dependent modulating effect of the RyRs by ryanodine

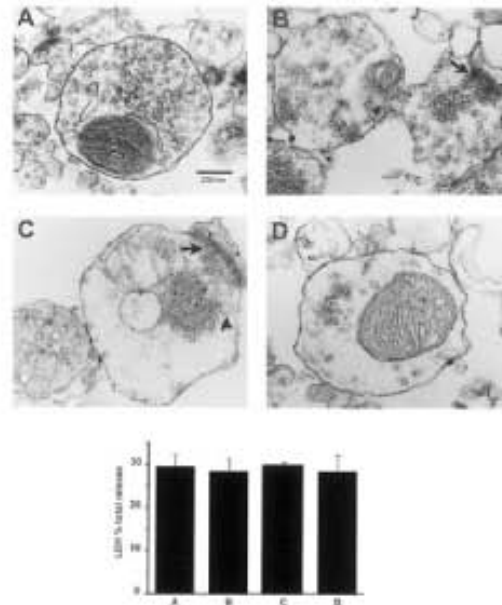


Fig. 4. Electron micrographs of cortical synaptosomes, and release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Synaptosomes were exposed for 3 hr to different treatments as described in Materials and Methods. **A:** Control synaptosome isolated from rat cerebral cortex. **B:** Synaptosome incubated with 100 nM of ryanodine. **C:** Synaptosome incubated with A β 25–35 50 μ M. **D:** Synaptosome after co-incubation with ryanodine and A β 25–35. Small synaptic vesicles (SSV) docked at the active zone are indicated by arrows and pleomorphic vesicles by arrowhead. Magnification $\times 25,000$. LDH release was used as an index of integrity of synaptosomal membrane and is expressed as percentage of the maximum LDH activity releasable by fresh synaptosome lysis using 0.5% Triton X-100. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of four experiments.

was in accord with an internal Ca $^{2+}$ mobilization (Meissner, 1986), (2) at an open channel concentration, the effects of ryanodine were totally independent of external Ca $^{2+}$, (3) the inhibition of MTT reduction was totally blocked with dantrolene, and (4) caffeine induced effects similar to 100 nM ryanodine. Interestingly, when ryanodine was cocubated with A β 25–35 the mitochondrial dysfunction was enhanced. Present findings show that the effects of A β on MTT reduction occurred only under K $^{+}$ depolarization and ryanodine incubation, which suggests that alterations in the intrasynaptosomal homeostasis of Ca $^{2+}$ are involved in A β effects. Consistent with this interpretation is the fact that in cortical synaptosomes and in cultured neurons, the increase of cytoplasmic Ca $^{2+}$ concentration induced by K $^{+}$ depolarization, excitatory amino acids, or the calcium ionophore A23187 is poten-

TABLE 1. Quantification of Diverse Parameters of Ultrastructural Changes of Synaptosomes Treated With Ryanodine and A β 25-35[†]

<i>n</i>	Control (37)	Ryanodine (26)	A β 25-35 (24)	Ryanodine + A β 25-35 (19)
Synaptic vesicle (total number)	38 \pm 2	22 \pm 2*	17 \pm 2**	22 \pm 4*
Synaptosomes with clustered vesicles	0	21 \pm 1**	15 \pm 1**	22 \pm 1**
Synaptic perimeter (μ m)	2.92 \pm 0.12	3.48 \pm 0.14*	4.17 \pm 0.18*	4.59 \pm 0.15*

[†]Results are the mean \pm S.E.M. of the total number of counted synaptosomes (*n* = in parenthesis), from three different experiments of each condition in nine fields of 7 \times 9 μ m².

P* < 0.05; *P* < 0.005 (experimental compared with control).

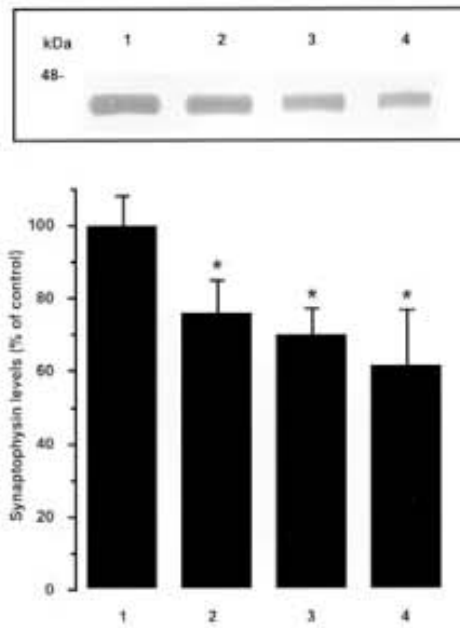


Fig. 5. Representative Western blot and densitometric analysis of synaptophysin levels from cortical synaptosomes exposed for 3 hr to ryanodine and A β 25-35. **Lane 1:** Control synaptosomes; **lane 2:** synaptosomes incubated with ryanodine 100 nM; **lane 3:** synaptosomes incubated with A β 25-35 50 μ M; and **lane 4:** synaptosomes incubated with ryanodine plus A β 25-35. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of five experiments. **P* < 0.05.

tiated and maintained for considerably longer periods when A β peptide has been present in the medium (Mattson et al., 1992, 1993; Hartmann et al., 1993; MacManus et al., 2000).

Although the mechanism by which A β -induced toxicity has not been firmly yet established, our findings support the possibility that in synaptosomes, A β may exert its effects directly on ER-mediated Ca²⁺ stores, considering that even in absence of external Ca²⁺ (with 100 μ M EGTA), the A β fragment 25-35 potentiated the inhibition

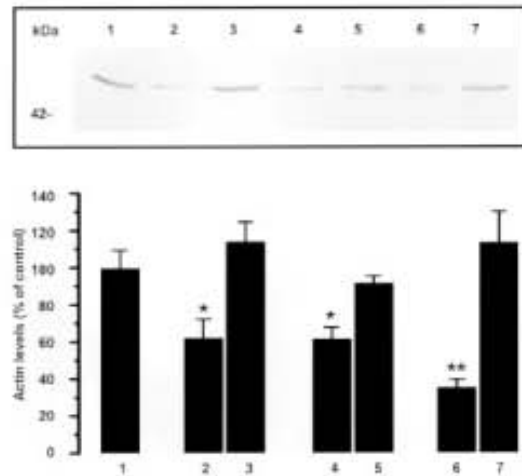


Fig. 6. Representative Western blot and densitometric analysis of actin levels from cortical synaptosomes exposed for 3 hr to ryanodine, A β 25-35, and the caspase inhibitor, Z-VAD(OMe)FMK-O-methylated (ZVAD). Control actin levels (**lane 1**); ryanodine 100 nM (**lane 2**); ryanodine 100 nM plus ZVAD 100 μ M (**lane 3**); A β 25-35 50 μ M (**lane 4**); A β 25-35 plus ZVAD (**lane 5**); ryanodine plus A β 25-35 (**lane 6**), and ryanodine plus A β 25-35 in the presence of ZVAD (**lane 7**). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of seven experiments. **P* < 0.05; ***P* < 0.005.

produced by ryanodine on MTT reduction. Supporting this hypothesis, A β 25-35 has been shown to stimulate the activity of phospholipase C and increase levels of inositol-phosphates in cultured neurons (Singh et al., 1997) and in human platelets (Ishikawa et al., 1998).

The lack of effect of substance P on MTT reduction in combination with ryanodine suggests that a specific amino acid sequence present in A β 25-35 is required for its inhibitory effects on MTT reduction. This hypothesis is supported by the fact that a scrambled sequence of the A β peptide was also ineffective in modifying mitochondrial function. On the other hand, the finding that substance P completely blocked the effects of A β on MTT reduction suggests that the former interferes with the interaction of

fragment 25–35 with the synaptosomal membrane. Substance P also prevents the neurotoxic effects of fragment 25–35, both in vivo and in cell cultures (Yankner et al., 1990; Kowall et al., 1991) and inhibits the effects of A β 25–35 on excitatory amino acid release from depolarized hippocampal slices (Arias et al., 1995).

Ultrastructural Alterations and Protein Changes Induced by A β and Ryanodine

A β 25–35 profoundly affected synaptosomal morphology as well as the levels of synaptophysin and actin proteins alone or in combination with ryanodine.

Electron microscopic analysis of synaptosomes incubated with A β showed a depletion in SSV content as well as recruitment to and docking at the active zone and the appearance of pleomorphic vesicles, suggesting that A β is capable of activating the mechanism of vesicular exocytosis. Similar changes were observed after synaptosome exposure to ryanodine and ryanodine plus A β . Interestingly, synaptosomes incubated with A β , ryanodine, or ryanodine plus A β showed a slight increase in the total surface area, mitochondrial swelling, and a well-preserved integrity of the external membrane, which was confirmed with the experiments on LDH escape. This is the first demonstration to our knowledge that A β protein and RyRs activation induced ultrastructural changes similar to those observed after a period of intense stimulation of the machinery involved in vesicular exocytosis in isolated nerve terminal from central nervous system.

The ultrastructural changes observed in cortical synaptosomes were accompanied by biochemical alterations in the total content of the synaptic proteins synaptophysin and actin. Immunoblot analysis showed a reduction in synaptophysin content in all experimental conditions. This loss may be associated with the intense vesicle depletion induced by RyRs activation and by A β peptide.

The cytoskeletal protein actin is a target substrate for caspases (Mashima et al., 1995) and is a major component of nerve terminals (Toh et al., 1976). The observed marked reduction of actin immunoreactivity may be due to the activation of local caspases, which is supported by the fact that the wide range caspase inhibitor ZVAD reverted this reduction. In our experimental conditions, caspases activation probably results from the RyRs activation and mitochondrial failure induced by A β and ryanodine.

In view that synaptosomes from rat cerebral cortex were taken as a model system for the central presynapse, present results indicate that A β protein in conjunction with the RyRs activation induced significant ultrastructural and biochemical changes, which may be relevant to understanding some of the pathological events underlying synaptic loss in AD.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Mauricio Diaz Muñoz and Ricardo Tapia for helpful suggestions, and Isabel Pérez-Montfort for the revision of the English manuscript.

REFERENCES

- Arias C, Arrieta I, Tapia R. 1995. β -amyloid peptide fragment 25–35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 1:561–566.
- Bergmeyer HU, Bent E, Hess B. 1983. Lactic dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. p 736–741.
- Cole GM, Yang F, Chen PP, Fraunholz SA, Hsiao K. 1999. Caspase activation in dystrophic neurites in Alzheimer's disease and aged HsA-PPsw transgenic mice. In: Iqbal K, Swaab DF, Winblad B, Wisniewski HM, editors. *Alzheimer's disease and related disorders: etiology, pathogenesis, and therapeutics*. New York: Wiley & Sons. p 363–369.
- Clatz SL, Mayne M, Holden CP, Griger JD, Mattson MP. 2000. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* 275:18195–18200.
- DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. 1996. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5:417–421.
- Emptage NJ, Reid CA, Fine A. 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29:197–208.
- Erecinska M, Nelson D, Chaner B. 1991. Depolarization-induced changes in cellular energy production. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7600–7604.
- Hartmann H, Eickert A, Müller WE. 1993. β -amyloid protein amplifies calcium signaling in central neurons from the adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1216–1220.
- Ishikawa H, Ozawa H, Saito T, Takahara N, Takemura H. 1998. Calcium mobilization evoked by amyloid β -protein involves inositol 1,4,5-triphosphate production in human platelets. *Life Sci* 62:705–713.
- Kellier M, Faston J, Cowburn RF, Bonkale W, Ohm TG, Ravid R, Sorrentino V, O'Neill C. 1999. Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience* 92:499–513.
- Kowall NW, Deal MF, Buciglio J, Duffy LK, Yankner BA. 1991. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7247–7251.
- Lüscher W, Bohme G, Müller F, Pagliusi S. 1985. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45:879–889.
- McGraw CF, Sonsho AV, Blaustein MP. 1980. Probing for calcium in presynaptic nerve terminals. *FASEB* 39:2796–2801.
- MacManus A, Ramsden M, Murray M, Henderson A, Pearson HA, Campbell V. 2000. Enhancement of $^{45}Ca^{2+}$ influx and voltage-dependent Ca^{2+} channel activity by β -amyloid (1–40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. *J Biol Chem* 275:4713–4718.
- Martinez-Semano A, Saratogai J. 1989. Caffeine-sensitive calcium stores in presynaptic nerve endings: a physiological role? *Biochem Biophys Res Commun* 161:965–971.
- Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. 1995. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217:1185–1192.
- Masilah E, Terry RD, Alford M, De Teresa R, Hansen LA. 1991. Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138:235–246.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberberg L, Rydel RE. 1992. β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376–389.

- Mitson MP, Burger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel R. 1993. β -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16:409-414.
- Mitson MP, Parin J, Begley JG. 1998a. Amyloid β -peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain Res* 5:167-716.
- Mitson MP, Keller JN, Begley JG. 1998b. Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol* 153:35-48.
- Mitson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leisring MA, Stepel PN, Geiger JD. 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23:222-229.
- Meisner G. 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:6300-6306.
- Musman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Padua RA, Nagy JJ, Geiger JD. 1996. Subcellular localization of ryanodine receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 248:185-189.
- Pereira C, Moreira P, Seica R, Santos MS, Oliveira CR. 2000. Susceptibility to β -amyloid-induced toxicity is decreased in Goto-Kakizaki diabetic rats: involvement of oxidative stress. *Exp Neurol* 161:383-391.
- Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tyrmiński M. 1998. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2349-2364.
- Singh IN, Sorrentino G, Kaufner JN. 1997. Amyloid β protein (25-35) stimulation of phospholipase C in LA-N-2 cells. *J Neurochem* 69:252-258.
- Tob BH, Gallichio HA, Jeffrey PL, Livert BC, Muller HK, Cauchi MN, Clarke FM. 1976. Anti-actin stains synapses. *Nature* 264:648-650.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β -protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.