



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA TRANSDUCCIONAL INVOLUCRADA EN LOS
EFECTOS DE LA PROTEÍNA BETA AMILOIDE SOBRE LA DINÁMICA DE LAS
REDES NEURONALES DEL HIPOCAMPO**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. HUGO BALLEZA TAPIA

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
UNIDAD DE BIOMEDICINA DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO, IZTACALA-UNAM
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS, IFC-UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 2014



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 9 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Sede Sur; y en el Laboratorio de Circuitos Neuronales (C-01) del Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Fernando Peña Ortega.

Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos del CONACYT (151261; 181323), de la Alzheimer's Association (NIRG-11-205443) y de la DGAPA-UNAM (IACODI1201511; IB200212)

A lo largo del Doctorado conté con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; número de BECARIO 255776).

RESUMEN

La enfermedad del Alzheimer (EA) es la patología neurodegenerativa más común en la población adulta. Se ha reportado que las formas solubles de la proteína beta amiloide ($A\beta$), que se asocian a esta enfermedad y que se presentan mucho antes de las placas seniles, afectan diversas funciones neuronales implicadas en procesos cognoscitivos y, de esta manera, parecen ser las responsables de los síntomas tempranos de la EA. Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos a través de los cuales la $A\beta$ altera la funcionalidad de los circuitos neuronales relevantes para los procesos cognoscitivos. Uno de los muchos receptores que puede activar la $A\beta$ son las integrinas. La interacción integrinas- $A\beta$ puede desencadenar la activación de diversas proteínas cinasas, como FAK, Fyn y la GSK3 β , que inducen alteraciones en la actividad neuronal. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis fue determinar si la $A\beta$ altera la funcionalidad de la red neuronal del hipocampo a través de la activación de la vía de señalización Integrinas/FAK/Fyn/GSK3. Para ello, se realizaron registros de campo en la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo, imágenes funcionales multineuronales de fluorescencia y *western blots* para determinar los patrones de fosforilación de la GSK3; como reportero de la activación de la vía de señalización propuesta. Los resultados muestran que la $A\beta$ oligomerizada ($A\beta_o$) disminuye la actividad espontánea del hipocampo, a concentraciones nanomolares, lo que correlaciona con un aumento en la fosforilación de la tirosina 216 y una disminución en la serina 9 de la GSK3 β (indicadores de activación de esta cinasa). Además, se demostró que las integrinas y las cinasas FAK, Fyn y GSK3 β participan en el efecto inhibitorio de la $A\beta_o$. Por otra parte, se demostró que la $A\beta_o$ disminuye la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo a través de una reducción en el número de estados funcionales de esta red y la aparición de un estado preferente. Este cambio en la red hipocampal no se observó en animales carentes de la cinasa Fyn KO y fue reproducido en un modelo transgénico de la EA (3xTgAD). En conclusión, los resultados sugieren que la $A\beta$ altera la funcionalidad de la red neuronal del hipocampo a través de una vía de señalización que involucra a las

Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β , además de que en presencia de la A β o la red hipocampal pierde su capacidad de alternar entre distintos estados funcionales.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative pathology in adulthood. It has been reported that soluble forms of A β , which are associated to AD and which appear before senile plaques, affect neuronal functions involved in cognitive processes, and thus, seem to be responsible for AD early symptoms. Nonetheless, the mechanisms through which A β affects the function of neural circuits related to cognitive processes are not well understood. Integrins are one of many receptors that can be activated by A β . Integrins-A β interaction may trigger the activation of several kinases including FAK, Fyn and GSK3, which leads to neuronal dysfunction. Therefore, the aim of this thesis was to determine whether A β affects hippocampal function through the activation of the Integrin/FAK/Fyn/GSK3 signal transduction pathway. To that end, field recordings were performed in the CA1 pyramidal layer of the hippocampus, along with functional Multineuronal Calcium Imaging and western blots to determine the GSK3 phosphorylation patterns; as a reporter for the activation of the proposed transduction cascade. The results show that oligomerized A β (A β _o) decreases hippocampal spontaneous network activity, at nanomolar concentrations, which correlates with an increase in GSK3 β phosphorylation in tyrosine 216 and a decrease in serine 9 phosphorylation (which are indicative of activation of the kinase). Furthermore, it was shown that integrins and the kinases FAK, Fyn as well as GSK3 β participate in the A β _o-induced inhibitory effect. On other hand, the results demonstrated that A β _o-induce reduction of hippocampal spontaneous network activity is related to a reduction in the amount of functional states of the network along with the induction of a preferred state of this neural network. Such effects were not observed Fyn knockout mice and were reproduced in a transgenic AD model (3xTgAD). In conclusion, the data suggest that A β _o impairs the functionality of the hippocampal neuronal network through a signaling pathway involving Integrins/FAK/Fyn/GSK3 β . Furthermore, in the presence of A β _o the hippocampal network losses its property of alternating among different functional states.

ABREVIATURAS

3xTgAD	Ratón triple transgénico con fenotipo EA.
aa	Aminoácidos
A β o	Solución oligomerizada de A β .
AF	Adhesiones focales
AICD	Dominio Intracelular de la APP
ApoE4	Apolipoproteína E4
ApoJ	Apolipoproteína J
APP	Proteína Precursora del Amiloide (por sus siglas en inglés)
APP ^{swe}	Mutación sueca de la APP (por sus siglas en inglés)
ASAP1	Proteína 1 activada por la GTPasa Arf (por sus siglas en inglés)
A β	Proteína β amiloide (por sus siglas en inglés)
BACE1	Enzima β -secretasa
BIN1	Proteína Adaptadora del Núcleo 1 (por sus siglas en inglés)
CE	Corteza Entorrinal
CR1	Receptor 1 de componentes del complemento (por sus siglas en inglés)
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEG	Electroencefalograma
EGFr	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés)
ERK1/2	Proteína cinasa 1 y 2 regulada por señales extracelulares (por sus siglas en inglés)
FAK	Cinasa de adhesión focal (por sus siglas en inglés)
FAT	Blanco de adhesiones focales (por sus siglas en inglés)
FERM	Dominio 4.1, ezrina, radixina y moesina (por sus siglas en inglés)

fMCI	Imágenes funcionales multineuronales con imagenología de calcio (por sus siglas en inglés)
fMRI	Imágenes de resonancia magnética funcional (por sus siglas en inglés)
G384A	Mutante de la PS1
GD	Giro dentado
GRAF	Regulador de la GTPasa asociado a FAK (por sus siglas en inglés)
Grb-2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento (por sus siglas en inglés)
GSK3 α , - β	Cinasa 3 de la glucógeno sintetasa α/β (por sus siglas en inglés)
hAPP	APP humana (por sus siglas en inglés)
I-EGF	Dominio similar al Factor de Crecimiento Epidérmico (por sus siglas en inglés)
KAI1	Proteína supresora de metástasis (por sus siglas en inglés)
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor para lipoproteínas (por sus siglas en inglés)
LTP	Potenciación de largo plazo (por sus siglas en inglés)
MAP2c	Proteína asociada a microtúbulos 2c (por sus siglas en inglés)
MCI	Deterioro cognoscitivo leve (por sus siglas en inglés)
MEG	Magnetoencefalograma
p130Cas	Proteína asociada a Crk
p53	Proteína supresora de tumores
PDGFr	Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (por sus siglas en inglés)
PI3K	Cinasa 3 de fosfatidil inositol (por sus siglas en inglés)
PICALM	Proteína de ensamble de la clatrina que se une al fosfatidil inositol (por sus siglas en inglés)
PP1	Proteína fosfatasa 1 (por sus siglas en inglés)
PrPC	Proteína priónica celular (por sus siglas en inglés)

PRR	Secuencia rica en prolinas ¹ (por sus siglas en inglés)
pSer	Fosfo-serina (por sus siglas en inglés)
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PSI	Dominio Plexina/semforina/integrina
pTyr	Fosfo-tirosina (por sus siglas en inglés)
RE	Retículo endoplásmico
Ser	Serina
SFK	Cinasas de la familia src (por sus siglas en inglés)
SH, -2, -3, -4	Dominio homólogo de src 2, -3, -4 (por sus siglas en inglés)
Shc	Proteína que contiene el dominio SH
TGN	Red trans-Golgi (por sus siglas en inglés)
TREM2	Receptor 2 que se expresa en células mieloides.
Tyr	Tirosina (por sus siglas en inglés)
α APPs	Fragmento soluble de la APP α (por sus siglas en inglés)
α CTF	Fragmento carboxilo terminal α (por sus siglas en inglés)
β APPs	Fragmento soluble de la APP β (por sus siglas en inglés)
β CTF	Fragmento carboxilo terminal β (por sus siglas en inglés)

ÍNDICE

RESUMEN		. 2
ABSTRACT.		. 4
ABREVIATURAS		. 5

1. ANTECEDENTES

1.1. La Enfermedad de Alzheimer		.12
1.1.2. Etapas de la EA y síntomas clínicos		.12
1.1.2.1. <i>Etapa Pre-demencia o Deterioro Cognoscitivo Leve</i>		.12
1.1.2.2. <i>Etapa Temprana</i>		.14
1.1.2.3. <i>Etapa Moderada</i>		.15
1.1.2.4. <i>Etapa Avanzada</i>		.16
1.1.3. Factores de riesgo de la EA.		.16
1.1.4. Histopatología de la EA		.19
1.1.4.1. <i>Marañas neurofibrilares</i>		.19
1.1.4.2. <i>Placas seniles.</i>		.20
1.1.5. La EA y la A β		.21
1.1.5.1. <i>Procesamiento de la APP y biogénesis de la Aβ</i>		.22
1.1.5.2. <i>Oligómeros solubles de Aβ</i>		.25
1.2. La EA y el hipocampo		.26
1.2.1. Anatomía del hipocampo.		.28
1.2.2. El circuito hipocampal		.29
1.2.3. Oscilaciones hipocampales		.32
1.2.3. Alteraciones en las oscilaciones cerebrales en los pacientes con la EA		.36
1.2.4. Efecto de la A β sobre las oscilaciones cerebrales.		.38
1.3. Las Redes neuronales y la EA.		.40
1.3.1. Redes Neuronales.		.40
1.3.2. Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales en pacientes con la EA		.41

1.3.2.1. Coherencia.	.42
1.3.2.2. Probabilidad de sincronización.	.43
1.3.2.3. Primer exponente de Lyapunov.	.43
1.3.2.4. Análisis de información mutua	.44
1.3.2.5. Complejidad Omega	.44
1.3.2.6. Correlación dimensional	.44
1.3.2.7. Complejidad de Lempel-Ziv	.45
1.3.2.8. Entropía.	.45
1.3.2.9. Dimensión fractal de Higuchi	.46
1.3.3. Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales en modelos animales de la EA	.46
1.3.4. Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales inducidas por la A β <i>in vitro</i>	.48
1.4. Las vías de señalización activadas por la Aβ.	.49
1.4.1. Receptores de membrana integrinas.	.50
1.4.1.1. Estructura de las integrinas.	.51
1.4.1.2. Función Biológica y señalización intracelular mediada por las integrinas.	.53
1.4.1.3. Las integrinas y la EA	.55
1.4.2. La cinasa de tirosinas FAK.	.56
1.4.2.1. Estructura de la cinasa FAK.	.56
1.4.2.2. Regulación de la actividad la cinasa FAK.	.58
1.4.2.3. La cinasa FAK y la EA	.58
1.4.3. La cinasa de tirosinas Fyn	.59
1.4.3.1. Estructura y regulación de la actividad de la cinasa Fyn	.59
1.4.3.2. Formación del complejo enzimático FAK/Fyn	.60
1.4.3.3. La cinasa Fyn y la EA	.61
1.4.4. La cinasa de serinas/treoninas GSK3	.63
1.4.4.1. Estructura de la GSK3.	.63
1.4.4.2. Regulación de la actividad de la GSK3.	.64
1.4.4.3. La cinasa GSK3 y la EA	.65

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	.	.	.67
3. HIPÓTESIS	.	.	.68
4. OBJETIVO GENERAL	.	.	.68
4.1. Objetivos específicos	.	.	.68
5. MATERIALES Y MÉTODOS	.	.	.69
5.1. Animales	.	.	.69
5.2. Oligomerización y caracterización de la A β o	.	.	.69
5.3. Obtención de rebanadas de hipocampo	.	.	.70
5.4. Cultivos organotípicos de hipocampo.	.	.	.71
5.5. Registro electrofisiológico de hipocampo <i>in vitro</i>	.	.	.71
5.6. Imágenes funcionales multineuronales (fMCI)	.	.	.72
5.7. <i>Western blot</i>	.	.	.72
5.8. Análisis de datos	.	.	.73
5.8.1. Registros de campo	.	.	.73
5.8.2. <i>Western blot</i>	.	.	.73
5.8.3. fMCI	.	.	.74
5.9. Análisis estadístico.	.	.	.77
6. RESULTADOS	.	.	.78
6.1. Alteraciones en la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo producidas por la A β o	.	.	.78
6.2. Efectos de la A β o sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo. Papel de la cinasa Fyn.	.	.	87
6.3. Vía de señalización involucrada en los efectos de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.	.	.	.110
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	.	.	.126
7.1. Alteraciones en la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo inducidas por la A β o.	.	.	.126
7.2. Efectos de la A β o sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo. Papel de la cinasa Fyn.	.	.	.130
7.3. Vía de señalización involucrada en los efectos de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.	.	.	.136

8. CONCLUSION GENERAL		.147
9. BIBLIOGRAFÍA CITADA		.148

10. PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO

- 10.1. **Balleza-Tapia** H, Peña F. Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. Mini Rev Med Chem. 2009 Jun;9(6):724-40. PMID: 19519498. **180**

- 10.2. **Balleza-Tapia** H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F. Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. Curr Alzheimer Res. 2010 Aug;7(5):453-62. PMID: 20043810. **197**

- 10.3. Peña F, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. Hippocampus. 2010 Jan;20(1):78-96. PMID: 19294646. **207**

- 10.4. Adaya-Villanueva A, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F. Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. Peptides. 2010 Sep;31(9):1761-6. PMID: 20558221. **226**

- 10.5. Pena-Ortega F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Javier Lopez-Guerrero J. Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3. Curr Alzheimer Res. 2012 Sep;9(7):857-63. PMID: 22631612. **232**

1. ANTECEDENTES

1.1. La Enfermedad de Alzheimer

En 1907 el Dr. Aloysius “Alois” Alzheimer hizo la descripción de una enfermedad basada en observaciones de la paciente Auguste D, de 51 años de edad, quién presentaba síntomas que incluían: pérdida de la memoria, dificultades en la comprensión de la información, desorientación y alucinaciones (Alzheimer et al. 1995). El análisis histológico *post mortem* del cerebro de la paciente reveló la presencia de agregados intracelulares y extracelulares que, eventualmente, se convirtieron en los marcadores histopatológicos de esta enfermedad (Alzheimer et al. 1995; Goedert y Spillantini 2006). Estudios posteriores han determinado que estos agregados proteicos se desarrollan específicamente en áreas del cerebro como la corteza entorrinal (CE), la formación hipocampal, la amígdala, el bulbo olfatorio y la neocorteza (Braak et al. 1993; Selkoe 2001a); siendo el hipocampo una de las primeras estructuras en presentarlos (Braak et al. 1993; Blennow et al. 2006). Las observaciones realizadas por el Dr. Alois Alzheimer describieron a la enfermedad como un tipo de demencia senil que más tarde Emil Kraepelin nombró como Enfermedad de Alzheimer (EA) (Goedert y Spillantini 2006). Actualmente, la EA es la neuropatología más común de la población adulta mayor y su impacto sobre la salud pública se ha incrementado debido al desplazamiento de la pirámide poblacional y al aumento en la expectativa de vida (Lopes y Bottino 2002; Guerra-López 2005; Zúñiga y Vega 2005; Brookmeyer et al. 2007).

1.1.2. Etapas de la EA y síntomas clínicos

Clínicamente, la EA se divide en 3 etapas dependiendo de la progresión en el deterioro cognoscitivo del paciente (Forstl y Kurz 1999). No obstante, de acuerdo a estudios recientes, se ha propuesto una cuarta etapa denominada pre-demencial (para una revisión ver (Backman et al. 2004).

1.1.2.1. Etapa Pre-demencia o Deterioro Cognoscitivo Leve

Frecuentemente, los primeros síntomas que presentan los pacientes con EA son usualmente confundidos con el envejecimiento normal o incluso con el estrés

(Doraiswamy et al. 1998; Spaan et al. 2003). Esto, debido a que el envejecimiento promueve alteraciones en los procesos de memoria y aprendizaje de manera normal que no interfieren con la capacidad del individuo de realizar las actividades de la vida diaria (Morrison y Hof 1997). No obstante, diversos estudios han sugerido que los individuos que eventualmente desarrollaron la EA presentan alteraciones en funciones cognoscitivas mucho antes de que se les realice un diagnóstico clínico de demencia (Backman et al. 2005; Small et al. 2007; Salmon 2012). Estas alteraciones cognoscitivas tempranas tienen una alta relevancia ya que pueden ayudar a identificar individuos con una probabilidad muy alta de desarrollar la EA (Arnaiz y Almkvist 2003; Backman et al. 2004; Small et al. 2007; Salmon 2012). Como resultado de estos estudios, se ha propuesto una etapa previa a la EA que se denomina predemencial (Backman et al. 2004). En ésta etapa, el síntoma más sobresaliente es una pérdida ligera de la memoria de corto plazo; que se refleja como la dificultad para recordar eventos recientes (Forstl y Kurz 1999; Backman et al. 2004; Salmon 2012). Además, se observan alteraciones en el aprendizaje que se traducen en la incapacidad de adquirir información nueva (Arnaiz y Almkvist 2003; Backman et al. 2004). Las alteraciones en la memoria semántica, como la memoria de significados y relaciones conceptuales, también pueden ser un síntoma de la primera etapa de la EA (Backman et al. 2004; Salmon 2012). Otros síntomas característicos de esta etapa están relacionados con un deterioro leve en otros procesos cognoscitivos como la atención, la planificación y el pensamiento abstracto (Backman et al. 2004).

Al conjunto de síntomas descritos en el párrafo anterior se le ha denominado Deterioro Cognoscitivo Leve (MCI, por sus siglas en inglés) (Galluzzi et al. 2001; Scheltens et al. 2002; Arnaiz y Almkvist 2003). El MCI puede durar hasta 8 años antes de que el paciente presente los síntomas claros de la demencia asociada a la EA (Galluzzi et al. 2001; Scheltens et al. 2002; Arnaiz y Almkvist 2003). No obstante, la asociación directa entre el MCI y la EA todavía está en discusión (Para una revisión ver (Small et al. 2007). Clínicamente, el MCI se define como una patología caracterizada por alteraciones selectivas de la memoria que son insuficientes para alcanzar el criterio diagnóstico de demencia (Flicker et al. 1991;

Kantarci et al. 2001; Petersen et al. 2001). Sin embargo, el deterioro cognoscitivo observado en las personas que presentan el MCI es capaz de interferir con las actividades diarias del paciente aunque no representa un riesgo muy alto a la seguridad y bienestar del sujeto (Forstl y Kurz 1999; Perneczky et al. 2006). Finalmente, la posibilidad de que la MCI representa un estado de transición hacia el desarrollo de la EA se apoya en estudios que han demostrado una tasa anual del 10 al 15% de progresión de pacientes con el MCI que eventualmente desarrollaron la EA (para una revisión ver (Petersen et al. 2001; Small et al. 2007).

1.1.2.2. Etapa Temprana de la EA

La etapa temprana de la EA consiste en episodios de olvido ligeros que eventualmente se manifiestan de forma más pronunciada sobretudo en la memoria de corto plazo (Carlesimo y Oscar-Berman 1992; Jelicic et al. 1995). El deterioro de la memoria episódica tiene una progresión retrógrada de manera que los eventos más próximos a la niñez son más difíciles de recordar para el paciente en esta etapa en contraste a los eventos recientes (Carlesimo y Oscar-Berman 1992). En la etapa temprana de la EA aparecen también problemas en la percepción (agnosia), en la ejecución de movimiento (apraxia) y alteraciones en el estado de ánimo (Forstl y Kurz 1999). Se observan también alteraciones en la planeación, la memoria de trabajo, la atención, el razonamiento verbal, entre otras (Chan et al. 2008). La memoria episódica (memoria relacionada con sucesos autobiográficos), la memoria semántica (El conocimiento conceptual y fáctico) y la memoria implícita (relacionada con hábitos o destrezas), también presentan alteraciones muy ligeras en esta etapa de la EA (Carlesimo y Oscar-Berman 1992; Jelicic et al. 1995). Asimismo, en esta etapa de la EA, también se observan problemas de lenguaje como la disminución del vocabulario y la fluidez verbal que se manifiestan como un empobrecimiento del lenguaje oral y escrito (Forstl y Kurz 1999; Taler y Phillips 2008). No obstante, los pacientes en esta etapa de la EA aún son capaces de comunicar ideas básicas de forma adecuada (Frank 1994; Forstl y Kurz 1999; Taler y Phillips 2008). De hecho, los pacientes en esta etapa de la EA son capaces de realizar tareas motoras finas como dibujar, escribir o vestirse (Forstl y Kurz 1999). Por estos motivos, a pesar de que existe apraxia u otras alteraciones, usualmente

el padecimiento pasa desapercibido para las personas que rodean al paciente (Forstl y Kurz 1999). Sin embargo, a pesar de que los pacientes pueden desarrollar tareas de manera independiente, a medida que la EA progresa, frecuentemente necesitan asistencia o supervisión para desarrollar tareas que involucran una alta demanda cognoscitiva (Forstl y Kurz 1999).

1.1.2.3. Etapa Moderada de la EA

A medida que la EA avanza, los pacientes son menos independientes y se vuelven incapaces de realizar la mayoría de las actividades de la vida diaria (Forstl y Kurz 1999). Las alteraciones en el lenguaje se vuelven más evidentes, ya que el paciente no puede recordar el vocabulario, lo que le obliga a sustituir las palabras de forma incorrecta (parafasias) (Manenti et al. 2004). También, la capacidad de lectura y escritura se pierden de manera progresiva, así como la coordinación para desarrollar tareas motoras complejas (Frank 1994; Forstl y Kurz 1999). Los problemas de memoria se acentúan y los pacientes tienen dificultad para reconocer a parientes cercanos (Forstl y Kurz 1999) y también presentan problemas con la memoria de largo plazo (Forstl y Kurz 1999). En esta etapa de la EA se pueden presentar delirios, en los que el paciente cree que las personas u objetos han sido alterados o cambiados por completo (Reisberg et al. 1996). Es común que durante esta etapa de la EA, los pacientes presenten alucinaciones; principalmente visuales (Perry et al. 1990). También pueden presentar anosognosia (Forstl y Kurz 1999); lo que significa que el paciente es incapaz de reconocer que está enfermo (Maki et al. 2012). En la etapa moderada de la enfermedad de Alzheimer las alteraciones conductuales se vuelven más evidentes y se manifiestan como desorientación, vagancia, irritabilidad, agresividad física o verbal e incluso, los pacientes pueden presentar incontinencia urinaria (Stern et al. 1997). En esta etapa de la EA es común que los pacientes presenten resistencia a ser cuidados y el estrés que manifiestan puede provocar que los parientes que conviven con el paciente lo transfieran a un centro de cuidado (Forstl y Kurz 1999).

1.1.2.4. Etapa Avanzada de la EA

La etapa final de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la incapacidad del paciente de realizar cualquier tarea, lo que lo hace completamente dependiente (Forstl y Kurz 1999). En la etapa avanzada de la EA, la memoria está completamente comprometida y los pacientes pierden la capacidad de evocar los recuerdos biográficos más antiguos (Forstl y Kurz 1999). El lenguaje se reduce drásticamente a frases simples o palabras simples que eventualmente deriva en la pérdida completa de la capacidad de comunicación oral (Frank 1994; Forstl y Kurz 1999). No obstante, los pacientes son capaces de responder al lenguaje verbal con señales emocionales (Forstl y Kurz 1999). El deterioro de las capacidades cognitivas va acompañado de cambios conductuales también. En este sentido, los pacientes usualmente se vuelven agresivos, depresivos o apáticos; incluso, algunos presentan cuadros paranoicos y alucinaciones (Burns et al. 1990; Perez-Madrinan et al. 2004; Apostolova et al. 2007). Una característica importante de esta etapa final de la enfermedad de Alzheimer es la apraxia, que se manifiesta como la incapacidad de realizar cualquier actividad; incluso masticar y tragar los alimentos (Forstl y Kurz 1999). La falta de actividad física, en esta fase de la EA, provoca que la masa muscular y la movilidad se deterioren al punto de que los pacientes están confinados a una silla de ruedas o a la cama (Forstl y Kurz 1999). La EA es considerada como una patología terminal (Burns et al. 1991; Bracco et al. 1994; Bowen et al. 1996), debido a que después del diagnóstico clínico, la expectativa de vida del paciente se reduce a aproximadamente 5 años (Heyman et al. 1987). No obstante, la causa de la muerte suele ser externa a la enfermedad (Forstl y Kurz 1999), pues los pacientes mueren generalmente de neumonía, de infarto al miocardio y de septicemia (Forstl y Kurz 1999).

1.1.3. Factores de riesgo de la EA.

La EA se puede clasificar de acuerdo a su origen en la EA familiar, que tiene un componente genético, y la EA de tipo esporádico, que tiene un origen aún desconocido (Lehtovirta et al. 1996b; Tanzi et al. 1996). No obstante, a pesar de

que sus causas difieren, los dos tipos de la EA comparten los mismos síntomas clínicos antes descritos (Lehtovirta et al. 1996b; Tanzi et al. 1996).

La EA de tipo familiar, o de inicio temprano, es poco frecuente y representa del 5 al 10% de todos los casos de la EA (Lehtovirta et al. 1996b; Tanzi et al. 1996). Este subtipo de EA se caracteriza por desarrollarse antes de los 65 años de edad y la progresión tiende a ser más rápida comparada con la EA esporádica (Swearer et al. 1996). Se estima que los pacientes con EA familiar tienden a depender del cuidado externo con mayor rapidez y, de igual forma, la mortandad se presenta antes que los pacientes con la EA esporádica (Swearer et al. 1996). La EA familiar está asociada a mutaciones en genes autosómicos dominantes que codifican para la Proteína Precursora del Amiloide (APP), que se localiza en el cromosoma 21, la presenilina 1 (PS1), que se localiza en el cromosoma 1 y la presenilina 2 (PS2), que se localiza en el cromosoma 14 (Chartier-Harlin et al. 1991; Goate et al. 1991; Selkoe 1997; Holmes 2002). Es importante mencionar que todas las mutaciones asociadas a este grupo de genes incrementan la producción de la proteína β amiloide ($A\beta$) 1-42; que es la forma de $A\beta$ que más aumenta en los cerebros de los pacientes con la EA y que es la responsable de los síntomas tempranos de enfermedad (Selkoe 1999; Naslund et al. 2000; Walsh y Selkoe 2007).

La EA de tipo esporádico se manifiesta a partir de los 65 años y representa del 90 al 95% de los casos (Tanzi et al. 1996). A pesar de que este tipo de EA no está ligada directamente a la expresión de uno o varios genes en específico, existen factores de riesgo genético que incrementan la posibilidad de desarrollar la enfermedad y que a continuación se mencionan. El factor de riesgo genético más importante es la expresión de la isoforma 4 de la Apolipoproteína E (ApoE) (Raber et al. 2004). Existen tres isoformas de la ApoE (E2, E3 y E4), de las cuales la E4 está relacionada con un incremento en la prevalencia de la EA (Raber et al. 2004) y la isoforma E2 está asociada a una menor prevalencia de la EA (Farrer et al. 1997; Corder et al. 1998). La expresión de la ApoE4 puede aumentar el riesgo de desarrollar la EA hasta 3 veces en individuos heterocigotos y 15 en homocigotos (Tanzi et al. 1996; Blennow et al. 2006). De hecho, se estima que la ApoE4 es

responsable del 20% de los casos de EA esporádica (Chapman et al. 2001). Por otro lado, estudios de asociación del genoma completo (GWAS; por sus siglas en inglés), han identificado que la expresión de los genes que codifican para la Apolipoproteína J (ApoJ) o closterina, el receptor 1 de componentes del complemento (CR1), la proteína de ensamble de la clatrina que se une al fosfatidil inositol (PICALM) y la proteína adaptadora del núcleo BIN1 son un factor de riesgo para desarrollar la EA (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009; Seshadri et al. 2010; Hu et al. 2011a; Barral et al. 2012). Aún así, se desconoce la participación de la expresión de estos genes en la EA y se requiere un mayor estudio para identificar si los polimorfismos y/o variaciones en su expresión son las que incrementan la probabilidad de desarrollar la EA (Kauwe et al. 2011; Lambert y Amouyel 2011). Otro factor genético asociado a la EA es la expresión de una mutación del receptor perteneciente al sistema inmune TREM2 (Guerreiro et al. 2012; Jonsson et al. 2012; Neumann y Daly 2012). En este caso, se ha asociado la mutación en el receptor TRM2 a un incremento de 3 a 5 veces en el riesgo de desarrollar la EA (Guerreiro et al. 2012; Jonsson et al. 2012; Neumann y Daly 2012).

Además de los factores genéticos, existen otros factores de riesgo no genéticos para desarrollar la EA como son la presencia de problemas enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, los niveles de colesterol altos, la obesidad, el infarto del miocardio y la diabetes, que pueden aumentar las probabilidades de padecer EA hasta en un 34% (Luchsinger et al. 2004; de Toledo Ferraz Alves et al. 2010; Holscher 2011). Sin embargo, el factor más importante para desarrollar la EA es la senescencia, ya que la EA solo afecta a individuos mayores de 65 años de edad, en el caso de que la EA sea de tipo esporádico (Brookmeyer et al. 1998; Wimo et al. 2003). La probabilidad de desarrollar la EA se incrementa al doble cada 5 años a partir de los 65 años, hasta alcanzar una prevalencia del 50% de la población a los 85 años (Brookmeyer et al. 1998; Wimo et al. 2003).

1.1.4. Histopatología de la EA

El diagnóstico definitivo de la EA se realiza mediante un examen del tejido cerebral *post-mortem* (Mena-López et al. 2003; Blennow et al. 2006). Histopatológicamente, la EA se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas en las regiones del hipocampo y la corteza cerebral, principalmente (Selkoe 2001a; Mena-López et al. 2003). La muerte celular está asociada a un fenómeno de acumulación de filamentos proteicos insolubles que constituyen dos tipos de lesiones (Fig. 1): agregados intracelulares conocidos como marañas neurofibrilares que están conformados por la proteína Tau y las placas seniles que son agregados extracelulares compuestos principalmente por la proteína beta-amiloide (A β) (Selkoe 2001a; Mena-López et al. 2003; Blennow et al. 2006). Ambos agregados proteicos son la marca característica de la EA y es su presencia en el tejido cerebral permite dar el diagnóstico definitivo de la EA (Mena-López et al. 2003). La formación de fibrillas, tanto de A β como de Tau, está asociada a un trastorno de plegamiento de proteínas caracterizado por cambios conformacionales y proteólisis que generan polímeros insolubles con una estructura secundaria β plegada (Mena-López et al. 2003).

1.1.4.1. Marañas neurofibrilares

Las marañas neurofibrilares, también llamadas ovillos neurofibrilares, son agregados intracelulares constituidos de filamentos helicoidales apareados cuyo componente principal es la proteína Tau en su forma sobrefosforilada (Selkoe 2001a). Tau es una proteína asociada a los microtúbulos que se presenta en 6 isoformas de peso molecular de entre 50 y 64 kDa y de una longitud de 352 a 441 aminoácidos (Wang y Liu 2008). Se localiza principalmente en los axones (Binder et al. 1985) y su función es la estabilización del citoesqueleto a través de la polimerización de la tubulina (Drechsel et al. 1992). La hiperfosforilación de Tau evita su interacción con los microtúbulos y promueve su agregación en formas fibrilares (Lovestone y Reynolds 1997).

1.1.4.2. Placas seniles

Las placas seniles, también llamadas placas β amiloideas, se presentan en dos formas: 1) las placas neuríticas, que tienen un diámetro de 10 a 120 micras y están conformadas por un núcleo denso de $A\beta_{1-40}$ y, principalmente, de $A\beta_{1-42}$ en su forma fibrilar (Jarrett et al. 1993; Selkoe 2001a). Estas placas están rodeadas por una cantidad alta de microglía activada que se ubica en la región más cercana al núcleo de las mismas (Selkoe 2001a). Por otra parte, la parte exterior de la placa es encapsulada por neuritas distróficas así como por astrocitos reactivos (Selkoe 2001a). 2) Las placas difusas, estos agregados deben su nombre a que no tienen una estructura central compacta y tampoco se encuentran rodeadas de neuritas distróficas (Selkoe 2001a). Debido a su estructura, se piensa que estas placas son precursoras de las placas neuríticas (Selkoe 2001a).

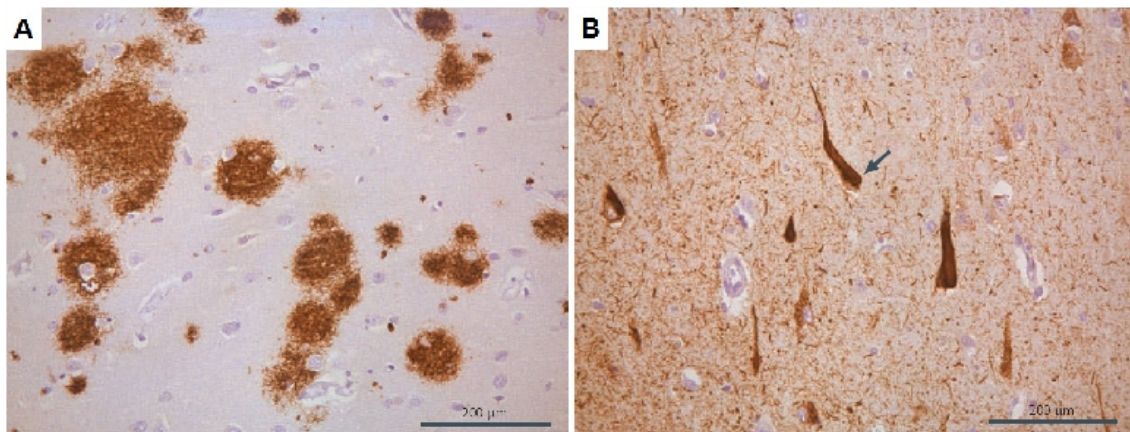


Figura 1 – Marcadores histopatológicos de la EA. A) Placas β amiloideas constituidas de agregados extracelulares de la $A\beta$. Se muestra un corte histológico de corteza cerebral de un paciente con EA teñido con un anticuerpo específico para la $A\beta$. B) Marañas neurofibrilares constituidas de agregados intracelulares de la proteína Tau (Flecha). Se muestra un corte histológico de corteza cerebral de un paciente con EA teñido con un anticuerpo específico para la proteína Tau. Tomado de (Aguzzi y O'Connor 2010).

1.1.5. La EA y la A β .

Debido a que la EA familiar está relacionada con polimorfismos en genes relacionados con el procesamiento y expresión del precursor de la proteína β amiloide (APP), se han impulsado estudios para determinar la participación de la A β en la patología de la enfermedad (Chartier-Harlin et al. 1991; Goate et al. 1991; Sabo et al. 1995; Selkoe 1997; Holmes 2002). Inicialmente, diversos trabajos se enfocaron en determinar la densidad de las placas seniles en el tejido cerebral de los pacientes con la EA, la muerte neuronal asociada a estas lesiones y su relación con el deterioro cognoscitivo observado en pacientes con la enfermedad (Pike et al. 1991; Mattson et al. 1992; Lorenzo y Yankner 1994; Deshpande et al. 2006). No obstante, actualmente se sabe que la densidad de placas, así como la muerte neuronal asociada, no correlaciona con el nivel de demencia, sobre todo en las etapas tempranas de la EA (Lue et al. 1999). Más aún, se ha demostrado la presencia de placas amiloideas en individuos completamente sanos (Naslund et al. 2000). Estudios posteriores demostraron que la concentración de agregados pequeños y solubles de la A β si correlaciona con los niveles de demencia en los pacientes con la EA y que parecen ser éstos los responsables del deterioro cognoscitivo en las etapas tempranas de la enfermedad (Lue et al. 1999; Naslund et al. 2000; Walsh et al. 2002a; Gong et al. 2003; Selkoe 2003). Esta correlación se ha podido observar en mediciones directas de tejido cerebral obtenido de pacientes con la EA (Lue et al. 1999; Gong et al. 2003), así como en modelos murinos que expresan una patología tipo EA (Hsia et al. 1999; Moechars et al. 1999; Giacchino et al. 2000; Mucke et al. 2000; Stephan et al. 2001). Actualmente, se sabe que los agregados solubles oligoméricos de la A β son capaces de alterar la funcionalidad de las redes neuronales a nivel de la excitabilidad neuronal (Wang et al. 2009; Hazra et al. 2013), la transmisión sináptica (Giacchino et al. 2000; Brown et al. 2005a; Nimmrich et al. 2008) la plasticidad sináptica (Bach et al. 1999; Chen et al. 2002; Klyubin et al. 2004; Rowan et al. 2004; Nomura et al. 2005) y las oscilaciones o ritmos cerebrales (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001; Balleza-Tapia et al. 2010). Por lo tanto, de acuerdo a la evidencia mencionada, se ha propuesto que la A β en estado

soluble oligomérico estaría provocando el deterioro cognoscitivo observado en los pacientes con la EA en etapas tempranas a través de la alteración, a nivel funcional, de las redes neuronales más que a un mecanismo relacionado con la muerte celular

1.1.5.1. *Procesamiento de la APP y la biogénesis de la A β .*

La Proteína β Amiloide (A β) es un péptido de peso molecular de ~4kDa y una longitud de 39 a 43 aminoácidos que tiene una naturaleza anfipática (Masters y Selkoe 2012). La A β es producida de forma natural por las células y se encuentra en concentraciones picomolares en el líquido extracelular (Seubert et al. 1992; Shoji et al. 1992), siendo el fragmento A β_{1-40} el más común (Fig. 2)(Takahashi et al. 2002). No obstante, en la EA el fragmento A β_{1-42} , que es la forma más tóxica, se sobreproduce en mayor medida (Selkoe 1999; Wang et al. 1999; Shioi et al. 2007). La A β se genera a partir de la hidrólisis de una proteína integral de la membrana celular llamada proteína precursora del amiloide (*APP*; por sus siglas en inglés). La ubicación del fragmento que originará a la A β se encuentra entre el dominio transmembranal y la región extracelular de la APP (Takahashi et al. 2002; Thinakaran y Koo 2008).

La APP es una proteína transmembranal de clase I que se expresa en todos los tejidos (Takahashi et al. 2002). Esta proteína pertenece a una familia de genes que incluye a la Proteína Similar a la APP 1 y 2 (*APLP1* y *APPL2*; por su siglas en inglés; en mamíferos), la *Appl* (en la mosca *Drosophila*) y la *apl-1* (en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*) (Takahashi et al. 2002; Thinakaran y Koo 2008). Todas las proteínas de ésta familia poseen un dominio extracelular largo en la terminal amino y una región citoplasmática corta en la terminal carboxilo (Takahashi et al. 2002; Thinakaran y Koo 2008). Cabe destacar que solo la APP contiene la secuencia que origina a la A β (Thinakaran y Koo 2008). El gen que codifica para la APP se encuentra en el cromosoma 21 de los humanos y el ARN mensajero es capaz de producir 8 isoformas a través del mecanismo de “*splicing*” alternativo. De las isoformas formadas por este proceso, la APP695, la APP751 y la APP770 (de 695, 751 y 770 aminoácidos respectivamente), se expresan predominantemente en el

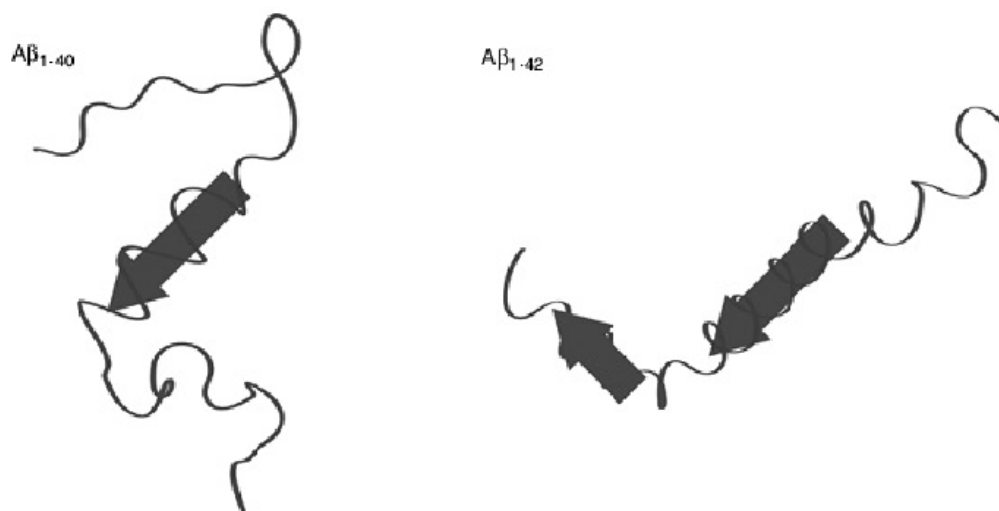


Figura 2 – Estructura secundaria de las dos isoformas principales de la Aβ. Los monómeros de Aβ tienen una naturaleza anfipática que favorece la formación de estructuras α-hélice (flechas en gris) en condiciones que simulan la membrana lipídica. No obstante, en un ambiente acuoso la estructura secundaria cambia para formar arreglos β-plegados. La Aβ₁₋₄₀ posee una sola región con la conformación de α-hélice, mientras la Aβ₁₋₄₂ posee dos regiones α-hélice separadas por una secuencia denominada “kink”. Tomado de (Gregory et al. 2007).

cerebro (Tanaka et al. 1988; Kang y Muller-Hill 1990; Takahashi et al. 2002) y la APP695 se produce principalmente en la neuronas (Rohan de Silva et al. 1997). La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) y se transporta a través del aparato de Golgi hacia la región *trans*, compuesta por una red de membranas y vesículas conocida como Red *trans*-Golgi (TGN; por sus siglas en inglés). Es en la TGN donde se ha encontrado la mayor concentración de la APP en las neuronas (Hartmann et al. 1997; Xu et al. 1997; Greenfield et al. 1999). Desde la TGN, la APP puede ser transportada hacia la membrana celular por vesículas secretoras ó ser reinternalizada a través de los endosomas/lisosomas para ser degradada (Nordstedt et al. 1993; Caporaso et al. 1994; Thinakaran y Koo 2008).

La hidrólisis de la APP se realiza por tres enzimas proteolíticas denominadas α-, β- y γ-secretasas (Takahashi et al. 2002). La APP se puede degradar por dos vías (Fig. 3): la vía amiloidogénica, que es la que genera la Aβ, y la vía no amiloidogénica que genera fragmentos que están relacionados con funciones celulares no patológicas (Thinakaran y Koo 2008). En la vía no-amiloidogénica, la

α -secretasa corta a la APP justo en medio de la secuencia de la A β , en el aminoácido 17, inhibiendo la producción de la A β y generando los fragmentos α APPs y α CTF (Mills y Reiner 1999). La actividad enzimática de la α -secretasa se lleva a cabo principalmente en la membrana celular (Sisodia 1992). El fragmento α APPs tiene funciones relevantes en la plasticidad neuronal, en la sobrevivencia celular (Furukawa et al. 1996; Mattson 1997) y también se ha descrito que participa en el desarrollo temprano del sistema nervioso central (Ohsawa et al. 1999; Caille et al. 2004). Por su parte, el fragmento α CTF es procesado subsecuentemente por la actividad de la γ -secretasa generando los péptidos p3 y AICD (Haass et al. 1993b). El péptido p3 es degradado rápidamente y se desconoce si tiene alguna función fisiológica (Zhang et al. 2011). El fragmento AICD, que se libera en el interior celular, posee la actividad de transactivación, lo que le permite regular la transcripción de genes, entre los cuales se encuentran la misma APP (von Rotz et al. 2004), la GSK3 β (Kim et al. 2003b; Ryan y Pimplikar 2005), la BACE1 (von Rotz et al. 2004), la nefrilisina (Pardossi-Piquard et al. 2005), el gen KAL1 (Baek et al. 2002), la p53 (Checler et al. 2007), el EGFR (Zhang et al. 2007) y el LRP1 (Liu et al. 2007). Por otro lado, la vía amiloidogénica es la que genera la A β a partir de la proteólisis del dominio extracelular de la APP por la enzima β -secretasa (BACE1) y la del dominio intramembranal por la γ -secretasa (Thinakaran y Koo 2008). Este último corte es el que determina que la longitud final del péptido sea de entre 37 a 43 aminoácidos (Lansbury 1992; Shoji et al. 1992; Seubert et al. 1993; Takahashi et al. 2002). La actividad catalítica de la BACE1 sobre la terminal amino de la APP genera los fragmentos β APPs y β CTF (Takahashi et al. 2002). La enzima BACE1 se localiza en las regiones Golgi/TGN y en los endosomas (Thinakaran y Koo 2008). En este sentido, se ha reportado que la A β se genera principalmente en las regiones RE/Golgi/TGN de las neuronas, más que en su membrana celular (Hartmann et al. 1997; Xu et al. 1997; Greenfield et al. 1999). No obstante, se ha propuesto que la A β también puede ser generada y liberada a través de la vía de los endosomas (Haass et al. 1993a; Haass et al. 1993b; Koo y Squazzo 1994). Finalmente, la γ -secretasa corta el fragmento β CTF produciendo la A β y el

fragmento AICD (Zhang et al. 2011). Esta enzima se localiza en el ER, el Golgi/TGN, los endosomas y la membrana celular (Thinakaran y Koo 2008).

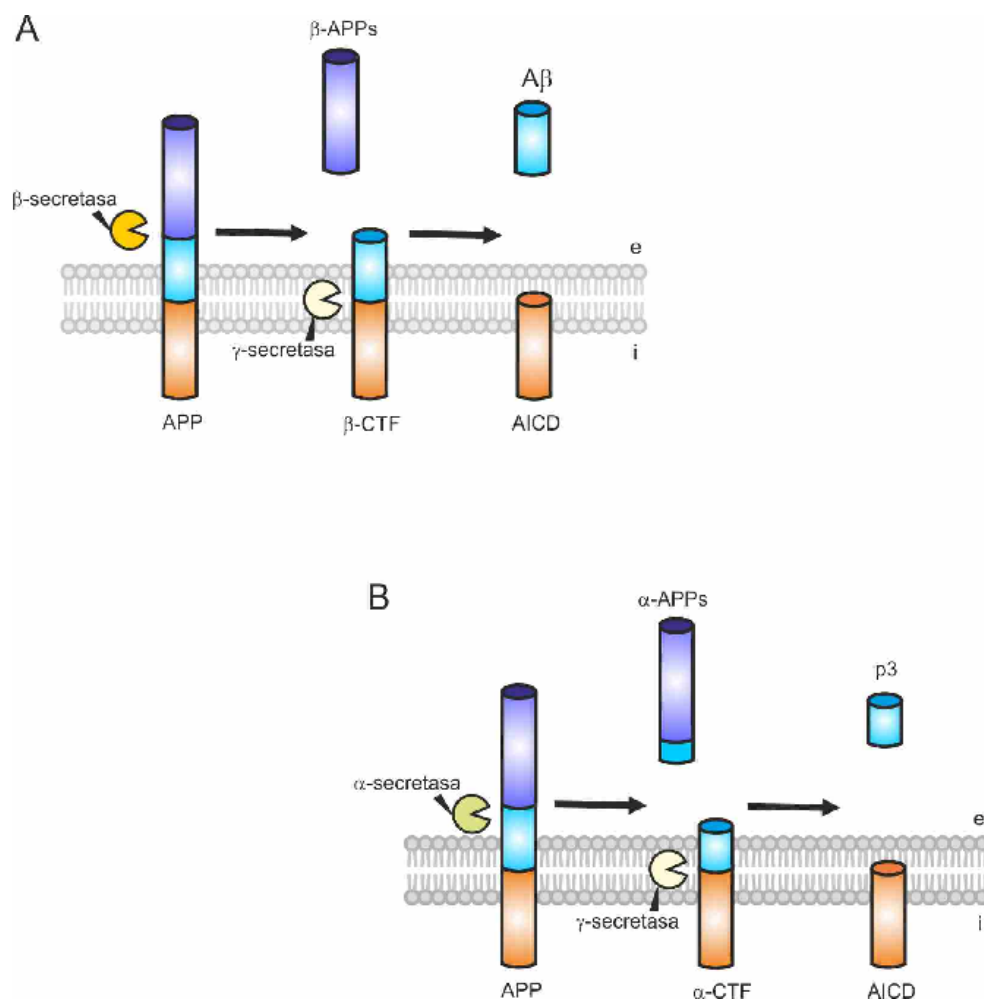


Figura 3 – Procesamiento de la APP. A) Vía amiloidogénica. La enzima proteolítica β-secretasa genera el fragmento soluble de la APP β (β-APPs; por sus siglas en inglés) y el Fragmento Carboxilo Terminal β (β-CTF; por sus siglas en inglés). Posteriormente, la γ-secretasa corta el fragmento β-CTF en la porción intramembranal generando el Dominio Intracelular de la APP (AICD; por su siglas en inglés) y la Aβ. B) En la vía no-amiloidogénica participa la α-secretasa generando los fragmentos α-APPs y α-CTF, subsecuentemente la γ-secretasa genera los péptidos p3 y AICD a partir del α-CTF. i = intracelular; e = extracelular.

1.1.5.2. Oligómeros solubles de Aβ

Debido a sus características fisicoquímicas, la Aβ tiende a agruparse rápidamente generando agregados solubles quienes se asocian para finalmente

formar las estructuras fibrilares, con una estructura β plegada, que componen a las placas β amiloideas (Fig. 4) (Chromy et al. 2003). Los agregados solubles de la $A\beta$ se han denominado oligómeros y existe evidencia que demuestra que son los responsables del deterioro cognoscitivo en la etapa temprana de la EA (Walsh et al. 2002b; Haass y Selkoe 2007). Entre estas evidencias, se ha encontrado que la concentración de los oligómeros solubles de la $A\beta$ en los cerebros de pacientes correlaciona con el nivel de demencia (Lue et al. 1999; McLean et al. 1999; Naslund et al. 2000). La agregación de monómeros de $A\beta$ para la generación de oligómeros solubles parece ocurrir de forma distinta dependiendo de la longitud del péptido (Bitan et al. 2003a; Bitan et al. 2003b). Por ejemplo, la $A\beta_{1-40}$ forma preferentemente dímeros, trímeros y tetrámeros, mientras que la $A\beta_{1-42}$ se agrega en pentámeros y hexámeros; siendo los hexámeros una unidad estable (Bitan et al. 2003a). El ensamble de estas unidades oligoméricas dan origen posteriormente a protofibrillas y a las placas seniles (Bitan et al. 2003a; Bitan et al. 2003b).

1.2. La EA y el hipocampo.

Como se mencionó anteriormente, una de las primeras estructuras que presenta alteraciones en la EA es el hipocampo (Katzman 1986; Braak et al. 1993; Selkoe 1993; Blennow et al. 2006). El hipocampo es una estructura fundamental para los procesos de la memoria y el aprendizaje y, por lo tanto, su mal funcionamiento puede generar una alteración en dichos procesos cognoscitivos. El hipocampo, al igual que la corteza cerebral, genera patrones de oscilación o ritmos que son relevantes para la memoria y el aprendizaje (Kahana et al. 2001; Buzsaki y Draguhn 2004), ya que proporcionan una ventana temporal para la codificación y evocación de la información (Traub et al. 1999; Engel et al. 2001; Buzsaki y Draguhn 2004; Buzsáki 2006; Artieda et al. 2009). Registros electroencefalográficos (EEG) del cerebro de pacientes con la EA han demostrado una disminución en las oscilaciones de frecuencia rápida y un aumento de las oscilaciones de frecuencia lenta que se conoce como enlentecimiento del EEG (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001; Balleza-Tapia et al. 2010). Más aún, se ha demostrado que la

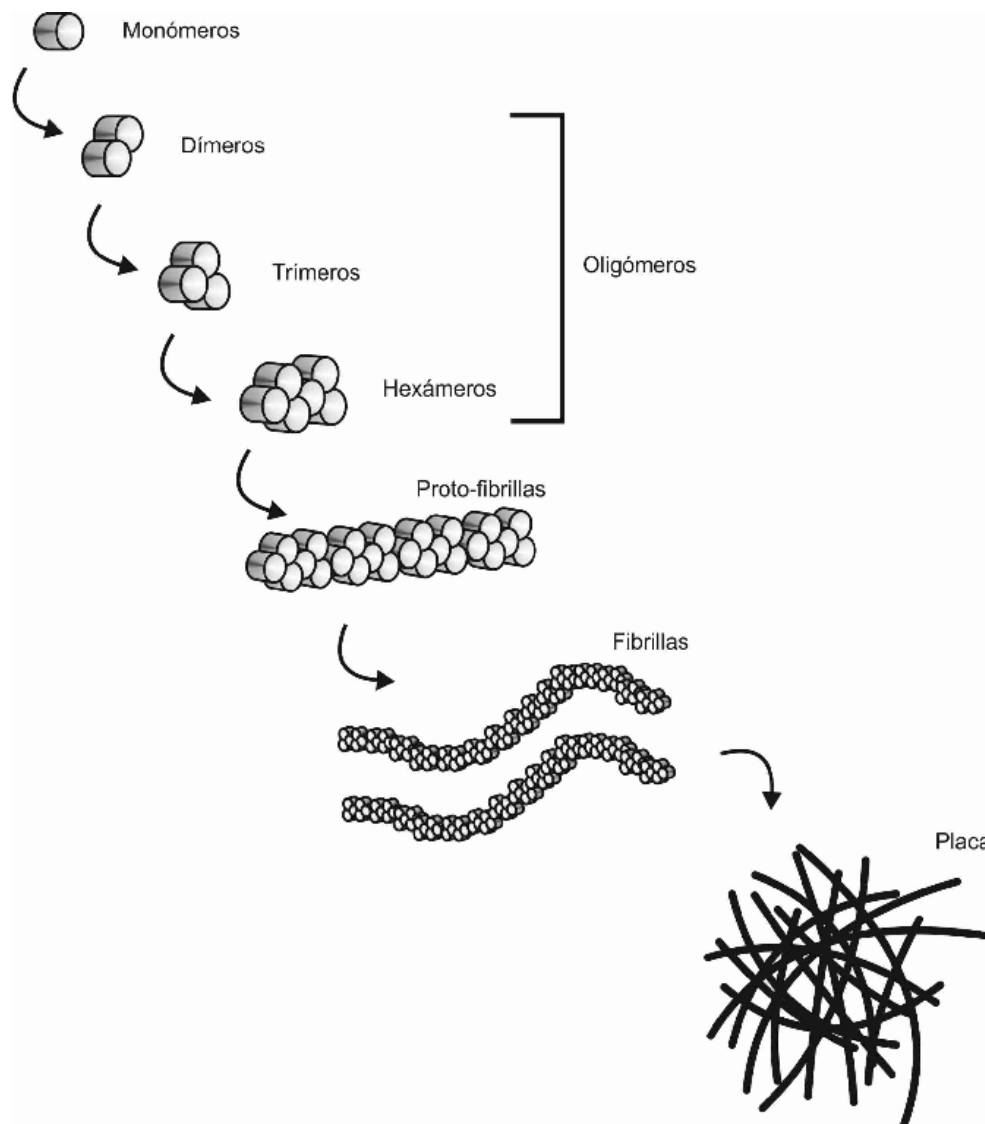


Figura 4 – Modelo de agregación de la Aβ. Los monómeros se agregan rápidamente para formar oligómeros de distintos tamaños: dímeros, trímeros y hexámeros, entre otros. Los hexámeros funcionan como una unidad estable que genera eventualmente protofibrillas y finalmente fibrillas.

Aβ es capaz de generar un enlentecimiento en el espectro de potencia de registros electrofisiológicos del hipocampo *in vivo* (Pena-Ortega y Bernal-Pedraza 2012). Otros trabajos han demostrado también que la Aβ puede alterar la generación de distintas oscilaciones hipocampales, como las oscilaciones beta (Adaya-Villanueva et al. 2010), las gamma (Driver et al. 2007; Pena-Ortega et al. 2012), las theta (Sun y Alkon 2002; Colom et al. 2010; Villette et al. 2010) y la actividad espontánea

(Balleza-Tapia et al. 2010). De esta forma, la A β puede provocar el deterioro cognoscitivo observado en los pacientes con la EA a través de alterar la capacidad del hipocampo de generar y/o mantener las oscilaciones (Balleza-Tapia et al. 2010; Pena-Ortega 2013).

1.2.1. Anatomía del Hipocampo.

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central que se ubica en la zona medial del lóbulo temporal y, de manera similar a otras estructuras corticales, es pareada, con un hipocampo en cada hemisferio del cerebro (Thammaroj et al. 2005). El hipocampo forma parte de la llamada formación hipocampal (Fig. 5) que incluye al giro dentado (GD); el hipocampo propiamente, o *Cornu Ammonis* (CA; conformado por las subregiones CA1, CA2 y CA3); el subículum y la corteza entorrinal (CE) (Thammaroj et al. 2005; Li et al. 2009; Mu y Gage 2011). El hipocampo posee una neuroanatomía distintiva y fácilmente identificable debido su organización laminar (Fig. 5)(Amaral 1993; Thammaroj et al. 2005; Amaral y Lavenex 2007; Li et al. 2009). Esta organización está conformada por 3 capas con características distintivas que a continuación se describen. La capa más profunda se denomina *stratum oriens* en la región CA del hipocampo e *hilus* o capa polimórfica en el GD (van Strien et al. 2009). Esta capa está conformada por una mezcla de fibras aferentes y eferentes, así como de interneuronas y las dendritas basales de las neuronas principales (neuronas granulares en el GD y neuronas piramidales en el hipocampo) (Amaral y Lavenex 2007; van Strien et al. 2009). Posterior al *stratum oriens* se encuentra una capa compuesta de los somas de las neuronas principales e interneuronas conocida como *stratum granulosum* en el GD y *stratum pyramidale* en CA y el subículum (van Strien et al. 2009). La capa más superficial está compuesta por las dendritas apicales de las neuronas principales y se denomina *stratum moleculare* en el DG y el subículum (Amaral y Lavenex 2007; van Strien et al. 2009). En la región CA3, esta capa superficial se subdivide en 3 regiones que se denominan *stratum lucidum*, que es la zona donde llegan los axones de las neuronas de proyección del GD (Amaral y Lavenex 2007; van Strien et al. 2009); *stratum radiatum*, que está

conformada por las dendritas apicales de las neuronas de proyección de CA3; y *stratum lacunosum-moleculare* que comprende las ramas más distales de las dendritas apicales de las neuronas principales e interneuronas (Amaral y Lavenex 2007; van Strien et al. 2009; Witter 2010). En la región de CA1, esta capa se subdivide sólo en *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare* (Amaral y Lavenex 2007; Witter 2010). En el subículum, la capa más superficial se denomina capa molecular (Amaral y Lavenex 2007; Witter 2010).

1.2.2. El circuito hipocampal

La organización del circuito neuronal del hipocampo se ha caracterizado como un circuito multisináptico unidireccional (Fig. 6)(Amaral 1993; Li et al. 2009). La CE es considerada la entrada principal y salida sináptica del hipocampo (Amaral 1993; Amaral y Lavenex 2007; Witter 2010). Esto debido a que la mayoría de las entradas sinápticas sensoriales provenientes de la corteza cerebral hacia el hipocampo, pasan a través de la CE y viceversa (Amaral y Lavenex 2007). Las neuronas de las capas II y III de la CE envían sus axones hacia el GD a través de una haz de fibras denominados vía perforante (Amaral 1993), que inerva también todas las regiones del hipocampo (Amaral 1993; Amaral y Lavenex 2007; Witter 2010). Específicamente, la vía perforante que se origina en la capa II de la CE viaja hacia el GD y la región CA3 del hipocampo (Tamamaki y Nojyo 1993; Amaral y Lavenex 2007; Witter 2010). En el GD las fibras de la vía perforante llegan al *stratum moleculare* y hacen contacto con las dendritas apicales de las células granulares, que son las células principales del GD (Steward 1976; Tamamaki y Nojyo 1993; van Strien et al. 2009). En el caso de la región CA3, la vía perforante llega al *stratum lacunosum* donde hace contacto con las espinas dendríticas de las neuronas piramidales (Tamamaki y Nojyo 1993; van Strien et al. 2009), que son las neuronas principales de toda las regiones de CA (Witter 2010). Por otro lado, la vía perforante que tiene su origen en la capa III de la CE, inerva la región CA1 y el subículum (Witter et al. 1988; Baks-Te Bulte et al. 2005; Amaral y Lavenex 2007; van Strien et al. 2009; Witter 2010), donde hace contacto con las dendritas apicales de las neuronas piramidales en el *stratum lacunosum- moleculare* y la capa

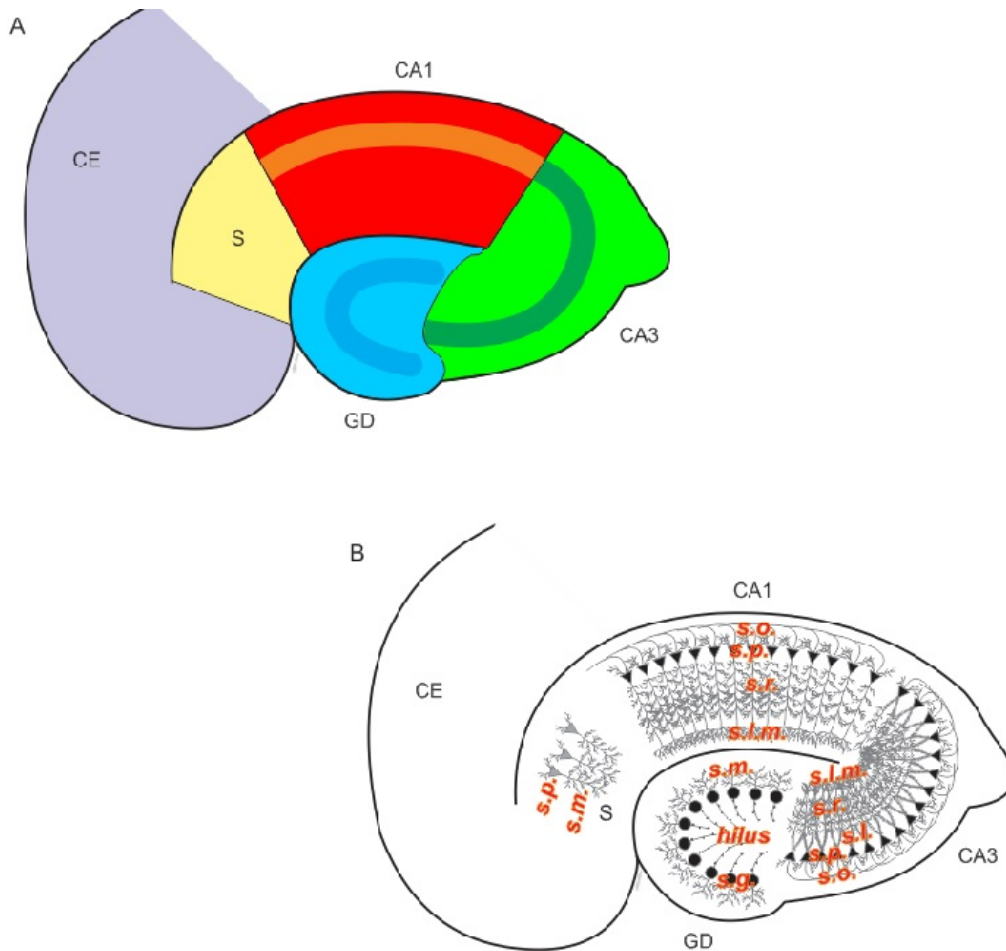


Figura 5 – Neuroanatomía del hipocampo. **A)** Representación de las regiones anatómicas de la formación hipocámpal que comprende el giro dentado (GD; en azul); el hipocampo con sus dos subregiones: CA1 (Rojo) y CA3 (Verde); el subículum (S; en amarillo); y la corteza entorrinal (CE; en morado). **B)** Representación de la organización laminar del hipocampo. El GD está conformado por tres estratos denominados *hilus*, *stratum granulosum* (s.g.) y *stratum moleculare* (s.m.). En el hipocampo, las regiones de CA1 y CA3 están compuestas por el *stratum oriens* (s.o.), el *stratum piramidale* (s.p.), el *stratum radiatum* (s.r.) y el *stratum lacunosum-moleculare* (s.l.m.); adicionalmente, la región de CA3 posee el llamado *stratum lucidum* (s.l.) que se ubica entre el s.p. y el s.r. El subículum está conformado por el *stratum piramidale* (s.p.) y el *stratum moleculare* (s.m.).

molecular, respectivamente (Witter et al. 1988; Baks-Te Bulte et al. 2005; van Strien et al. 2009).

El GD es el siguiente elemento principal del circuito hipocámpal (Li et al. 2009). Las células granulares son las neuronas principales del GD. Los axones de estas neuronas se concentran primero en el *hilus* y posteriormente viajan y se

distribuyen sobre el *stratum lucidum* de la región CA3 del hipocampo (Claiborne et al. 1986). Estas fibras dejan botones sinápticos de gran tamaño (3 a 5 μm en promedio), conocidos como botones musgosos (Amaral y Lavenex 2007). Los botones musgosos hacen contacto con las dendritas proximales de las neuronas piramidales de CA3 (Claiborne et al. 1986).

El siguiente elemento del circuito hipocampal es la región CA3 del hipocampo (Amaral 1993; van Strien et al. 2009). Las neuronas piramidales de CA3 mandan sus axones hacia CA1 a través de una vía conocida como colaterales de Schaffer (Amaral 1993; Li et al. 2009). Estos axones se agrupan primero en el *stratum oriens* de CA3 y posteriormente viajan principalmente hacia el *stratum radiatum* y también hacia el *stratum oriens* de CA1 (Amaral y Lavenex 2007). En el *stratum radiatum*, las colaterales de Schaffer hacen contacto con las dendritas apicales de las neuronas piramidales, mientras que en el *stratum oriens* hacen contacto con las dendritas basales (Amaral y Lavenex 2007). Las colaterales de Schaffer representan la entrada sináptica principal de la región CA1 (Amaral 1993; van Strien et al. 2009).

En la región de CA1, las neuronas piramidales proyectan sus axones principalmente hacia las neuronas piramidales del subículum y también hacia las neuronas de las capas profundas IV/V de la CE (Amaral et al. 1991; Tamamaki y Nojyo 1995; Naber et al. 2001; Amaral y Lavenex 2007; Li et al. 2009). Las proyecciones hacia el subículum se dirigen primero hacia el *stratum oriens* de CA1, posteriormente bajan y se ramifican en el *stratum pyramidal*, así como en la capa molecular del subículum (Amaral y Lavenex 2007), donde hacen contacto con las dendritas distales y apicales de las neuronas piramidales (Witter 2010). La ramificación de los axones provenientes de CA1 hacia el subículum presentan una organización columnar (Amaral 1993).

Finalmente, los axones de las neuronas piramidales del subículum proyectan de regreso a la CE (Amaral 1993; Tamamaki y Nojyo 1995; Naber et al. 2001). Los axones que llegan a la CE se distribuyen y hacen contacto principalmente con las neuronas de la capa V (Amaral y Lavenex 2007). Tanto la región CA1 como el

subículum se han considerado como la salida del circuito hipocampal debido a que proyectan hacia la CE (Witter 2010) y, como se mencionó anteriormente, es la corteza CE la estructura que media la comunicación del hipocampo con otras áreas corticales (Amaral y Lavenex 2007). No obstante, el subículum se considera la principal salida del circuito hipocampal (Witter y Groenewegen 1990; O'Mara et al. 2001; O'Mara 2005), debido a que proyecta no solo a la CE sino, también, hacia otras regiones cerebrales como el complejo mamilario, el tálamo y el núcleo acumbens (Amaral 1993; O'Mara 2005), así como, los núcleos septales, la corteza prefrontal y la amígdala (Amaral y Lavenex 2007).

1.2.3. Oscilaciones hipocampales

Como se mencionó en apartados previos, el hipocampo es capaz de generar diversos patrones de oscilación poblacional que son fundamentales para los procesos cognoscitivos (Kahana et al. 2001; Buzsaki y Draguhn 2004). Estas oscilaciones neuronales están altamente preservadas filogenéticamente en los mamíferos (Gray et al. 1989; Llinas y Ribary 1993; Kahana et al. 2001; Destexhe y Sejnowski 2003; Buzsaki y Draguhn 2004), lo que sugiere que tienen un papel funcional relevante en las redes neuronales (Buzsaki y Draguhn 2004; Uhlhaas et al. 2008). La actividad oscilatoria puede definirse como un conjunto de fluctuaciones rítmicas o repetitivas de la actividad eléctrica de una neurona o un conjunto de neuronas (Artieda et al. 2009; Buzsaki et al. 2012; Basar 2013) que pueden generarse de manera espontánea o en respuesta a un estímulo (Basar 2013). Esta actividad involucra al patrón de disparo rítmico de los potenciales de acción y a las fluctuaciones de los potenciales postsinápticos resultantes de la interacción entre las neuronas de una red neuronal local o de un área cortical (Artieda et al. 2009). Es decir, las oscilaciones cerebrales pueden interpretarse como el resultado de la interacción dinámica entre las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas y las propiedades del circuito al que pertenecen (Buzsaki y Draguhn 2004). Además, la actividad oscilatoria depende también de la coordinación temporal de la actividad de las neuronas (sincronización) que, en

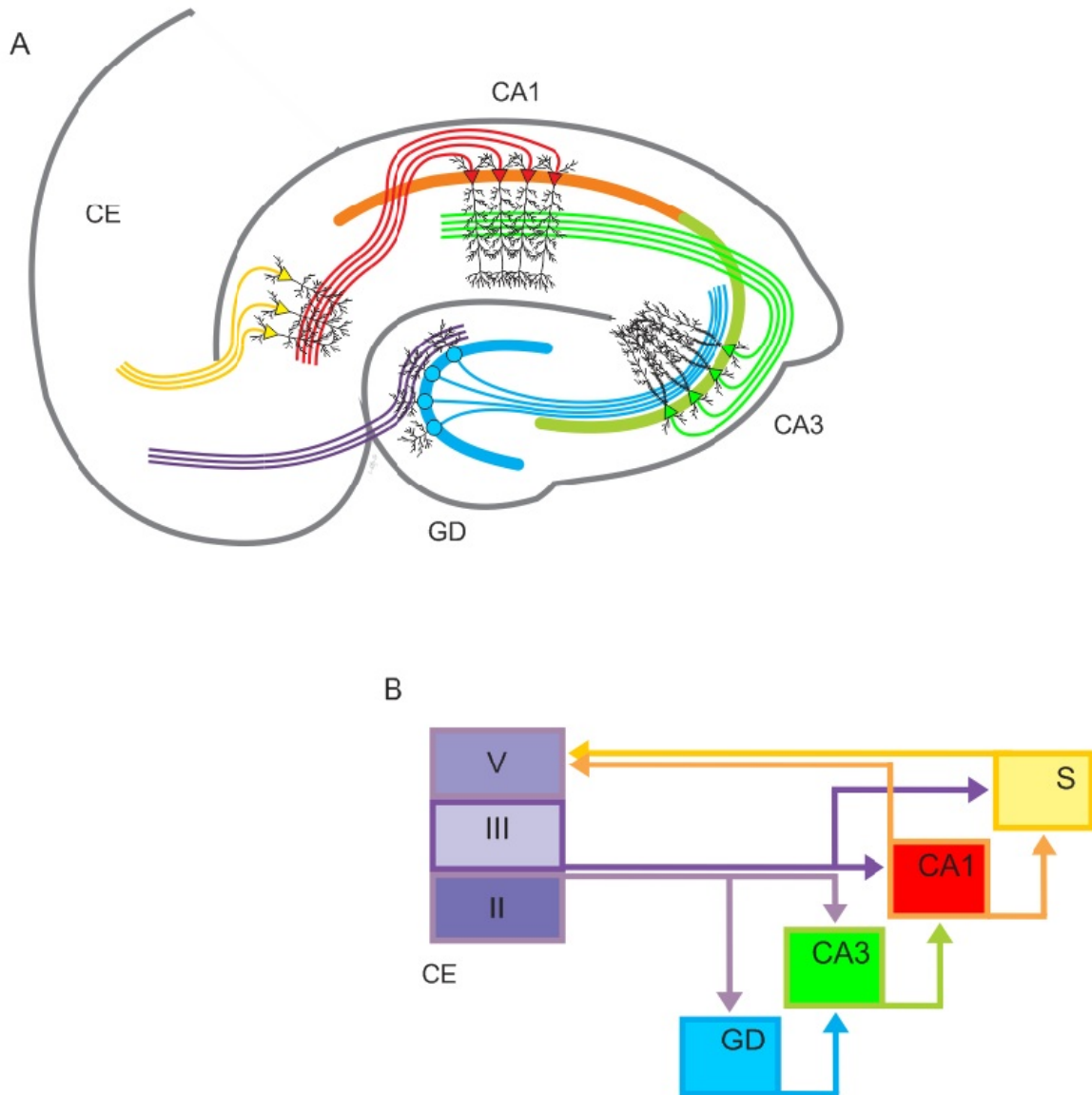


Figura 6 – Circuito neuronal del hipocampo. A) Representación de las principales conexiones del circuito del hipocampo. La corteza entorrinal (CE) proyecta hacia las neuronas granulares del giro dentado (GD) a través de un haz de fibras denominado vía perforante (en naranja). Las neuronas granulares a través de las fibras musgosas (en azul) proyectan a las neuronas piramidales de la región CA3 y éstas a través de las colaterales de Schaffer (en verde) hacia las piramidales de CA1. Las neuronas de CA1 mandan sus axones al subículo (S) y las neuronas de éste proyectan de nuevo hacia la CE. **B)** Representación esquemática de todas las conexiones del circuito del hipocampo. Se muestra como la vía perforante que proyecta a partir de la capa II de la CE llega tanto al GD como a CA3. La capa III de la CE, por otro lado, conecta hacia CA1 y S. La región CA1 del hipocampo puede proyectar directo a la CE en la capa V/VI. Es importante notar que todas las conexiones del circuito son unidireccionales.

conjunto originan las fluctuaciones rítmicas en el potencial de campo (Buzsaki et al. 2012).

Convencionalmente, las oscilaciones se han clasificado en rangos de frecuencia y se les designó una letra griega para su identificación (Buzsáki 2006). A la actividad en el rango de frecuencias de 0.5 a 4 Hz se le denomina oscilación o ritmo delta, de 4 a 8 Hz se denomina ritmo theta, al rango de 8 a 12 Hz ritmo alfa, ritmo beta al rango de frecuencias de 12 a 30 HZ y ritmo gamma a las frecuencias mayores de 30 Hz (Buzsáki 2006). Actualmente, se ha planteado que estas oscilaciones constituyen un mecanismo básico del funcionamiento del cerebro ya que proporcionan una ventana temporal donde se reclutan de manera coherente múltiples redes neuronales para la representación, procesamiento, almacenaje y evocación de la información (Traub et al. 1999; Engel et al. 2001; Buzsaki y Draguhn 2004; Buzsáki 2006; Artieda et al. 2009).

La actividad oscilatoria en las diferentes bandas de frecuencia, aparece a diferentes niveles cerebrales, incluyendo el hipocampo, y participa en procesos perceptivos, cognitivos y motores (Artieda et al. 2009; Lisman y Jensen 2013). El ritmo theta, en particular, se ha asociado con diferentes procesos cognoscitivos en distintas especies, incluyendo el humano. Por ejemplo, en roedores, el ritmo theta incrementa su potencia, particularmente en el hipocampo, durante la atención y la locomoción (Vanderwolf 1969), así como en la formación de la memoria espacial (Winson 1978). Se ha reportado también que el ritmo theta es fundamental para las conductas de exploración y para el sueño de movimientos oculares rápidos (McNaughton et al. 2006). En humanos, el ritmo theta juega un papel importante durante tareas asociadas a la memoria de trabajo (Gevins et al. 1997; Tesche y Karhu 2000; Jensen y Tesche 2002; Raghavachari et al. 2006), y la memoria episódica (Guderian et al. 2009; Lega et al. 2012; Hsieh y Ranganath 2014). Por ejemplo, se ha observado un incremento en la potencia del ritmo theta poco antes de la aplicación de un estímulo que va asociado a la memoria (Kleberg et al. 2014). De forma similar, se ha reportado que el nivel de acoplamiento del disparo de las neuronas hipocampales a alguna fase de ritmo theta puede predecir el nivel de

consolidación en la formación de la memoria (Rutishauser et al. 2010). El ritmo gamma, por su parte, está relacionado con procesos cognoscitivos como en el "binding" sensorial (Tallon-Baudry y Bertrand 1999; Bertrand y Tallon-Baudry 2000), la memoria (Fell et al. 2001) y la atención (Fries et al. 2001). Por ejemplo, estudios de memoria de largo plazo en monos han demostrado que tanto la potencia como la coherencia del ritmo gamma, particularmente en el hipocampo, se incrementa durante el periodo de codificación de la información (Jutras et al. 2009). Resultados similares se han encontrado también en humanos, tanto en el hipocampo (Sederberg et al. 2007), como en la corteza cerebral (Osipova et al. 2006; Sederberg et al. 2007). Más aún, en registros de MEG y registros intracraneales realizados en humanos se ha reportado un incremento en la potencia del ritmo gamma durante el periodo de retraso ("delay") en tareas que implican a la memoria de trabajo y que dicho incremento varía dependiendo del número de datos que se necesita mantener en la memoria (Howard et al. 2003; Roux et al. 2012).

Por otra parte, las oscilaciones también son capaces de generar un marco funcional que favorece otros mecanismos asociados con los procesos cognoscitivos. Por ejemplo, se ha observado que la aplicación de trenes de estimulación con frecuencia theta induce la LTP (Larson y Lynch 1986; Greenstein et al. 1988). Por otra parte, cuando se utiliza una estimulación a frecuencias similares al ritmo gamma sobre la cresta del ritmo theta se induce la LTP de manera más eficiente (Pavlidis et al. 1988). También se ha reportado que los potenciales sinápticos se incrementan si coinciden con la cresta del ritmo theta y son inhibidos si coinciden con el valle del mismo tanto en el corto plazo (Wyble et al. 2000), como en el largo plazo (Hyman et al. 1990). Más aún, descubrimientos recientes indican que las oscilaciones asociadas a una entrada sensorial facilitan la plasticidad sináptica y la cooperatividad de ensambles neuronales para formar la representación temporal del estímulo y para consolidar la información a largo plazo (Buzsaki y Draguhn 2004).

En resumen, la actividad oscilatoria posibilita la sincronización de grupos neuronales de la misma área cortical o de grupos neuronales de áreas distantes entre sí que intervienen, de manera conjunta, en una acción motora, tarea cognitiva o perceptiva (Artieda et al. 2009). Por esta razón, una alteración en la actividad oscilatoria puede favorecer y/o representar un funcionamiento aberrante de las redes neuronales y, por lo tanto, ser la base fisiopatología de enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Uhlhaas et al. 2008; Artieda et al. 2009). Por ejemplo, se han identificado alteraciones en los patrones oscilatorios en la enfermedad de Parkinson (Brown 2006; Artieda et al. 2009; McCarthy et al. 2011; Schwab et al. 2013), la esquizofrenia (Gallinat et al. 2004; Light et al. 2006; Uhlhaas et al. 2008; Uhlhaas y Singer 2010), el desorden bipolar (Oda et al. 2012; Onitsuka et al. 2013; Ozerdema et al. 2013), la depresión (Fingelkurts et al. 2006) y la enfermedad de Alzheimer (Palop y Mucke 2010; Lizio et al. 2011; Mucke y Selkoe 2012; Goutagny y Krantic 2013).

1.2.3. Alteraciones en las oscilaciones cerebrales de pacientes con la EA.

La hipótesis de que una alteración en las oscilaciones cerebrales puede ser la base del deterioro cognoscitivo en la EA se ve apoyada en observaciones directas en pacientes con EA en los que se ha reportado un "enlentecimiento" en registros cerebrales medidos a través de EEG y MEG (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001). Dicho enlentecimiento correlaciona, además, con el nivel de la demencia en etapas tempranas de la EA (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001), y también está reportado en modelos animales de la EA (Wang et al. 2002).

De manera general, los registros en humanos con EA han demostrado que estos pacientes presentan un incremento en la potencia de los ritmos theta y delta en mediciones realizadas tanto con EEG (Coben et al. 1985; Soininen et al. 1989; Martin-Loeches et al. 1991; Soininen et al. 1991b; Elmstahl et al. 1994; Prichep et al. 1994; Jelic et al. 1996; Stam et al. 1996; Chiaramonti et al. 1997; Huang et al. 2000; Jelic et al. 2000; Adler et al. 2003; Ponomareva et al. 2003; Babiloni et al.

2004; Koenig et al. 2005; van der Hiele et al. 2007a), como con MEG (Berendse et al. 2000; Fernandez et al. 2006; Poza et al. 2007a; de Haan et al. 2008; Poza et al. 2008a; Besga et al. 2010), en las regiones temporal, parietal y occipital (Fernandez et al. 2002; Fernandez et al. 2003; de Haan et al. 2008; Besga et al. 2010). El incremento en la potencia del ritmo theta comienza en etapas tempranas de la EA (Schreiter-Gasser et al. 1994; Bennys et al. 2001; Czigler et al. 2008) y aumenta considerablemente hacia las etapas tardías (Prichep et al. 1994). Por su parte, el incremento en el ritmo delta está más relacionado con las etapas tardías de la EA (Coben et al. 1985; Prichep et al. 1994). Además, algunos estudios han reportado que el incremento en la potencia del ritmo theta correlaciona con el puntaje de las pruebas cognitivas de los pacientes con EA (Brenner et al. 1986; Leuchter et al. 1987; Rae-Grant et al. 1987; Filipovic et al. 1989; Primavera et al. 1990; Gueguen et al. 1991; Schreiter-Gasser et al. 1994; Strijers et al. 1997; Rodriguez et al. 1998; Fernandez et al. 2002), lo que sugiere que existe una correlación entre el incremento en la potencia de los ritmos lentos y el deterioro cognoscitivo encontrado en los pacientes con EA (Claus et al. 1998; Fernandez et al. 2002). En el caso del ritmo gamma, existen pocos estudios que han medido este ritmo en los pacientes con la EA y la mayoría ha encontrado una disminución en la potencia de este ritmo (Herrmann y Demiralp 2005; Koenig et al. 2005; de Haan et al. 2008; Poza et al. 2008a); principalmente en las regiones parietal, temporal y occipital (de Haan et al. 2008). No obstante, el trabajo de van Deursen y colaboradores (2008) han reportado un aumento de este ritmo en sujetos con EA (van Deursen et al. 2008). En contraste con los ritmos theta y delta, se ha observado una disminución en la potencia de los ritmos alfa y beta, tanto en estudios realizados con EEG (Coben et al. 1985; Penttila et al. 1985; Prinz y Vitiello 1989; Soininen et al. 1989; Giannitrapani et al. 1991; Soininen et al. 1991b; Dierks et al. 1993; Elmstahl et al. 1994; Holschneider y Leuchter 1995; Signorino et al. 1995; Ihl et al. 1996; Jelic et al. 1996; Pucci et al. 1998; Rodriguez et al. 1999; Huang et al. 2000; Musha et al. 2002; Ponomareva et al. 2003; Moretti et al. 2004; Koenig et al. 2005; van der Hiele et al. 2007a; Babiloni et al. 2009), como con MEG (Berendse et al. 2000; Osipova et al. 2005; Fernandez et al. 2006; Franciotti et al. 2006; Poza et al. 2007b; de

Haan et al. 2008; Poza et al. 2008a). De manera similar a los ritmos theta y delta, la disminución en el ritmo alfa parece estar más relacionada a las etapas tempranas de la EA (Czigler et al. 2008) y la disminución en el ritmo beta a las etapas tardías (Ihl et al. 1996). La alteración en estas bandas de frecuencia se ha reportado en las regiones temporal, parietal y occipital en ambas bandas de frecuencia (Schreiter-Gasser et al. 1993; Holschneider y Leuchter 1995; Osipova et al. 2005; de Haan et al. 2008). Más aún, se ha observado un desplazamiento de la actividad en la frecuencia alfa hacia regiones frontales del cerebro (Dierks et al. 1993; Huang et al. 2000; Kurimoto et al. 2008), lo que correlaciona con el nivel de demencia de los pacientes con la EA (Dierks et al. 1993; Chiaramonti et al. 1997; Claus et al. 2000).

Los pacientes con la EA que expresan el alelo ApoE- ϵ 4 (que como se mencionó previamente, es un factor de riesgo de origen genético para el desarrollo de la EA) presentan una alteración mayor en los diferentes ritmos cerebrales con respecto a pacientes que no poseen el alelo (Lehtovirta et al. 1996a; Ponomareva et al. 2008). Es decir, los pacientes ApoE- ϵ 4 registran un incremento aún mayor en el ritmo theta (Lehtovirta et al. 1996a) y Delta (Lehtovirta et al. 1996a; Ponomareva et al. 2008), así como una disminución mayor en las oscilaciones alfa (Lehtovirta et al. 1996a; Babiloni et al. 2006a; Ponomareva et al. 2008) y beta (Lehtovirta et al. 1996a). Más aún, el análisis cuantitativo del registro de EEG en individuos con la mutación en la presenilina I (E280A Presenilin-1; una mutación asociada a la EA de tipo familiar), ha demostrado una alteración temprana de la banda de frecuencia beta antes de que aparezcan los síntomas clínicos (Rodriguez et al. 2014). Estos estudios sugieren que la A β puede estar involucrada en las alteraciones funcionales de las redes neuronales que se refleja como alteraciones en la potencia de las distintas oscilaciones cerebrales.

1.2.4. Efecto de la A β sobre las oscilaciones cerebrales.

A la fecha, existen diversos estudios que han demostrado que la A β es capaz de alterar las oscilaciones, principalmente, en el hipocampo. Por ejemplo, se ha reportado que la inyección intracerebroventricular de la A β produce deterioro cognoscitivo que correlaciona con una reducción en la generación del ritmo theta

en el hipocampo *ex vivo* (Sun y Alkon 2002). La microinyección de la A β en el septum medial también es capaz de inducir una disminución del 49% de la potencia del ritmo theta del hipocampo (Colom et al. 2010). Este efecto sobre el ritmo theta hipocampal se debe a que la microinyección de la A β provoca una disminución de la actividad de las neuronas colinérgicas del septum medial que inervan el hipocampo y son importantes para la generación del ritmo theta (Bland y Colom 1993; Lee et al. 1994; Bland et al. 1999). Recientemente, datos publicados del laboratorio demostraron que la inyección intracisternal de la A β es capaz de alterar la evocación a través de un estímulo sensorial del ritmo theta (Pena-Ortega y Bernal-Pedraza 2012). Es importante mencionar que la microinyección de la A β provoca un aumento de las frecuencias lentas en el registro electrofisiológico de la actividad hipocampal *in vivo* que se manifiesta como un desplazamiento hacia la izquierda en el espectro de potencia (Pena-Ortega y Bernal-Pedraza 2012), de manera muy similar a lo observado en el EEG de los pacientes con la EA (Lehtovirta et al. 1996a; Babiloni et al. 2006a; Ponomareva et al. 2008). Más aún, Villete y colaboradores (2010) demostraron que la microinyección de la A β directamente en el hipocampo es capaz de crear una disminución en la potencia y la frecuencia del ritmo theta asociado a una prueba de reconocimiento visuoespacial en ratas (Villette et al. 2010). Estas alteraciones inducidas por la A β están asociadas con una disminución en la tasa de disparo de las neuronas GABAérgicas que se encuentran en el septum medial y que son responsables de la propagación del ritmo theta al hipocampo (Villette et al. 2010). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que la inducción del ritmo gamma con la aplicación de kainato se inhibe en rebanadas de hipocampo de ratones que sobreexpresan una mutante de la APP (Driver et al. 2007). De hecho, se ha demostrado que la aplicación aguda de la A β inhibe el ritmo theta (Gutierrez-Lerma et al. 2013) y el ritmo gamma (Pena-Ortega et al. 2012) en rebanadas que contienen al hipocampo (Pena-Ortega et al. 2012). Finalmente, se ha reportado que la aplicación de la A β es capaz de disminuir también las oscilaciones de tipo beta en rebanadas de hipocampo (Adaya-Villanueva et al. 2010).

1.3. Las Redes neuronales y la EA

Como ya se mencionó en apartados previos, el deterioro cognoscitivo en la etapa temprana de la EA parece estar asociado a alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales inducidas por las formas solubles de la A β , más que a la neurotoxicidad asociada a las formas fibrilares. En este sentido, se sabe que los oligómeros solubles de la A β se acumulan en las sinapsis (Lacor et al. 2004) y se ha demostrado que son capaces de alterar la transmisión sináptica (Rowan et al. 2007; Shankar et al. 2007; Nimmrich et al. 2008) y el proceso plástico de la LTP (Lambert et al. 1998; Walsh et al. 2002a; Wang et al. 2002; Rowan et al. 2004; Nomura et al. 2005; Townsend et al. 2006; Rowan et al. 2007). También se sabe que las oscilaciones neuronales y la actividad espontánea de varios circuitos neuronales se alteran con la A β (Adaya-Villanueva et al. 2010; Balleza-Tapia et al. 2010; Colom et al. 2010; Pena-Ortega y Bernal-Pedraza 2012), así como las propiedades de disparo de las neuronas (Yun et al. 2006; Orban et al. 2010). Este efecto de la A β sobre las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas puede ser la base de las alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales (Pena-Ortega 2013). Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han demostrado que la A β puede inducir un deterioro en las oscilaciones cerebrales, que están íntimamente relacionadas con los procesos cognoscitivos. Las oscilaciones cerebrales son el resultado de la dinámica de las redes neuronales y dependen de la actividad de las neuronas y de las conexiones entre ellas (Artieda et al. 2009). Por lo tanto, una alteración en la dinámica de las redes neuronales responsables de la generación de las oscilaciones puede ser la base fisiopatológica de los problemas cognoscitivos observados en los pacientes con la EA.

1.3.1. Redes Neuronales.

Cómo se mencionó en la sección anterior, la actividad oscilatoria cortical se encuentra alterada desde las etapas tempranas de la EA. Estas oscilaciones anormales pueden ser el resultado de una dinámica aberrante de las redes neuronales que las producen y pueden jugar un papel fisiopatológico importante en los síntomas tempranos de la enfermedad (Artieda et al. 2009). De manera general,

se puede decir que las redes neuronales constituyen un sistema auto-organizado que presentan un alto grado de complejidad debido al elevado número de elementos que lo componen y de la forma en que éstos se interrelacionan (Artieda et al. 2009). Convencionalmente, el potencial de acción constituye la unidad básica del procesamiento de la información en el sistema nervioso central de los mamíferos (Axmacher et al. 2006). No obstante, los potenciales de acción de una neurona particular no ocurren de forma aislada e independiente, si no, están correlacionados a través de la actividad sincrónica de las redes neuronales a la cual pertenece esa neurona (Axmacher et al. 2006). De tal manera que la actividad sincrónica de las redes neuronales subyace el procesamiento y transmisión de la información en el cerebro (Axmacher et al. 2006). Dicha función involucra a las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas que forman parte de la red (Mao et al. 2001; Fujisawa et al. 2006; Klausberger y Somogyi 2008). Más aún, la actividad de red depende de los patrones espacio-temporales de la actividad sincrónica de la red neuronal local y su correlación con otras redes neuronales en distintas zonas cerebrales; generando así los patrones y marcos funcionales donde se procesa la información (Klausberger y Somogyi 2008; Artieda et al. 2009; Battaglia et al. 2011). Por lo tanto, se puede decir que las funciones cognitivas no dependen solo de la localización anatómica de la actividad neuronal, sino que también depende de los patrones temporales precisos de la actividad sincrónica de los ensambles o redes neuronales (Axmacher et al. 2006; Artieda et al. 2009) (Pena-Ortega 2013). Un ejemplo de esto se observa en el trabajo de Axmacher y colaboradores (2006), que muestran que la sincronización en la banda de frecuencia gamma entre las región hipocampal y la parahipocampal puede inducir LTP en la región CA3 del hipocampo (Axmacher et al. 2006).

1.3.2. Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales en pacientes con la EA.

Cómo ya se mencionó, la A β es capaz de alterar la función de las redes neuronales en el hipocampo (Para una revisión ver (Pena-Ortega 2013). Una de estas alteraciones se refleja como una disminución en la capacidad de la red de

generar y/o mantener las oscilaciones cerebrales y, por lo tanto, puede ser la base del deterioro cognoscitivo que se observa en los pacientes con la EA (Pena-Ortega 2013). La alteración de las oscilaciones cerebrales en los pacientes con la EA se ha descrito ampliamente en secciones anteriores, así como el efecto directo de la A β sobre esta actividad de la red (ver apartado 1.2.4.). Estos efectos incluyen reportes donde se observa un deterioro en las oscilaciones tanto en humanos (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001), como en modelos animales que reproducen la EA (Wang et al. 2002). Más aún, se ha demostrado que la aplicación de la A β de manera aguda o crónica es capaz de reproducir las alteraciones en las oscilaciones observadas en los pacientes con EA (Sun y Alkon 2002; Driver et al. 2007; Adaya-Villanueva et al. 2010; Colom et al. 2010; Villette et al. 2010; Pena-Ortega y Bernal-Pedraza 2012; Pena-Ortega et al. 2012). Dado que las alteraciones en los patrones de oscilación observadas en pacientes con la EA parecen reflejar un deterioro en la transmisión de la información entre regiones corticales (Delbeuck et al. 2003), se ha planteado que la EA es un síndrome de desconexión funcional en la cual el procesamiento y transmisión de la información entre las redes neuronales locales o entre estructuras corticales se interrumpe (Delbeuck et al. 2003). En este sentido, se han empleado distintos métodos analíticos que permiten evaluar la eficiencia en la transmisión de la información en los cerebros de pacientes con la EA, ya sea a nivel de redes neuronales locales o entre redes de distintas zonas corticales y que a continuación se describen.

1.3.2.1. Coherencia

Una forma de medir la conectividad funcional entre dos estructuras cerebrales es la coherencia, una medida lineal normalizada que permite ver la similitud entre dos canales del EEG en una banda de frecuencia (oscilación) particular, es decir, calcula la sincronía de la actividad neuronal que refleja la conectividad cortical (Thatcher et al. 1986; Nunez et al. 1997; Nunez et al. 1999; Adler et al. 2003). Analizando los registros de EEG y MEG de pacientes con la EA, se ha observado una pérdida en la coherencia entre diferentes áreas del cerebro

(Leuchter et al. 1987; Leuchter et al. 1992; Dunkin et al. 1994; Jelic et al. 1996; Comi et al. 1998; Berendse et al. 2000). Esta pérdida de la coherencia se ha observado para todas las bandas de frecuencia (Comi et al. 1998; Berendse et al. 2000) y refleja la pérdida en la comunicación entre las distintas áreas del cerebro de los pacientes con la EA (Besthorn et al. 1994; Dunkin et al. 1995).

1.3.2.2. Probabilidad de sincronización (Synchronization likelihood)

La probabilidad de sincronización (SL; por sus siglas en inglés) es una variante de la medida de la coherencia (Stam et al. 2003) que combina la sensibilidad a la información lineal y no-lineal con una alta resolución temporal (Rombouts et al. 1995). Esta medida es una herramienta adecuada para caracterizar los cambios en la actividad sincrónica cerebral (Stam et al. 2003) y se puede utilizar para probar la conectividad funcional. El análisis de las señales de EEG y MEG demostró una disminución significativa de la SL en los pacientes con la EA (Stam et al. 2002; Stam et al. 2003; Pijnenburg et al. 2004; Stam et al. 2005; Babiloni et al. 2006b; Stam et al. 2006). Los valores bajos en la SL se asociaron a las bandas de frecuencia delta, theta, alfa, beta y gama (Stam et al. 2002; Stam et al. 2003; Pijnenburg et al. 2004; Stam et al. 2005; Babiloni et al. 2006b; Stam et al. 2006; Stam et al. 2009). Más aún, los valores bajos de la SL en la banda beta se han asociado con las etapas tempranas de la EA (Stam et al. 2003; Pijnenburg et al. 2004).

1.3.2.3. Primer exponente de Lyapunov.

El primer exponente de Lyapunov (L1) es una medida de la flexibilidad de procesamiento de información en el cerebro (Jeong 2004). Se ha observado que los pacientes con EA tienen bajos valores de L1 comparados con los controles normales de edad avanzada (Jeong et al. 1998; Jeong et al. 2001). Los resultados de este estudio sugieren que los cerebros con AD muestran comportamientos que son menos caóticos que los cerebros normales (Jeong et al. 1998).

1.3.2.4. Análisis de información mutua

Este análisis es una medida de la dependencia estadística lineal y no-lineal entre dos series temporales y proporciona una medida de proyección de puntos futuros tomando como referencia los puntos anteriores (Jeong et al. 2001; Gomez et al. 2006b). A través de este análisis se ha observado una disminución significativa en la transmisión de información entre pares de señales de EEG provenientes de pacientes con la EA (Jeong et al. 2001). Del mismo modo, los estudios con MEG han reportado una disminución en la transmisión de la información, que refleja una dinámica aberrante de la actividad cerebral en la EA (Gomez et al. 2006b; Gomez et al. 2007b). Los resultados de estos estudios sugieren que los valores bajos en el análisis de información mutua pueden correlacionarse con el deterioro cognoscitivo en la EA (Gomez et al. 2006b).

1.3.2.5. Complejidad Omega

La complejidad omega es un parámetro que indica el nivel de sincronización entre estructuras que puede inferir si uno o más mecanismo están implicado en ella (Czigler et al. 2008). Se ha reportado que el valor de complejidad omega se incrementa en pacientes con AD en las primeras etapas y se asocia con un incremento en el número de conjuntos neuronales independientes y, por lo tanto, probablemente indica la desintegración de diferentes partes del sistema nervioso, incluyendo diferentes regiones de la corteza cerebral (Czigler et al. 2008).

1.3.2.6. Correlación dimensional

La correlación dimensional (D2), es una medida de la complejidad dimensional de un sistema y refleja el número de variables independientes que son necesarios para describir la dinámica del sistema (Jelles et al. 1999b; Jeong 2004; Abasolo et al. 2006b). Se ha encontrado una disminución en los valores de la D2 en pacientes con la EA que denota una disminución de la complejidad dimensional en el registro del EEG (Pritchard et al. 1991; Pritchard et al. 1994; Stam et al. 1994; Besthorn et al. 1995; Stam et al. 1995; Stam et al. 1996; Jeong et al. 1998; Jelles et al. 1999a; Jelles et al. 1999b; Jeong et al. 2001; Jeong 2004). También en los

registros de MEG se encontraron unos valores bajos de D2 (Abatzoglou et al. 2007). Además, la reducción en la D2 correlacionó significativamente con el grado de demencia, así como el aumento en las bandas de baja frecuencia en la señal del EEG (Stam et al. 1994; Besthorn et al. 1995; Stam et al. 1995).

1.3.2.7. Complejidad de Lempel-Ziv

La complejidad de Lempel-Ziv (cLZ) es una medida no paramétrica de la complejidad en una señal unidimensional relacionada con el número de subseries distintas y la tasa de su recurrencia (Abasolo et al. 2006b). Esta medida refleja la tasa de aparición de patrones de actividad nuevos a lo largo del registro del EEG o MEG. Los estudios realizados con este análisis han demostrado que los pacientes con la EA tuvieron valores significativamente más bajos de la cLZ, lo que sugiere una disminución en la complejidad de los patrones de actividad del EEG y MEG en los sujetos con EA (Gomez et al. 2005; Abasolo et al. 2006b; Gomez et al. 2006a; Gomez et al. 2009a). Dicha reducción puede interpretarse como una disminución en la complejidad del sistema asociada con la inactivación de las redes neurales previamente activas (Abasolo et al. 2006b).

1.3.2.8. Entropía

La entropía es un concepto asociado a los eventos aleatorios y a la previsibilidad: una mayor entropía se asocia a menudo a un aumento en la aleatoriedad y menos orden de un sistema; pero también representa una medición de la irregularidad de una serie a través del tiempo (Abasolo et al. 2005). Tanto los registros de EEG como MEG de pacientes con EA se han analizado con los parámetros de entropía y los resultados muestran que sus valores son menores con respecto a los registros de sujetos control (Abasolo et al. 2005; Abasolo et al. 2006a; Poza et al. 2007a; Poza et al. 2008b). La pérdida de entropía se ha encontrado en todas las regiones del cerebro (Poza et al. 2008b). Los bajos valores de entropía sugieren una pérdida en la irregularidad y la complejidad del registro de EEG y MEG (Berendse et al. 2000; Gomez et al. 2007a; Poza et al. 2007a; Poza et al. 2008b; Gomez et al. 2009a).

1.3.2.9. Dimensión fractal de Higuchi

La dimensión fractal de Higuchi (HFD) es una medida no-lineal que estima la complejidad dimensional de una señal a través del tiempo (Accardo et al. 1997). El registro de MEG de los pacientes con EA presentó valores pequeños de HFD, lo que sugiere que los ritmos cerebrales registrados con MEG son menos complejos en pacientes con EA que en los sujetos control (Gomez et al. 2009b). Esto indica una anomalía en la dinámica de la actividad de los cerebros de los pacientes con la EA (Gomez et al. 2009b).

1.3.3. Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales en modelos animales de la EA.

A pesar de que la evidencia en la alteración de la funcionalidad de las redes neuronales en la EA está ampliamente documentada (Gomez et al. 2009b), a la fecha, los mecanismos responsables de las alteraciones sobre la función y la dinámica de las redes neuronales producida por la A β aún no está bien descrita (Gomez et al. 2009b). Una de las estrategias que se ha utilizado para poder estudiar de forma sistemática el desarrollo y progresión de la EA, así como el papel fisiopatológico de la A β en este proceso, es el uso de modelos animales en los que se eleva el contenido cerebral de la A β (Gomez et al. 2009b). Por ejemplo, Brown y colaboradores (2005) estudiaron la transmisión sináptica en rebanadas de hipocampo de los ratones transgénicos TAS10. Estos ratones sobreexpresan la APP humana con una mutación denominada sueca (hAPPswe). En este estudio se encontró una disminución en la relación entrada-salida de las sinapsis glutamatérgicas de las colaterales de Schaffer en los ratones TAS10. Más aún, observaron que la sincronización de la red neuronal inducida por la aplicación del fármaco 4-aminopiridina es menor en las rebanadas de hipocampo provenientes de estos ratones, lo que sugiere que hay alteraciones en la transmisión glutamatérgica cuando se sobreproduce la A β que están asociadas con las alteraciones en la actividad sincrónica de la red neuronal del hipocampo (Brown et al. 2005a). Otro estudio, utilizando los ratones doble transgénicos Tg2576 que sobreexpresan la mutación hAPPswe y una mutante de la presenilina 1 (G384A), demostró una

alteración en los niveles de expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.1 α , tanto en neuronas piramidales como en interneuronas en la corteza cerebral e hipocampo. Esta alteración en la expresión de los canales Nav1.1 α correlacionó con un aumento en la actividad de alta frecuencia y con un deterioro en tareas de memoria (Corbett et al. 2013). Utilizando otro ratón doble transgénico (APP23xPS45) que se sobreexpresa la hAPPswe y la mutante de la presenilina 1 (G384A), se ha observado un efecto diferencial sobre la actividad de la población neuronal de la corteza *in vivo* (Busche et al. 2008). Se encontró que existe una población neuronal que presenta una disminución en su actividad, mientras que otra población muestra una hiperactividad. Interesantemente, las neuronas hiperactivas se localizan en la periferia de las placas seniles. Un estudio posterior demostró resultados similares en la región CA1 del hipocampo de los mismos ratones transgénicos (Busche et al. 2012). Más aún, se observó que este efecto diferencial sobre las poblaciones neuronales se presenta en ratones transgénicos jóvenes; donde aún no hay formación de placas seniles. Además, éste efecto diferencial se replicó también cuando se agregaron oligómeros de la A β de forma aguda, lo que sugiere que las formas solubles de la A β promueven este comportamiento aberrante de las redes hipocámpal y cortical (Busche et al. 2012). Por otro lado, Hazra y colaboradores encontraron que los ratones APdE9, que contienen la hAPPswe y la mutación en la enzima presenilina 1 PSEN1DeltaE9, presentan una alteración en la funcionalidad de la red neuronal del giro dentado (Hazra et al. 2013). Estos autores observaron que al estimular con alta frecuencia la vía perforante, se evoca un potencial de campo anormal en el giro dentado que se caracteriza por una amplitud mayor que la observada en ratones control. Adicionalmente, se observó que en rebanadas control, la estimulación de alta frecuencia es capaz de activar solo la región que comprende a la vía perforante en el giro dentado, mientras que en las rebanadas provenientes de ratones transgénicos la activación se extiende hasta la región CA3. Buscando el mecanismo celular responsable de este efecto se encontró que las interneuronas de la capa molecular del giro dentado presentaban una alteración en su actividad eléctrica, lo cual provoca una sobreactivación de la vía perforante y también, la

activación inespecífica en el perfil espacial de activación de la red neuronal. Finalmente, Grienberger y colaboradores (2012) investigaron el aumento en la concentración de la A β en relación a las alteraciones neuronales en la corteza visual de los ratones transgénicos APP23xPs45 *in vivo*. Estos autores demostraron que el deterioro progresivo en lo que se llama “tuning” neuronal asociado a la orientación de estímulos visuales ocurre paralelamente al incremento, dependiente de la edad, de la A β en la corteza visual. Es importante hacer notar que este deterioro se encontró solo en neuronas que son hiperactivas durante la actividad espontánea de la corteza visual. Además, esta alteración correlaciona con un deterioro en la discriminación de patrones visuales (Grienberger et al. 2012).

1.3.4 Alteraciones en la funcionalidad de las redes neuronales inducidas por la A β *in vitro*.

Otra de las estrategias que se ha empleado para entender el mecanismo responsable del efecto de la A β sobre la dinámica de las redes neuronales ha sido el empleo de modelos *in vitro*. Por ejemplo, utilizando técnicas con imágenes de calcio en rebanadas de septum medial, se ha observado que la aplicación de la A β altera la actividad de tres poblaciones distintas de neuronas (Leao et al. 2012). En la población de neuronas glutamatérgicas la A β incrementa la frecuencia de los disparos de potenciales de acción y, además, bloquea las corrientes de potasio tipo A y M. Por otro lado, se encontró que aplicación de la A β provoca la disminución en la coherencia del disparo de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas, con la pérdida en la ritmicidad de la frecuencia theta. (Leao et al. 2012). Por otro lado, Rui y colaboradores (2006) analizaron el efecto de la A β sobre las oscilaciones de calcio espontáneas en cultivos neuronales (Rui et al. 2006). Utilizando la técnica de imágenes de calcio en cultivos primarios de neuronas corticales de rata, observaron que la aplicación aguda de la A β inhibe las oscilaciones de calcio de la red neuronal del cultivo. Este efecto parece explicarse debido a que la A β causa una disminución en la frecuencia y la amplitud de los transitorios de calcio en las neuronas. En otro trabajo, utilizando la técnica de registro multineuronal de “patch clamp” en rebanadas de corteza prefrontal de rata, se demostró que la actividad

sincrónica de las neuronas piramidales se inhibe con la aplicación de la A β a concentraciones nanomolares bajas (Wang et al. 2009). No obstante, si se utiliza una concentración alta de forma crónica, la red neuronal registra una mayor actividad con la característica de que las neuronas disparan de manera tónica. Resultados similares se han reportado utilizando cultivos primarios de neuronas corticales sobre un arreglo de multielectrodos (Gortz et al. 2009). En este trabajo se observó que la aplicación de la A β a concentraciones bajas, induce una disminución transitoria en la actividad espontánea de la red neuronal en cultivo, específicamente en la tasa de disparo y también en la tasa de disparo en ráfagas. Finalmente, Ronicke y colaboradores (2011) demostraron también que la A β provoca una disminución en la actividad espontánea de neuronas hipocámpales en cultivo primario, así como en rebanadas de hipocampo (Ronicke et al. 2011). Más aún, observaron que los efectos de la A β incluyen también una alteración en la LTP y una disminución en la transmisión sináptica.

1.4. Las vías de señalización intracelular activadas por la A β

Diversos estudios se han enfocado en determinar si la A β se une a receptores en la membrana de manera específica (Cowburn et al. 1997; Wang et al. 2000a; Wang et al. 2000b; Xie et al. 2002; Yaar et al. 2002; Li et al. 2004; Verdier y Penke 2004; Verdier et al. 2004; Verdier et al. 2005; Townsend et al. 2007; Zhao et al. 2008). A la fecha se conoce que la A β no posee receptores específicos, pero que es capaz de activar una amplia variedad de receptores de membrana y, de esta manera, activar cascadas de señalización intracelular tanto en las neuronas como en las células gliales (Verdier y Penke 2004; Verdier et al. 2004; Balleza-Tapia y Peña 2009). Entre los receptores que la A β es capaz de activar en las neuronas se encuentran: 1) Receptores ionotrópicos como los receptores para NMDA (NMDA-R) (Cullen et al. 1996; Cowburn et al. 1997; Ye et al. 2004; Self et al. 2005; Kelly y Ferreira 2006; Lipton 2006; Montiel et al. 2006; De Felice et al. 2007; Domingues et al. 2007; Abbott et al. 2008; Texido et al. 2011) y los receptores nicotínicos para acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) (Wang et al. 2000a; Wang et al. 2000b; Dineley et al. 2001; Kihara et al. 2001; Shimohama y Kihara

2001; Dineley et al. 2002; Shaw et al. 2002; Dineley 2007); 2) Receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas como el receptor para la insulina (IR) (Xie et al. 2002; Townsend et al. 2007; Zhao et al. 2008); 3) Receptores de citocinas como el receptor 75 para neurotrofinas (p75NRT) (Yaar et al. 1997; Kuner et al. 1998; Yaar et al. 2002; Tsukamoto et al. 2003; Zhang et al. 2003; Hashimoto et al. 2004; Costantini et al. 2005a; Costantini et al. 2005b; Susen y Blochl 2005) y el receptor para el factor de necrosis tumoral 1 (TNF-R1) (Li et al. 2004; Wang et al. 2005; Rowan et al. 2007); y 4) receptores de adhesión como las integrinas (Ghisso et al. 1992; Sabo et al. 1995; Anderson y Ferreira 2004; Bozzo et al. 2004). En este trabajo de tesis, se estudiará el papel de las integrinas en el efecto de la A β sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.

1.4.1. Receptores de membrana integrinas.

El anclaje de las células a la matriz extracelular está regulado a través de la familia de receptores de membrana denominada integrinas (Denda y Reichardt 2007; Campbell y Humphries 2011). Las integrinas son miembros de una superfamilia de glicoproteínas de membrana que están ampliamente expresadas en todos los tipos celulares (Denda y Reichardt 2007). Estas proteínas forman heterodímeros compuestos de una subunidad α y una β que actúan como receptores de proteínas de la matriz extracelular y contra-receptores en células adyacentes. La interacción de estos receptores con las proteínas de la matriz extracelular promueve cambios conformacionales y la regionalización de las integrinas formando complejos proteicos que se conocen como adhesiones focales (AF), que regulan diversos procesos celulares como la migración, la proliferación y la diferenciación (Hynes 1992; Giancotti y Ruoslahti 1999).

Los ligandos de las integrinas generalmente forman substratos multivalentes que promueven la agrupación de estos receptores y desencadenan la activación de cascadas de señalización y la formación de uniones focales de gran fuerza (Miyamoto et al. 1995). Las proteínas de la matriz extracelular, los contrareceptores en las membranas celulares y las disintegrinas del veneno de algunas serpientes poseen secuencias específicas de reconocimiento que son reconocidas por las

integrinas (Fig. 7). La secuencia principal de reconocimiento por las integrinas es la secuencia Arg-Gly-Asp (Vonderheide et al. 1994; Ruoslahti 1996). No obstante, existen otras secuencias que pueden ser reconocidas por las integrinas, por ejemplo: la Arg-Leu-Asp, la Arg-His-Asp, la Lys-Gly-Asp, la Asn-Gly-Arg, la Ile-Glu-Leu y la Leu-Asp-Val (Vonderheide et al. 1994; Ruoslahti 1996).

1.4.1.1. Estructura de las integrinas.

La familia de las integrinas en mamíferos consiste de 18 subunidades α y 8 β que generan al menos 24 distintos receptores heterodiméricos (Fig. 7) (Giancotti y Ruoslahti 1999; Hynes 2002; Caltagarone et al. 2007; Campbell y Humphries 2011). La subunidad α , de peso molecular de 120 a 180 kDa, tiene una longitud aproximada de 1000 aminoácidos (aa) organizados en 9 dominios (Fig. 8)(Staunton et al. 2006; Luo et al. 2007; Fu et al. 2012). En la subunidad α , las integrinas pueden presentar un dominio extra conocido como α -I que se encuentra en el extremo amino terminal y está presente en 9 de las 18 subunidades α (Campbell y Humphries 2011). Éste dominio está compuesto por ~200 aa y, de estar presente, es el sitio principal de unión al ligando (Lee et al. 1995; Fu et al. 2012). Cuando el dominio α -I está ausente, la terminal amino forma una pequeña región conocida como “cap” que participa en la unión al ligando (Kamata et al. 2001; Xiao et al. 2004) (16,10). La subunidad α posee también una sección compuesta por siete segmentos de ~60 aa que se pliegan conformando un dominio conocido como propela β (Xiong et al. 2001; Xiao et al. 2004; Zhu et al. 2008). Posteriormente se encuentran los dominios conocidos como “Thigh”, calf-1 y calf-2, que presentan estructuras similares a las inmunoglobulinas que consisten en estructuras β -plegadas de aproximadamente 140 a 170 aa (Xiong et al. 2001). Posterior a los dominios calf, les sigue el dominio transmembranal compuesto por una única α -hélice y finalmente la terminal carboxilo de la subunidad α (Fu et al. 2012). Por su parte, la subunidad β está conformada por aproximadamente 750 aminoácidos organizados en 4 o 5 dominios y tiene un peso molecular de 90 a 110 kDa (Fig. 8) (Staunton et al. 2006; Luo et al. 2007; Fu et al. 2012). A detalle, la región extracelular de la subunidad β está compuesta por el dominio β -I conformado por

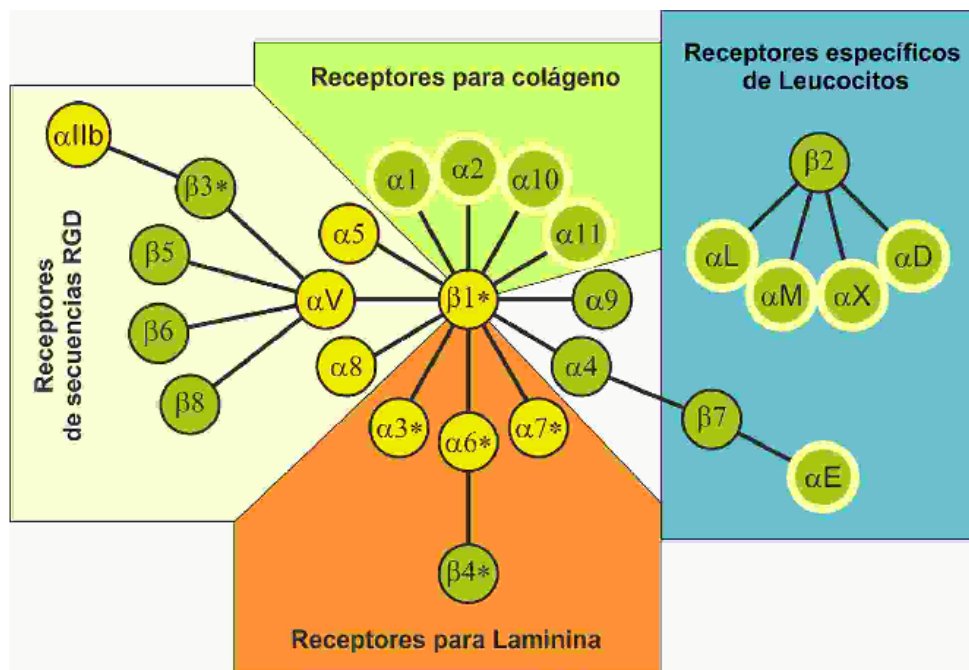


Figura 7 – Familia de las Integrinas en mamíferos. Las integrinas son receptores compuestos de una subunidad α y una β . En mamíferos, se ha reportado que existen 24 Integrinas que se forman por la interacción de 18 subunidades α y 8 β . Éstas pueden agruparse en familias dependiendo de su capacidad para unirse a ciertos ligandos (Bloques verde, blanco, crema y naranja) o, en el caso de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 7$, se pueden agrupar por su especificidad de expresión en leucocitos (Bloque azul). También pueden clasificarse de acuerdo a su expresión: las subunidades coloreadas en verde se expresan solo en cordados, mientras las amarillas se expresan en todos los *metazoa*. Los asteriscos son subunidades que pueden tener variaciones por el mecanismo de *splicing* en su dominio citoplasmático. Las subunidades α con borde amarillo claro son aquellas que presentan el dominio I. Las integrinas del bloque blanco ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 9\beta 1$) reconocen ligandos vasculares y también son capaces de unirse a proteínas de la matriz extracelular con la secuencia MLDG. Figura e información basadas en Hynes 2002.

~240 aa y es análogo en su estructura al α -I; en las integrinas que carecen del α -I, el dominio β -I une directamente al ligando (Fu et al. 2012). Posteriormente, le siguen el dominio denominado Híbrido y el PSI (Plexina/semforina/integrina), 4 dominios I-EGF (dominio de las Integrinas similares al Factor de Crecimiento Epidérmico) ricos en cisteínas y finalmente un dominio denominado " β -tail"; es importante hacer notar que el dominio β -I se encuentra insertado en el Híbrido y este a su vez, en el PSI (Staunton et al. 2006; Luo et al. 2007; Campbell y Humphries 2011; Fu et al. 2012). De manera similar a la subunidad α , la subunidad β posee un dominio transmembranal conformado por una única α -hélice y

finalmente la terminal carboxilo que se encuentra en el citoplasma (Fu et al. 2012). Es importante mencionar, que la terminal carboxilo de la subunidad β posee secuencias de reconocimiento NPXY que le permite la interacción de las integrinas con proteínas que posean dominios de tipo PTB (Campbell y Humphries 2011).

1.4.1.2. Función Biológica y señalización intracelular mediada por las integrinas.

Originalmente, se describió que las integrinas tenían un papel estructural en las células debido a que éstas interactúan en el interior celular con el citoesqueleto y con la matriz extracelular fuera de las células (Hynes 1992). No obstante, hoy en día se ha reportado que las integrinas pueden activar vías de señalización que regulan funciones como la respuesta inmune, la migración celular, la expresión de genes, la sobrevivencia celular y la proliferación (Hynes 1992; Schwartz y Assoian 2001). Estructuralmente, las integrinas son capaces de interactuar con elementos asociados al citoesqueleto como la actina, la tubulina, la paxilina, la p130CAS, la talina, la tensina, la vinculina y la sixina (Schwartz 2001; Hynes 2002; Caltagarone et al. 2007). Las integrinas no poseen una actividad enzimática intrínseca (Hynes 2002). Por ello, para poder integrar y transmitir señales hacia el interior celular, las integrinas se asocian con cinasas como Syk, FAK, Fyn, PI3K, c-Abl, Csk y Pyk2 (Schwartz y Assoian 2001; Hynes 2002), así como las proteínas de andamiaje y adaptadoras Crk, Shc, Grb2 y Nck (Giancotti y Ruoslahti 1999; Schwartz 2001; Schwartz y Assoian 2001; Hynes 2002). Es importante mencionar que la cinasa de tirosinas FAK se considera como el regulador central de la señalización asociada a la activación de las integrinas (Parsons 2003a; Mitra et al. 2005).

En el sistema nervioso central, la expresión de éstos receptores se presenta altamente en las sinapsis y espinas dendríticas (Nishimura et al. 1998; Chan et al. 2003b; Gall y Lynch 2004a; Gerrow y El-Husseini 2006; Denda y Reichardt 2007; Rowan et al. 2007) que indica una posible participación en la transmisión sináptica. Las sinapsis, de hecho, se pueden considerar como uniones adhesivas (*adhesive junctions*) altamente especializadas para la comunicación entre neuronas en el sistema nervioso central. La fuerza de ésta comunicación puede modificarse (plasticidad sináptica), lo cual, representa una característica clave en los cambios

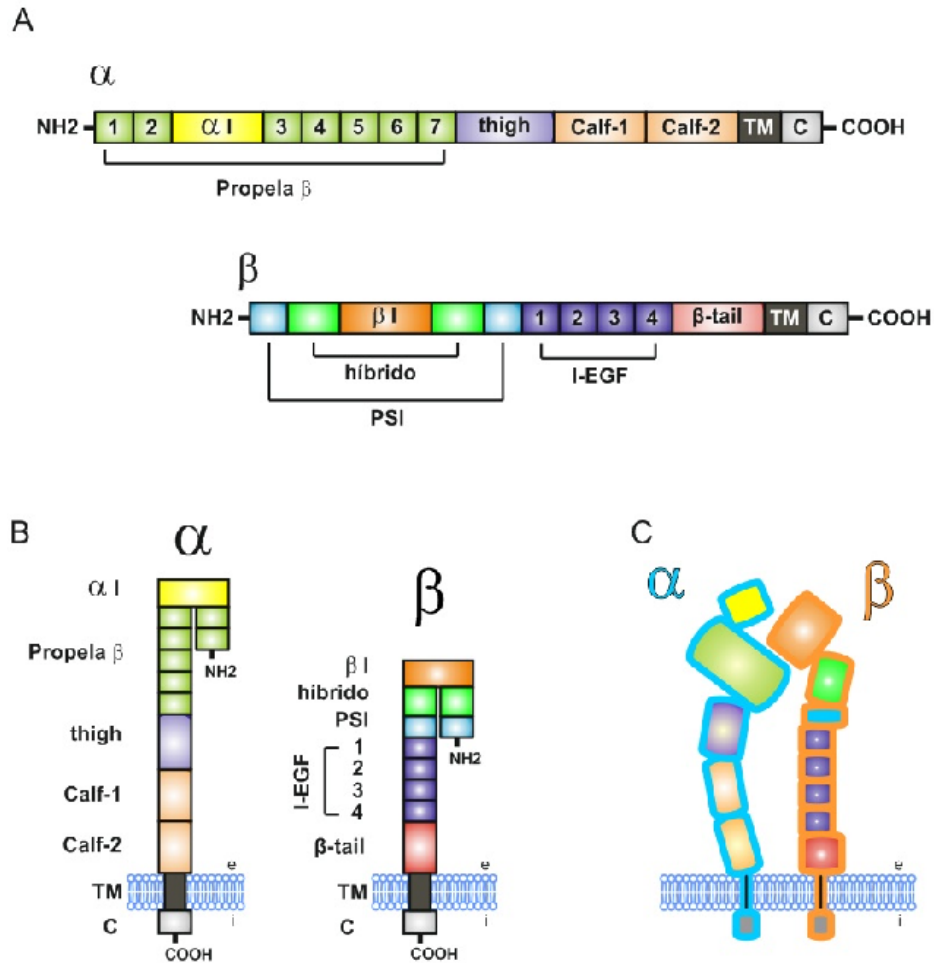


Figura 8 – Dominios y estructura de las integrinas. A) Organización de los dominios dentro de la estructura primaria de la subunidad α y β de las integrinas (para la descripción de todos los dominios revisar el texto). **B)** Representación de la estructura terciaria de las subunidades α y β en la membrana celular; se puede apreciar la disposición del dominio α I con respecto a la propela β de la subunidad α y al β I con los dominios híbrido y PSI de la subunidad β . Note la disposición espacial que adoptan la propela β , híbrido y PSI para poder exponer los dominios α I y β I que son los que unen el ligando. **C)** Representación de un heterodímero de una integrina en su estructura terciaria. e = extracelular; i = intracelular.

celulares que se piensa, son la base del aprendizaje y la memoria (Benson et al. 2000). La participación de las integrinas en la regulación de procesos plásticos del sistema nervioso está bien documentada; por ejemplo, se conoce que las integrinas participan en el proceso plástico relacionado con la memoria; conocido como LTP. En este sentido, se ha reportado que ratones heterocigotos alterados genéticamente que tienen una expresión disminuida de las integrinas,

particularmente las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\alpha 8$, presentan alteraciones tanto en la LTP como en la memoria espacial (Chan et al. 2003a). De igual manera, la delección de la subunidad $\alpha 3$ en ratones promueve un deterioro en la memoria de trabajo (Chan et al. 2006). Otra evidencia notable de la participación de las integrinas con la formación de la memoria esta reportada en la mosca *Drosophila* (Grotewiel et al. 1998). En este trabajo la disrupción de un gen denominado *Volado*, que codifica para dos isoformas de la subunidad α de las integrinas, altera el aprendizaje olfatorio. Otros trabajos que marcan una relación entre las integrinas con la memoria, se han enfocado en el estudio de la proteína asociada a integrinas (IAP o CD47); esta proteína incrementa la función de las integrinas de las familias $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (Brown y Frazier 2001). Los estudios respecto a esta proteína, han reportado que la expresión de la IAP y la subunidad αv de las integrinas, están relacionadas con la consolidación de la memoria en ratas (Huang et al. 1998; Lee et al. 2000). Más aún, se ha demostrado que ratones que carecen de la IAP, manifiestan un deterioro en la memoria y una disminución en la LTP (Chang et al. 1999). El bloqueo funcional de la IAP también se ha asociado a un deterioro en la memoria, así como a una disminución en la liberación de glutamato en el hipocampo (Chang et al. 2001).

1.4.1.3. Las integrinas y la EA.

Existen diversos trabajos que aportan evidencia importante de que las integrinas pueden estar relacionadas con la EA. Lo que más llama la atención, es la colocalización de las integrinas con las placas seniles y neuritas distróficas en los cerebros de los pacientes con EA. Este mismo fenómeno se ha descrito en modelos animales con fenotipo tipo EA (Akiyama et al. 1991; Eikelenboom et al. 1994; Van Gool et al. 1994; Grace y Busciglio 2003). Más aún, se ha reportado que la A β es capaz de funcionar como un ligando de las integrinas (Sabo et al. 1995; Wright et al. 2007) y, a través de estos receptores, activa cascadas de señalización intracelulares que incluyen a la cinasa ERK1/2 (Anderson y Ferreira 2004; Frasca et al. 2008), la cinasa FAK (Zhang et al. 1994; Williamson et al. 2002a; Grace y Busciglio 2003; Frasca et al. 2008), y la cinasa Fyn (Williamson et al. 2002a; Frasca

et al. 2008). Estas dos últimas cinasas parecen ser muy importantes para los efectos de la A β pues a través de un mecanismo relacionado con FAK/Fyn, así como por la cinasa PI3K, la A β induce la sobrefosforilación de la proteína asociada a microtúbulos MAP2c y a la proteína TAU (Williamson et al. 2002a). Otra proteína cinasa activada por la interacción A β /Integrinas es la cinasa de tirosinas Pyk2 lo que lleva a la subsecuente activación de las proteínas adaptadoras Tsk5/FISH o la Paxilina; que están relacionadas con la disfunción neuronal y la apoptosis (Berg et al. 1997; Grace y Busciglio 2003; Brown y Turner 2004; Wright et al. 2007). Finalmente, se ha reportado que la reducción en la LTP, inducida por la A β esta mediada por integrinas tanto *in vivo* como *in vitro* (Rowan et al. 2007; Wang et al. 2008a).

1.4.2. La cinasa de tirosinas FAK.

La cinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína altamente conservada de 125 kDa que se recluta en las adhesiones focales (Abbi y Guan 2002). Una vez que las integrinas interactúan con las proteínas de la matriz extracelular permiten la activación del dominio catalítico de la cinasa (Hayashi et al. 2002). FAK se expresa de manera ubicua en todos los tejidos celulares, regula la señalización activada a través de las integrinas y las funciones celulares asociadas a estos receptores de membrana (Parsons 2003b; Mitra y Schlaepfer 2006). Se ha reportado que la expresión de FAK es especialmente alta en la etapa adulta en el cerebro, en específico en la corteza cerebral y el hipocampo (Burgaya et al. 1995). En las neuronas, se ha encontrado que la cinasa FAK se expresa altamente en las dendritas, principalmente en el hipocampo, donde se piensa que FAK puede tener un papel relevante en fenómenos de plasticidad sináptica como la LTP (Grant et al. 1995).

1.4.2.1. Estructura de la cinasa FAK

La estructura de FAK está conformada por diferentes dominios que le confieren una función dual (Fig. 9): como cinasa de tirosinas y como proteína de andamiaje (Parsons et al. 2008). En la terminal amino, FAK está compuesta por un

dominio FERM (Proteína 4.1, ezrina, radixina y moesina; por sus siglas en inglés) posterior a este, se encuentra una secuencia rica en prolina (PRR1; por sus siglas en inglés), y después se encuentra el dominio con la actividad catalítica de cinasa de tirosinas (Parsons et al. 2008). En la porción carboxilo terminal se encuentran dos secuencias PRR y finalmente un dominio FAT (focal adhesión targetin; por sus siglas en inglés); que en conjunto funcionan como una proteína de andamiaje (Parsons et al. 2008). El dominio FERM sirve como sitio de interacción de diversas proteínas: como la ezrina, la Arp2/3, la p53 y de receptores de membrana como el PDGFr, el EGFr y las integrinas (Parsons 2003b; Mitra y Schlaepfer 2006). Las secuencias PRR funcionan como sitios de reconocimiento de proteínas que contienen dominios SH3; como la p130Cas, la GRAF y la ASAP1 (Harte et al. 1996; Taylor et al. 1998; Liu et al. 2002). El dominio FAT es el responsable de que FAK se ubique en las AF y funciona como una secuencia blanco específica de reconocimiento asociada a este tipo de uniones celulares (Parsons et al. 2008). Esto, debido a que interacciona con proteínas que se encuentran en las AF, como la paxilina (Hayashi et al. 2002).

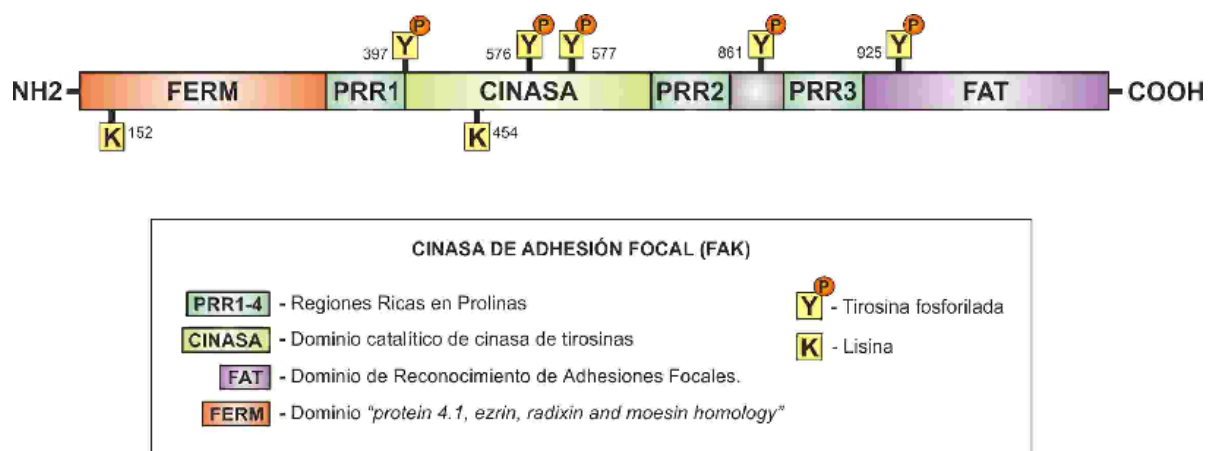


Figura 9 – Organización de los dominios dentro de la estructura primaria de la cinasa FAK. La cinasa de tirosinas FAK posee los dominios FERM, FAT, un dominio de cinasa de tirosinas y tres regiones ricas en prolina (PRR1-3). En la figura también se muestran los residuos de tirosinas y lisinas que son importantes para la regulación de su actividad (ver texto).

1.4.2.2. Regulación de la actividad de la cinasa FAK.

Fisiológicamente, la cinasa FAK se encuentra en un estado inactivo debido a que los dominios FERM y el dominio catalítico se asocian creando una estructura cerrada que bloquea el sitio activo de la cinasa (Lietha et al. 2007). Es la interacción de FAK con el extremo carboxilo de las integrinas lo que promueve el desacople de éstos dominios liberando así su actividad catalítica (Lietha et al. 2007). Esta interacción promueve también la fosforilación de la tirosina (Y) 397 creando así un motivo estructural que permite la interacción de FAK con cinasas de la familia Src (SFK; por sus siglas en inglés); a través del dominio SH2 que reconoce tirosinas fosforiladas (Schaller et al. 1994; Parsons 2003b). Esta interacción activa a las SFK (Src o Fyn) quiénes, a su vez, fosforilan otros residuos de tirosinas en la cinasa FAK aumentando tanto su capacidad catalítica como su función como proteína adaptadora (Lietha et al. 2007). Esta interacción FAK-SFK genera un complejo enzimático que desencadena procesos de señalización que regula funciones celulares como la reorganización del citoesqueleto de actina, la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y la sobrevivencia (Schaller et al. 1994; Parsons y Parsons 2004; Lietha et al. 2007; Parsons et al. 2008).

1.4.2.3. La cinasa FAK y la EA.

Una de las evidencias sólidas de que la cinasa FAK puede estar involucrada en la EA es la presencia de niveles altos de la cinasa activada en cerebros de pacientes con la EA (Grace y Busciglio 2003). Además, se ha reportado incremento en la fosforilación de FAK inducido por la A β tanto en neuronas (Zhang et al. 1994; Zhang et al. 1996b; Williamson et al. 2002a; Grace y Busciglio 2003) como en la microglía (McDonald et al. 1997). Por ejemplo, se ha reportado que la A β es capaz de aumentar la forma activa de la cinasa FAK en las líneas celulares SH-SY5Y y B103; ambas derivadas de neuroblastoma de humano y rata respectivamente (Zhang et al. 1994). En cultivos primarios de neuronas de rata se ha observado también un aumento en la forma activa de FAK cuando éstas son tratadas con la A β (Grace y Busciglio 2003). Más aún, se ha demostrado que la A β incrementa no

solo la forma activa de FAK sino, también, su asociación con otra cinasa de tirosinas implicada en la EA, la cinasa Fyn (Zhang et al. 1996a). Resultados similares se han reportado en cultivos primarios de neuronas de humano donde la A β induce un aumento en la forma activa de FAK y su asociación con la cinasa Fyn (Williamson et al. 2002a). Además, en este estudio también se encontró que la A β induce un aumento en la fosforilación de la proteína tau a través de un mecanismo dependiente de la cinasa Fyn.

1.4.3. La cinasa de tirosinas Fyn.

La cinasa Fyn es una proteína de 59 kDa y es miembro de la familia src de cinasas de tirosinas (Resh 1998). Fyn está involucrada en diversas funciones celulares como la diferenciación de los oligodendrocitos (Osterhout et al. 1999) o como elemento de la vía de señalización activada por las uniones estrechas (Beggs et al. 1997). También juega un papel muy importante en la señalización de las células T del sistema inmune (Gauen et al. 1994) y en la LTP (Grant et al. 1992; Kojima et al. 1997).

Como resultado del mecanismo de “*splicing*” alternativo, la cinasa Fyn se expresa en dos isoformas (Resh 1998). En las células T del sistema inmune, el exón 7B produce la isoforma Fyn(T), mientras que en el sistema nervioso central y otros tejidos el exón 7A origina la isoforma Fyn(B). La diferencia entre ambas isoformas es de 50 aminoácidos y se ubica entre los dominios SH2 y el catalítico (Resh 1998).

1.4.3.1. Estructura y regulación de la actividad de la cinasa Fyn.

La estructura de la cinasa Fyn es muy similar a los otros miembros de la familia de src (Fig. 10) (Resh 1998; Tatosyan y Mizenina 2000; Parsons y Parsons 2004). En la terminal carboxilo se encuentra la tirosina 530 que regula su actividad catalítica y posteriormente, se localiza un dominio con actividad catalítica de cinasa de tirosinas (Resh 1998). En la región central, la cinasa posee dos dominios moduladores SH. El dominio SH2 reconoce tirosinas fosforiladas con la secuencia consenso pTyr-Glu-Glu-Ile y el dominio SH3 reconoce regiones ricas en prolinas

con la secuencia consenso Pro-X-X-Pro (Resh 1998). Entre los dominios catalítico y el SH2 se encuentra una región denominada Hélice Tipo II de Poliprolinas que es importante para la regulación de la actividad de la cinasa Fyn (Resh 1998). En la terminal amino la cinasa Fyn posee un dominio SH4 que contiene el motivo Met-Gly-Cys que regula la unión de la cinasa a la membrana plasmática a través de una reacción de acilación por miristato y palmitato de la Met y Cys respectivamente (van't Hof y Resh 1997; Resh 1998). Entre los dominios SH4 y SH3 se encuentra una secuencia única que le da su identidad a cada cinasa (Tatosyan y Mizenina 2000) y se ha sugerido que esta secuencia es la responsable de la interacción de la cinasa Fyn con ciertos receptores y proteínas específicos (Thomas y Brugge 1997). Como dato adicional, se sabe que esta cinasa es sintetizada y miristolizada, en la terminal amino, en polisomas citosólicos, para después ser dirigida hacia la membrana celular donde es palmitoilada (Resh 1998).

La actividad de Fyn, al igual que las otras cinasas que pertenecen a la familia src, es regulada a través de dos mecanismos (Tatosyan y Mizenina 2000). El primero consiste en la interacción de la tirosina fosforilada ubicada en su terminal carboxilo con el dominio SH2 que evita que el dominio catalítico quede expuesto (Tatosyan y Mizenina 2000). En el segundo mecanismo el dominio SH3 interactúa con la Hélice Tipo II de Poliprolinas formando una estructura cerrada que también evita que el dominio catalítico interactúe con sus sustratos (Resh 1998).

1.4.3.2. Formación del complejo enzimático FAK/Fyn.

La cinasa Fyn es capaz de interactuar con FAK a través de su dominio SH2 formando un complejo enzimático estable (Fig. 11); que promueve subsecuentemente la activación de Fyn (Schaller et al. 1994; Xing et al. 1994). Con la formación del complejo FYN/FAK, la cinasa Fyn puede regular la señalización a través de la fosforilación de FAK, lo que aumenta la actividad de la enzima y, por otro lado, genera motivos estructurales que son reconocidos por otras proteínas (Schaller et al. 1994; Schaller y Parsons 1994; Schlaepfer y Hunter 1996).

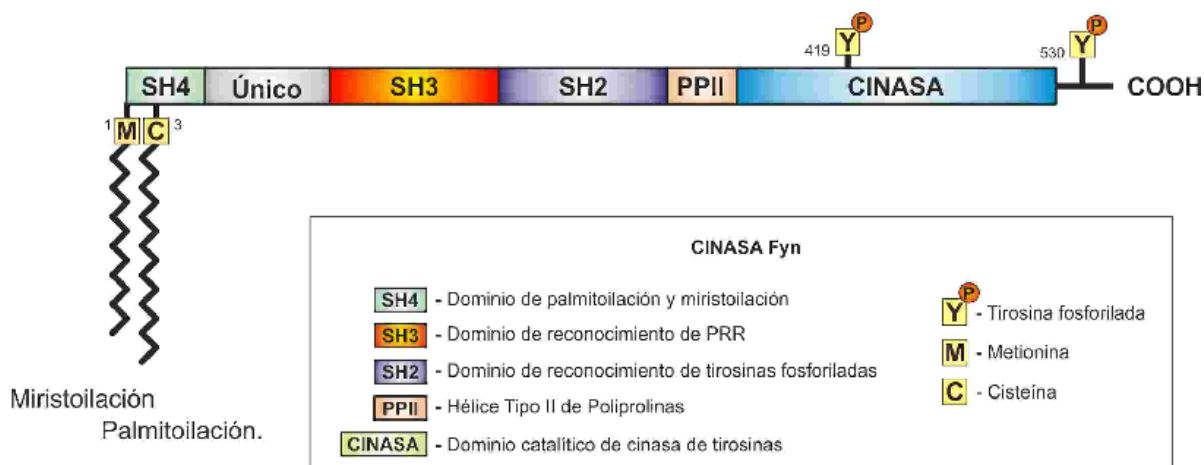


Figura 10 – Organización de los dominios dentro de la estructura primaria de la cinasa Fyn. La cinasa de tirosinas Fyn posee una estructura similar a los demás miembros de la familia de cinasas src. Posee dominios SH2, SH3 y SH4, además del dominio catalítico de cinasa de tirosinas y un dominio PPII. La cinasa Fyn posee un dominio que se denomina único y éste distingue a cada uno de los miembros de la familia src. En la terminal amino, la M1 pasa por un proceso de miristoilación y la C3 de palmitoilación que le permite a Fyn asociarse a la membrana celular. También se muestran las tirosinas 419 y 530 que son importantes para su regulación.

1.4.3.3. La cinasa Fyn y la EA.

De entre las evidencias bioquímicas que apoyan la hipótesis de que Fyn participa en los efectos de la A β se encuentran: La sobreexpresión de esta cinasa en cerebros de pacientes con EA (Shirazi y Wood 1993; Ho et al. 2005b) y el incremento en la fosforilación de sustratos específicos de la cinasa Fyn, incluida la proteína Tau, en presencia de A β (Zhang et al. 1996a; Lee 2005; Hernandez et al. 2009; Roberson et al. 2011). Además, hay evidencias funcionales de que Fyn está implicada en las alteraciones en la fisiología neuronal que produce la A β . Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de Fyn en ratones transgénicos que presentan un fenotipo tipo EA, aumenta los efectos sinaptotóxicos de la A β y altera la memoria espacial (Chin et al. 2004a; Chin et al. 2005) y, por otra parte la ausencia de Fyn, previene la mortalidad prematura de estos ratones (Chin et al. 2004b). Además, cultivos primarios de neuronas provenientes de ratones carentes

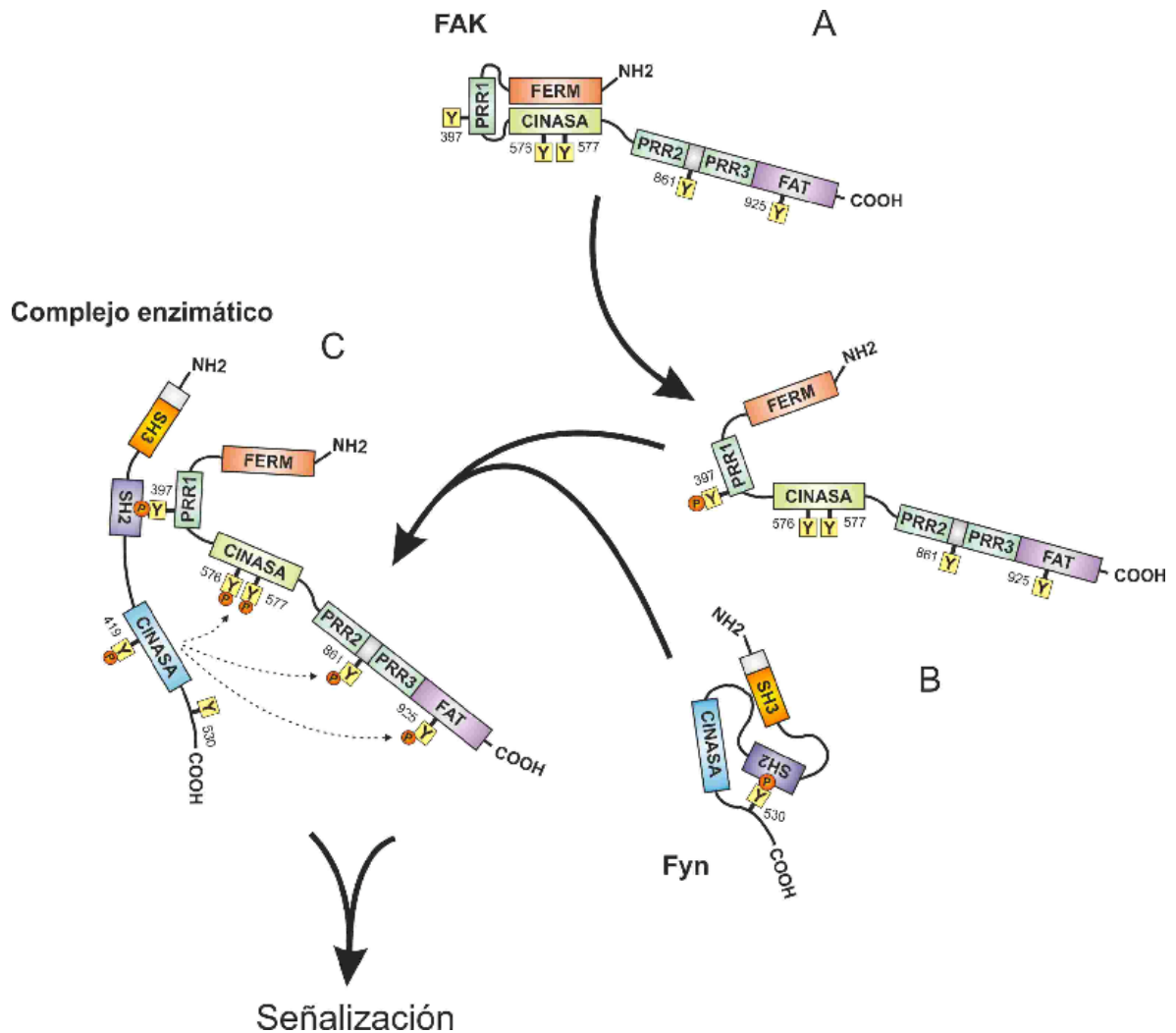


Figura 11 – Formación del complejo enzimático FAK/Fyn. **A)** cinasa FAK en su estado inactivo, una vez que se inicia la señalización a través de las integrinas, la interacción del dominio FERM con el dominio citoplasmático de las integrinas permite que se libere el dominio catalítico. **B)** Una vez liberado el sitio catalítico existe una autofosforilación de la tirosina 397 (pY397) que funciona como motivo estructural para el dominio SH2 de la cinasa Fyn. Cuando interactúan la pY397 y el SH2, se libera también el dominio catalítico de Fyn. **C)** Posteriormente, FAK fosforila a Fyn en la Y419 aumentando su capacidad catalítica. Fyn es capaz de fosforilar las tirosinas 576, 577, 861 y 925; que aumentan la capacidad catalítica de FAK y además genera motivos estructurales de pTyr que pueden ser reconocidos por otras proteínas con dominios SH2.

de Fyn son resistentes al efecto neurotóxico de la A β (Williamson et al. 2008) en un mecanismo que involucra a las balsas lipídicas en la membrana celular (Williamson et al. 2008; Hernandez et al. 2009). Por otra parte, se ha demostrado que los efectos neurotóxicos de la A β soluble se ven bloqueados en neuronas que

carecen de la cinasa Fyn (Lambert et al. 1998). Otros trabajos han demostrado también que la interacción entre la A β con la proteína priónica celular (PrPC) induce una disminución en las espinas dendríticas a través de la activación de la cinasa Fyn (Um et al. 2012; Um y Strittmatter 2012). Finalmente, se ha reportado que la inhibición de la actividad espontánea del hipocampo provocada por la A β está ausente en ratones carentes de la cinasa Fyn (Pena et al. 2010).

1.4.4. La cinasa de serinas/treoninas GSK3

La cinasa 3 de la glicógeno sintetasa (GSK3; por sus siglas en inglés) es una cinasa de serinas/treoninas que inicialmente fue descrita como una enzima reguladora del metabolismo celular, debido a que fosforila e inhibe a la enzima glicógeno sintetasa (Embi et al. 1980). No obstante, la GSK3 actúa como una enzima central que regula diversas vías de señalización (Grimes y Jope 2001; Woodgett 2001) asociadas a diversas funciones celulares como el metabolismo del glucógeno (Embi et al. 1980; Orena et al. 2000; Grimes y Jope 2001), la regulación del ciclo celular (Ryves y Harwood 2003), la sobrevivencia (Pap y Cooper 1998; Pap y Cooper 2002; Maurer et al. 2014) y la proliferación (Force y Woodgett 2009; Shin et al. 2011). Es importante mencionar que las vías de señalización en las que participa la cinasa GSK3 asociadas a un mal funcionamiento de la enzima han sido involucradas en el desarrollo de diversos tipos de enfermedades desde somáticas, como la diabetes (Nikoulina et al. 2000; Henriksen et al. 2003; Henriksen y Dokken 2006) y el cáncer (Polakis 2000; Taipale y Beachy 2001; Manoukian y Woodgett 2002); hasta neurológicas, como el desorden bipolar (Detera-Wadleigh 2001; Gould y Manji 2002), la esquizofrenia (Koros y Dörner-Ciossek 2007) y la EA (Balaraman et al. 2006; Hooper et al. 2008; Kremer et al. 2011). La GSK3 se expresa en todos los tejidos celulares, sin embargo, en el sistema nervioso central se encuentra su nivel más alto de expresión (Woodgett 1990; Leroy y Brion 1999).

1.4.4.1. Estructura de la GSK3.

Existen dos isoformas de esta cinasa que se codifican en distintos genes; la GSK3 α y la GSK3 β que poseen una masa de 51 y 47 kDa respectivamente

(Woodgett 1990). La estructura de la GSK3 es muy similar en ambas isoformas (Fig. 12) (Doble y Woodgett 2003), la diferencia principal entre ellas radica en la terminal amino de la GSK3 α que posee una región extra rica en glicinas (Woodgett 1990). En general, se ha descrito que la GSK3 posee una región amino, un dominio catalítico de cinasa de serinas/treoninas y una terminal carboxilo (Doble y Woodgett 2003). Adicionalmente, en el dominio catalítico se ubica un pequeño dominio de unión (BD; por sus siglas en inglés) que le permite a la GSK3 interactuar con otras proteínas y sustratos (Doble y Woodgett 2003).

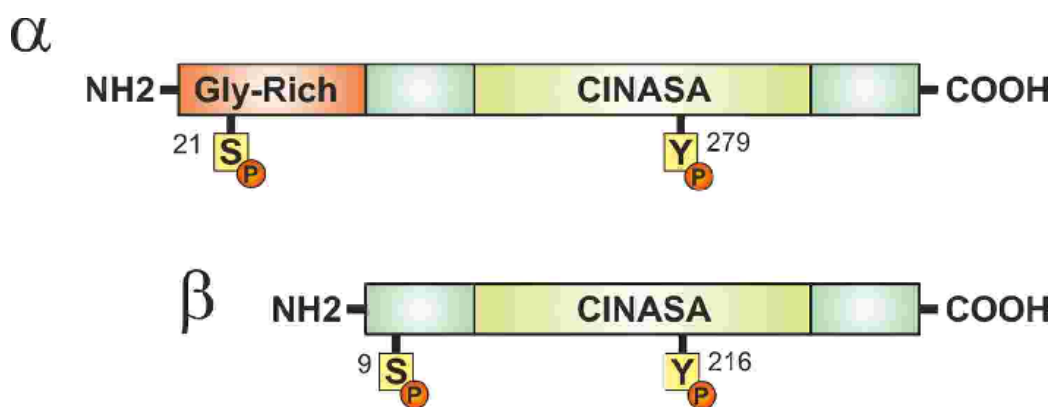


Figura 12 – Organización de los dominios dentro de la estructura primaria de la cinasa GSK3. Tanto la isoforma α como β , están conformadas por 3 dominios principales, el dominio amino-terminal, el dominio de cinasa de serinas/treoninas y el carboxilo-terminal. La isoforma α , además, posee una región rica en glicinas en el extremo amino. Se muestran las serinas 21 y 9, así como las tirosinas 279 y 216 de la GSK3 α y GSK3 β , respectivamente. Estos residuos aminoacídicos son relevantes para la regulación de la actividad de la cinasa.

1.4.4.2. Regulación de la actividad de la GSK3.

La GSK3 está constitutivamente activa en las células (Doble y Woodgett 2003) y es regulada negativamente por la vía de PI3K/Akt a través de la fosforilación de las serinas 9 y 21 (GSK3 α y GSK3 β respectivamente) en la terminal amino (Plyte et al. 1992; Cross et al. 1995). De manera contraria, la fosforilación en las tirosinas 216 (GSK3 α) y 279 (GSK3 β) aumenta la actividad de estas enzimas (Hughes et al. 1993). La fosforilación de las tirosinas mencionadas si bien no es un

requisito para la activación de la cinasa GSK3, y, no altera negativamente su función catalítica, si aumenta la eficiencia de fosforilación de la misma (Thomas et al. 1999; Dajani et al. 2001). La fosforilación de las serinas 9 y 21 de la GSK3 α/β , respectivamente, crea un pseudosustrato que se une intramolecularmente al dominio catalítico de la cinasa inhibiendo así su actividad catalítica (Thomas et al. 1999).

La secuencia consenso que reconoce la GSK3 en sus sustratos es Ser/Thr-X-X-X-pSer/pThr, siendo el primer residuo el aminoácido blanco de fosforilación (Doble y Woodgett 2003). Adicionalmente la fosforilación de los sustratos de la GSK3 puede requerir una fosforilación previa del último aminoácido en la secuencia de reconocimiento que funciona como “*primer*” (Fiol et al. 1988; Dajani et al. 2001). Dicho residuo es fosforilado de manera independiente a la GSK3 por las cinasas CKI y CKII, principalmente (Fiol et al. 1988; Fiol et al. 1990; Flotow et al. 1990; Grimes y Jope 2001). Aunque la fosforilación del aminoácido *primer* no es estrictamente necesaria para que la GSK3 pueda fosforilar a sus sustratos, ésta incrementa de 100 a 1000 veces la eficiencia de la subsecuente fosforilación (Thomas et al. 1999).

1.4.4.3. La cinasa GSK3 y la EA.

Existen evidencias de la participación de la cinasa GSK3 β en la fisiopatología de la EA (Balaraman et al. 2006; Hooper et al. 2008; Kremer et al. 2011). Por ejemplo, se ha observado un incremento tanto en la actividad de la GSK3 β en la corteza frontal (Leroy et al. 2007), como en su expresión en el hipocampo de pacientes con la EA (Blalock et al. 2004). El cambio en la expresión de la GSK3 β se ha observado también en sinaptosomas derivados de cerebro de pacientes con la EA (Pei et al. 1997). También, se ha reportado que un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para la GSK3 β es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de la enfermedad (Mateo et al. 2006). Por otra parte, se ha observado una disminución en la muerte neuronal inducida por la A β cuando se utilizan oligonucleótidos específicos para evitar la expresión de la GSK3 β (Takashima et al. 1993) y que la neurotoxicidad mediada por la GSK3- β ,

así como la sobrefosforilación de la proteína Tau, dependen de la actividad de la cinasas fosfatidil inositol 3 (PI3K, por sus siglas en inglés) (Takashima et al. 1996). Más aún, la inhibición farmacológica de la GSK3 β con litio y el inhibidor VIII de la GSK3 β , previene la sobrefosforilación de Tau y muerte neuronal mediada por la A β (Alvarez et al. 1999; Koh et al. 2008). Finalmente, resultados recientes del laboratorio han demostrado que la A β es capaz de inhibir las oscilaciones beta-gamma en la corteza entorrinal a través de un mecanismo que requiere a la cinasa GSK3 β (Pena-Ortega et al. 2012).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Alzheimer's Disease International*, en su informe anual del año 2010, reportó que la prevalencia de demencia (entre ellas la EA) en la población mundial era de un 5% a 7% y de 7.3% para Latinoamérica. Esta cifra representa que 35.6 millones de personas alrededor del mundo padecía demencia en el 2010. Dicha cantidad se duplica cada 20 años de manera que en 2030 serían alrededor de 65.7 millones pacientes con demencia y para el 2050 serán 115.4 millones pacientes demenciados (International 2010). En base a estos datos y al incremento en la esperanza de vida, se estima que las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como la EA, representarán un problema de salud pública importante. Por este motivo, estudiar los mecanismos que subyacen al inicio de la EA cobra interés para el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan combatirla.

Actualmente, los mecanismos que subyacen al inicio y al desarrollo de la EA son desconocidos. No obstante, se tiene evidencia de que los oligómeros solubles de la A β son las responsables del deterioro cognoscitivo en etapas tempranas de la enfermedad. Más aún, actualmente, se conoce que los oligómeros de la A β son capaces de alterar procesos plásticos de las sinapsis y también pueden alterar la funcionalidad de las redes neuronales como las oscilaciones hipocampales; que son fundamentales para los procesos de memoria y aprendizaje. Sin embargo, a pesar de que existe mucha información que muestra las alteraciones que la A β produce en la actividad de las redes neuronales, a la fecha se desconoce el efecto de la A β sobre la dinámica de las redes neuronales; los efectos específicos de la A β sobre los distintos tipos neuronales así como los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales la A β media sus efectos deletéreos. Hace falta integrar los efectos que la A β produce sobre las distintas poblaciones de neuronas y determinar el tipo de dinámica que la red adopta en las condiciones patológicas inducidas por la A β . De la misma forma, el mecanismo molecular a través del cual la A β puede estar alterando la funcionalidad de la red neuronal del hipocampo no está bien descrito aún. Debido a esto, resulta importante estudiar los mecanismos

que subyacen a síntomas específicos de la EA para eventualmente desarrollar tratamientos que permitan prevenir y/o minimizar el impacto de la EA sobre la salud pública.

De acuerdo a la evidencia citada en los antecedentes, el objetivo de ésta tesis se basó en las siguientes preguntas: ¿Puede la A β alterar la actividad espontánea del hipocampo?, ¿De qué manera la A β soluble (oligómeros) altera la funcionalidad y dinámica del circuito hipocampal? y ¿La vía de señalización intracelular Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β participa en el efecto de la A β sobre la actividad espontánea poblacional del hipocampo?

3. HIPÓTESIS

La proteína β amiloide afecta la funcionalidad y la dinámica de la red neuronal del hipocampo a través de la vía de señalización intracelular Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β .

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la A β sobre la funcionalidad y la dinámica de la red neuronal del circuito del hipocampo así como la participación de la vía de señalización Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β en dicho efecto.

4.1. Objetivos específicos

Caracterizar el efecto de la A β sobre la actividad poblacional del hipocampo a través de registros de campo.

Determinar los efectos de las A β sobre la dinámica de la red neuronal del hipocampo a través de imágenes funcionales multineuronales. Así como la participación de la cinasa Fyn en dicho efecto.

Determinar la participación de la vía Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β en los efectos de la A β sobre la actividad poblacional del hipocampo a través de experimentos farmacológicos y con la técnica de *western blot*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Animales

Para los experimentos se utilizaron ratones macho de las cepas Swiss Webster (SW), 129/SvImJ (WT) y 129/SvImJ *knock out* para la cinasa Fyn (Fyn KO). Además, se emplearon ratones macho triple transgénicos con fenotipo EA (3xTgAD) que poseen tres genes mutantes: APP_{swe}, PS1_{M146V} y tau_{P301L}. El manejo de los animales y los protocolos experimentales fueron evaluados y aprobados por el comité local de ética y manejo de animales de nuestras Instituciones y siguieron las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

5.2. Oligomerización y caracterización de la A β .

El protocolo de oligomerización de la A β se realizó siguiendo las indicaciones de Klein y colaboradores (Klein 2002) basadas en el protocolo de Lambert y colaboradores (Lambert et al. 1998). De manera general, la A β fue incubada con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración final del péptido de 1mM, por 60 min, a temperatura ambiente (TA). La solución fue posteriormente evaporada (a TA) para remover todo el HFIP durante un periodo de aproximadamente 18 hrs. Acto seguido, el péptido fue resuspendido en una solución 5 mM de DMSO al 100% y posteriormente se diluyó en medio F12 (sin rojo fenol) a una concentración final de 100 μ M. Esta solución se incubó por 24 hrs a 4-5 °C y se centrifugó, en frío (4°C), a 14, 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante (la fase donde quedan los oligómeros) fue alicuotada y usada directamente en los experimentos como se describe más adelante. Con el objetivo de conocer la composición de la solución oligomerizada, se caracterizó mediante electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras de dicha solución fueron corridas en un gel y teñidas con un protocolo de tinción con plata (Fig. 13; Vilchis-Landeros et al., 2001).

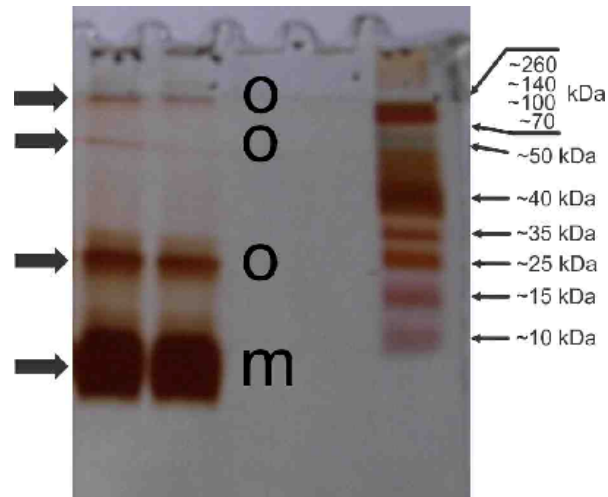


Figura 13 – Composición de la solución de A β oligomerizada (A β o). El gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tratado con la tinción de plata, muestra los diferentes niveles de agregación de la solución de A β ₁₋₄₂ oligomerizada utilizada en el presente trabajo (m = monómeros; o = oligómeros). A la derecha del gel se muestra el peso en kDa de los marcadores de peso molecular.

5.3. Obtención de rebanadas de hipocampo.

Para la obtención de rebanadas de cerebro, se utilizaron ratones macho de las cepas SW, WT y Fyn KO. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (63 mg/Kg). Previo a la obtención del cerebro, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con líquido cefaloraquídeo artificial modificado (LCRAM) con un pH de 7.4. El LCRAM contiene (en mM): 238 sacarosa, 30 D-glucosa, 25 NaHCO₃, 3 KCl y 2.5 MgCl₂. La solución se mantuvo fría y gaseada constantemente con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ (carbógeno). Una vez finalizada la perfusión, los animales fueron decapitados y el cerebro fue extraído y disecado en frío. Uno de los hemisferios se pegó a un bloque de agar con una inclinación de 30° con respecto a la navaja de corte. Con el uso de un vibratomo, se obtuvieron rebanadas transversales de hipocampo de un grosor de

350-400 μm . Las rebanadas obtenidas se dejaron recuperar, al menos, durante una hora y media a temperatura ambiente, antes de ser transferidas a una cámara de registro perfundida con LCRA normal que contenía (en mM): 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO_3 , 3 KCl, 1 MgCl_2 y 1.5 CaCl_2 . El pH (7.4) y la oxigenación se mantuvo constante por gaseo con carbógeno a una temperatura de 30°-32°C.

5.4. Cultivos organotípicos de hipocampo.

Para la obtención de los cultivos se utilizaron ratones macho de las cepas WT, Fyn KO y 3xTgAD de entre 2 y 6 días de edad. Los cerebros fueron extraídos dentro de una campana de flujo laminar, por decapitación y disección en una solución Hank's fría, que contiene las siguientes concentraciones de iones (mM): NaCl 137, KCl 5.4, NaHCO_3 4.2, Glucosa 15; pH de 7.4. Una vez obtenidos los hemisferios; se hicieron rebanadas de cerebro de 400 μm de espesor en un *chopper*. Una vez obtenidas las rebanadas, se disectó el hipocampo y colocó sobre insertos para cultivos organotípicos (Millicell, 0.4 μm de poro), los cuales fueron previamente situados en placas de cultivo de 6 pozos. Posteriormente se agregó 1.2 ml de medio basal de Eagle (Sigma) adicionado con 20 % de suero de caballo (Sigma) y .5 % de penicilina/estreptomicina (Gibco) a cada pozo y se colocaron en una incubadora a una temperatura de 37°C con 5% de CO_2 . Cada tercer día se hizo cambio de medio de cultivo hasta el día del experimento.

5.5. Registro electrofisiológico de hipocampo *in vitro*

Los registros poblacionales de campo se llevaron a cabo en la región CA1 del hipocampo. Para ello se usaron electrodos extracelulares de borosilicato con una resistencia de 400 a 600 $\text{k}\Omega$, rellenos con LCRA, los cuales fueron colocados sobre la superficie de la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo. La señal fue amplificada y filtrada (pasa-altas, 0.5 Hz; pasa-bajas. 1.5 KHz) utilizando un amplificador AC de banda ancha (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S. A.). La actividad espontánea del hipocampo en condiciones control se registró por 15-20 minutos. Tiempo transcurrido, se adicionó la A β oligomerizada (A β o) o los tratamientos farmacológicos correspondientes. El tiempo de tratamiento con los

distintos fármacos (descritos posteriormente) fue de 1 hr y de la A β o fue de 40 min. Al término del experimento se adicionó lidocaína (1 mM) para bloquear la actividad neuronal, como un control de la viabilidad de la rebanada.

5.6. Imágenes funcionales multineuronales

Se utilizaron cultivos organotípicos que fueron incubados en líquido ceforraquídeo artificial adicionado con Fluor-4 AM (10 μ M) y 0.1% dimetilsulfoxido (DMSO). El tejido se dejó incubar, en ausencia de luz, por un lapso de 20 a 30 minutos y posteriormente se colocó en la cámara de registro a una temperatura de 31 °C en constante perfusión con líquido ceforraquídeo artificial y gaseado con una mezcla de carbógeno (95% O, 5% CO).

Para medir la epifluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600FN, integrado a una cámara Cool Snap ES (Photometrics), y alimentado con luz proveniente de una lámpara de xenón (Sutter Instrument Company). La excitación del fluoróforo es controlada con un disparador Lambda 10-B/Smart Shutter (Sutter Instrument Company). El disparador, a su vez, está conectado a una PC, que lo controla y toma las imágenes con el programa RS Image (Roper Scientific). Se tomaron videos de epifluorescencia en condiciones control y 30 minutos posteriores a la aplicación de A β 10 nM.

5.7. Western blot

Los experimentos de western blot se realizaron con muestras de extractos totales de rebanadas de hipocampo en las diferentes condiciones experimentales realizadas. El hipocampo se disectó de rebanadas de cerebro obtenidas con el protocolo antes descrito, éstas se dejaron reposar durante al menos 40 min en una cámara de recuperación con mLCA gaseado constantemente con carbógeno. Posteriormente se colocaron los hipocampos en la cámara de registro y se realizaron los tratamientos. Finalizado el tratamiento se colocaron los hipocampos en 500 ml de solución de lisis y se homogenizó el tejido en la misma. Las muestras lisadas se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y guardó en el ultracongelador. Para la electroforesis, las muestras se

separaron en un gel de poliacrilamida al 10-12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con leche al 7.5% y se incubaron con el anticuerpo primario anti-pTyr-GSK3- α [279]/ β [216] o el anti-pSer-GSK3- α [9]/ β [21] a una dilución de 1:1,000 durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron usando el kit de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnology. Posteriormente se realizó un “stripping” y la misma membrana se bloqueó e incubó con los anticuerpos anti-GSK3 β y anti GSK3 α .

5.8. Análisis de datos

5.8.1. Registros de campo

Los registros fueron digitalizados a 3 – 9 KHz y guardados en una computadora personal con un sistema de adquisición de National Instruments (Austin, TX, U.S.A.) y un sistema de *software* diseñado en el lenguaje del programa LabView (Lemus-Aguilar et al. 2006). Posteriormente, los registros obtenidos de los experimentos fueron analizados “*off-line*” en una computadora personal. Para analizar los registros poblacionales se llevó a cabo un análisis de potencia espectral mediante el uso de la Transformada Rápida de Fourier. Para ello se tomaron 5 segmentos de 5 segundos cada uno, espaciados 40 segundos entre cada toma. Los datos se analizaron con una ventana Hamming en el programa Clampfit (Molecular Devices). El espectro de potencia de 1 a 60 Hz resultante fue integrado y graficado para cuantificar la potencia total del registro. Los datos se muestran como la actividad biológica (ver Fig. 14). La actividad biológica es el resultado de la resta de potencia integrada de la actividad total en condiciones control menos la actividad registrada con la lidocaína.

5.8.2. Western blot

Para el análisis de los resultados de esta sección, se tomaron escaneados de las placas fotográficas que se utilizaron para revelar la señal de quimioluminiscencia. Se utilizó el software ImageJ v1.46r, (National Institutes of Health, USA) para calcular la densidad óptica (Den.Op.) de las bandas correspondientes a la GSK3 α / β y Akt. En ambos casos, se dividió el valor de la

Den.Op. de las formas fosforiladas entre el valor de la proteína total y se graficó dicho valor en unidades arbitrarias (u.a.).

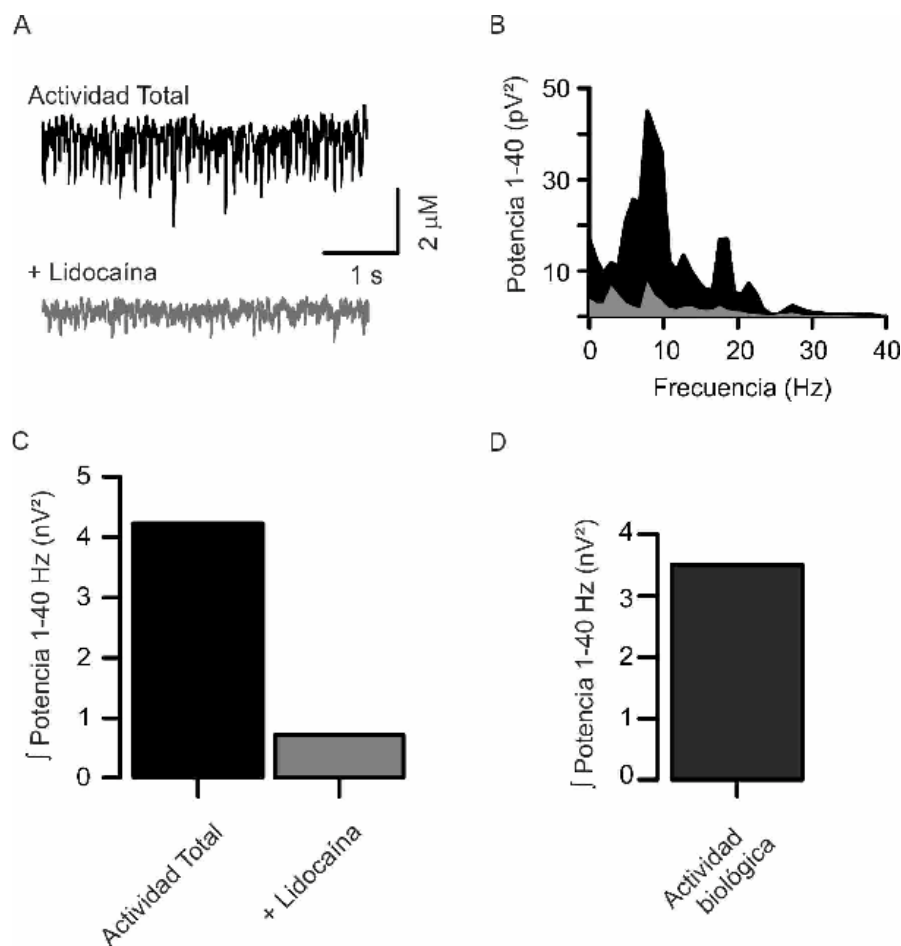


Figura 14 – Representación del análisis de la actividad biológica. A) Registros electrofisiológicos de campo de la actividad espontánea de la región CA1 del hipocampo en condiciones control (negro) y posterior a la aplicación de lidocaína (1mM; gris). **B)** Espectros de potencia de la actividad total de las condiciones en A. **C)** Cuantificación de la potencia integrada total del experimento representado en A. **D)** Cuantificación de la potencia integrada de la actividad biológica. La actividad biológica es el resultado de la resta de potencia integrada de la actividad total en condiciones control (negro) menos la actividad registrada con lidocaína (gris). Biológicamente, la actividad biológica representa la actividad eléctrica de las neuronas resultado de potenciales de acción y la transmisión sináptica. La actividad registrada con la lidocaína es el resultado de ruido eléctrico de origen no-biológico.

5.8.3. fMCI

El procesamiento de las imágenes obtenidas se realizó con el software ImageJ v1.46r, así como programas escritos en IDL (Carrillo-Reid 2008) y Matlab

(the Math-Works, Inc, Natick, MA). El análisis de la dinámica de la red neuronal se realizó de acuerdo a lo reportado por Carrillo y colaboradores (2008) y a continuación se describe (Para una mejor revisión ver (Carrillo-Reid 2008; Jaidar-Benavides 2010). Todas las células activas fueron identificadas de manera semiautomática y la media de la fluorescencia fue calculada en función del tiempo. El ruido de pixeles aislados fue descartado utilizando un filtro de 5 pixeles de radio.

Las señales de fluorescencia, dependientes de calcio, fueron computadas como $(F_i - F_o)/F_o$, donde F_i es la intensidad de la fluorescencia en cualquier imagen y F_o es la fluorescencia de fondo. Los transitorios de calcio fueron detectados basándose en un valor umbral fijo (2.5 veces la desviación estándar del valor del ruido) dado por la primera derivada de las señales de calcio (Carrillo-Reid 2008). Los transitorios se inspeccionaron manualmente para eliminar artefactos y señales de calcio de origen glial (Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010).

Para determinar si la actividad de la red neuronal estaba correlacionada, se cuantificó el número de eventos simultáneos de cada célula por experimento. Para descartar los eventos ocurridos de forma simultánea que ocurren debido al azar se realizaron simulaciones de Monte Carlo con 1000 repeticiones (Carrillo-Reid 2008).

El grado de correlación entre las células activas durante un experimento se calculó utilizando el coeficiente de correlación de Jaccard. Este coeficiente mide eventos con correlaciones simétricas; es decir, el grado de correlación entre un par de neuronas es el mismo no importando cual se tome como referencia. Con este análisis se construyeron mapas de correlación donde se representan la distribución espacial de las neuronas y se dibuja una línea que las une si están correlacionadas. El grosor de la línea indica el grado de correlación entre cada par de células. También se construyeron gráficas de pseudocolor que permite observar directamente el grado de correlación.

Para la identificación de los picos de actividad sincrónica se tomó como umbral, que dichos picos sobrepasaran 3 veces la desviación estándar de la

actividad sincrónica total por condición experimental. Los picos que cumplían esta característica se utilizaron para un análisis posterior.

Para la reconstrucción de la dinámica de la red neuronal se construyeron matrices multidimensionales de $A \times B$; donde A representa el número de neuronas activas durante un experimento y B denota el disparo de las neuronas durante una ventana de tiempo determinada (Carrillo-Reid 2008). De esta forma, los picos de actividad sincrónica fueron vectorizados, donde cada vector corresponde a la suma de diferentes transitorios de calcio de distintos elementos (células) de la red neuronal en un momento dado. Por lo tanto, cada vector representa un patrón de actividad dado por la suma de cada elemento de la red neuronal que corresponde a un estado de la misma en función del tiempo (Carrillo-Reid 2008).

Para buscar patrones de actividad similares dentro la dinámica de la red, se midió el índice de similitud entre los vectores calculando el producto interno de cada par de vectores (Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008). El producto interno entre dos vectores representa la proyección espacial de un vector sobre el otro; es decir, el valor obtenido de este producto indica que tan similares son entre sí un par de vectores (Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008). Éste valor se obtiene mediante el cálculo del coseno del ángulo formado entre los vectores; si el valor del coseno es de 1 significa que los vectores son completamente iguales y si es 0 que son completamente distintos (Carrillo-Reid 2008). Después se construyó una matriz de pseudocolor donde se puede observar el índice de similitud de cada par de vectores en función del tiempo; donde aquellos vectores que presentan dinámicas similares se pueden observar como estructuras cuadradas en la matriz (Carrillo-Reid 2008).

Para un mejor estudio de la dinámica de la red neuronal, se utilizó el algoritmo de reducción dimensional denominado agrupamiento local linear (LLE, por sus siglas en inglés: *Locally Linear Embedding*). Este algoritmo permite realizar reducciones dimensionales en sistemas no lineales y tiene la ventaja de que conserva la estructura del sistema analizado (Roweis y Saul 2000; Brown et al. 2005b). Una vez aplicado, los vectores que representan la dinámica de la red

neuronal se proyectan en un espacio bidimensional en el cual, cada punto representa un vector en un periodo de tiempo determinado. Los vectores que son similares serán proyectados de forma adyacente generando conjuntos que representan dinámicas similares. Las líneas que conectan los conjuntos de vectores indican las trayectorias seguidas por la actividad sincrónica de los diferentes estados de la red (Carrillo-Reid et al. 2008).

Para separar de forma óptima a los grupos de vectores y definir los estados funcionales de la red neuronal, se utilizaron algoritmos de agrupamientos estrictos y difusos, tomando en consideración el índice de Dunn como medida en la función de validez (Sasaki et al. 2007). Para identificar las neuronas que pertenecen a cada estado de la red, se utilizaron algoritmos de agrupamiento jerárquico, utilizando distancias euclidianas y el método del vecino más cercano (Carrillo-Reid et al. 2008).

5.9. Análisis estadístico

Para todos los datos, se aplicaron las pruebas de normalidad “KS normality test” y “D'Agostino & Pearson omnibus normality test” para calcular la distribución de los datos. Posteriormente, de acuerdo a la naturaleza de los datos y a los resultados de las pruebas de normalidad, se aplicaron las pruebas paramétricas de t-pareada, una ANOVA de una vía seguida de una prueba t-pareada, una ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tuckey o una ANOVA de medias repetidas seguida de una t-pareada para los datos con distribuciones normales. Para los datos con distribución no-normal, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon, la prueba de Friedman seguida de una Wilcoxon o una prueba de Friedman seguida de una prueba de Dunn. En todos los casos, se graficó el valor de la media $\pm$ el error estándar de la media y se consideró una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa. Todo el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism.

6. RESULTADOS

6.1. Alteraciones en la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo producidas por la A β .

El punto de partida para este proyecto fue determinar si la A β oligomerizada (A β o) alteraba la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo a concentraciones clínicamente relevantes (Naslund et al. 2000). También se probó si los efectos de la A β o sobre la actividad espontánea dependían de la edad; esto en base a que los síntomas de la EA se desarrollan conforme la edad avanza y a que varios de los efectos de la A β dependen de la edad también (Selkoe 2001b; Oddo et al. 2003; Balleza-Tapia et al. 2010; Ardiles et al. 2012).

La A β o inhibe la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.

Para determinar el efecto de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo, se realizaron registros de campo en la capa piramidal de la región CA1 de ratones SW, en condiciones normales (control) y posterior al tratamiento con 10 nM de la A β o en rebanadas de hipocampo provenientes de ratones de 8 a 12 semanas de edad. Como puede observarse en el registro electrofisiológico mostrado en la figura 15A, la actividad espontánea del hipocampo no es dominada por una oscilación particular sino que consiste de una mezcla de actividades de distintas frecuencias y amplitudes (Balleza-Tapia et al. 2010; Pena et al. 2010). El espectro de potencia muestra que las bandas de frecuencia que componen a la actividad espontánea hipocámpal van de 0 a 40 Hz, con una frecuencia pico (f_p) de 8.2 ± 1.0 Hz (Fig. 15A) y que la suma de la potencia de todas las bandas de frecuencia observada en el espectro de potencia de 0 a 60 Hz es de 0.98 ± 0.34 nV². La aplicación de la A β o (10 nM) produjo una inhibición estadísticamente significativa de 0.38 ± 0.14 nV² en la potencia de la actividad espontánea del hipocampo (Fig. 14A). Esta inhibición es del $70 \pm 7\%$ cuando se mide la suma de la potencia de todas las bandas de frecuencia (Fig. 15A). La f_p en presencia de A β o no presenta cambios con respecto al control (8.5 ± 0.8 Hz). La reducción en la actividad espontánea se revierte cuando la A β o se lava por 30min del baño de registro y se puede observar una tendencia de la actividad espontánea a

incrementar más allá de los niveles del control ($2.0 \pm 0.51 \text{ nV}^2$). Sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo (Fig. 15A). La fp tampoco cambia con el lavado ($7.4 \pm 1.6 \text{ Hz}$). Como un control negativo y de especificidad, se utilizó el péptido con la secuencia inversa ($A\beta_{42-1}$). Este péptido control no alteró la potencia de la actividad espontánea del hipocampo

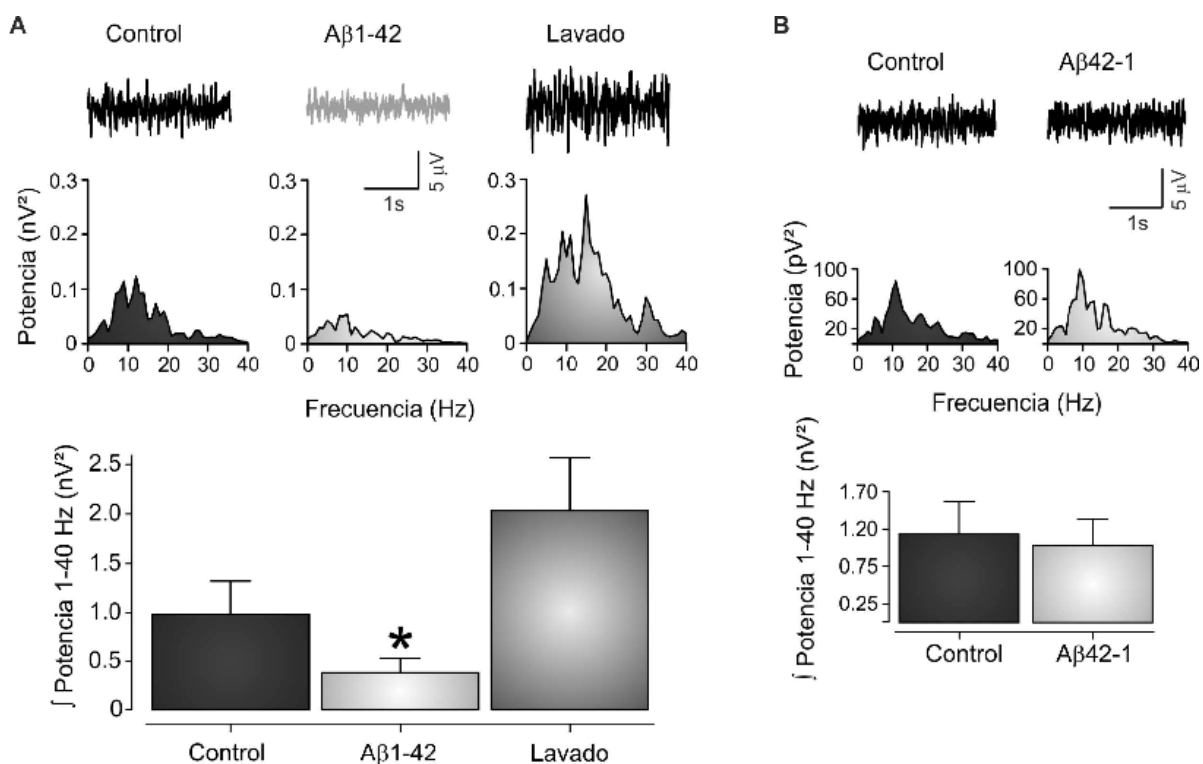


Figura 15. La inhibición de la actividad espontánea del hipocampo por la $A\beta_0$ es reversible y específica. **A)** Registros electrofisiológicos de campo de la actividad espontánea del hipocampo y sus respectivos espectros de potencia obtenidos de ratones de 8-12 meses de edad en condiciones control (negro; registro y espectro de potencia izquierdo), posterior a la aplicación de 10 nM de $A\beta_0$ por 30 min (gris claro; registro y espectro de potencia medio) y después de 30 minutos de lavado (gris oscuro; registro y espectro de potencia derecho). La gráfica inferior muestra la cuantificación de la potencia integrada del experimento representado en el panel superior ($n = 9$). **B)** Registros representativos y sus correspondientes espectros de potencia de la actividad espontánea en condiciones control (negro) y 30 minutos posteriores a la aplicación de la $A\beta_{42-1}$ (gris claro). La gráfica del panel inferior muestra la cuantificación de la potencia integrada del experimento representado en el panel superior ($n = 8$). Los valores de la potencia integrada se presentan como la media $\pm$ SEM; (*) denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una $P < 0.05$.

(**Control** = 1.1 ± 0.43 vs. **A β ₄₂₋₁** = 1.0 ± 0.34 nV²), ni la *f_p* (**Control** = 8.7 ± 0.5 Hz vs. **A β ₄₂₋₁** = 8.3 ± 1.2 Hz; Fig. 15B). Estos resultados demuestran que la inhibición de la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo es reversible y específica.

La actividad espontánea del hipocampo es estable y se inhibe rápidamente por la A β .

Una vez comprobado que la A β inhibe la actividad espontánea de la red hipocampal, el siguiente paso fue caracterizar dicho efecto a lo largo del tiempo. Así mismo, caracterizar la actividad espontánea misma a lo largo del tiempo. Los datos obtenidos muestran que la actividad espontánea es estable y mantiene valores similares de la potencia integrada a lo largo del tiempo de registro en condiciones sin la presencia de la A β (Fig. 16A Y Tabla 1). La *f_p* también se mantiene estable a lo largo de tiempo (Tabla 2). En contraste, la aplicación de la A β al baño de perfusión ocasiona una disminución constante de la potencia de la actividad en los primeros 15 minutos, a partir de los cuales llega a la inhibición máxima que se mantiene estable a lo largo del tiempo de registro (Fig. 16A y Tabla 1). La *f_p* no se modificó a lo largo del tiempo que la A β estuvo presente en el baño de perfusión (Tabla 2). En este grupo de experimentos, la aplicación continua, por 30 min, de A β inhibe la actividad espontánea del hipocampo en un 66% con respecto a su control (T0), y 87% con respecto al T30 del control sin la A β (Fig. 16B). Debido a que la inhibición de la actividad espontánea provocada por la

Tabla 1. Actividad espontánea de la región CA1 del hipocampo.		
Tiempo	Sin Aβ	Con Aβ
(min)	(nV ²)	(nV ²)
0	0.58 ± 0.19	0.62 ± 0.14
5	0.61 ± 0.17	0.50 ± 0.12
10	0.75 ± 0.17	0.36 ± 0.10
15	0.67 ± 0.11	0.18 ± 0.06
20	0.65 ± 0.11	0.27 ± 0.04
25	0.67 ± 0.16	0.30 ± 0.10
30	0.73 ± 0.17	0.20 ± 0.12
35	0.77 ± 0.17	0.21 ± 0.08
40	0.76 ± 0.16	0.24 ± 0.06

Tabla 2. Frecuencia pico de la actividad espontánea de la región CA1 del hipocampo.		
Tiempo	Sin Aβ	Con Aβ
(min)	(Hz)	(Hz)
0	8.6 ± 0.6	8.9 ± 0.7
5	8.6 ± 0.6	8.1 ± 0.8
10	8.2 ± 0.9	9.6 ± 0.8
15	8.9 ± 0.9	8.6 ± 0.8
20	8.3 ± 0.9	7.8 ± 0.7
25	8.2 ± 0.7	7.8 ± 0.7
30	9.3 ± 0.9	9.0 ± 0.7
35	8.7 ± 0.9	7.7 ± 0.7
40	8.9 ± 0.9	7.6 ± 0.5

presencia de la A β se encuentra en su máximo efecto a los 30 min, y este efecto se mantiene estable durante el periodo subsecuente, se decidió utilizar el tiempo de 30 min de incubación con la A β para propósitos comparativos en lo sucesivo.

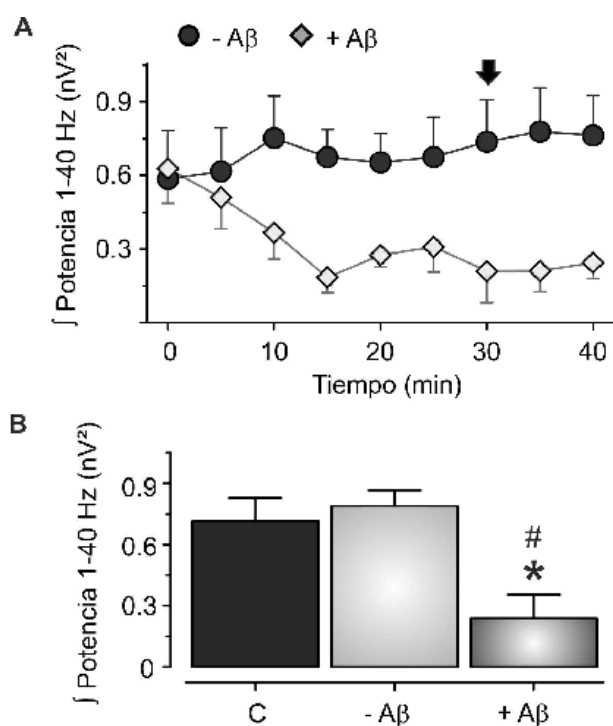


Figura 16 – La actividad espontánea del hipocampo es estable y se inhibe rápidamente por la A β . A) Curso temporal de la potencia integrada obtenida de la actividad espontánea en rebanadas de hipocampo expuestas a 10 nM de A β (diamantes; n = 7) o al vehículo (círculos; n = 6). B) Cuantificación de la actividad espontánea después de 30 minutos en presencia de la A β o el vehículo (medio F12). Los valores de la potencia integrada se presentan como la media $\pm$ SEM; (*) denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una P < 0.05.

La A β inhibe la actividad espontánea del hipocampo a concentraciones nanomolares bajas.

Con la finalidad de probar la potencia de la A β para inhibir la actividad espontánea de la red hipocampal, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de la misma sobre la actividad de rebanadas de hipocampo obtenidas de ratones SW de 8 a 12 semanas de edad (Fig. 17). Como se muestra en la figura 17A, así como en las cuantificaciones en las figuras 17A y C, la A β inhibe de manera dependiente de la concentración la actividad espontánea del hipocampo (en nV²: **control** = 0.73 ± 0.11 ; **0.01 nM** = 0.52 ± 0.18 ; **0.1 nM** = 0.42 ± 0.07 ; **1 nM** = 0.30 ± 0.13 ; **10 nM** = 0.20 ± 0.12 ; y **100 nM** = 0.40 ± 0.14 ; Fig. 17); el efecto inhibitorio producido por la A β se puede observar directamente en los registros electrofisiológicos o en los espectros de potencia correspondientes

(Fig.17A,B). Los espectros de potencia promedio (Fig. 17B) muestran claramente que la A β o induce una reducción dependiente de la concentración en la potencia de todos los componentes de las bandas de frecuencia registradas. La f_p no presenta alteraciones para ninguna de las concentraciones de la A β o aplicada (en Hz: **control** = 8.9 ± 0.3 ; **0.01 nM** = 9.5 ± 0.8 ; **0.1 nM** = 9.6 ± 0.6 ; **1 nM** = 8.3 ± 0.5 ; **10 nM** = 9.0 ± 0.7 ; y **100 nM** = 9.3 ± 0.9). Cuando el efecto de las diferentes concentraciones de A β o son graficadas como % de inhibición de la potencia integrada, una curva dosis-respuesta de comportamiento sigmoidal se ajusta a los datos (Fig. 17C). A partir de esta curva, se observa que las concentraciones más bajas de la A β o (0.01 y 0.1 nM) no producen efecto significativo sobre la actividad espontánea del hipocampo (**0.01 nM** = 0%; **0.1 nM** = 9%). En contraste, la A β o 1 nM y concentraciones mayores inhiben de manera estadísticamente significativa la actividad de la red hipocampal que llega a su nivel de saturación a la concentración de 10 nM (**1 nM** = 42%; **10 nM** = 77%; y **100 nM** = 60%). Al ajustar la ecuación de Hill a la curva dosis-respuesta, se obtiene que la IC₅₀ del efecto de la A β o es de 0.4 ± 3.2 nM, el valor del coeficiente de Hill es de ~ 1 y el efecto máximo del efecto de la A β o es de 69 % de inhibición (que se logra a la concentración de 10 nM).

La reducción en la actividad espontánea producida por la A β o es dependiente de la edad.

Con la intención de conocer si el efecto de la A β o sobre la actividad espontánea hipocampal depende de la edad, se evaluó dicho efecto con la concentración saturante de A β o (10 nM) en rebanadas del hipocampo obtenidas de ratones SW de diferentes edades. Mientras que las potencias de la actividad espontánea hipocampal se mantienen sin alteraciones a lo largo de la edad (Fig.18 y Tabla 3), el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad hipocampal se incrementa con la edad (Tabla 4). En la figura 18A se muestran los registros electrofisiológicos representativos, así como sus respectivos espectros de potencia, donde puede observarse que la actividad espontánea del hipocampo de ratones de 1 a 3 semanas de edad es resistente al efecto inhibitorio de la A β o 10 nM. Una inhibición estadísticamente significativa de la actividad hipocampal producida por la

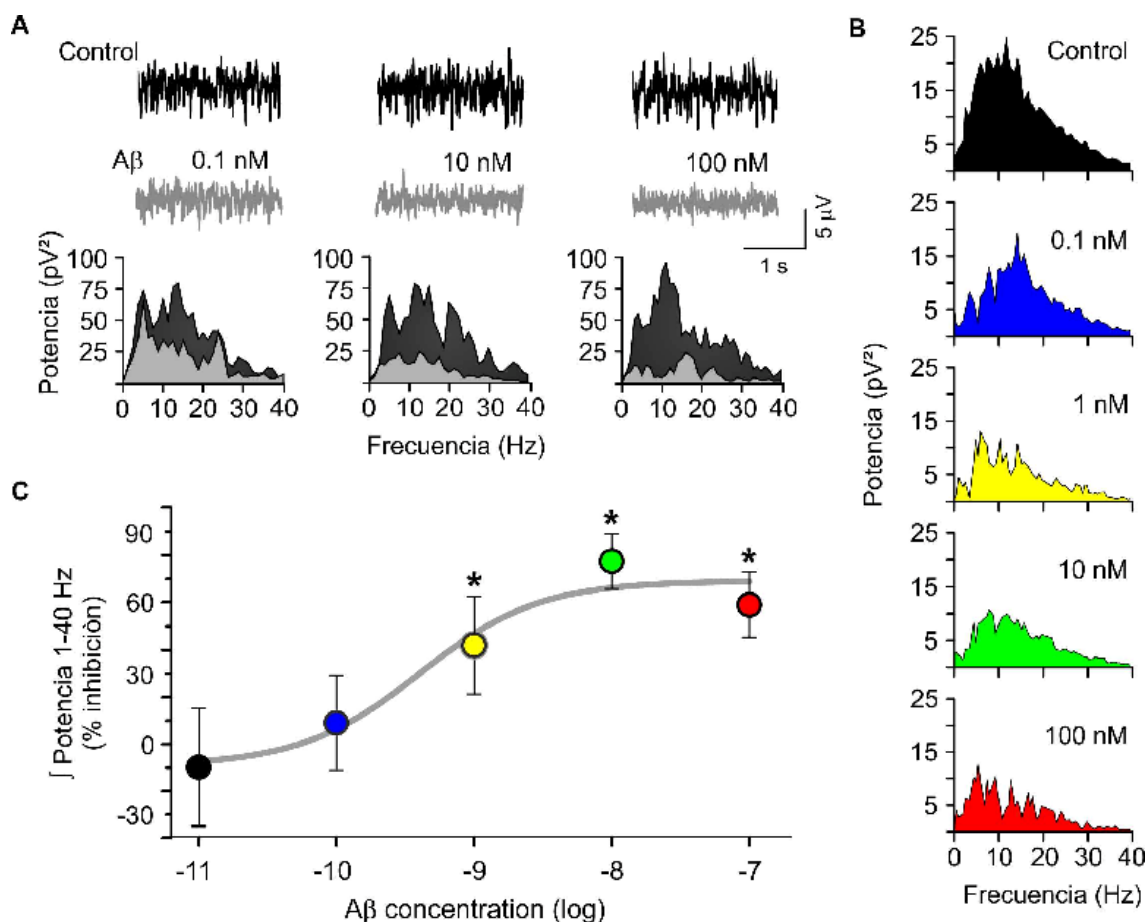


Figura 17 – La Aβo inhibe la actividad espontánea del hipocampo a concentraciones nanomolares bajas. A) Registros representativos y sus respectivos espectros de potencia de la actividad espontánea de rebanadas de hipocampo obtenidas de ratones de 8-12 meses de edad en condiciones control (negro) y 30 minutos posteriores a la aplicación de Aβo a distintas concentraciones (gris). B) Espectro de potencia promedio de la actividad espontánea en condiciones control y después de 30 minutos de exposición a la Aβo a diferentes concentraciones. C) Curva concentración-respuesta del porcentaje de inhibición inducido por la Aβo sobre la actividad espontánea posterior a la aplicación de las diferentes concentraciones 0.01 (n = 5), 0.1 (n = 8), 1 (n = 6), 10 (n = 7) y 100 nM (n = 6). Los valores, graficados como % de inhibición de la potencia integrada, se presentan como la media ± SEM; (*) denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una P < 0.05. La curva que se ajustó a los datos corresponde a una sigmoide.

Aβo se produce hasta que las rebanadas se obtienen de animales de 7 semanas de edad (61 % de inhibición; Fig. 18B). Esta inhibición se mantiene significativa con respecto a la actividad control hasta las 32 semanas de edad (en % de inhibición: **8 sem** = 67; **10 sem** = 48; **21 sem** = 70; y **32 sem** = 56), y no cambia significativamente a partir de las 7 semanas cuando se comparan entre las

diferentes edades (Fig. 18A). El análisis de los componentes de frecuencia mostró que la *fp* no cambia con la aplicación de la A β o 10 nM en ninguna de las edades estudiadas (Tabla 4).

Edad	Sin Aβo	Con Aβo
(sem)	(nV ²)	(nV ²)
1	1.67 $\pm$ 0.29	1.75 $\pm$ 0.28
2	1.48 $\pm$ 0.27	1.13 $\pm$ 0.25
3	1.40 $\pm$ 0.26	1.42 $\pm$ 0.37
7	1.20 $\pm$ 0.36	0.46 $\pm$ 0.16
8	0.84 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.11
10	0.94 $\pm$ 0.24	0.49 $\pm$ 0.10
21	1.30 $\pm$ 0.32	0.38 $\pm$ 0.10
32	1.11 $\pm$ 0.30	0.49 $\pm$ 0.11

Edad	Control	Aβo
(sem)	(Hz)	(Hz)
1	9.6 $\pm$ 0.9	8.3 $\pm$ 0.7
2	9.6 $\pm$ 0.8	11.5 $\pm$ 0.9
3	13.7 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 0.7
7	9.0 $\pm$ 1.0	10.5 $\pm$ 1.0
8	9.0 $\pm$ 0.8	9.0 $\pm$ 0.8
10	8.4 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.5
21	9.8 $\pm$ 1.0	9.6 $\pm$ 1.4
32	9.2 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.6

Las espigas poblacionales generadas en rebanadas de hipocampo provenientes de animales neonatos son más sensibles a la A β o que la actividad espontánea.

Mientras que la actividad espontánea generada por las rebanadas obtenidas de animales de 2 semanas de edad es insensible a la aplicación de 10 nM de la A β o, el aumento de la concentración de la A β o a 100 nM es capaz de inhibir significativamente la actividad espontánea hipocampal en un 41 % (Fig. 19A). Con el fin de comparación, se graficó el efecto de ambas concentraciones de la A β o (10 y 100 nM) junto a la curva sigmoideal obtenida en los experimentos dosis-respuesta en rebanadas obtenidas de animales más grandes (8–12 semanas; Fig. 19A). Note que la concentración de 100 nM inhibe la actividad espontánea de forma homogénea en todas las bandas de frecuencia (Fig. 19A – Espectros de potencia), sin embargo, el porcentaje de inhibición es menor comparado con el efecto de 10 nM y 100 nM de la A β o sobre la actividad espontánea de rebanadas provenientes de animales de mayor edad (Fig. 19A). La *fp* no presenta cambios estadísticamente significativos con la aplicación de la A β o 100 nM (en Hz: control = 8.0 $\pm$ 0.7 vs. A β o = 9.1 $\pm$ 0.8). Como dato interesante, las rebanadas de hipocampo

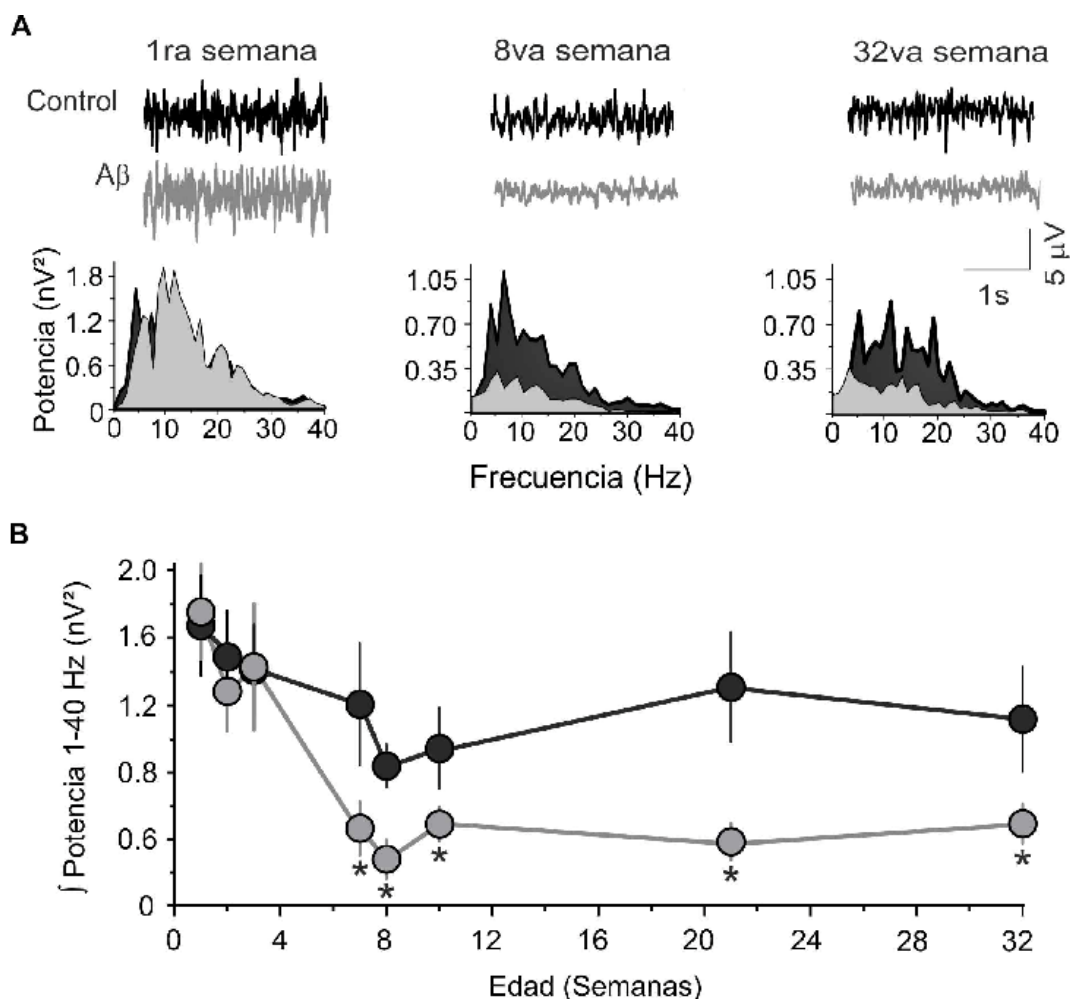


Figura 18 – La reducción en la actividad espontánea producida por la Aβ es dependiente de la edad. A) Registros representativos y sus respectivos espectros de potencia de la actividad espontánea de rebanadas de hipocampo obtenidas de ratones a diferentes edades en condiciones control (negro) y 30 minutos posteriores a la aplicación de Aβ (10 nM) a distintas concentraciones (gris). B) Cuantificación de la actividad espontánea en condiciones control (círculos negros) y 30 min posteriores a la aplicación de Aβ (círculos grises) a través de la edad (1 sem n = 7; 2 sem n = 8; 3 sem n = 6; 7 sem n = 6; 8 sem n = 6; 10 sem n = 8; 21 sem n = 5; y 32 sem n = 9). Los valores de la potencia integrada se presentan como la media ± SEM; (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con respecto al registro control para cada edad y respecto a la actividad espontánea de las rebanadas con una semana de edad.

de animales de 1 y 2 semanas de edad, presentan espigas poblacionales espontáneas (Fig. 19B) (Khazipov et al. 1997; Peña y Alavez-Perez 2006), que, en contraste con la actividad espontánea “de fondo”, son inhibidas casi en su totalidad por la Aβ 10 nM. La misma concentración de Aβ (10 nM) que no tiene efecto

sobre la actividad espontánea en las rebanadas de éstos animales neonatos (Fig. 19A), reduce la amplitud de las espigas poblacionales un 59 % y 49 % después de 30 y 60 minutos posteriores a la aplicación de la A β o, respectivamente (Fig. 19A), Más aún, la frecuencia de estas espigas también disminuye 47 % y 79 % a los 30 y 60 minutos de aplicación de A β o 10 nM, respectivamente.

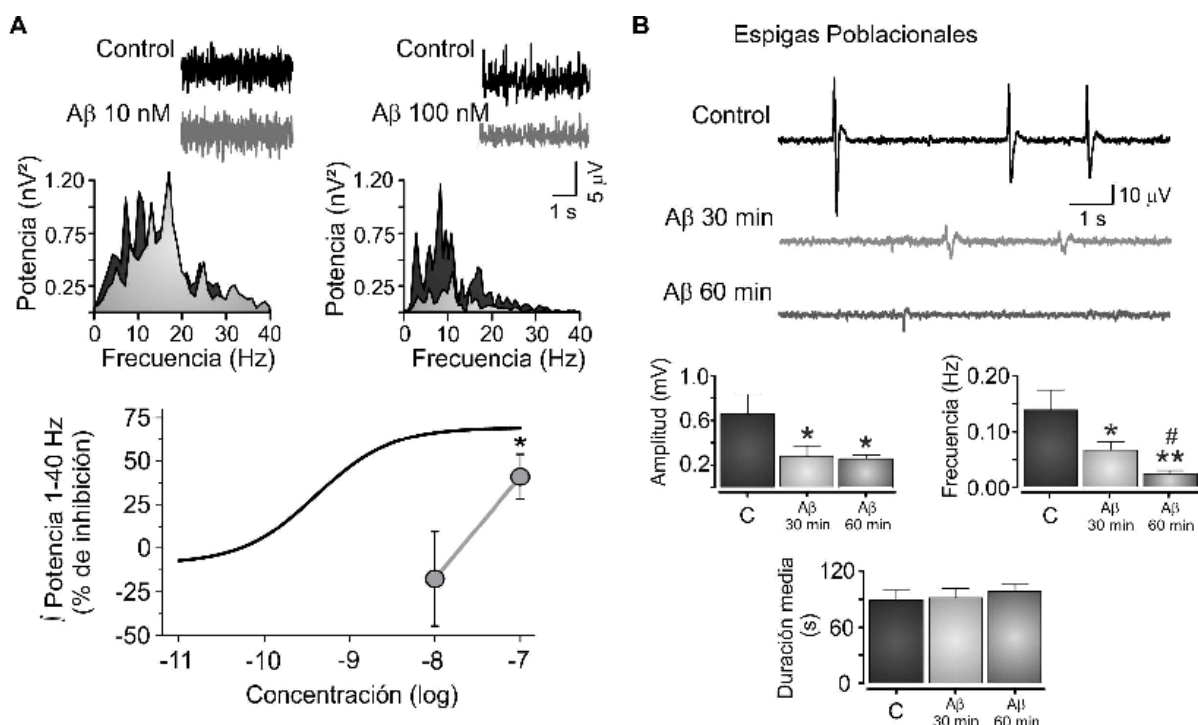


Figura 19 – Los diferentes patrones de actividad provenientes de animales neonatos son diferencialmente sensibles a la A β o. A) Registros representativos, y sus respectivos espectros de potencia, de la actividad espontánea de rebanadas de hipocampo obtenidas de ratones neonatos en condiciones control (negro) y 30 minutos posteriores a la aplicación de la A β o a distintas concentraciones (gris). La gráfica inferior muestra la cuantificación de los experimentos representados en el panel superior (círculos grises). La sigmoide ajustada correspondiente a la Figura 4C es presentada con fines de comparación. Los valores, graficados como % de inhibición de la potencia integrada, se presentan como la media $\pm$ SEM. B) Registros representativos de las espigas poblacionales registradas en rebanadas de hipocampo obtenidas de ratones neonatos en condiciones control (negro), así como 30 min (gris claro) o 60 min (gris oscuro) posteriores a la aplicación de A β o. Las gráficas inferiores muestran la cuantificación de las amplitud, frecuencia y duración media de las espigas poblacionales. Los valores, graficados como % de inhibición de la potencia integrada de la actividad de “fondo”, se presentan como la media $\pm$ SEM. Note que la dosis de 100 nM de la A A β o es capaz de inhibir la actividad espontánea de rebanadas provenientes de animales jóvenes. (*) Denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una $P < 0.05$ y (**) para $P < 0.01$. (#) Denota diferencias estadísticamente significativas con respecto a 30 min de A β o con una $P < 0.05$.

6.2. Efectos de A β o sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo. Papel de la cinasa Fyn.

A pesar de que diversos estudios han demostrado que los pacientes con EA muestran alteraciones en la actividad de las redes neuronales (ej. las oscilaciones), no se sabe aún de manera directa si estos efectos son producto de la A β y cómo esta proteína puede alterar la dinámica de las redes neuronales. Por lo tanto, el objetivo de esta sección fue determinar el efecto de la A β o sobre la dinámica de la red neuronal del hipocampo. Para tal motivo, se realizaron experimentos con imágenes neuronales multifuncionales con imagenología de calcio (fMCI; por sus siglas en inglés). Este tipo de experimentos permiten evaluar la actividad de las neuronas que forman parte de una red y analizar la dinámica de ésta con una resolución unicelular (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008; Jaidar; Sasaki 2006, 2007). Es decir, la fMCI es una herramienta que permite evaluar los patrones espacio-temporales de la actividad de las redes neuronales (Carrillo-Reid et al. 2008). La base de la técnica consiste en la detección de la entrada de calcio (transitorio de calcio) en las neuronas como resultado de la generación de potenciales de acción (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008; Jaidar; Sasaki 2006, 2007). La amplitud de los transitorios de calcio asociados a los potenciales de acción es suficiente que puede ser detectado como un cambio en la fluorescencia emitida por un fluoróforo sensible a calcio que se ha introducido al citoplasma de una célula (Takahashi et al. 2011). A través de ésta técnica, la temporalidad de los patrones de disparo que ocurren de manera simultánea en cada neurona se puede reconstruir y, de esta manera, se puede analizar la dinámica de la red neuronal (Sasaki et al. 2007; Takahashi et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010; Takahashi et al. 2011).

Para esta serie de experimentos se utilizaron cultivos organotípicos de hipocampo provenientes de ratones WT (ver métodos). Los cultivos se colocaron en la cámara de registro perfundida constantemente con LCRA, a una temperatura de 30-32°C y gaseado con una mezcla de carbógeno (95% O, 5% CO). Se tomaron

una serie de imágenes de la actividad espontánea de los cultivos en condiciones normales (control), utilizando un campo visual de 800 x 600 μm . Los resultados obtenidos con la fMCI muestran que un número significativo de las células del cultivo incorporan el marcador fluorescente sensible a calcio Fluo-4 (Fig. 20A). La diferenciación de las neuronas y las células presumiblemente gliales se llevó a cabo de acuerdo a las características de los transitorios de calcio (Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010) (Fig. 20B y C; ver materiales y métodos). Al igual que estudios anteriores (Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010), en el laboratorio se demostró que los cambios en la fluorescencia del Fluo-4 en las neuronas es producto de potenciales de acción (al menos dos de ellos) y que la primera derivada de los transitorios de calcio corresponde a la duración total del tren de potenciales de acción generados por una neurona en un momento dado (Pena et al. 2010). Por lo anterior, es posible reconstruir la actividad eléctrica de cada neurona de la red y representarla como líneas en una gráfica tipo “raster” (Fig. 21A).

Antes de analizar el efecto de la A β o sobre la dinámica de la red hipocampal, se evaluó la estabilidad de la misma, a lo largo del mismo tiempo de registro, en ausencia de A β o. En la figura 21A se puede observar la representación de la actividad eléctrica de las neuronas de una rebanada hipocampal en el gráfico tipo “raster”. En éste se muestra el tiempo en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas se representa cada una de las neuronas que tuvieron actividad durante los 360 seg que duró el experimento. En condiciones normales (control), se puede observar una gran actividad espontánea en el cultivo que se mantiene constante 30 minutos (T30) después de tomado el primer video (T0; Fig. 21); todo en ausencia de la A β o. El análisis de estos experimentos mostró que el número de neuronas activas se mantiene constante a través del tiempo (en neuronas activas: T0 = 555.4 ± 162.3 vs. T30 = 500.1 ± 171.3 ; Fig. 21D). El promedio de espigas por célula (tasa de actividad), se mantiene constante también a lo largo de los 360 seg de duración de los videos (en espigas por célula: T0 = 12.7 ± 1.6 vs. T30 = 11.3 ± 1.1 ; Fig. 21E). Los mapas de correlación espacial muestran que las neuronas presentan una alta actividad correlacionada que se distribuye en toda la rebanada (Fig. 21B).

La correlación se denota como una línea que une pares de neuronas (cuadros) y el

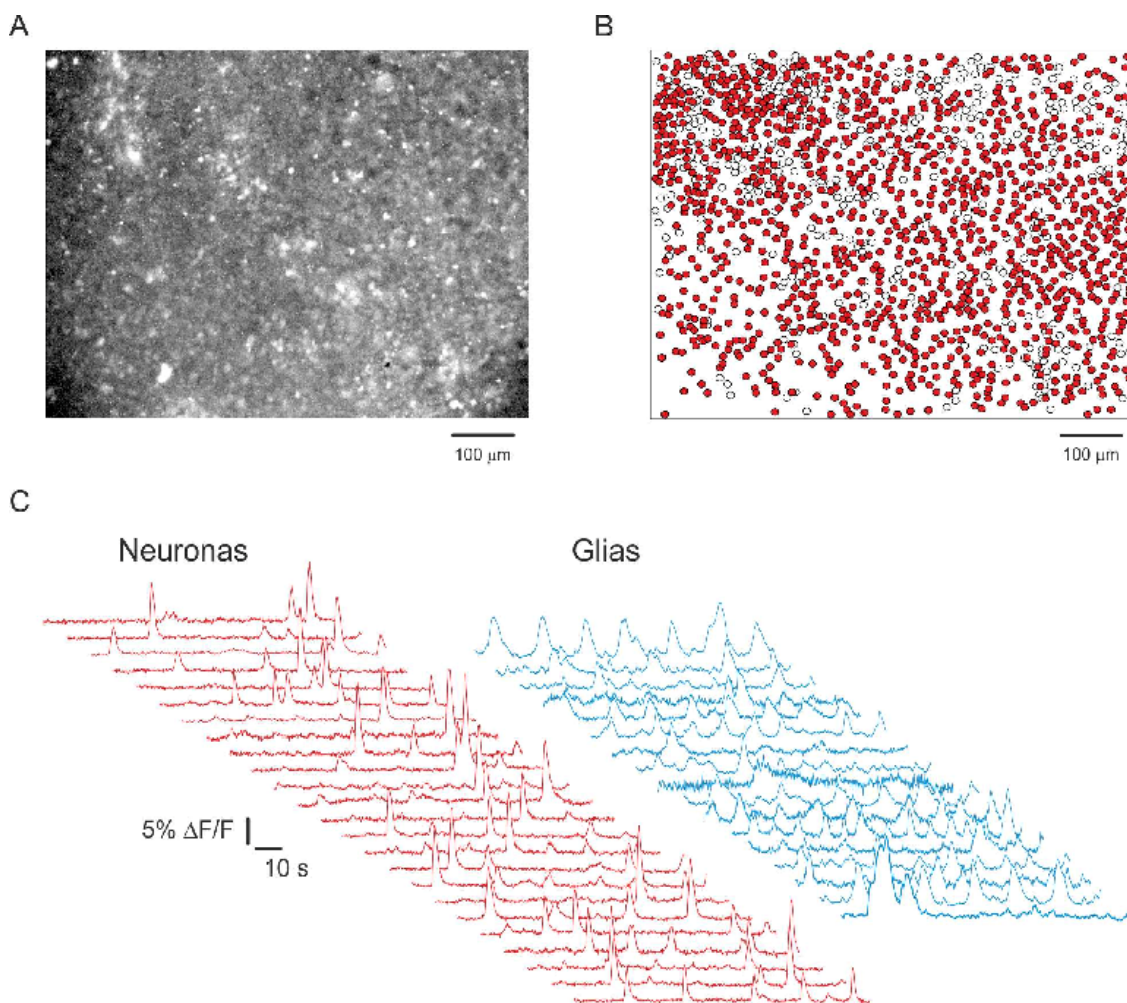


Figura 20 – Los cultivos organotípicos de hipocampo muestran una dinámica con muchos elementos activos. A) Cultivo organotípico de hipocampo de 10 *div* cargado con Fluo-4. B) Representación de las coordenadas correspondientes a las células que tuvieron actividad en el cultivo organotípico durante el experimento. C) Trazos representativos de los transitorios de calcio correspondientes a neuronas (Rojo) y células gliales (Azul).

grosor de ésta línea es proporcional al grado de correlación. En las gráficas de correlación en pseudocolor se puede apreciar, además, que el grado de correlación entre los distintos pares de neuronas es muy heterogéneo (Fig. 22). Una de las características de la actividad espontánea de la red neuronal de los cultivos

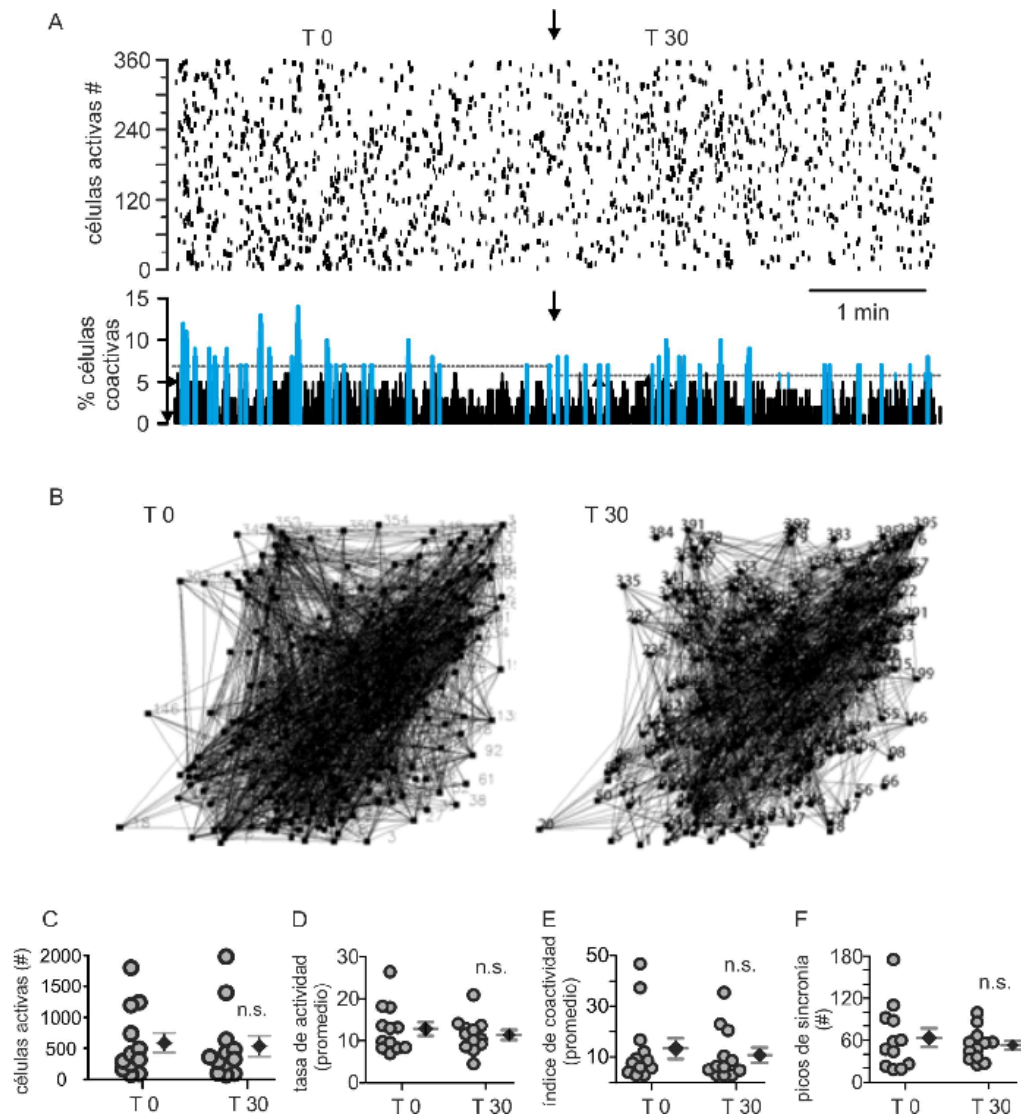


Figura 21 – La actividad espontánea de la red neuronal de los cultivos organotípicos de hipocampo es estable a través del tiempo. **A)** Arriba: “*raster plots*” de la actividad espontánea de un cultivo organotípico de hipocampo al inicio del experimento (T0) y 30 minutos después (T30); abajo: porcentaje de las células coactivas en función del tiempo tanto en T0 como en T30. Cada fila representa una célula activa. En azul se muestran los picos de actividad sincrónica poblacional significativa tomando como umbral 3 veces la desviación estándar de la actividad coactiva total. Se puede apreciar como las neuronas se encuentran muy activas, esta actividad es caótica y no se distingue una gran sincronía en su actividad. **B)** Mapas de correlación de la actividad espontánea de las neuronas a T0 y T30. Las líneas conectan neuronas que tienen una actividad correlacionada estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Se muestran también las cuantificaciones del número de células activas (**C**), la tasa promedio de actividad por neurona (**D**), el índice de actividad coactiva total (**E**) y el número de picos de sincronía (**F**) en cada condición experimental; los rombos representan el promedio de 12 experimentos $\pm$ E.E.; n.s. denota que no existe diferencia significativa con respecto a T0. Note que la actividad espontánea se mantiene estable a través del tiempo.

organotípicos es la presencia de picos de actividad sincrónica que se pueden observar directamente en los “raster” como pequeños bloques de espigas (Fig. 21A). Estos picos pueden observarse con mayor claridad en la gráfica donde se presenta el porcentaje de células coactivas (Fig. 21A). En esta gráfica se puede ver en azul los picos de actividad sincrónica (que corresponden a los picos de actividad que sobresalen de la línea punteada que representa 3 veces la desviación estándar del ruido de actividad; ver materiales y métodos). Como se muestra en la figura 21A, los picos de actividad sincrónica aparecen de forma recurrente y se mantienen constantes a lo largo del tiempo (en picos de sincronía: $T0 = 63 \pm 13$ vs $T30 = 52 \pm 6.5$; Fig. 21G). Estos datos sugieren que la dinámica de la actividad espontánea de la red neuronal del cultivo de hipocampo sigue patrones espacio-temporales definidos y estructurados (picos de actividad sincrónica). En este sentido, algunos trabajos han sugerido que el grado de sincronización entre los distintos pares de neuronas, al ser heterogéneo, indica que la dinámica de red observada no es debida al azar sino, a la dinámica propia del circuito (Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010).

Con la finalidad de reconstruir la dinámica de la red neuronal del cultivo de hipocampo, se dividió la actividad global de la red en ventanas de tiempo, considerando solamente las neuronas involucradas en los picos de actividad sincrónica. Así, los segmentos temporales que se obtienen representan vectores multidimensionales que codifican la actividad de los potenciales de acción de neuronas individuales que participan en los picos de actividad sincrónica (patrones de actividad neuronal). Cada vector representa una ventana de tiempo y la dimensión del vector indica el número de células activas en dicho momento (Carrillo-Reid 2008). Se ha demostrado que la vectorización de la actividad global de una red neuronal permite reconstruir y comparar diferentes estados funcionales de la red a través del tiempo (Brown et al. 2005b; Sasaki et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010). Es decir, los vectores obtenidos revelan la dinámica de una red neuronal durante los picos de actividad sincrónica (Jaidar-Benavides 2010). Una vez que se vectorizó la actividad neuronal, se calculó el producto interno (ver materiales y métodos), de cada par posible de vectores para comparar

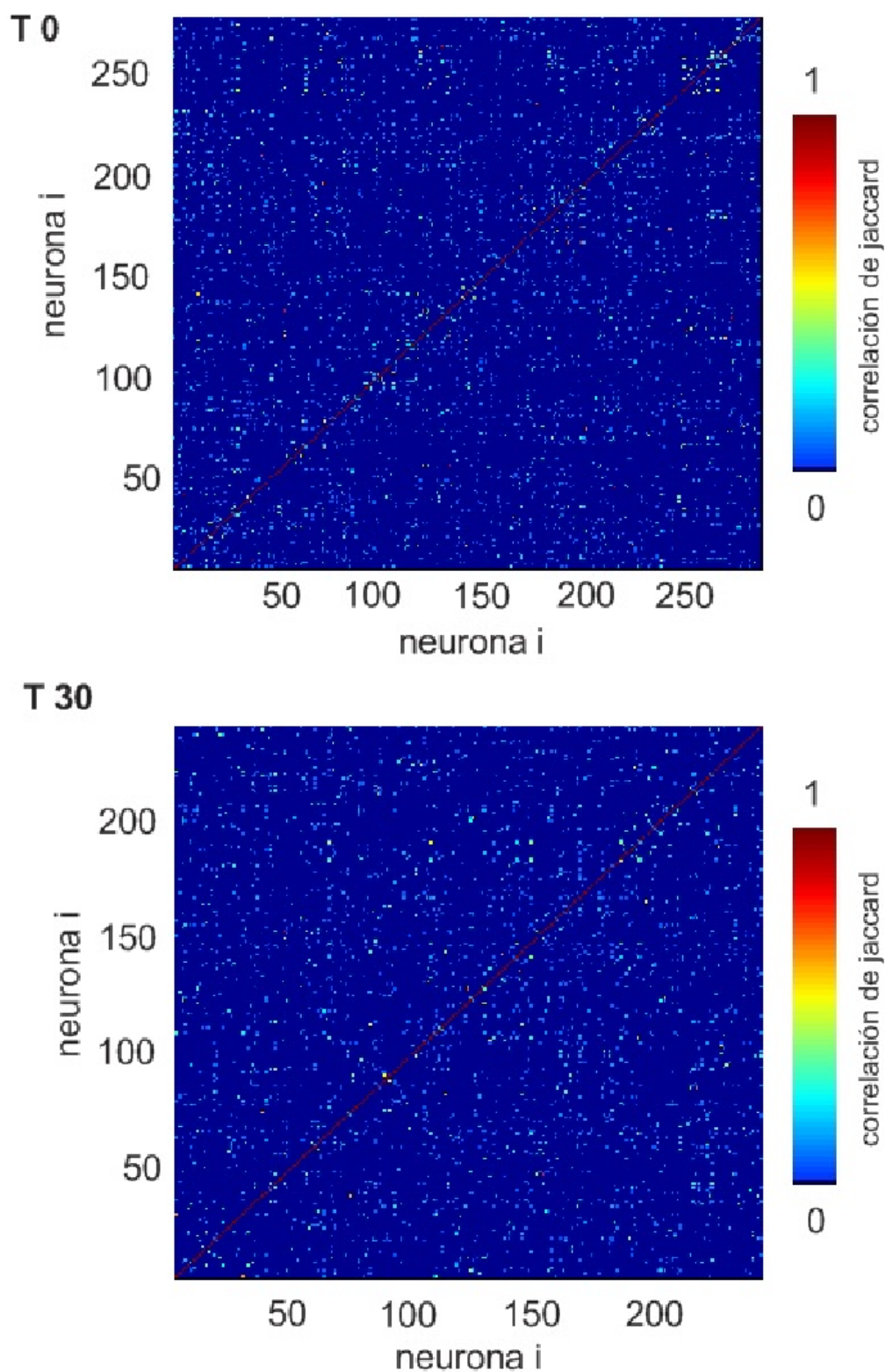


Figura 22 –Mapa de correlación cruzada de todos los posibles pares de neuronas que muestran actividad espontánea en la red neuronal de los cultivos organotípicos de hipocampo a través del tiempo. Note que la actividad correlacionada de cada par de neuronas se mantiene sin alteraciones a través del tiempo.

sus similitudes (índice de similitud: ver materiales y métodos) y reconstruir los estados funcionales y la dinámica de la red neuronal (Carrillo-Reid 2008). En la figura 23A se muestra el índice de similitud de cada par posible de vectores a lo largo del tiempo. Note que se forman estructuras agrupadas tipo mosaico que denotan las semejanzas entre los distintos vectores. Para agrupar estos vectores en estados funcionales de la red se utilizó el algoritmo de LLE (ver materiales y métodos), que permite la reducción de dimensiones de espacios vectoriales multidimensionales de sistemas no lineales, conservando la estructura de dicho sistema (Roweis y Saul 2000). Además, se ha demostrado que la aplicación de este algoritmo refleja fidedignamente los estados funcionales de la red (Carrillo-Reid 2008). Una vez que se hace la reducción dimensional, el algoritmo de LLE proyecta la organización nueva de los vectores en un espacio de dos dimensiones (Fig. 23B). Cada punto representa un vector y cada grupo de puntos representa vectores con dinámicas similares que forman parte de un estado funcional de la red (Carrillo-Reid 2008). En la Fig. 23B puede observarse los distintos estados funcionales que componen la actividad espontánea del cultivo de hipocampo en condiciones normales. Las trayectorias que se observan entre cada grupo de puntos denota el porcentaje de transición entre los distintos estados funcionales o el porcentaje de recurrencia en un estado. Es importante hacer notar que el número de estados funcionales de la actividad espontánea se mantiene constante a lo largo del tiempo (Fig. 23B-F; en estados funcionales: $T0 = 3.5 \pm 0.2$ vs. $T30 = 4.1 \pm 0.3$). En la figura 23C, se representa parte de la dinámica de la red neuronal del cultivo de hipocampo. Se grafican los diferentes picos de actividad sincrónica a lo largo del tiempo (puntos) y el estado al cual pertenecen, para observar claramente los comportamientos de la red neuronal, como son la recurrencia de la actividad espontánea hacia un estado y la transición entre los diferentes estados funcionales de la red. Note que no existe un estado preferente de la red y que la alternancia entre estados es alta tanto a T0 como a T30. En la figura 23D se presenta la distribución espacial de las neuronas, cuyos patrones de actividad sincrónica, generan los distintos estados funcionales. Note que las células pertenecientes a cada estado tienen una distribución difusa. Finalmente, se realizó un análisis

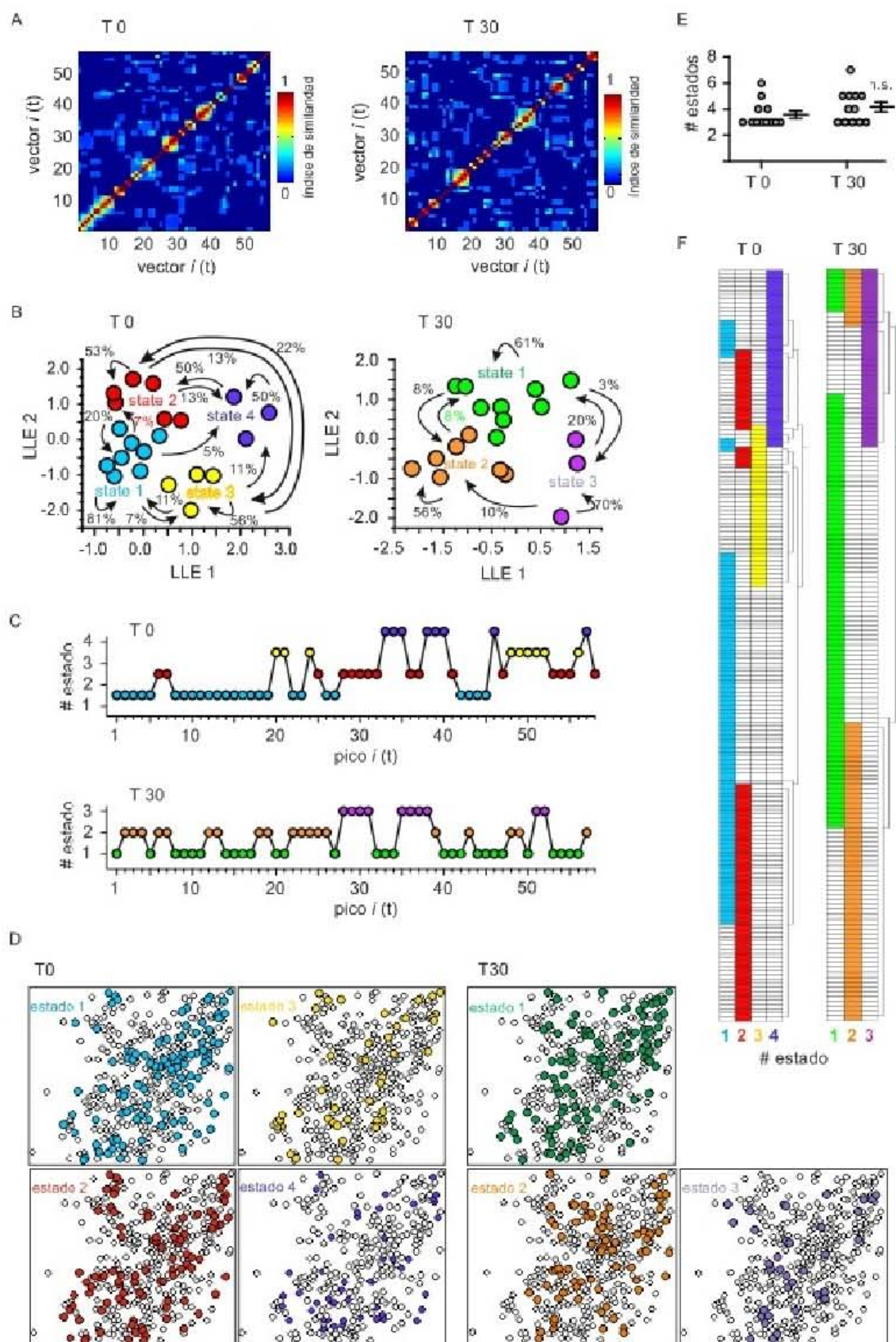


Figura 23 – Estados funcionales del cultivo organotípico de hipocampo. **A)** Matrices de similitud de los vectores de la dinámica de la red neuronal como una función del tiempo del cultivo organotípico de hipocampo al tiempo cero (T0) y 30 minutos posteriores (T30). **B)** Reducción multidimensional utilizando el algoritmo LLE (del inglés *Locally Linear Embedding*). Cada punto representa un vector a un tiempo dado y los colores denotan diferentes estados de la red (revisar Métodos). Los porcentajes y las flechas indican la probabilidad de la red de cambiar de estado. **C)** Gráfica que representa el comportamiento de la red neuronal. Cada punto denota los picos de actividad sincrónica a un tiempo dado. Los colores denotan los picos de sincronía pertenecientes a cada estado funcional dado. La disposición horizontal de los puntos indica la recurrencia en un estado mientras las líneas indican la transición hacia otro estado. **D)** Mapas de la distribución espacial de las neuronas que participan en cada estado funcional. **E)** Cuantificación del número de estados funcionales en las diferentes condiciones experimentales. Los rombos representan el promedio de 12 experimentos $\pm$ E.E.; n.s. denota que no existe diferencia significativa con respecto a T0. **F)** Análisis de agrupamiento jerárquico (en inglés: *hierarchical cluster analysis*) de las células que participan en los estados de la red, los colores indican la participación de cada neurona en un estado dado. Note que diferentes grupos de neuronas participan en cada estado funcional, no obstante algunas células participan en más de un estado.

jerárquico que demostró que cada estado funcional se genera a partir de la actividad de grupos diferentes de neuronas. No obstante, se observa que existen elementos neuronales que se comparten entre los diferentes estados (Fig. 23F). Se ha hipotetizado que estos elementos podrían estar coordinando la transición entre los diferentes estados funcionales de la red (Carrillo-Reid 2008).

Una vez caracterizada la dinámica de la red neuronal del cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control, así como a través del tiempo, se procedió determinar el comportamiento de la red en las condiciones patológicas provocadas por la aplicación de la A β o. Primero se caracterizó la actividad de la red en condiciones control (Fig. 24). Como se había demostrado previamente, esta actividad es muy frecuente y heterogénea (ver Fig. 22). Se pueden apreciar los picos de actividad sincrónica tanto en forma de bloques en el “raster” (Fig. 24A, panel superior), como en la gráfica del porcentaje de células coactivas (Fig. 24A, panel inferior, color azul). La aplicación de la A β o (10 nM) por 30 min provoca una disminución la actividad de la red hipocampal (Fig. 24A). Este efecto se ve reflejado en la disminución del número de neuronas activas (Fig. 24D; en células activas: control = 410.4 ± 120.9 vs. A β o = 312.2 ± 101.4), y también, en la disminución en el

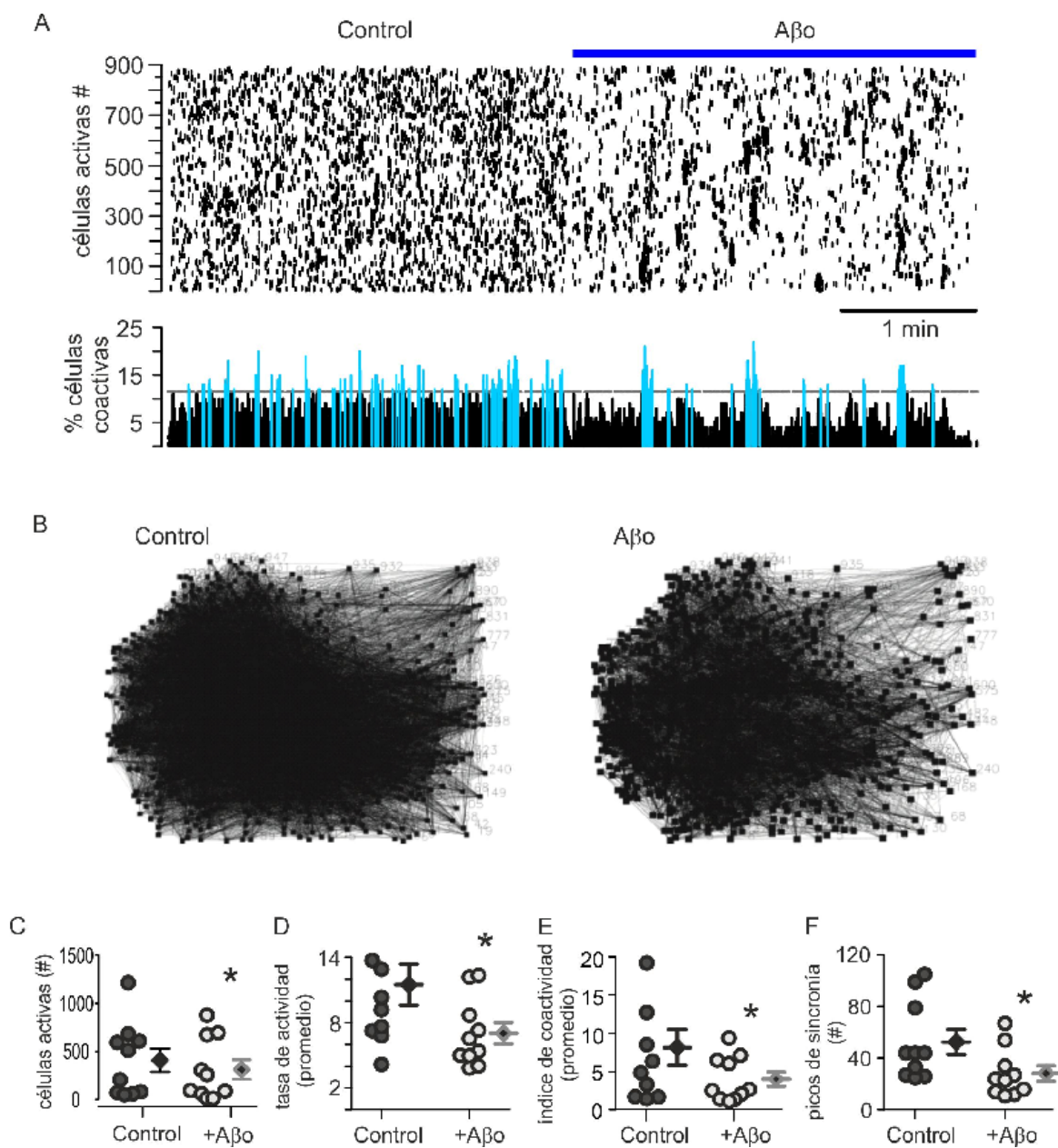


Figura 24 – La Aβ disminuye la actividad espontánea del cultivo organotípico de hipocampo. **A)** *raster plot* y porcentaje de células coactivas de la actividad espontánea de un cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control y 30 minutos después del tratamiento con 10 nM de Aβ. En azul se muestran los picos de actividad sincrónica poblacional **B)** Mapas de correlación de la actividad espontánea de las neuronas en la condición control y después del tratamiento con la Aβ. Se muestran también las cuantificaciones del número de células activas **(C)**, la tasa promedio de actividad por neurona **(C)**, el índice de actividad coactiva total **(E)** y el número de picos de sincronía **(F)** en cada condición experimental; los rombos representan el promedio de 10 experimentos ± E.E.; * denota diferencias significativas con respecto al control. Note que la correlación entre los pares de neuronas disminuye dejando ver la formación de agregados de células en los mapas espaciales, sugiriendo que las células que se agrupan se enganchan y presentan actividad similar.

número espigas de actividad por célula (tasa de actividad; Fig. 24E; en espigas por célula: control = 11.5 ± 1.8 vs. A β o = 7.0 ± 0.9). Además, los mapas de correlación espacial muestran una clara disminución en la correlación entre pares de neuronas (Fig. 24B). Incluso, la aplicación de la A β o parece que promueve la formación de agregados o islas de neuronas donde se concentran la mayoría de las correlaciones (Fig. 24B, A β o). Las gráficas de correlación en pseudocolor muestran la formación de estructuras cuadradas (agregados) con la aplicación de la A β o, en comparación con la condición control (Fig. 25), sugiriendo que la A β o promueve una actividad aberrante en la red hipocampal. Es importante notar que la A β o disminuye la capacidad de sincronización de la actividad de las neuronas de la red. Este fenómeno se ve reflejado en la disminución de los picos de actividad sincrónica (en picos de sincronía: control = 52.6 ± 9.6 vs. A β o = 28.2 ± 5.9 ; Fig. 24G). No obstante, se puede observar en la gráfica tipo “raster”, que los bloques que corresponden a los picos de sincronía que quedan después de la aplicación de la A β o se ven con mayor claridad (Fig. 24A). Estos resultados sugieren que la A β o promueve una inhibición en la sincronía de la actividad de las neuronas que posiblemente es influenciada por la disminución en la tasa de disparo. Notablemente, la correlación entre los pares de neuronas disminuye dejando ver la formación de agregados de células en los mapas espaciales (Fig. 24B) y la formación de estructuras cuadradas en el mapa de pseudocolor, sugiriendo que las células que se enganchan en actividad más homogénea que en el control.

Posteriormente, se analizó el efecto de la A β o sobre las características de los vectores de la actividad espontánea de la red neuronal del cultivo de hipocampo. En las gráficas de pseudocolor se puede observar como aumenta la similaridad entre los diferentes vectores con la aplicación de la A β o (Fig. 26A). En la Fig. 26B se muestran los distintos estados funcionales que componen la actividad espontánea del cultivo de hipocampo en condiciones control y posterior a la aplicación de la A β o. El cálculo de los estados funcionales de la red muestra que la A β o (10 nM) disminuye significativamente el número de estados funcionales comparado con el control (Fig. 26B-F; en estados funcionales: control = 3.8 ± 0.29 vs. A β o = 2.2 ± 0.13). Es importante notar que la A β o genera un

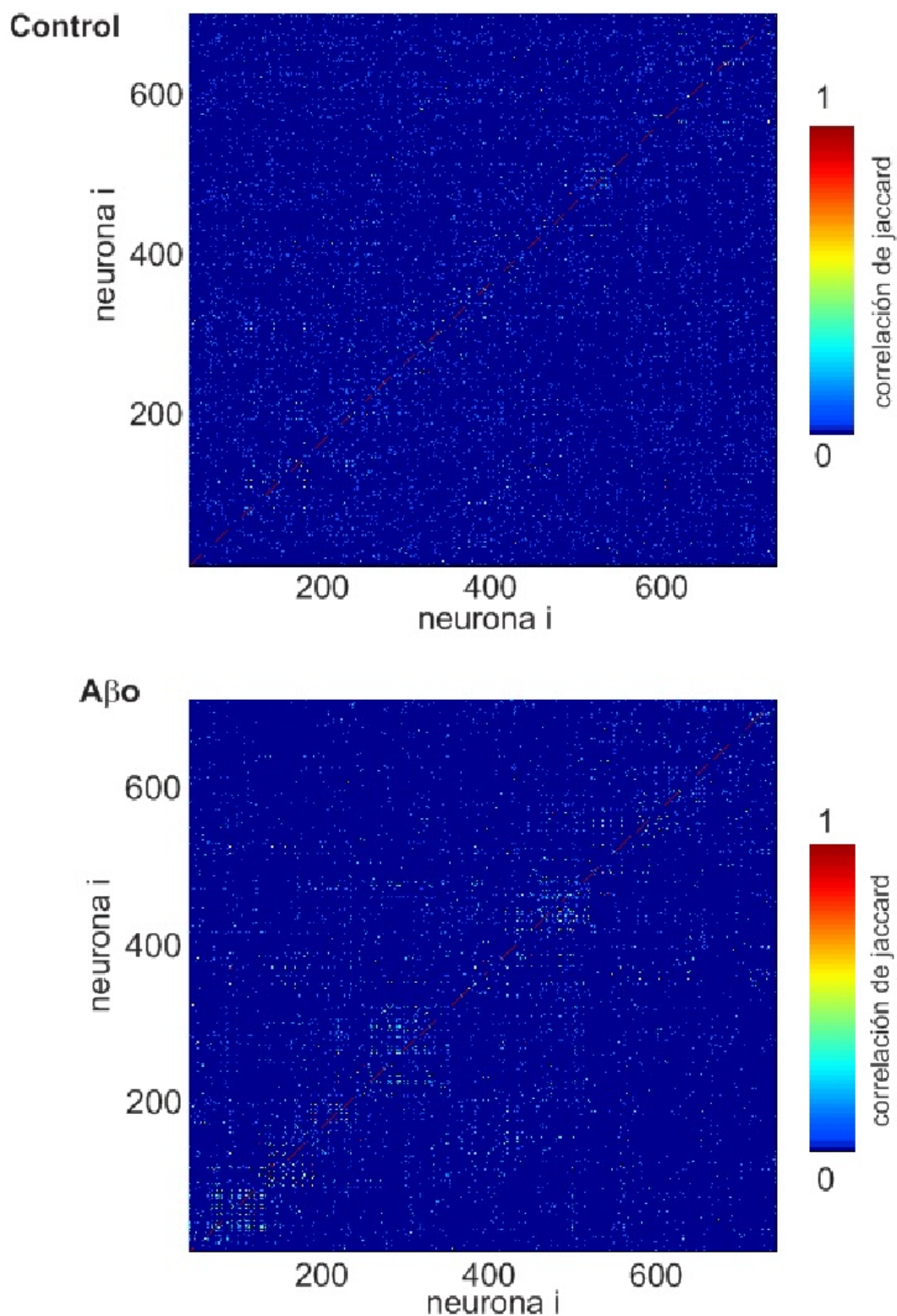


Figura 25 –Mapa de correlación cruzada de todos los posibles pares de neuronas activas en condiciones control y posteriormente a la aplicación de la Aβo. Note la formación de estructuras cuadradas en el mapa de pseudocolor posterior a la aplicación de la Aβo, lo que indica que las neuronas presentan actividad similar.

estado preferente que engloba la mayoría de los picos de actividad sincrónica (Fig. 26C). Como se demostró anteriormente, la dinámica de la red neuronal del cultivo de hipocampo en condiciones control es heterogénea y presenta una alta alternancia entre los distintos estados funcionales (Fig. 26C). Contrariamente, la aplicación de la A β promueve la formación de un estado preferente con una alta recurrencia (Fig. 26C). Note, que incluso la probabilidad de transición hacia otro estado funcional es muy baja. Los mapas de la ubicación espacial de las neuronas que forman parte de cada estado muestran que la aplicación de la A β altera las conexiones de la red neuronal y hace que los grupos activados en cada estado se localicen en grupos segregados espacialmente (Fig. 26D). Además, en presencia de la A β , el estado preferente recluta a la mayoría de las neuronas activas como se observa el análisis de agrupamiento jerárquico (Fig. 26G). Cabe notar, que estas agrupaciones o islas de neuronas que se forman con la aplicación de la A β corresponden a los observados en los mapas de correlación espacial. De lo anterior se desprende que la A β es capaz de inducir una dinámica aberrante de la red neuronal, cuya principal característica es la formación de un estado preferente con una alta recurrencia de este estado (Fig. 26C).

En los experimentos anteriores, se evaluó el efecto agudo de la A β sobre la dinámica de la red neuronal del hipocampo. El objetivo fue caracterizar los cambios inmediatos que presenta una red control a la que se le presenta condiciones patológicas de manera aguda (p.e. la aplicación de la A β). No obstante, dado que en la EA el efecto de la A β sobre las redes neuronales es crónico, se consideró necesario estudiar la dinámica de las redes neuronales en un circuito en condiciones patológicas similares a las encontradas en los pacientes con EA. Con esto en mente, se realizaron experimentos de dinámica de red en cultivos organotípicos de hipocampo provenientes de los ratones triple transgénicos para la EA (3xTgAD). Estos ratones reproducen muchos de los síntomas y de los cambios patológicos descritos en la EA (Oddo et al. 2003). Los resultados obtenidos de esta serie experimental muestran que la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo de ratones 3xTgAD es heterogénea y se observan también picos de

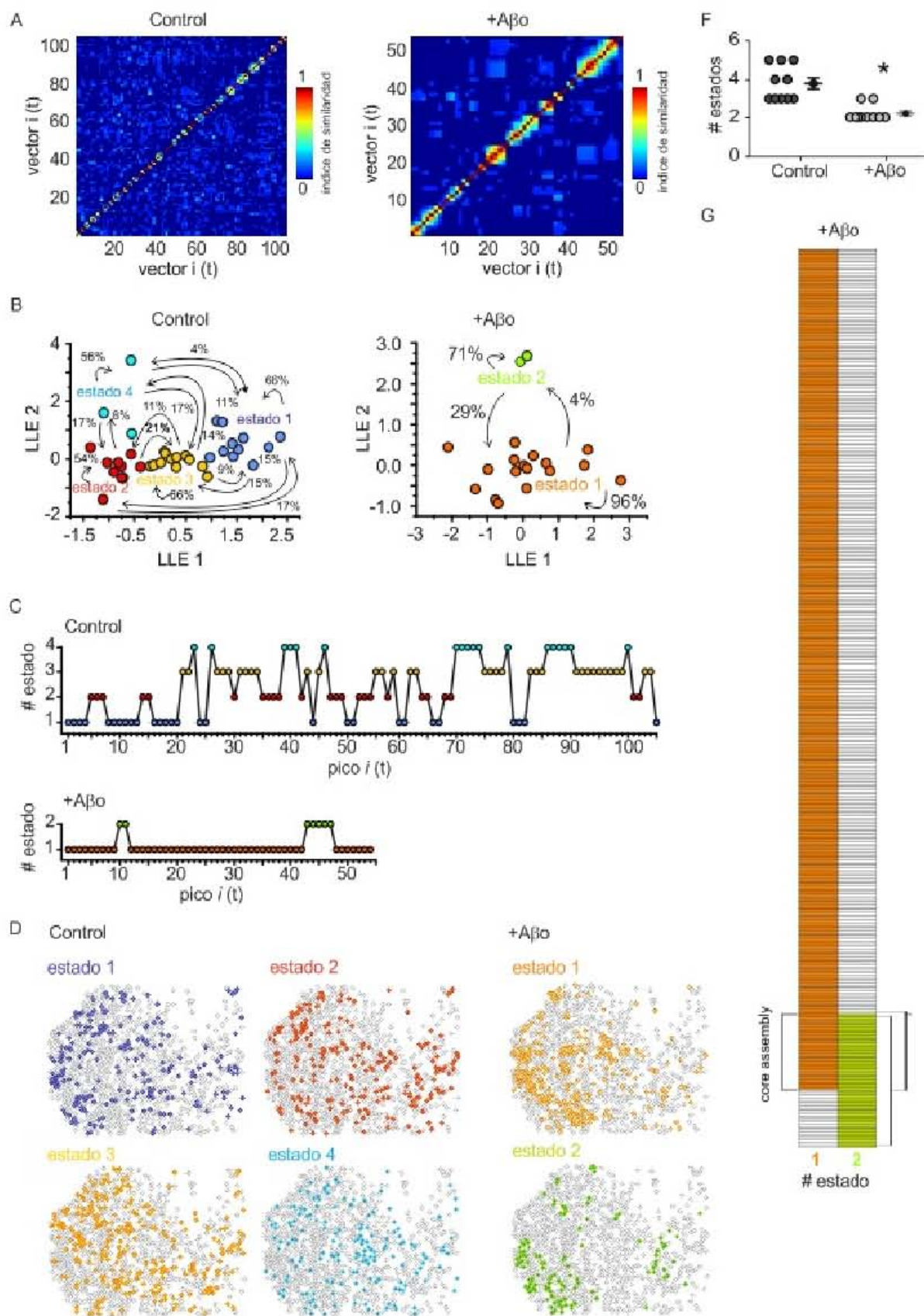


Figura 26 – La A β altera la dinámica de la red neuronal del hipocampo y genera un estado preferencial y recurrente. **A)** Matriz de similaridad de los vectores de la actividad del cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control y 30 min posteriores a la aplicación de la A β (10 nM). **B)** Proyección del LLE que muestra la dinámica de la red neuronal en las condiciones experimentales de A. La aplicación de la A β promueve una disminución en el número de estados funcionales. **C)** Comportamiento de la red neuronal antes y después de la aplicación de la A β . La disposición horizontal de los puntos indica la recurrencia en un estado mientras las líneas indican la transición hacia otro estado. Observe que la aplicación de la A β genera un estado preferencial y recurrente. **D)** Mapas de la distribución espacial de las neuronas que participan en cada estado funcional. Note que la A β promueve que las células activas en los estados funcionales se agrupen en islas. **E)** Cuantificación de los estados funcionales en las diferentes condiciones experimentales. Los rombos representan el promedio de 10 experimentos $\pm$ E.E.; * denota diferencias significativas con respecto al control. **F)** Análisis de agrupamiento jerárquico de las células que participan en los estados de la red.

actividad sincrónica, tanto en la gráfica tipo “raster”, como en la gráfica de células coactivas (Fig. 27A). Además, esta actividad se mantiene constante a través del tiempo (Fig. 27A; T0 vs. T30). El número de células activas no cambia en T30 con respecto a T0, (Fig. 27D; en células activas: T0 = 96.22 ± 19.00 vs. T30 = 79.89 ± 12.89). Sin embargo, los cultivos de hipocampo de ratones 3xTgAD tienen un menor número de células activas comparado con los ratones WT (en neuronas activas: T0 = 555.4 ± 162.3 vs. T30 = 500.1 ± 171.3 ; Fig. 21D). Interesantemente, la tasa de actividad por neurona es similar a la encontrada en la red neuronal de ratones WT, tanto en T0 como en T30 (Fig. 27E; en espigas por célula: T0 = 10.9 ± 0.7 vs. T30 = 10.9 ; WT ver Fig. 21E y Fig. 24E). El mapa de correlación espacial muestra que existen menos correlaciones entre los diferentes pares de neuronas en la red hipocampal de los ratones 3xTgAD (Fig. 27B). En las gráficas de correlación en pseudocolor se muestra la correlación que existe entre todos los posibles pares de neuronas tanto en T0, como en T30 (Fig. 28). El número de picos de actividad sincrónica de esta red neuronal a través del tiempo es estable (Fig. 27F; en picos de sincronía: T0 = 41.3 ± 4.7 vs. T30 = 36.1 ± 6.0) y también es menor comparada con la red de los cultivos WT (ver Fig. 21F y Fig. 24F).

Posteriormente se analizaron los vectores de actividad del circuito hipocampal de los ratones 3xTgAD a través del tiempo. En las gráficas de

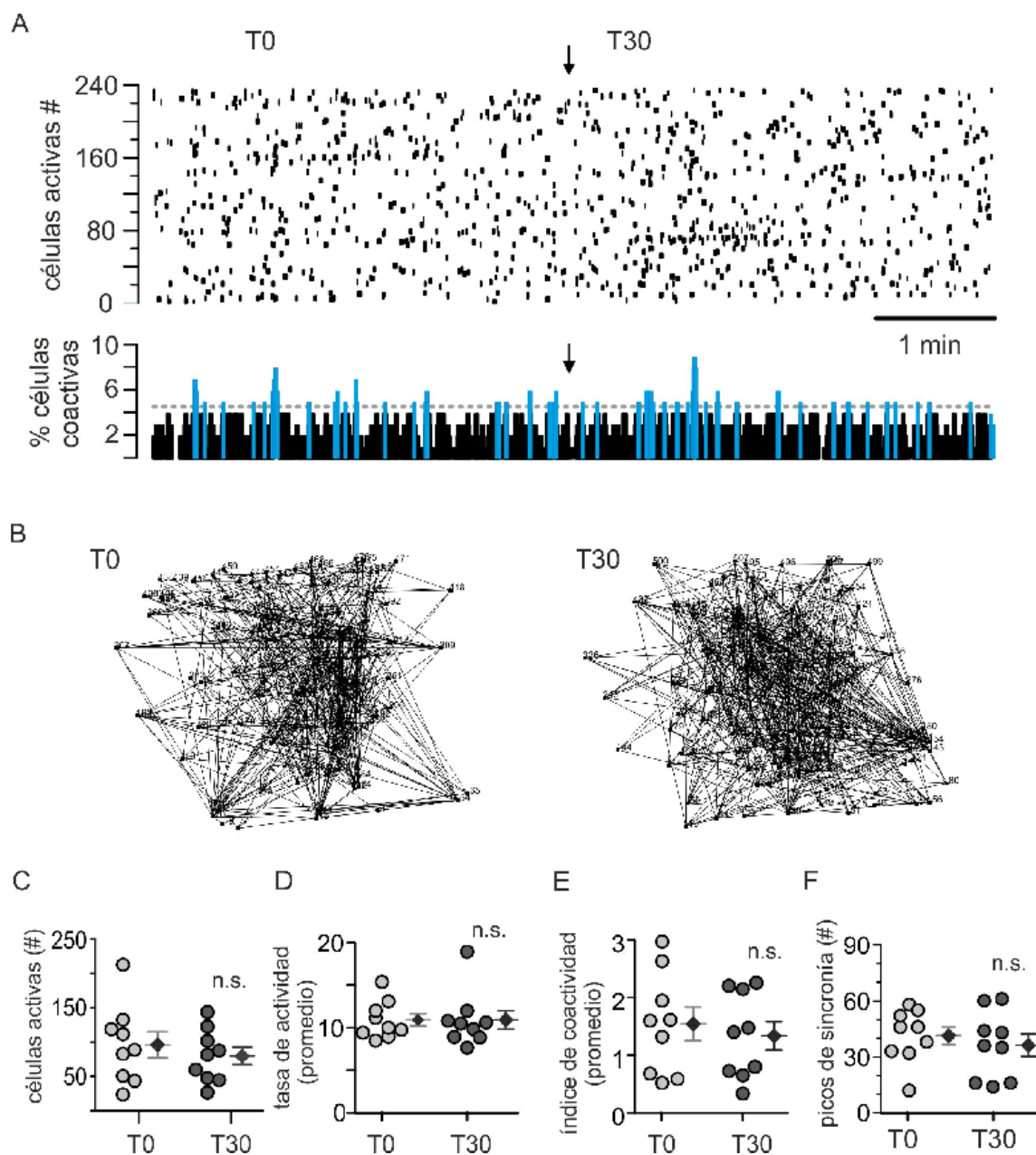


Figura 27 – Actividad espontánea de la red neuronal de cultivos organotípicos de ratones 3xTgAD. **A)** *Raster plot* y porcentaje de las células coactivas de la actividad espontánea de un cultivo organotípico de hipocampo proveniente de ratones 3xTgAD al inicio del experimento (T0), 30 minutos después (T30). Cada fila del *raster* representa una célula activa. En azul se muestran los picos de actividad sincrónica poblacional tomando como umbral 3 veces la desviación estándar de la actividad coactiva total. **B)** Mapas de correlación de la actividad espontánea de las neuronas a T0 y T30. Se muestran también las cuantificaciones del número de células activas (**C**), la tasa promedio de actividad por neurona (**D**), el índice de actividad coactiva total (**E**) y el número de picos de sincronía (**F**) en cada condición experimental; los rombos son el promedio de 9 experimentos $\pm$ E.E.; n.s. denota que no existe diferencia significativa con respecto a T0; * denota diferencias significativas con respecto a T0 y # con respecto a T30.

pseudocolor se puede observar una alta similaridad entre los diferentes vectores resultantes de la actividad espontánea del cultivo en el T0 y en el T30 (Fig. 29A). Además, es importante resaltar que este patrón es similar al que adopta una red control después de la aplicación aguda de la A β o (ver Fig. 26). El análisis de los estados funcionales que componen la actividad espontánea de la red neuronal de ratones 3xTg AD muestra un número reducido de estados en la dinámica de la red tanto a T0 como a T30 (Fig. 29B-F: en número de estados: T0 = 2.4 ± 0.2 vs. T30 = 2.3 ± 0.1). Esta dinámica de la red se observó también en rebanadas de ratones WT después de la aplicación aguda de la A β o (ver Fig. 26B-F). Es importante mencionar que la dinámica de la red neuronal del hipocampo de los ratones 3xTgAD y la dinámica inducida por la A β o en cultivos normales (WT) revela un comportamiento aberrante de la red neuronal muy similar. Note además, que al igual que la aplicación aguda de la A β sobre cultivos WT, la dinámica de la red de cultivos 3xTgAD muestra un estado preferente que engloba la mayoría de los picos de actividad sincrónica en T0 y en T30 (Fig. 29C). Este estado preferente tiene una alta recurrencia y la probabilidad de transición hacia otro estado funcional es muy baja también. Los mapas espaciales de las neuronas que participan en los pocos estados que presenta en hipocampo de ratones 3xTgAD muestran una red distribuida en la que el estado preferente posee la mayoría de las neuronas activas (Fig. 29D), lo que se confirma con el análisis jerárquico de grupos (Fig. 29G). Los datos obtenidos con el análisis de la dinámica de la red neuronal de los cultivos de ratones 3xTgAD muestra un comportamiento patológico similar al inducido por la aplicación aguda A β o en cultivos normales. Por lo tanto, la probabilidad de que la A β sea la responsable de las alteraciones funcionales en este ratón transgénico, y posiblemente, en los pacientes con EA en etapa temprana, es alta.

Finalmente, se evaluó el papel de la cinasa Fyn en el efecto de la A β o sobre la dinámica de la red neuronal del hipocampo. Para ello, se realizaron cultivos organotípicos de hipocampo provenientes de ratones Fyn KO. En la Fig. 30A se puede observar la actividad espontánea que presentan estos cultivos. De manera interesante, el número de neuronas activas en condiciones control de estos cultivos

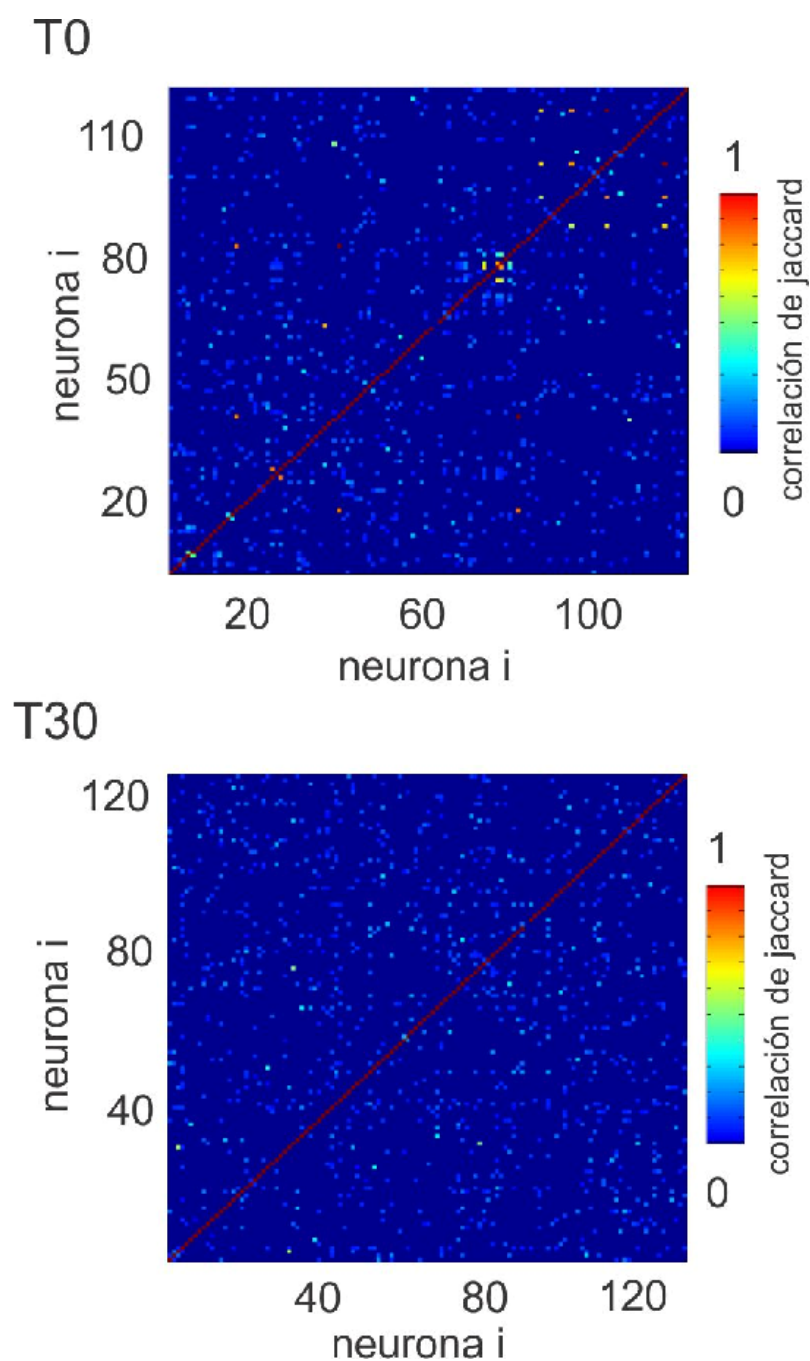


Figura 28 – Mapa de correlación cruzada de todos los posibles pares de neuronas activas en el cultivo organotípico de hipocampo de ratones 3xTgAD al inicio del experimento (T0) y 30 minutos después (T30).

es menor comparado con los cultivos WT (en células activas: Fyn KO control = 133.9 ± 31.4). La aplicación de la A β o sobre los cultivos procedentes de ratones Fyn KO disminuye significativamente la cantidad de neuronas activas del cultivo

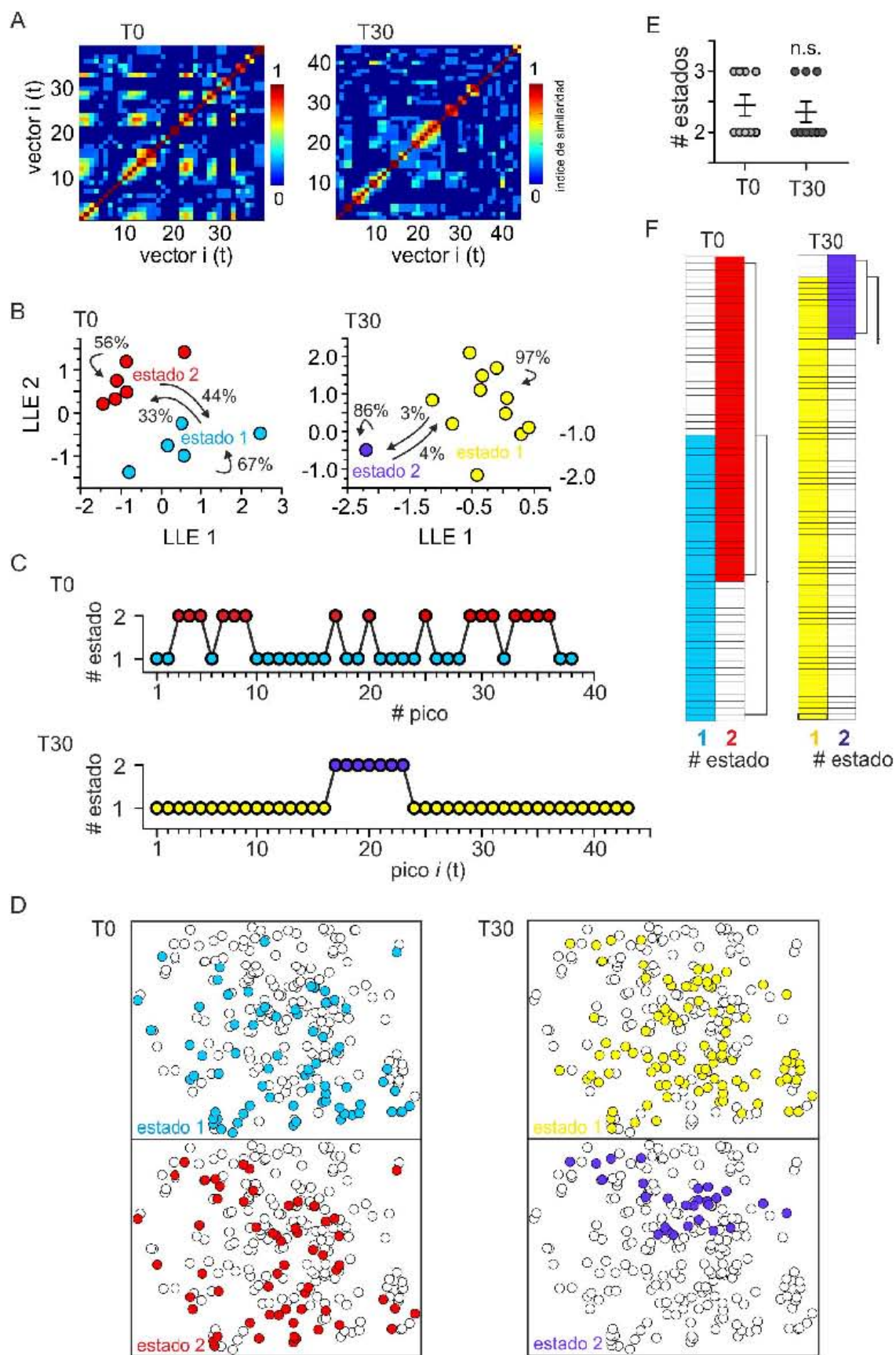


Figura 29 –Dinámica de la red neuronal en cultivos organotípicos de hipocampo provenientes de ratones 3xTgAD. A) Matriz de similaridad de los vectores de la actividad del cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control al inicio del experimento (T0) y 30 minutos sin ningún cambio experimental (T30). **B)** Proyección del LLE que muestra la dinámica de la red neuronal en las condiciones experimentales de A. Note que la dinámica de la red neuronal tiene un número pequeño de estados funcionales. **C)** Comportamiento de la red neuronal a T0, T30 y después de la aplicación de la A β o. La disposición horizontal de los puntos indica la recurrencia en un estado mientras las líneas indican la transición hacia otro estado. **D)** Mapas de la distribución espacial de las neuronas que participan en cada estado funcional. **E)** Cuantificación de los estados funcionales en las diferentes condiciones experimentales. Los rombos representan el promedio de 9 experimentos $\pm$ E.E.; **n.s.** denota que no existe diferencia significativa con respecto a T0. **F)** Análisis de agrupamiento jerárquico de las células que participan en los estados de la red.

(Fig. 30D; en neuronas activas: control = 133.9 ± 31.4 vs. A β o = 69.9 ± 17.8). La tasa de actividad también se reduce con la aplicación de la A β o (Fig. 30E; en espigas por célula: control = 10.6 ± 0.9 vs. A β o = 7.3 ± 0.6). Sin embargo, el número de picos de sincronía no presenta alteraciones significativas (Fig. 30G; en picos de sincronía: control = 47.2 ± 11.3 vs. A β o = 28.8 ± 6.4). La correlación entre los posibles pares de neuronas de los cultivos Fyn KO en condiciones control es menor comparado con los cultivos WT (Fig. 30B; ver Fig.21B y Fig. 24B), y disminuye aún más con la aplicación de la A β o (Fig. 30B). Es importante mencionar que en el mapa de correlación espacial se pueden notar agregados de neuronas y en el mapa en pseudocolor se denotan estructuras cuadradas en condiciones control (Fig. 30B-C). Ambas características son muy similares a las generadas por la aplicación aguda de la A β o en cultivos WT (ver Fig. 24B-C y Fig. 25). Note, además, que la aplicación posterior de la A β o en los cultivos provenientes de ratones Fyn KO disminuye el número de pares de neuronas con actividad correlacionada (Fig. 30B), y aumenta el número de estructuras cuadradas en los mapas de pseudocolor (Fig. 30C). Estos datos sugieren que la ausencia de Fyn provoca un funcionamiento de la red hipocampal con características patológicas similares a las que produce la A β o. Como dato interesante, se ha reportado que los

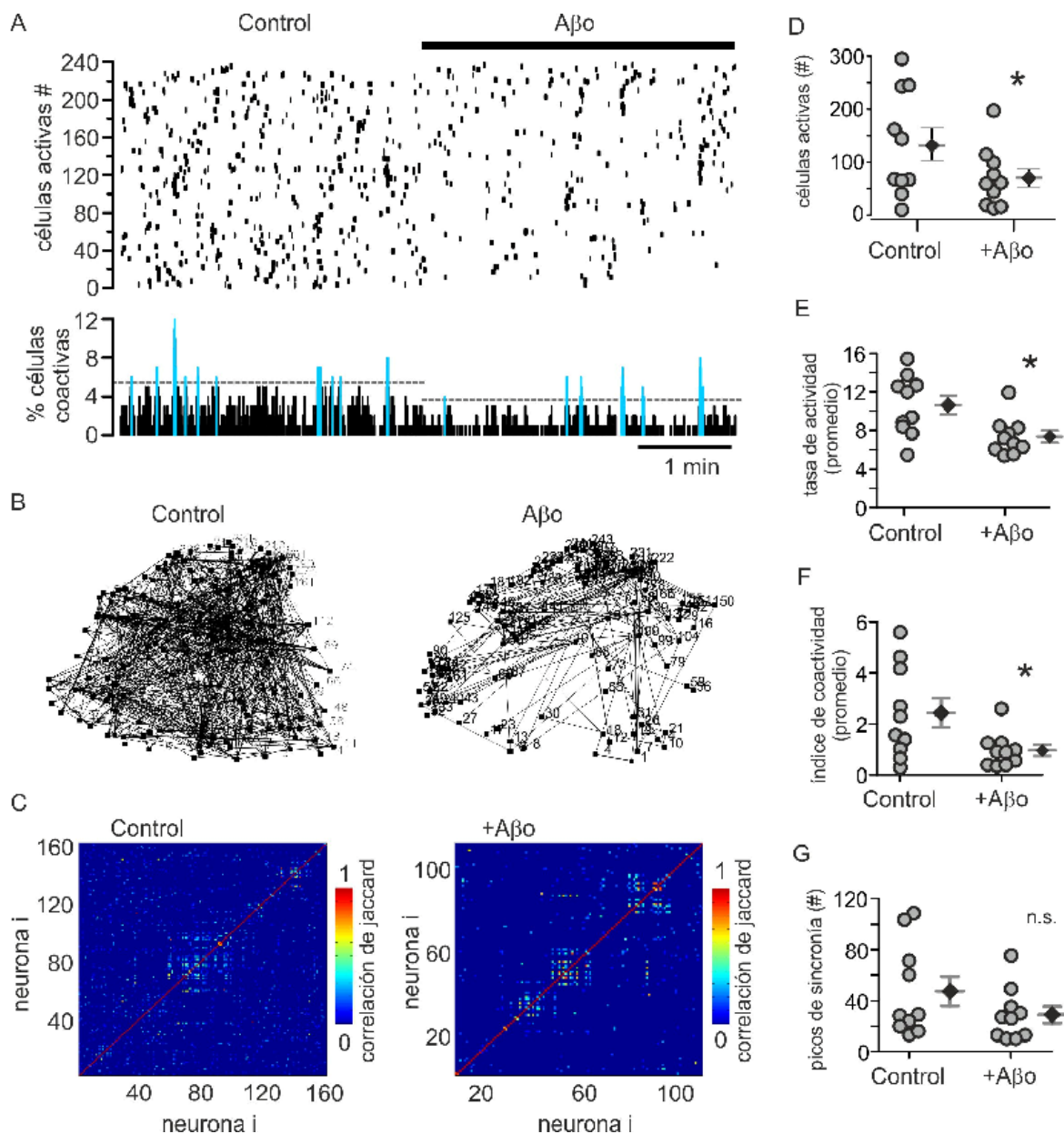


Figura 30 – Efecto de la Aβ sobre la actividad espontánea del cultivo organotípico de hipocampo de ratones Fyn KO. **A)** *Raster plot* y porcentaje de células coactivas de la actividad espontánea de un cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control y 30 minutos después del tratamiento con 10 nM de Aβ. En azul se muestran los picos significativos de actividad sincrónica poblacional **B)** Mapas de correlación espacial de la actividad espontánea de las neuronas en condiciones control y después del tratamiento con la Aβ. **C)** Mapa de correlación cruzada de todos los posibles pares de neuronas. Se muestran también las cuantificaciones del número de células activas (**D**), la tasa promedio de actividad por neurona (**E**), el índice de actividad coactiva total (**F**) y el número de picos de sincronía (**G**) en cada condición experimental; los rombos representan el promedio de 10 experimentos ± E.E.; * denota diferencias significativas con respecto al control. **n.s.** denota que no existe diferencia significativa con respecto al control.

ratones Fyn KO presentan alteraciones en la LTP y la memoria (Lowell y Soriano 1996; Lambert et al. 1998) y quizá estas alteraciones funcionales son el resultado del comportamiento aberrante de la red descrito aquí.

Al analizar la dinámica de la red hipocampal de ratones Fyn KO, se encontró que la actividad espontánea de estos cultivos organotípicos de hipocampo genera distintos estados funcionales cuya dinámica se mantiene constante incluso después de la aplicación de la A β o 10 nM (en estados funcionales: control = 3.5 ± 0.3 vs. A β o = 3.6 ± 0.2 ; Fig. 31A-F). Note que no existe un estado preferente de la red y que la alternancia entre estados es alta tanto en condiciones control, como después de la aplicación de la A β o. En las gráficas que representan las transiciones entre estados de la red neuronal se puede observar que en condiciones control no existe un estado preferente de la red y que la alternancia entre estados es alta (Fig. 31C). La aplicación de la A β o no cambia la dinámica de la red e, incluso, se puede observar que la red se comporta de forma similar a los cultivos provenientes de ratones WT en condiciones control (Fig. 31C; ver Fig.23C y Fig. 26C). En la figura 31D, se muestran la distribución espacial de las neuronas que participan en cada uno de los estados funcionales de la red de un ratón Fyn KO y se puede observar la misma presenta agregados de neuronas coactivas en condiciones control y en presencia de A β o. Estos datos sugieren que la A β o tiene como blanco a diferentes tipos neuronales y que existe una población de neuronas hipocampales que resisten al efecto inhibitorio de la A β o debido en ausencia de Fyn. Al parecer esta población de neuronas resistentes podría ser suficiente para mantener la dinámica de la red neuronal del hipocampo. No obstante, será necesario realizar los experimentos que permitan comprobar esta hipótesis. Estos resultados se relacionan además, con datos electrofisiológicos donde se encontró que la inhibición o la ausencia de esta cinasa previenen el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo y que se presentarán en el siguiente apartado.

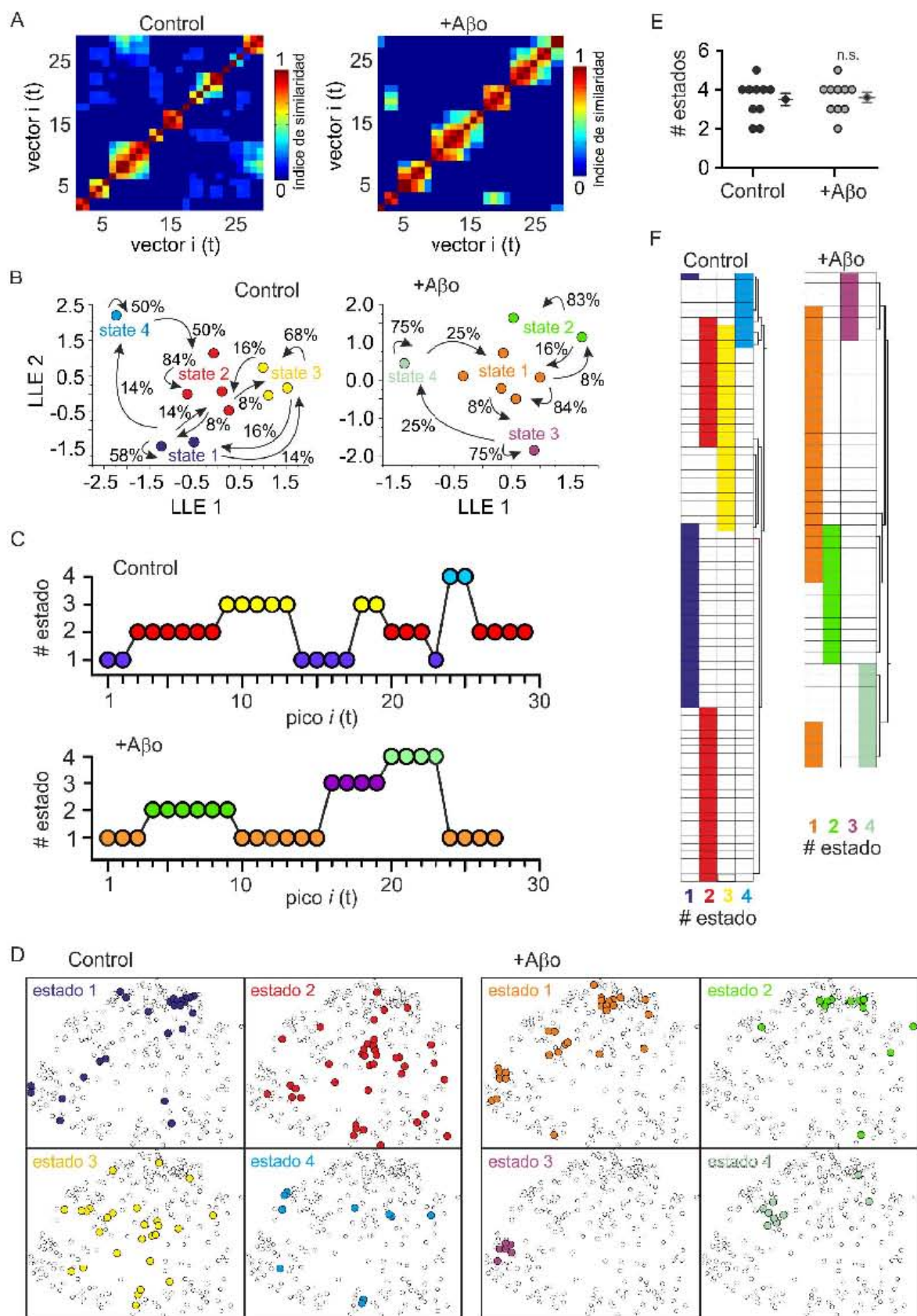


Figura 31 – Dinámica de la red neuronal en cultivos organotípicos de ratones Fyn KO. A) Matriz de similaridad de los vectores de la actividad del cultivo organotípico de hipocampo en condiciones control y 30 min posteriores a la aplicación de la A β o (10 nM). **B)** Proyección del LLE que muestra la dinámica de la red neuronal en las condiciones experimentales de A. Note que la dinámica de la red neuronal no cambia con la aplicación de la A β o. **C)** Comportamiento de la red neuronal en condiciones control y después de la aplicación de la A β o. La disposición horizontal de los puntos indica la recurrencia en un estado mientras las líneas indican la transición hacia otro estado. **D)** Mapas de la distribución espacial de las neuronas que participan en cada estado funcional. **E)** Cuantificación del número de estados funcionales en las diferentes condiciones experimentales. Los rombos representan el promedio de 10 experimentos $\pm$ E.E.; **n.s.** denota que no existe diferencia significativa con respecto a la condición control. **F)** Análisis de agrupamiento jerárquico de las células que participan en los estados de la red.

6.3. Vía de señalización intracelular involucrada en los efectos de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.

Una vez caracterizado el efecto de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo, se procedió a indagar los posibles mediadores moleculares implicados en los efectos de la A β o. Por lo tanto, el objetivo de esta sección, fue el de determinar los elementos de una cascada de señalización que participan en los efectos inhibitorios de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.

La inhibición de la actividad espontánea producida por la A β o, correlaciona con la activación de la GSK3 β .

Para explorar el mecanismo molecular relacionado con los efectos inducidos por la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo, se probó si la cinasa GSK3 está involucrada en dicho efecto. Para ello, se midió la activación de dicha cinasa a través de la fosforilación de las serinas (21 y 9), así como de las tirosinas (279 y 216) tanto de la isoforma GSK3 α como la GSK3 β , respectivamente (Fig. 19C-D). Los experimentos para medir la fosforilación de la GSK3 se llevaron a cabo en rebanadas de hipocampo provenientes de ratones WT y se desarrollaron independientemente de los registros de actividad de campo; pero en condiciones equivalentes. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de la A β o promueve una disminución significativa en la fosforilación de serinas para la GSK3 β

(Control = 1.68 ± 0.4 u.a. vs. $A\beta_o = 0.86 \pm 0.15$ u.a.), pero no para la GSK3 α (Control = 1.7 ± 0.97 u.a. vs. $A\beta_o = 0.86 \pm 0.15$ u.a.; Fig. 32C-D), lo que indica que la cinasa se activa cuando se aplica la $A\beta_o$. Esta activación se ve reflejada también en la fosforilación de las tirosinas en ambas isoformas (Fig. 32 C-D), que aumentaron de manera significativa con respecto al control después de la aplicación de la $A\beta_o$ (**GSK3 α** : Control = 0.69 ± 0.07 u.a. vs. $A\beta_o = 0.89 \pm 0.09$ u.a.; y **GSK3 β** : Control = 0.85 ± 0.07 u.a. vs. $A\beta_o = 10.5 \pm 0.09$ u.a.). Estos resultados sugieren que la GSK3 β , en mayor medida que la GSK3 α , participa en la vía de señalización activada por la $A\beta_o$. Se presenta también el efecto de la $A\beta_o$ sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo (Fig. 32A-B). Como se demostró previamente, la $A\beta_o$ inhibe de forma homogénea a todas las bandas de frecuencia que componen el registro electrofisiológico de la actividad espontánea (Fig. 32 A). Esta inhibición es de un 56 % cuando se analiza la suma de la potencia integrada de la actividad espontánea (Fig. 32B). Interesantemente, en este grupo de experimentos y a diferencia de los experimentos iniciales de esta tesis, la *fp* presenta una disminución significativa que se acompaña con un desplazamiento hacia la izquierda en el espectro de potencia (en Hz: Control = 12.56 ± 2 vs. $A\beta_o = 9.8 \pm 1.5$).

Los receptores de membrana integrinas median el efecto inhibitorio de la $A\beta_o$.

Para determinar si el efecto de la $A\beta_o$ sobre la actividad espontánea del hipocampo está mediado por los receptores de membrana integrinas, se utilizó la echistatina α_1 (e_{α_1}), un antagonista general de las integrinas (Gan et al. 1988; Garsky et al. 1989; Marcinkiewicz et al. 1997). El análisis de los registros y los espectros de potencia muestran que el tratamiento con la echistatina previene los efectos de la $A\beta_o$ sobre la actividad espontánea del hipocampo (en nV^2 : Control = 1.08 ± 0.19 vs. $e_{\alpha_1}+A\beta_o = 1.28 \pm 0.32$; Fig. 33A). La echistatina por sí misma no afecta la actividad hipocampal ($e_{\alpha_1} = 1.21 \pm 0.19$ nV^2 ; Figura 33B). La *fp* se mantiene sin alteraciones en las diferentes condiciones experimentales (en Hz: Control = 11.87 ± 0.95 ; $e_{\alpha_1} = 11.54 \pm 1.2$; $e_{\alpha_1}+A\beta_o = 12.45 \pm 1.3$). Posteriormente, se midieron los niveles de fosforilación de la GSK3 para determinar si las integrinas

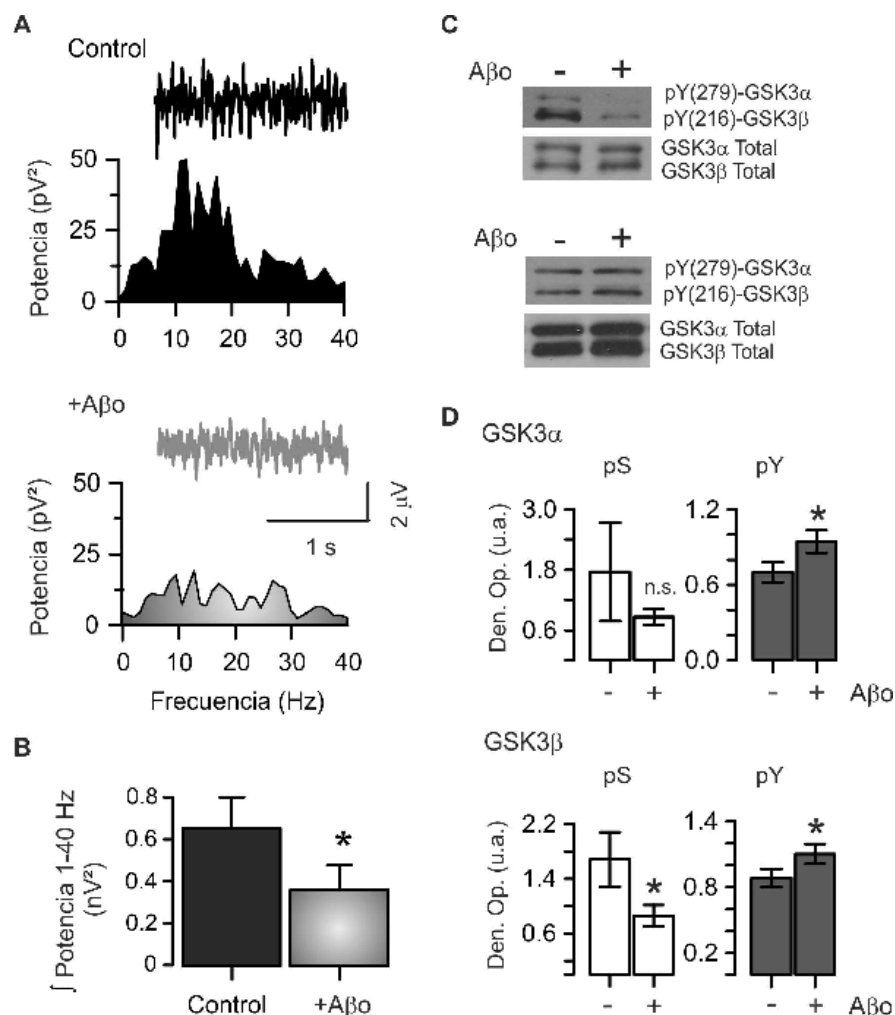


Figura 32 – La inhibición de la actividad espontánea del hipocampo inducida por la Aβ coincide con la activación de las GSK3α/β. **A)** Registro de campo y espectros de potencia de la actividad espontánea en la región CA1 del hipocampo de ratones WT en condiciones control (Negro) y 30 min posteriores a la aplicación de Aβo 10 nM **B)** Cuantificación de la potencia integrada de la actividad espontánea del hipocampo en condiciones control y en presencia de Aβo. **C)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas de la GSK3α/β en condiciones control y 30 minutos posteriores a la aplicación de Aβo 10 nM. **D)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de tirosinas de la GSK3 en condiciones control y 30 minutos posteriores a la aplicación de Aβo 10 nM. Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos ± E.E. Note que aplicación de la Aβo, además de inhibir la actividad espontánea, también promueve un cambio en los patrones de fosforilación de serinas y treoninas de la GSK3 α/β.

participan en la activación de ésta cinasa inducida por la Aβo. Se encontró que la echistatina es capaz de prevenir la activación de la GSK3α/β mediada por la Aβo, ya que los niveles de fosforilación se mantienen inalterados con respecto a la condición control; tanto para las serinas (en u.a.: **GSK3α**: control = 0.71 ± 0.14, eα1

= 0.70 ± 0.17 , $e_{\alpha 1} + A\beta o = 0.56 \pm 0.12$; **GSK3 β** : control = 0.94 ± 0.05 , $e_{\alpha 1} = 0.93 \pm 0.02$, $e_{\alpha 1} + A\beta o = 0.85 \pm 0.06$; Fig.33C-D), como para las tirosinas (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.76 ± 0.16 , $e_{\alpha 1} = 0.65 \pm 0.10$, $e_{\alpha 1} + A\beta o = 0.70 \pm 0.06$; **GSK3 β** : control = 0.67 ± 0.15 , $e_{\alpha 1} = 0.62 \pm 0.13$, $e_{\alpha 1} + A\beta o = 0.67 \pm 0.07$; Fig. 33C-D).

La cinasa de tirosinas FAK participa en el efecto inhibitorio de la A β .

En el apartado anterior, se demostró que las integrinas median el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo. El paso siguiente en la investigación fue determinar el mecanismo molecular a través del cual la interacción A β o-integrinas altera este proceso. Como punto de partida, se analizó si la cinasa FAK estaba involucrada. FAK, es una cinasa de tirosinas que participa de forma fisiológica en la cascada de señalización de las integrinas (Parsons 2003a; Mitra et al. 2005). Para analizar su participación en la inhibición de la actividad hipocampal producida por la A β o se empleó el inhibidor PF573228 (PF), específico de esta cinasa (Slack-Davis et al. 2007). Los registros electrofisiológicos y sus respectivos espectros de potencia muestran que la aplicación del inhibidor de FAK (Fig. 34A-B) no afecta la actividad espontánea del hipocampo (en nV²: control = 1.0 ± 0.16 vs. PF = 0.87 ± 0.16), y tampoco altera la fp (en Hz: control = 10.8 ± 0.7 vs. PF = 10.5 ± 0.6). Sin embargo, la aplicación del PF previene por completo el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo (en nV²: control = 1.0 ± 0.16 vs. PF+A β o = 1.06 ± 0.26 ; Fig. 22A-B) y evita el desplazamiento de la fp también (en Hz: control = 10.8 ± 0.7 vs. PF+A β o = 10.3 ± 0.9). Más aún, el tratamiento con el PF573228 previene el efecto de la A β o sobre los patrones de fosforilación de la GSK3 (Fig. 34C-D). Es decir, el PF previene la disminución en la fosforilación de las serinas (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.70 ± 0.09 , PF = 0.67 ± 0.10 , PF+A β o = 0.75 ± 0.11 ; **GSK3 β** : control = 0.87 ± 0.18 , PF = 0.79 ± 0.13 , PF+A β o = 0.81 ± 0.13) y también el aumento en la fosforilación de las tirosinas (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.66 ± 0.08 , PF = 0.66 ± 0.11 , PF+A β o = 0.76 ± 0.19 ; **GSK3 β** : control = 0.64 ± 0.15 , PF = 0.54 ± 0.16 , PF+A β o = 0.67 ± 0.14), lo cual sugiere que la inhibición de esta cinasa previene la activación de la GSK3 y que FAK se encuentra cascada arriba de la

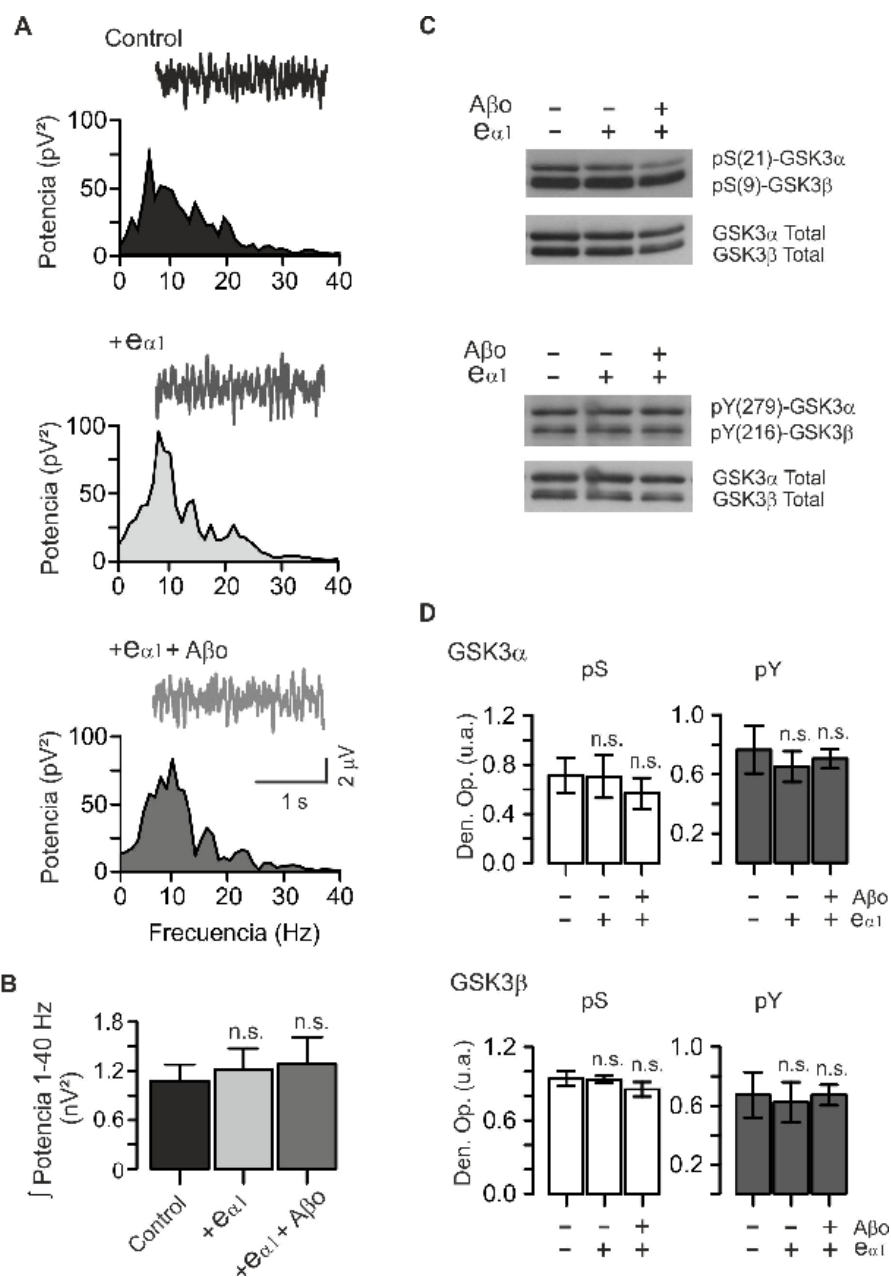


Figura 33 – Las integrinas median el efecto inhibitor de la $A\beta$ sobre la actividad espontánea del hipocampo. **A)** Registros electrofisiológicos de la actividad espontánea del hipocampo en condiciones control (negro) y después de la adición de la $A\beta$ (10 nM; gris claro) en presencia del inhibidor de integrinas echistatina $\alpha 1$ ($e_{\alpha 1}$; 30 nM); las gráficas debajo de los registros son los espectros de potencia respectivos de cada condición experimental. **B)** Cuantificación de la potencia de la actividad espontánea (negro), en presencia de 30 nM de echistatina por 1 hr (gris claro) y al agregar $A\beta$ 10 nM en presencia de la echistatina (gris oscuro). **C)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas de la GSK3 α/β en condiciones control, con $e_{\alpha 1}$ y 30 minutos posteriores a la aplicación de $A\beta$ 10 nM. **D)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de tirosinas de la GSK3. Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos $\pm$ E.E. Note que la aplicación de la echistatina evita la inhibición dependiente de la $A\beta$ de la actividad espontánea y también evita el cambio en los patrones de fosforilación en la GSK3.

GSK3 en la vía transduccional desencadenada por la activación de las integrinas en presencia de A β .

La cinasa Fyn es necesaria para el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad hipocampal.

La cinasa FAK es capaz de formar un complejo enzimático con otra cinasa de tirosinas que pertenece a la familia src (Schaller et al. 1994; Xing et al. 1994). Esta cinasa se llama Fyn y se sabe que la interacción FAK-Fyn potencia la señalización de las integrinas (Schaller et al. 1994; Schaller y Parsons 1994; Schlaepfer y Hunter 1996). Además, se ha reportado que la cinasa Fyn puede activar a la GSK3 β a través de la fosforilación en las tirosinas (Lesort et al. 1999) que, como se ha mostrado en esta tesis, se incrementa con el tratamiento con la A β o. Por lo tanto, se determinó si la cinasa de tirosinas Fyn también está involucrada en los efectos de la A β o sobre la actividad hipocampal. Como estrategia experimental, se realizaron registros de campo de la actividad espontánea de rebanadas de hipocampo provenientes de ratones carentes de esta cinasa (Fyn KO). Interesantemente, las rebanadas obtenidas de los ratones Fyn KO son resistentes al efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo (en nV²: control = 0.68 ± 0.10 vs. A β o = 1.00 ± 0.25 ; Fig. 35A). La fp tampoco presenta alteraciones (en Hz: control = 8.9 ± 0.8 VS. A β o = 8.0 ± 0.7). La cuantificación de la potencia integrada muestra que la actividad espontánea tiende a aumentar incluso con la aplicación de la A β o (Fig. 35B), no obstante, este aumento no es estadísticamente significativo. De manera similar a las rebanadas provenientes de ratones WT, se analizaron los patrones de fosforilación en la cinasa GSK3 α/β en rebanadas de hipocampo provenientes de ratones Fyn KO y se observó que la aplicación de la A β o 10 nM por 30 minutos, no genera un cambio en dichos patrones (Fig. 35C-D), tanto en los residuos de serinas (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.30 ± 0.04 vs. A β o = 0.25 ± 0.05 ; **GSK3 β** : control = 2.96 ± 0.18 vs. A β o = 3.34 ± 0.17), como en los de tirosinas (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.42 ± 0.02 vs. A β o = 0.43 ± 0.01 a; **GSK3 β** : control = 1.38 ± 0.25 vs. A β o = 1.50 ± 0.28). Esto datos sugieren que la cinasa Fyn participa en la vía de

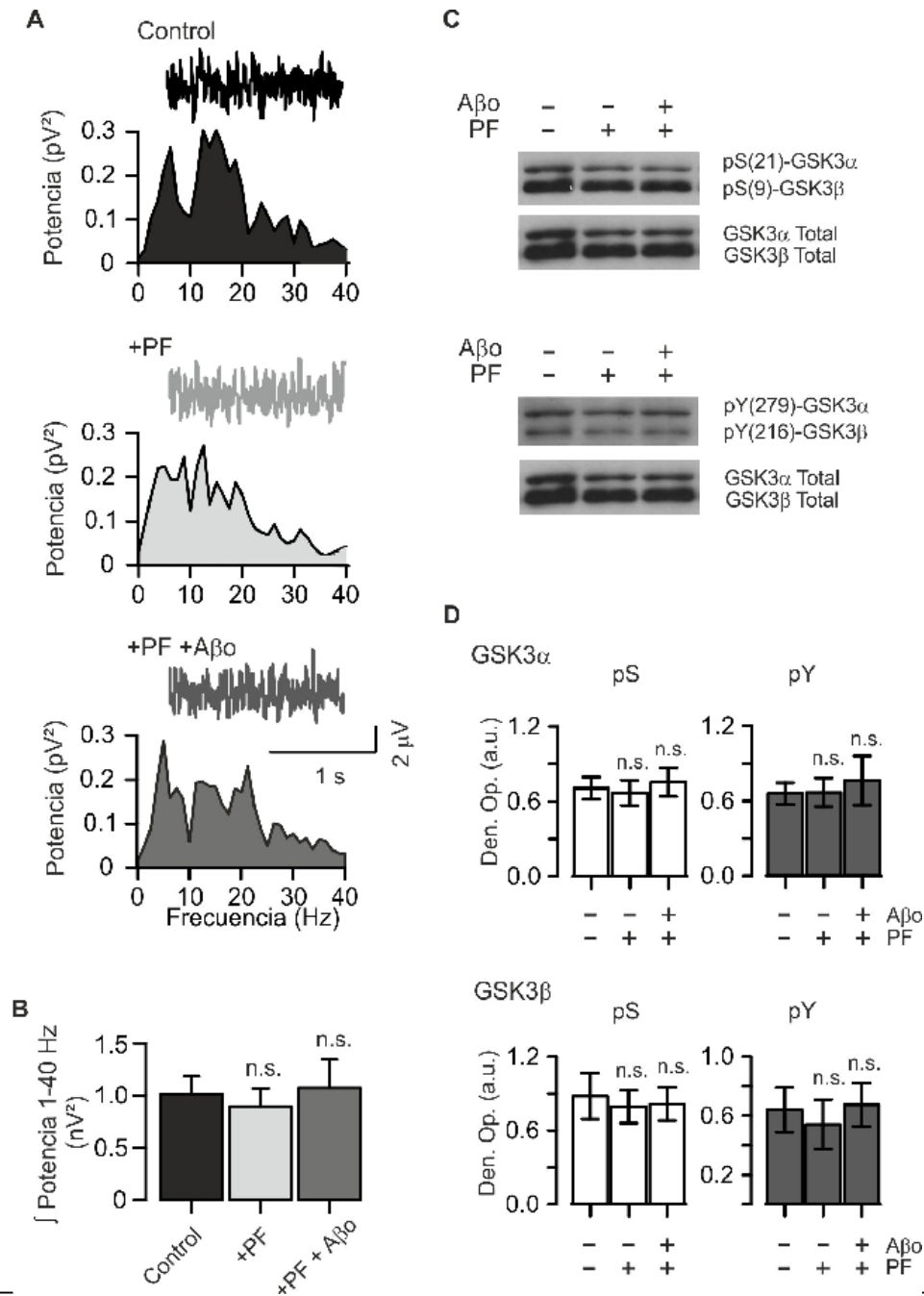


Figura 34 – Las cinasa de tirosinas FAK es necesaria para el efecto inhibitor de la Aβo. A)

Registros electrofisiológicos de la actividad espontánea del hipocampo en condiciones control (negro), después de la adición del inhibidor de FAK PF573228 (PF; gris claro) y con la aplicación de la Aβo (10 nM; gris claro) en presencia del PF; las gráficas debajo de los registros son los espectros de potencia respectivos de cada condición experimental. **B)** Cuantificación de la potencia integrada de las distintas condiciones experimentales en A. **C)** Western blots de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas de la GSK3α/β en condiciones control, con PF y 30 minutos posteriores a la aplicación de Aβo 10 nM. **D)** Western blot de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de tirosinas de la GSK3. Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos ± E.E. Note que la inhibición de la cinasa FAK, evita los efectos de la Aβo sobre la actividad espontánea y sobre los patrones de fosforilación de la GSK3.

señalización intracelular activada por la A β o y que lleva a la inhibición de la actividad de la red neuronal del hipocampo. Además, los resultados sugieren que la cinasa Fyn se encuentra cascada arriba de la cinasa GSK3.

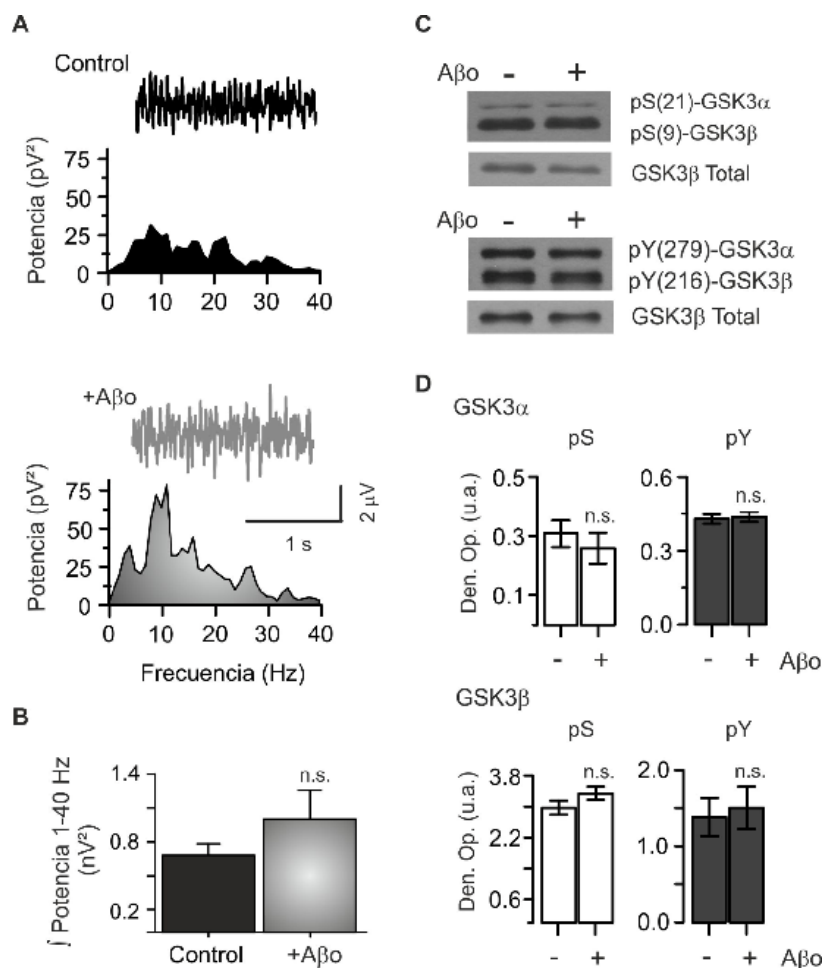


Figura 35 – Las rebanadas de hipocampo provenientes de ratones Fyn KO son resistentes a la A β o. **A)** Registro de campo de la actividad espontánea en la región CA1 del hipocampo de ratones Fyn KO en condiciones control (Negro) y 30 min posteriores a la aplicación de A β o (10 nM; gris). **B)** Cuantificación de la actividad espontánea del hipocampo en condiciones control y con A β o. **C)** Western blots de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas y tirosinas de la GSK3 α/β en condiciones control y 30 minutos posteriores a la aplicación de A β o 10 nM. Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos $\pm$ E.E. Note que la red neuronal del hipocampo proveniente de ratones Fyn KO es insensible a los efectos de la A β o.

Para corroborar la participación de la cinasa Fyn en los efectos de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo se utilizó el PP2, que es un inhibidor general de las cinasas de la familia src (Lee et al. 2004a; Lee et

al. 2004b; Lennmyr et al. 2004); a la cual pertenece Fyn (Resh 1998). La administración en el baño de perfusión del PP2 no afecta la actividad espontánea (nV^2 : control = 0.71 ± 0.22 vs. PP2 = 0.80 ± 0.25), sin embargo, previene el efecto inhibitorio de la A β o (nV^2 : control = 0.71 ± 0.22 vs. PP2+A β o = 0.98 ± 0.32 ; Fig. 36A-B). La aplicación del PP2 tampoco tiene efecto sobre la fp (en Hz: control = 9.2 ± 0.7 ; PP2 = 10.1 ± 0.9 ; PP2+A β o = 11.8 ± 0.8). Al analizar los patrones de fosforilación de la GSK3 se observó que el PP2 es capaz de evitar la fosforilación, dependiente de la A β o, de las tirosinas en ambas isoformas de la GSK3 (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.83 ± 0.12 , PP2 = 0.91 ± 0.12 , PP2+A β o = 0.82 ± 0.08 ; **GSK3 β** : control = 0.83 ± 0.12 , PP2 = 0.83 ± 0.12 , PP2+A β o = 0.74 ± 0.05 ; Fig. 36C-D) ratificando la participación de la cinasa Fyn en el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo. Interesantemente, la aplicación de la A β o en presencia del PP2, provocó la disminución en la fosforilación de las serinas (Fig. 36C-D) tanto de la GSK3 α (en u.a.: control = 0.96 ± 0.05 , PP2 = 1.08 ± 0.15 , PP2+A β o = 0.74 ± 0.10) como la GSK3 β (en u.a.: control = 1.27 ± 0.10 , PP2 = 1.14 ± 0.12 , PP2+A β o = 0.87 ± 0.06); de manera similar a lo observado con la aplicación solo de la A β o (ver Fig.32C-D). Estos resultados sugieren que el efecto inhibidor de la A β o, sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo, requiere de los cambios en fosforilación tanto de serinas como de las tirosinas que regulan la actividad de la GSK3.

La cinasa GSK3 β participa en el efecto de la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo

Como se mencionó al inicio de esta sección, una cinasa que ha cobrado mucha importancia en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen las alteraciones en procesos cognoscitivos en pacientes con EA es la GSK3 (Balaraman et al. 2006; Hooper et al. 2008; Kremer et al. 2011). Además, la GSK3 parece ser uno de los mediadores más importantes en la secuencia patológica que se ha descrito en esta tesis, debido a que su activación por regulación de la fosforilación en residuos de serinas y tirosinas es requerida para observar los efectos inhibitorios de la A β o. Por lo tanto, se decidió investigar su participación en

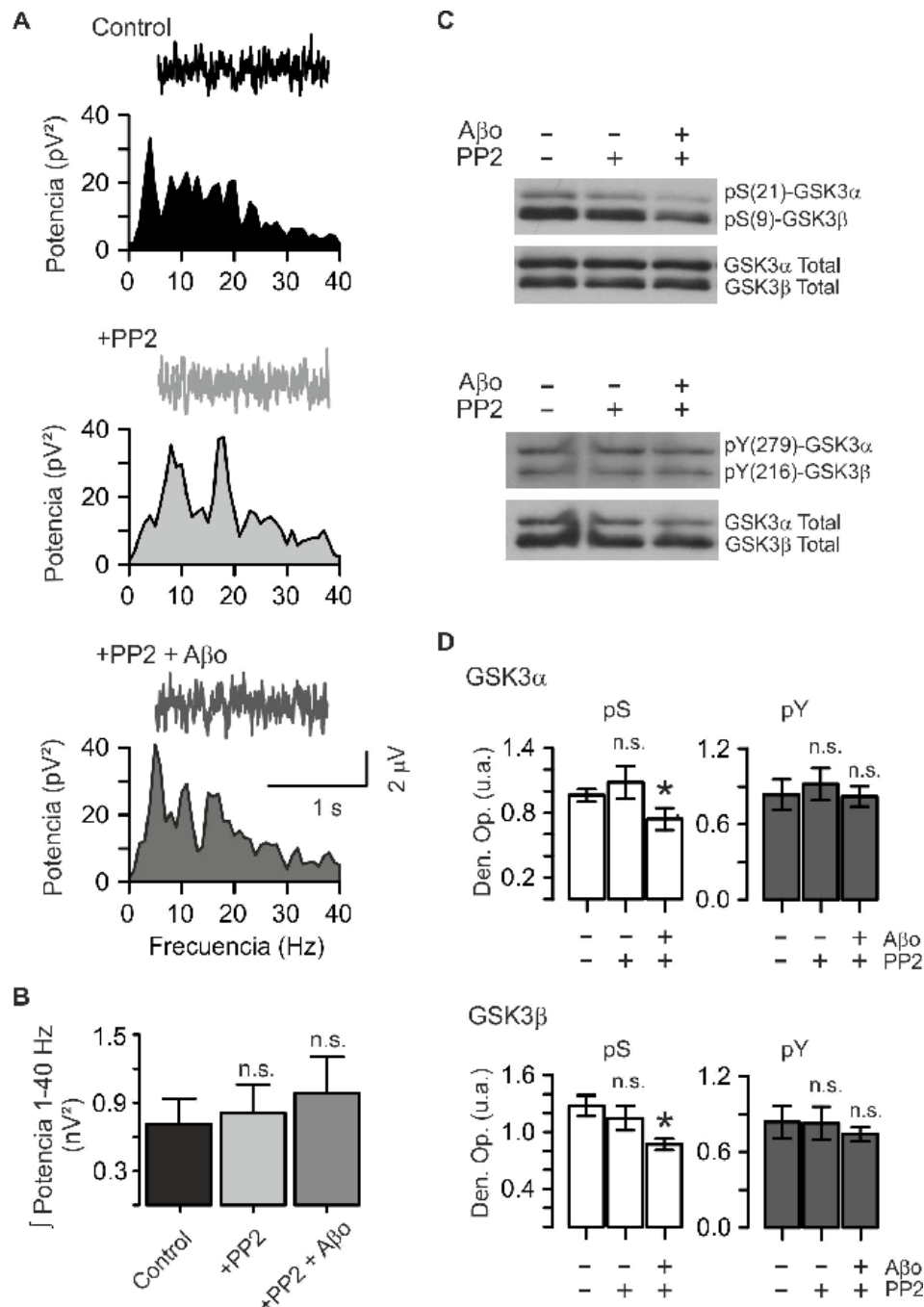
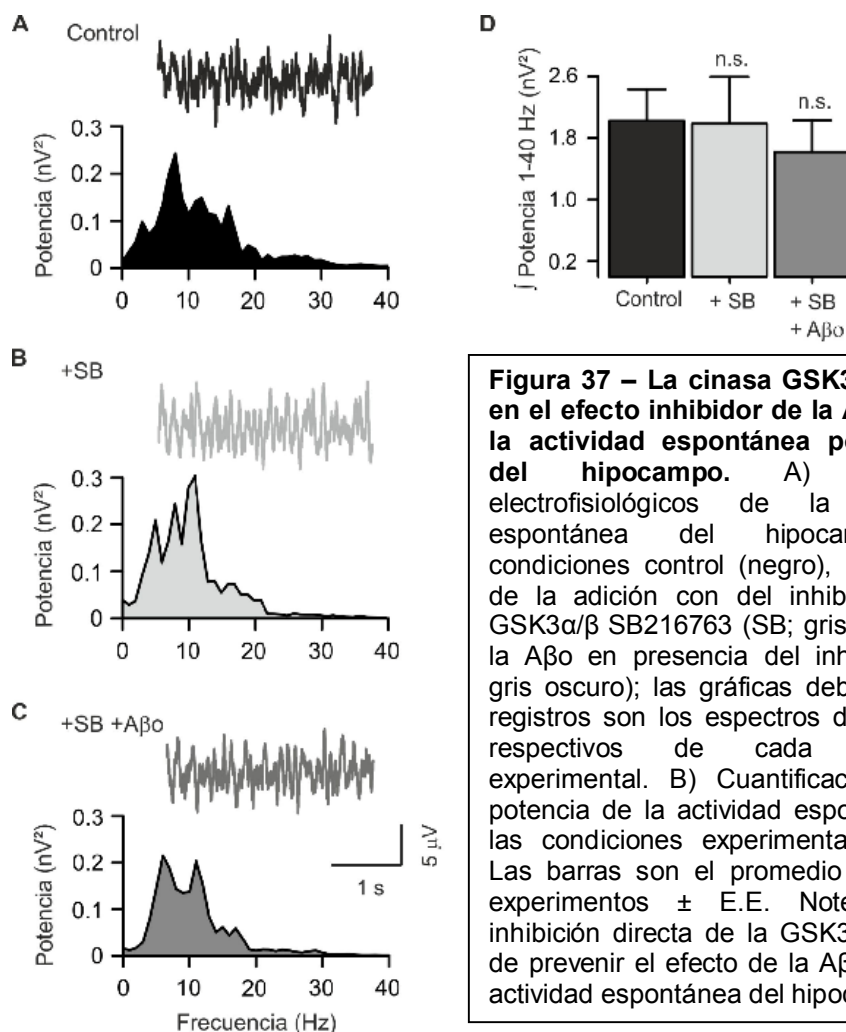


Figura 36 – La inhibición farmacológica de la cinasa Fyn previene el efecto inhibitorio de la Aβo. **A)** Registros electrofisiológicos de la actividad poblacional espontánea control (negro) y después de la adición de Aβ oligomerizada (gris oscuro) en presencia del inhibidor PP2 (5 μM; gris claro). Las gráficas debajo de los registros son los espectros de potencia correspondientes a cada trazo. **B)** Cuantificación de la potencia integrada del tratamiento con el inhibidor PP2 y el efecto de la Aβ. **C-D)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas y tirosinas de la GSK3α/β. Las barras representan el promedio de 5 a 7 experimentos ± E.E. Note que la aplicación del inhibidor PP2 previene el efecto de la Aβo.

la alteración de la actividad espontánea del hipocampo. Para ello se evaluó si el inhibidor SB216763 (SB), específico para ésta cinasa (Coghlan et al. 2000; Cross et al. 2001; Smith et al. 2001), era capaz de prevenir el efecto inhibitor de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación del SB sobre las rebanadas de hipocampo provenientes de ratones WT, previene el efecto de la A β o sobre la actividad espontánea registrada en la región CA1 del hipocampo. Esto se puede observar tanto en los registros electrofisiológicos como en los espectros de potencia correspondientes, así como en la cuantificación de la potencia integrada para todos los tratamientos (nV^2 : control = 2.0 ± 0.40 ; SB = 1.98 ± 0.61 ; SB+A β o = 1.62 ± 0.41 ; Fig. 37A, B). Ni la aplicación del SB ni de la A β o modifican la f_p (en Hz: control = 10.0 ± 0.8 ; SB = 9.0 ± 0.5 ; SB+A β o = 10.3 ± 0.7 Hz).

Para corroborar la participación de la cinasa GSK3 β en la inhibición de la actividad hipocampal se realizó un protocolo experimental para activar a dicha cinasa; que consiste en inhibir farmacológicamente a una proteína inhibidora de su actividad, la PI3K (Zhu et al. 2007; Wang et al. 2008b). Como se muestra en los registros electrofisiológicos y los respectivos espectros de potencia, la adición del inhibidor de la PI3K wortmanina (wrt; 100 nM) (Wymann et al. 1996), a rebanadas de hipocampo provenientes de ratones WT, inhibe la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo (nV^2 : control = 0.86 ± 0.19 vs. wrt = 0.43 ± 0.14 ; Fig. 38A-D). Esta inhibición es del 49 % y es muy similar al efecto observado por la adición solo de la A β o (56 %; Fig. 32). Más aún, la adición de la A β o (en presencia de la wortmanina) no resultó en un decremento mayor de la actividad espontánea (nV^2 : wrt = 0.43 ± 0.14 vs. wrt+A β o = 0.35 ± 0.08) de manera que la wortmanina es capaz de ocluir el efecto de la A β o (Fig. 38). La f_p no se altera con la aplicación de la wortmanina, ni con la A β o (en Hz: control = 8.7 ± 0.7 ; wrt = 9.6 ± 0.6 ; wrt+A β o = 8.1 ± 0.7). Al analizar los patrones de fosforilación de la GSK3 se observó que la aplicación de la wortmanina es capaz de disminuir la fosforilación en las serinas de la GSK3 β (Fig. 38C-D; en u.a: control = 0.82 ± 0.10 vs. wrt = 0.72 ± 0.10), pero no para la GSK3 α (Fig. 38C-D; en u.a.: control = 0.85 ± 0.32 vs. wrt = 0.79 ± 0.32). Más aun, la posterior aplicación de la A β o, en presencia de la wortmanina, provoca



una disminución mayor en la fosforilación de la serinas de la GSK3β en comparación tanto del control (Fig. 38C-D; en u.a.: control = 0.82 ± 0.10 vs. wrt+Aβo = 0.55 ± 0.08 .), como de la wrt (Fig. 38C-D; en u.a.: wrt = 0.72 ± 0.10 vs. wrt+Aβo = 0.55 ± 0.08). La aplicación posterior de la Aβo, no altera los patrones de fosforilación de serinas de la GSK3α en comparación tanto del control, como de la adición de la wrt (Fig. 38C-D; en u.a.: control = 0.85 ± 0.32 ; wrt = 0.79 ± 0.32 ; wrt+Aβo = 0.60 ± 0.15). La fosforilación de las tirosinas de la GSK3 no presenta cambios ni con la aplicación de la wrt, ni con la adición posterior de la Aβo (en u.a.: GSK3α: control = 0.36 ± 0.07 , wrt = 0.33 ± 0.05 , wrt+Aβo = 0.39 ± 0.10 ; GSK3β: control = 0.48 ± 0.10 , wrt = 0.50 ± 0.11 , wrt+Aβo = 0.47 ± 0.12 ; Fig. 38C-D).

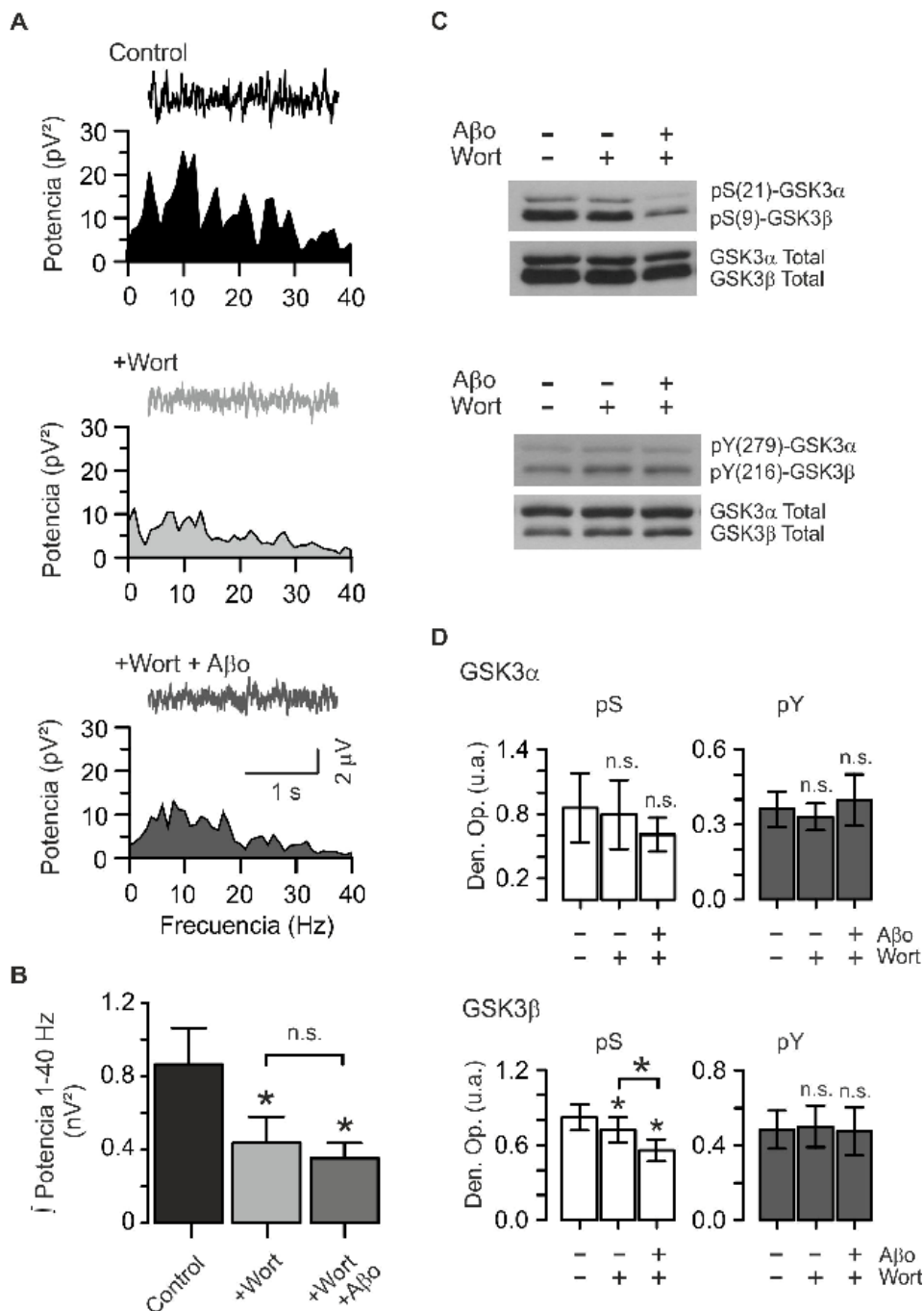


Figura 38 – La activación de la cinasa GSK3β mimetiza y ocluye el efecto inhibitorio de la Aβo. A) Registros electrofisiológicos y sus respectivos espectros de potencia de la actividad espontánea control (negro), y después de la adición con 100 nM del inhibidor para la PI3K, wortmanina (1hr; gris claro) y de la Aβo en presencia de la wortmanina (gris oscuro). B) Cuantificación de la potencia de las condiciones experimentales de la sección A. **C-D)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas y tirosinas de la GSK3α/β. Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos ± E.E.; * denota una diferencia significativa con respecto al valor control. Note que la aplicación de la wortmanina mimetiza y ocluye el efecto de la Aβo sobre la actividad espontánea del hipocampo y también sobre el patrón de fosforilación de tirosinas de la GSK3β.

El mismo protocolo experimental de activación farmacológica de la GSK3 se aplicó a rebanadas de hipocampo provenientes de ratones Fyn KO. Los resultados muestran que la wortmanina también induce una inhibición de la actividad espontánea hipocampal en este tejido (nV^2 : control = 1.08 ± 0.28 vs. wrt = 0.54 ± 0.20 ; Fig. 39A-D). Esta inhibición es del 50 % y muy similar al efecto observado para las rebanadas provenientes de ratones WT (49 %; Fig. 32A-B). La aplicación posterior de la A β o a las rebanadas Fyn KO tiende a inhibir aún más la actividad espontánea (wrt = 0.33 ± 0.12 nV^2), pero este efecto no es estadísticamente significativo (Fig. 39B). Un efecto similar se observó en la fp, donde existe una tendencia a disminuir tanto con la wortmanina como con la A β o (en Hz: control = 10.2 ± 0.8 ; wrt = 9.4 ± 0.8 ; wrt+A β o = 8.0 ± 0.9), sin embargo, estas tendencias tampoco son significativas para ninguna de las condiciones experimentales. Por otro lado, la aplicación de la wortmanina también es capaz de alterar los patrones de fosforilación de la GSK3 (Fig. 39C-D), de forma similar al efecto observado en las rebanadas WT (Fig. 26C-D). La wortmanina es capaz de inducir una disminución en la fosforilación de las serinas de ambas isoformas de la GSK3, que aumenta aún más con la posterior aplicación de la A β o (en u.a.: **GSK3 α** : control = 1.21 ± 0.12 , wrt = 1.04 ± 0.04 , wrt+A β o = 0.81 ± 0.08 ; **GSK3 β** : control = 0.85 ± 0.08 , wrt = 0.67 ± 0.07 , wrt+A β o = 0.52 ± 0.05 ; Fig. 39C-D). No obstante, los patrones de fosforilación de las tirosinas de la GSK3 no presentan cambios ni con la aplicación de la wrt, ni con la adición posterior de la A β o (en u.a.: **GSK3 α** : control = 0.36 ± 0.05 , wrt = 0.35 ± 0.04 , wrt+A β o = 0.38 ± 0.06 ; **GSK3 β** : control = 0.26 ± 0.03 , wrt = 0.25 ± 0.03 , wrt+A β o = 0.24 ± 0.02 ; Fig. 27C-D). Los datos obtenidos en esta sección corroboran que la GSK3 β participa en la inhibición de la actividad hipocampal producida por la A β o. Además, sugieren también que la GSK3 β se encuentra cascada abajo de la cinasa Fyn; debido a lo observado en las rebanadas Fyn KO donde se reporta una inhibición de la actividad espontánea con la aplicación de la wortmanina.

Finalmente, una de las preguntas que surgió de esta serie de experimentos se refiere a la fosforilación en las serinas de la GSK3. En este sentido, se sabe que

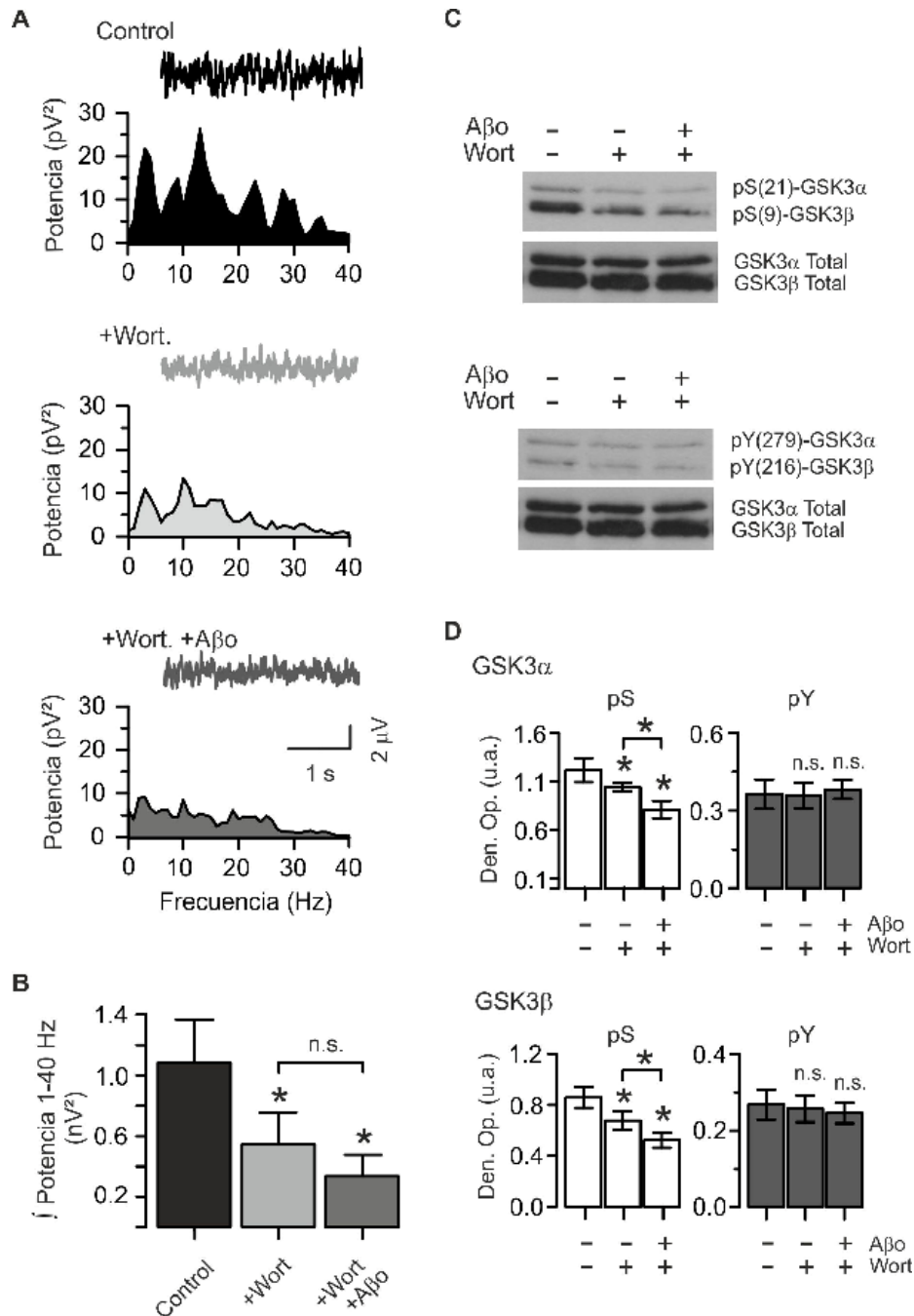


Figura 39 – La activación de la cinasa GSK3 en rebanadas de ratones Fyn KO inhibe la actividad espontánea del hipocampo. A) Registros electrofisiológicos y sus respectivos espectros de potencia de la actividad espontánea control (negro), y después de la adición con 100nM del inhibidor para la PI3K, wortmanina (1hr; gris claro) y de la A β o en presencia de la wortmanina (gris oscuro). B) Cuantificación de la potencia de las condiciones experimentales de la sección A. **C-D)** *Western blots* de lisados totales de rebanadas de hipocampo y cuantificación de los niveles de fosforilación de serinas y tirosinas de la GSK3 α/β . Las barras son el promedio de 5 a 7 experimentos $\pm$ E.E.; * denota una diferencia significativa con respecto al valor control. Note que la aplicación de la wortmanina mimetiza y ocluye el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea del hipocampo en rebanadas Fyn KO.

la cinasa que fosforila estos residuos aminoacídico es la Akt (Cross et al. 1995; Shaw et al. 1997; van Weeren et al. 1998), que pertenece a la vía de señalización de la PI3K y que regula negativamente a la la actividad constitutiva de la GSK3 a través de la fosforilación en las serinas. (Takashima et al. 1996; Chen et al. 2009; Jimenez et al. 2011). En este caso, la Akt mantiene inactiva a esta cinasa y, por lo tanto, la inhibición de su actividad podría activar a la GSK3. Tomando en cuenta estos datos, la pregunta que surgió en el presente trabajo de tesis fue si la A β o es capaz de inhibir la vía de señalización de la PI3K y en específico, a la cinasa Akt. Para ello, el planteamiento experimental fue medir la forma fosforilada de la Akt en la serina 473 que, como se ha reportado, es la forma activa de esta cinasa (Brunet et al. 2001). Los datos experimentales obtenidos demuestran que la aplicación de la A β o sobre rebanadas de hipocampo de ratones WT, disminuye la forma activa de la Akt con respecto al control. Es decir, la aplicación de la A β o promueve una menor fosforilación de la Akt en la serina 473 (Fig. 40; en u.a: control = 1.09 ± 0.19 vs. A β o = 0.83 ± 0.10). Estos resultados sugieren que la sobreactivación de la GSK por la aplicación de la A β o sobre las rebanadas de hipocampo involucra también la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt, de manera que, este evento molecular participa también en la disminución en la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo mediada por la A β o.

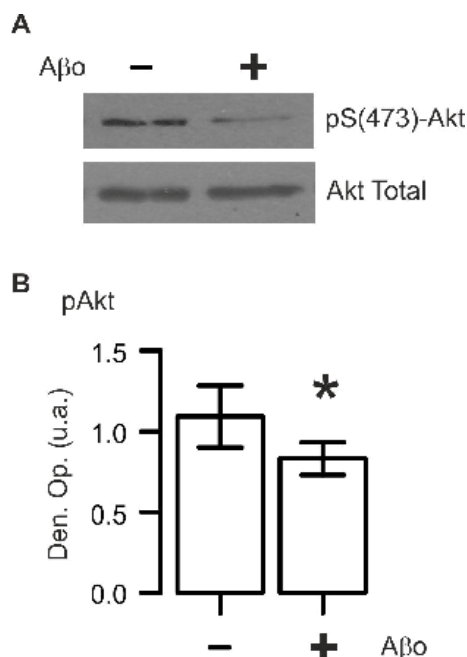


Figura 40 – La A β o inhibe la vía reguladora de la GSK3 mediada por Akt. **A)** *Western blots* de lisados totales de hipocampo en condiciones control y 30 minutos posteriores a la aplicación de la A β o 10 nM que muestran la fosforilación de la Akt (pAkt; forma activa). **B)** cuantificación de la densidad óptica del nivel de fosforilación de la cinasa Akt en las condiciones experimentales de A. Las barras son el promedio de 4 experimentos $\pm$ E.E.; * denota una diferencia significativa con respecto al valor control. Note que la A β o disminuye la fosforilación de serinas de la Akt.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este trabajo de tesis se demostró que la A β ₁₋₄₂ oligomerizada (A β o) es capaz de inhibir la actividad espontánea del hipocampo a concentraciones nanomolares bajas y que ese efecto es reversible y depende de la edad. También se demostró que la A β o aplicada de forma aguda altera la dinámica de la red neuronal del hipocampo, al provocar un funcionamiento aberrante de la red que se caracteriza por la formación de un estado dominante que recluta a la mayoría de las células activas en la red. Además, se mostró que la cinasa Fyn está implicada en este efecto sobre la dinámica de la red hipocampal. Se encontró también que la dinámica de la red hipocampal de ratones con fenotipo EA, es muy similar a la inducida por la aplicación aguda de la A β o. Finalmente, se encontró que el efecto inhibitorio de la A β o sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo está mediado por una vía de señalización intracelular que involucra a las integrinas y a las cinasas Fyn, FAK y GSK3 β . A continuación, se discute la relevancia de estos hallazgos.

7.1. Alteraciones en la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo inducidas por la A β .

Uno de los principales hallazgos de esta tesis fue que la A β o genera alteraciones de la red neuronal hipocampal a concentraciones nanomolares muy similares a aquellas reportadas en el cerebro de pacientes con la EA (Shinkai et al. 1997; Lue et al. 1999; McLean et al. 1999; Naslund et al. 2000; Religa et al. 2003; Klunk et al. 2005; Peña et al. 2006). Estos datos pueden tener una gran relevancia con respecto a la clínica; pues las concentraciones nanomolares bajas de A β correlacionan con el nivel de demencia (Masters et al. 1985; Lue et al. 1999; Naslund et al. 2000) y con la severidad de las alteraciones en el EEG de los pacientes con EA (Hughes et al. 1989; Schreiter-Gasser et al. 1994; Ihl et al. 1996; Nobili et al. 1999; Kowalski et al. 2001). En base a esta correlación y a los datos obtenidos, se propone en esta tesis que los oligómeros de la A β alteran la actividad de la red neuronal del hipocampo y que dicha alteración podría estar relacionada

con los problemas de memoria y aprendizaje en la etapa temprana de la EA (Peña et al. 2006; Peña et al. 2009; Harris et al. 2010; Villette et al. 2010).

A medida que el cerebro envejece, se vuelve más sensible al daño; incluido el efecto deletéreo de la A β (Lewis et al. 2006). La senescencia está asociada a alteraciones específicas de la función hipocampal, que se reflejan en el deterioro en los procesos de memoria y aprendizaje (Busciglio et al. 1998; Bach et al. 1999). Este deterioro puede estar asociado a la pérdida de contactos sinápticos (Chen et al. 2002), al “silenciamiento” de las sinapsis (Araki et al. 1997; Barnes et al. 2000) o la disminución en la respuesta postsináptica (Thibault y Landfield 1996) (para una mejor revisión checar (Rosenzweig y Barnes 2003). Estas alteraciones se reflejan en un deterioro en la generación de la plasticidad de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Rosenzweig et al. 1997; Bach et al. 1999; Rosenzweig y Barnes 2003) así como en alteraciones en la generación de ciertos patrones de actividad oscilatoria espontánea (Vreugdenhil y Toescu 2005). En las condiciones experimentales de este trabajo, se muestra que la actividad espontánea de la región CA1 del hipocampo se mantiene estable a lo largo del desarrollo postnatal; al menos hasta la semana 32 de edad. Sin embargo, esta actividad se vuelve más sensible a la A β a través de la edad. Los resultados mostrados en esta sección del trabajo sugieren que el incremento dependiente de la edad en la concentración de la A β en los cerebros de los pacientes con EA (Lewis et al. 2006), coincide con el hecho de que la red neuronal del hipocampo se vuelve más vulnerable al daño (Busciglio et al. 1998; Bach et al. 1999), y por lo tanto, a la A β . Esta situación, puede generar una transición entre el envejecimiento normal y la condición patológica relacionada al inicio de la EA (Kuo et al. 1996; Lue et al. 1999; Wang et al. 1999).

Anteriormente, se ha reportado que los oligómeros de la A β pueden inducir la muerte neuronal (Hartley et al. 1999; Kim et al. 2003a; Costantini et al. 2005a; Chong et al. 2006; Sturchler et al. 2008). Si bien la mayoría de estos experimentos utilizan concentraciones muy altas de oligómeros de la A β (Hartley et al. 1999; Kim et al. 2003a; Costantini et al. 2005a; Chong et al. 2006; Sturchler et al. 2008) o

tiempos de exposición muy largos (Hartley et al. 1999; Kim et al. 2003a; Chong et al. 2006), hay reportes de que la A β puede inducir neurotoxicidad a concentraciones muy cercanas a las utilizadas en los experimentos de este trabajo (Lambert et al. 1998). Lambert y colaboradores (1998) reportaron que la solución oligomerizada de A β a una concentración de 5 nM reduce la viabilidad celular en rebanadas de hipocampo si se aplica durante 24 hrs. En base a los datos anteriores, fue necesario resolver si la reducción de la actividad espontánea del hipocampo producida por la A β en la presente tesis estaba relacionada con daño celular. En los experimentos donde se lavó la A β del baño de registro se encontró que el efecto inhibitorio del péptido era reversible. Esto sugiere que el efecto de la A β no correlaciona con muerte celular ya que, por definición, la muerte celular es irreversible. Además, en el laboratorio se llevaron a cabo experimentos para medir la neurotoxicidad de la A β sobre la red neuronal del hipocampo y la corteza cerebral (Balleza-Tapia et al. 2010; Villanueva Castillo 2010). En ambos casos, se encontró que la A β 10 nM no produce neurotoxicidad en el hipocampo. Estos datos sugieren que los oligómeros de la A β son capaces de generar muerte neuronal a tiempos de exposición prolongados y, en contraste, que la aplicación aguda de la A β induce una disfunción reversible de las redes neuronales al alterar mecanismos celulares específicos involucrados en la generación de los patrones de actividad de estas redes (Peña et al. 2009; Balleza-Tapia et al. 2010; Alvarado-Martinez et al. 2013). Esta idea está apoyada, además, por diversos trabajos que han demostrado que la aplicación aguda de oligómeros de A β a concentraciones nanomolares altera la LTP generada en el hipocampo sin una relación con la muerte celular (Lambert et al. 1998; Walsh et al. 2002a; Wang et al. 2002; Wang et al. 2004b).

Una observación interesante de los experimentos de lavado de la A β , es que la recuperación de la actividad a los 30 minutos de lavado, tiende a incrementar la potencia de la actividad hipocámpal a niveles mayores a la actividad control (Fig. 14). A pesar de que este incremento no alcanzó la significancia estadística, la tendencia sugiere que la red neuronal que se recupera de la inhibición producida por la A β , puede volverse hiperexcitable. Esta idea está

respaldada por reportes previos donde se ha demostrado un aumento en la excitabilidad (hiperexcitabilidad) posterior al lavado de GABA (Garcia-Ugalde et al. 1992; Calixto et al. 2000; Casasola et al. 2001; Casasola et al. 2004), de agonistas opioides (Drdla et al. 2009), de óxido nítrico (Bohme et al. 1991; Bon et al. 1992; Bon y Garthwaite 2001) y de adenosina (Doolette y Kerr 1995). Es posible que esta actividad hiperexcitabilidad posterior al lavado de la A β participe en la generación de actividad de tipo epiléptica observada en modelos animales de la EA (Palop et al. 2007; Palop y Mucke 2009b; Palop y Mucke 2009a) así como en pacientes con EA (para una revisión ver (Palop y Mucke 2009b; Palop y Mucke 2009a)).

Existen numerosos reportes que muestran que durante las primeras semanas postnatales la actividad espontánea “de fondo” coexiste con espigas poblacionales de actividad sincrónica, que eventualmente desaparecen a medida que el animal crece (Khazipov et al. 1997; Peña y Alavez-Perez 2006). De forma interesante, en esta tesis se encontró que la A β afecta de manera diferencial las espigas poblacionales y a la actividad espontánea de fondo producidas en la misma rebanada obtenida de neonatos (Fig. 18). Mientras que la actividad espontánea se mantiene inalterable después de la aplicación de la A β en rebanadas de hipocampo provenientes de animales neonatos (Fig. 18A), las espigas de actividad poblacional presentes en la misma rebanada desaparecen casi por completo en presencia de A β (Fig. 18B). De forma similar, un estudio previo reportó que las espigas de actividad poblacional provocadas con 4-aminopiridina están disminuidas en rebanadas provenientes de animales transgénicos tipo EA (Brown et al. 2005a). Los resultados obtenidos en este trabajo soportan la idea de que los oligómeros de A β son capaces de alterar de manera diferencial ciertos tipos de actividad de las redes neuronales. En este sentido, se ha reportado que las oscilaciones de tipo beta inducidas por la aplicación de Kainato o Potasio son sensibles de manera diferencial a la aplicación de la A β (Adaya-Villanueva et al. 2010) y que las oscilaciones theta inducidas con carbacol o DHPG también son diferencialmente sensibles a la aplicación de A β (Gutierrez-Lerma et al. 2013). Más aún, trabajos recientes han demostrado que en modelos animales que sobreexpresan la APP, y por consiguiente, producen niveles altos de la A β , la

generación de oscilaciones de tipo gamma se ve alterada (Driver et al. 2007) pero no así la generación de un tipo de actividad de la red denominado “Sharp waves” (Hermann et al. 2009). En conjunto, estos datos sugieren que, por una parte, el efecto diferencial de la A β en la actividad de las redes neuronales puede ayudar a comprender el tipo de mecanismo celular involucrado en dicho efecto y, por otra parte, puede crear una falsa controversia con respecto al efecto, o ausencia de él, sobre ciertos tipos particulares de actividad de la red neuronal. Una controversia de este tipo existe con respecto a la LTP, la cual se ha explicado por la diversidad de mecanismos celulares involucrados en diferentes tipos de LTP (Cullen et al. 1997; Lambert et al. 1998; Fitzjohn et al. 2001; Stephan et al. 2001; Sun y Alkon 2002; Walsh et al. 2002a; Wang et al. 2002; Klyubin et al. 2004; Rowan et al. 2004; Wang et al. 2004a; Wang et al. 2004b; Rowan et al. 2007). En este sentido, es importante identificar cuales poblaciones neuronales son afectadas por la A β y, aún más interesante, cuáles de estas poblaciones neuronales y actividades de la red neuronal están involucradas en la disfunción de los procesos cognoscitivos alterados por la A β .

7.2. Efectos de la proteína β amiloide sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo. Papel de la cinasa Fyn.

Para monitorear la dinámica de la red neuronal del hipocampo y el efecto de la A β sobre ésta, se utilizó la técnica de fMCI. El análisis de los datos demostró que los cultivos organotípicos de hipocampo tienen una alta actividad espontánea que se refleja en un alto porcentaje de coactivación. También se encontró que la alta actividad hipocampal presenta picos de actividad sincrónica. Resultados similares indican que éste tipo de actividad es característico de los cultivos organotípicos de hipocampo (Sasaki et al. 2007). Sasaki y colaboradores (2007), además, demostraron que las neuronas mantienen su tasa de disparo constante y estable después de 20 minutos de registro, muy similar a los resultados encontrados en este trabajo.

En esta tesis se demostró también que la A β produce una disminución en la dinámica de la red hipocampal. Este efecto inhibitorio se ha observado también en rebanadas del septum medial. Utilizando fMCI, se demostró que la aplicación de la

A β promueve una disminución en la coherencia del disparo de las neuronas del septum que correlaciona con la pérdida de la ritmicidad de la frecuencia theta en neuronas colinérgicas y GABAérgicas registradas con la técnica de *patch clamp* (Leao et al. 2012). Este efecto inhibitorio sobre la actividad sincrónica se ha observado también en células neuronales en cultivo (Rui et al. 2006; Gortz et al. 2009), donde la aplicación aguda de la A β es capaz de inhibir la actividad sincrónica espontánea de los cultivos neuronales (Rui et al. 2006) y de disminuir la tasa de disparo y el disparo en ráfagas de neuronas cultivadas en arreglos de multielectrodos (Gortz et al. 2009). Todo lo anterior a concentraciones de la A β similares a las utilizadas en esta tesis. Los datos más relevantes utilizando la técnica de fMCI provienen de estudios *in vivo* con el modelo murino de la EA APP23xPS45 (Busche et al. 2008; Busche et al. 2012). Este ratón sobreexpresa la APPswe y la mutante de la presenilina 1 G384A. En estos trabajos midieron la actividad espontánea en la corteza y la región CA1 del hipocampo de los ratones APP23xPS45 y reportaron un efecto diferencial de la A β sobre distintas poblaciones neuronales; una proporción de neuronas presentaron un decremento en la actividad mientras que el otro presentó un aumento (Busche et al. 2008; Busche et al. 2012). La población de neuronas que se vuelven hiperexcitables en presencia de la A β se localiza en la periferia de las placas seniles mientras que la población que se inhibe se distribuye homogéneamente en la corteza. El número de neuronas que se inhiben se incrementa de forma directamente proporcional a la distancia de las placas (Busche et al. 2008; Busche et al. 2012). Interesantemente, en ratones que no han desarrollado placas, se encuentra un aumento en la hiperexcitabilidad neuronal en el hipocampo y, más aún, la aplicación aguda de la A β en ratones WT promueve un aumento temporal de la actividad neuronal en CA1 (Busche et al. 2012). Es posible que la hiperexcitabilidad neuronal reportada en los ratones APP23xPS45 sea producto de la adaptación de la red neuronal al efecto inhibitorio de la A β . A diferencia de lo reportado por Buche y colaboradores (2008, 2010); los resultados obtenidos en esta tesis no muestran ningún aumento significativo en la actividad neuronal de los ratones WT. Cabe señalar que la distribución espacial de la actividad medida con transitorios de calcio que reporta

Busche y colaboradores (2008) en los ratones APP23xPS45 es similar a la encontrada en esta tesis para los ratones 3xTgAD.

A través de registros electrofisiológicos, se ha podido demostrar que los circuitos neuronales son capaces de generar patrones de actividad coordinada que se repiten a través del tiempo tanto en preparaciones *in vitro* como *in vivo* (Ikegaya et al. 2004). Utilizando la fMCI se ha identificado que la activación secuencial de ensambles neuronales correlaciona con las secuencias de actividad neuronal registradas electrofisiológicamente (Ikegaya et al. 2004). Estas secuencias de activación poseen distintas estructuras espaciales que se repiten con cierta temporalidad revelando una dinámica modular de las redes neuronales a través del tiempo (Ikegaya et al. 2004). En este sentido, Carrillo y colaboradores (2008) analizaron el comportamiento de la red neuronal del estriado en presencia de distintos estímulos farmacológicos y electrofisiológicos y el análisis de sus resultados demostró que la red neuronal estriatal es capaz de responder a los estímulos generando patrones de actividad neuronal que representan estados funcionales del circuito (Carrillo-Reid et al. 2008). Utilizando los mismos algoritmos y criterios que Carrillo y colaboradores (2008), en ésta tesis se encontró que la actividad espontánea de la red hipocampal presenta patrones de actividad neuronal que se repiten en el tiempo y que generan distintos estados funcionales dinámicos y con una alta recurrencia. Estos datos son ligeramente diferentes a los estados funcionales reportados para el circuito del estriado donde la transición entre un estado y otro es menos dinámica y genera estados más estables. No obstante, estas diferencias pueden ser el resultado del protocolo experimental empleado por Carrillo y colaboradores, en el cual, utilizaron una estimulación con NMDA del circuito estriatal, mientras que en el presente trabajo solo se evaluó la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo sin fármaco alguno (Carrillo-Reid et al. 2008). Por otra parte, Sasaki y colaboradores (2007), que también midieron la actividad espontánea en cultivos organotípicos de hipocampo, encontraron que la dinámica del circuito neuronal se comporta de forma similar al circuito estriatal (Carrillo-Reid et al. 2008). En éste trabajo se reporta que la red hipocampal tiende a mantenerse en un estado funcional estable para súbitamente cambia a otros. Por

ello, en el hipocampo, la transición entre los estados es baja y la recurrencia tiene valores altos (Sasaki et al. 2007). Cabe señalar que los criterios de selección de los patrones de actividad neuronal utilizados en esta tesis se basaron en lo reportado para el circuito estriatal (Carrillo-Reid et al. 2008), pues se seleccionaron los patrones de picos de actividad sincrónica mientras que Sasaki y colaboradores (2007) incluyeron la totalidad de la actividad neuronal. Es posible que las diferencias que se observan entre ambos reportes radiquen en la metodología de análisis.

Al analizar el efecto de la A β sobre la dinámica del circuito hipocampal se observó una disminución en el número de estados funcionales y, además, se generó un estado preferencial y un aumento en la recurrencia de dicho estado. En este sentido, se ha reportado que la red neuronal del circuito estriatal en un modelo de Hemiparkinsonismo tiene un comportamiento similar (Jaidar et al. 2010). Dado que la aplicación de bicuculina, que bloquea los receptores GABA-A, disminuye la transición entre los estados funcionales y favorece un estado preferencial altamente recurrente (Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010), se ha sugerido que la transmisión GABAérgica es importante para la transición entre los distintos estados funcionales de los circuitos neuronales (Carrillo-Reid et al. 2008; Jaidar et al. 2010). De acuerdo a esta línea de evidencia, los datos obtenidos en ésta tesis permiten suponer que el efecto de la A β sobre la red neuronal puede estar regulado por una población de neuronas hipocampales de naturaleza GABAérgica, como se ha reportado para ratones transgénicos tipo EA (Verret et al. 2012).

Una de las características notables en los registros de la actividad de la red neuronal del cerebro de pacientes con la EA es la alteración en los ritmos cerebrales medidos con la técnicas de EEG y MEG (Duffy et al. 1984; Coben et al. 1985; Penttila et al. 1985; Hooijer et al. 1990; Soininen et al. 1992; Buchan et al. 1997; Bennys et al. 2001; Knott et al. 2001; van der Hiele et al. 2007b). Las alteraciones en los registros se manifiestan como un corrimiento hacia la izquierda del espectro de potencia (Giannitrapani et al. 1991; Signorino et al. 1995; Rodriguez et al. 1999). Más aún, se ha demostrado que existe una correlación

entre el nivel de demencia de los pacientes con EA y la alteración en los registros de EEG (Coben et al. 1985; Penttila et al. 1985; Soininen et al. 1991a; Wszolek et al. 1992; Prichep et al. 1994). Esta actividad anormal registrada con EEG y MEG en los pacientes con EA, desde etapas tempranas, sugiere un cambio en la funcionalidad de los circuitos neuronales responsables de la generación de los diferentes ritmos cerebrales. En este sentido, la disminución en el número de estados funcionales y la generación de un estado preferente en la dinámica de la red hipocampal producido por la aplicación aguda de la A β y observada también en los cultivos de ratones 3xTgAD (reportados en esta tesis), puede ser el sustrato de la alteración en el flujo de información en el circuito del hipocampo. Esta alteración en el flujo de información se ha reportado en diversos tipos de estudios que han analizado parámetros que miden la conectividad funcional de las regiones corticales de los pacientes, tanto en registros de EEG como MEG, en los que se ha encontrado una disminución en la coherencia (Leuchter et al. 1987; Leuchter et al. 1992; Dunkin et al. 1994; Jelic et al. 1996; Comi et al. 1998; Berendse et al. 2000; Adler et al. 2003), la *probabilidad de sincronización* (Stam et al. 2002; Stam et al. 2003; Pijnenburg et al. 2004; Stam et al. 2005; Babiloni et al. 2006b; Stam et al. 2006) y el primer exponente de Lyapunov (Jeong, Kim et al. 1998; Jeong, Chae et al. 2001). En conjunto, estos estudios demuestran que existe una pérdida en la conectividad funcional entre regiones corticales de los pacientes con EA que podría explicarse por la pérdida en la conectividad entre las redes neuronales que componen dichos circuitos. En ese sentido, por ejemplo, se ha propuesto que las alteraciones en la actividad oscilatoria cortical en la esquizofrenia podrían representar un correlato funcional de una desconexión funcional entre las redes neuronales de las estructuras corticales, y por tanto, sustentar la fragmentación de la mente y el comportamiento característico de la esquizofrenia (Artieda et al. 2009). De esta manera, los datos encontrados en esta tesis sugieren que posiblemente el hipocampo es incapaz de engancharse en oscilaciones relacionadas con los procesos cognoscitivos y que la generación de redundancia en la funcionalidad del circuito del hipocampo puede ser una de las limitantes para el flujo normal de la información. La alteración funcional del hipocampo producida

por la A β podría representar la base fisiopatológica de las alteraciones observada en los cerebros de los pacientes con la EA que origina la perdida de la conectividad funcional entre regiones cerebrales.

Como ya se mencionó, las funciones cerebrales dependen de una red compleja en la cual diversos tipos de neuronas están interconectadas (Takahashi et al. 2007). En los últimos años, se han desarrollado técnicas que han generado diversa información acerca del procesamiento de la información de las redes neuronales (EEG, MEG, fMRI, PET) que, sin embargo, tienen la limitante de que poseen una resolución espacial pobre, es decir, no pueden dar información sobre la dinámica de las redes a nivel unicelular (Takahashi et al. 2007). En este sentido, las fMCI es una herramienta que permite evaluar los patrones espacio-temporales de la actividad neuronal registrando la actividad de varias neuronas de manera simultánea con resolución unicelular (Ikegaya et al. 2004; Takahashi et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008). La temporalidad de los patrones de disparo que ocurren de manera simultánea en cada neurona se puede reconstruir y de esta forma, analizar la dinámica de la red neuronal (Smetters et al. 1999; Ikegaya et al. 2004; Sasaki et al. 2007; Takahashi et al. 2007; Carrillo-Reid et al. 2008; Takahashi et al. 2011). En análisis de los cultivos organotípicos de hipocampo con la fMCI ha permitido determinar que el comportamiento de la red neuronal de los cultivos de hipocampo genera estados funcionales dinámicos de gran alternancia y recurrencia. Estos estados funcionales son alterados por la A β generando una dinámica del circuito aberrante en la cual el circuito se engancha en un estado preferencial que recluta la mayoría de las neuronas activas del circuito, muy probablemente debido a alteraciones en redes de neuronas GABAérgicas (Verret et al. 2012).

En este sentido, los resultados obtenidos por Jaidar y colaboradores (2010) en un modelo de Hemiparkinsonismo y los datos obtenidos en esta tesis, permiten suponer que la generación de un estado preferencial y recurrente en la dinámica de los circuitos neuronales puede generar un comportamiento patológico común de las redes neuronales en enfermedades neurodegenerativas. En específico, el

comportamiento de la red observado con la aplicación aguda de la A β o en los ratones 3xTgAD, donde se reducen los estados funcionales y se genera un estado altamente recurrente que no permite la transición a otros estados podría traducirse en un deterioro en el envío de información entre ensambles neuronales. En este sentido, la pérdida o la disminución de la conectividad funcional entre distintas regiones del cerebro observado con registros de EEG y MEG en los pacientes con EA (Leuchter et al. 1987; Leuchter et al. 1992; Dunkin et al. 1994; Jelic et al. 1996; Comi et al. 1998; Berendse et al. 2000; Stam et al. 2002; Stam et al. 2003; Pijnenburg et al. 2004; Stam et al. 2005; Babiloni et al. 2006b; Stam et al. 2006), puede estar relacionada con este comportamiento patológico de las redes neuronales locales.

7.3. Vía de señalización involucrada en los efectos de la A β sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las integrinas median el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo, ya que el bloqueo de éstos con el antagonista echistatina, fue capaz de prevenir la disminución, dependiente de la A β , de la actividad espontánea del hipocampo. La interacción entre las integrinas con otras proteínas durante los procesos de adhesión celular se lleva a cabo a través de un dominio de unión que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (Ruoslahti 1996). Notablemente, la A β interactúa con estos receptores de membrana a través de un dominio análogo compuesto por la secuencia aminoacídica Arg-His-Asp-Ser (Ghisso et al. 1992; Sabo et al. 1995). En este sentido, la interacción A β -integrinas está ampliamente documentada (Sabo et al. 1995; Wright et al. 2007), y se ha demostrado también que la A β se une y activa cascadas de señalización a través de estos receptores (Para una mejor revisión ver (Caltagarone et al. 2007; Balleza-Tapia y Pena 2009). Por ejemplo, se ha descrito que la interacción de las integrinas con la A β es capaz de activar, cascada abajo, a las cinasas FAK (Frasca et al. 2008), Pyk2 (Wright et al. 2007), ERK1/2 (Anderson y Ferreira 2004; Frasca et al. 2008) y Fyn (Frasca et al. 2008). Estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis sustentan la

idea de que la A β puede activar proteínas efectoras relacionadas con los sistemas de señalización intracelular asociados a las integrinas (Caltagarene et al. 2007). Es importante mencionar, que trabajos previos han reportado que la activación de las integrinas por la A β está relacionada con neurotoxicidad. Por ejemplo, se ha observado que la A β , en su forma fibrilar, puede causar muerte celular de neuronas hipocámpales *in vitro* a través de la activación de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ (Bamberger et al. 2003). Resultados similares se han reportado en cultivos primarios de neuronas corticales de humano (Wright et al. 2007). En las líneas celulares derivadas de neuroblastoma SK-N-BE y SH-SY5Y, se ha reportado que la aplicación de A β 25 mM induce apoptosis a través de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ (Bozzo et al. 2004; Frasca et al. 2008). Estos trabajos contrastan con lo encontrado en la tesis, donde se observó que el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo es reversible, y además, no está relacionada con la muerte celular (Balleza-Tapia et al. 2010). Una posible explicación en esta diferencia de efecto de la A β , es que en la mayoría de los trabajos que reportan neurotoxicidad a través de las integrinas utilizan a la A β en su forma fibrilar (Bamberger et al. 2003; Wright et al. 2007), o a concentraciones muy altas (μ M) (Bozzo et al. 2004; Frasca et al. 2008). En contraste, en la presente tesis se utilizaron oligómeros solubles de la A β a una concentración nanomolar baja (10 nM). En este sentido, trabajos previos han reportado que las integrinas están involucradas en los efectos de la A β soluble sobre la funcionalidad de los circuitos neuronales, en especial, el fenómeno plástico de la LTP (Rowan et al. 2007; Wang et al. 2008a). Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación, tanto *in vitro* como *in vivo*, de anticuerpos contra las integrinas αv , es capaz de bloquear la inhibición de la LTP provocada por oligómeros de la A β en el hipocampo (Rowan et al. 2007; Wang et al. 2008a). Además, la aplicación de fibronectina, un ligando natural de las integrinas, así como los antagonistas echistatina y SM256 previene también la inhibición de la LTP inducida por la A β , lo que ratifica la participación de las integrinas en los efectos inhibitorios de la A β sobre la plasticidad sináptica (Rowan et al. 2007; Wang et al. 2008a). A pesar de todo lo anterior, el mecanismo molecular a través del cual la A β es capaz de alterar la transmisión sináptica y la actividad de las redes

neuronales no está claro aún (Pena-Ortega 2013). Una posible explicación es que la activación de la integrinas por la A β sea capaz de regular las propiedades eléctricas de las neuronas y de esta manera afectar la actividad de las redes neuronales (Pena-Ortega 2013). Esta posibilidad se sustenta en diversos estudios que han demostrado que estos receptores de membrana son capaces de regular la actividad de diversos canales iónicos (Davis et al. 2002). Por ejemplo, un estudio reporta que la activación de las integrinas por un péptido agonista, denominado GRGDSP, promueve la expresión de factores neurotróficos por un mecanismo que depende, en parte, de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L en cerebros adultos (Gall et al. 2003). Por otro lado, se ha observado que la conversión de células PC12 a un fenotipo neuronal, inducido por moléculas de adhesión neuronales y N-caderinas, está mediado por canales de sodio dependientes de voltaje (Doherty et al. 1991). La relación entre las integrinas y los canales de potasio también ha sido documentada en neuronas (Becchetti et al. 1992). La activación de integrinas por la fibronectina (una proteína de la matriz extracelular), regula la diferenciación en células eritroleucémicas a través de la activación de canales de potasio dependientes de calcio (Becchetti et al. 1992; Arcangeli et al. 1993). También, la interacción integrinas-fibronectina media la extensión de neuritas en algunos tipos de células de neuroblastoma a través de canales de potasio de tipo Kir (Arcangeli et al. 1993). En linfocitos T, las integrinas con la subunidad β 1 y los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3 coimmunoprecipitan, de manera que esta interacción sugiere una cooperatividad en la función de estas proteínas (Levite et al. 2000). Una evidencia directa de que las integrinas regulan canales iónicos en la neuronas es la del trabajo de Vasilyev y Barish (Vasilyev y Barish 2003), donde se observa que la activación de las integrinas con la vitronectina, regula a la alta la función de la corriente de potasio A (I_A); probablemente a través de un aumento en la expresión del gen que codifica a este canal de potasio. Es interesante mencionar que la A β también activa a estos canales (Peña et al. 2006). Estos datos sugieren que la activación de las integrinas por la A β podría repercutir en una alteración en la excitabilidad celular y por lo tanto, en la actividad eléctrica de los circuitos neuronales. Más específicamente,

una sobreexpresión o activación de algunos de los canales de potasio provocaría una disminución en la excitabilidad neuronal y por lo tanto una disminución en la actividad de la red neuronal; muy parecido al efecto inhibitorio que produce la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo en los resultados obtenidos en este trabajo. En conjunto, los datos obtenidos en la tesis y los datos de la literatura demuestran que las integrinas son un blanco de la A β , que activa cascadas de señalización intracelular que pueden alterar la actividad de las redes neuronales. Por lo tanto, dado que las integrinas tienen un papel relevante en los procesos plásticos de la sinapsis (Hoffman 1998; Benson et al. 2000; Gall y Lynch 2004b; Dityatev et al. 2006; Kawaguchi y Hirano 2006; McGeachie et al. 2011), es probable que una alteración en su funcionalidad normal provocada por la A β pueda jugar un papel relevante en la fisiopatología de la EA.

La señalización intracelular activada por las integrinas es un proceso complejo que regulan no solo funciones estructurales sino, también, aspectos fisiológicos de las células (Denda y Reichardt 2007; Campbell y Humphries 2011). Una de las vías activadas por integrinas más documentada se centra en la activación de la cinasa FAK, quien recluta diversos componentes estructurales y de señalización, entre ellos a la cinasa Fyn (Arcangeli y Becchetti 2006); y que además se activa a través de un mecanismo dependiente de la A β (Caltagarone et al. 2007). De hecho, se sabe que la cinasa de tirosinas FAK es un regulador central de la señalización a través de las integrinas (Parsons 2003a; Mitra et al. 2005). Los datos obtenidos en la tesis demuestran que el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo requiere la participación de FAK. Al respecto, existen diversos trabajos que han reportado la activación de la cinasa FAK a través de un mecanismo dependiente de la A β . En ese sentido, existen trabajos que han reportado que en sistemas *in vitro*, existe un incremento en la fosforilación de FAK inducido por la A β tanto en neuronas (Zhang et al. 1994; Zhang et al. 1996b; Williamson et al. 2002a; Grace y Busciglio 2003) como en la microglía (McDonald et al. 1997; Bamberger et al. 2003). La estimulación con A β promueve además, que FAK sea capaz de inducir la activación de ERK2 y GSK3 β (Williamson et al. 2002a). Más aún, como se mencionó en el apartado previo, existen reportes que

demuestran que la interacción de la A β con las integrinas activa a la cinasa FAK (Bozzo et al. 2004; Frasca et al. 2008).

A pesar de que la activación de FAK por la A β está bien documentada (Caltagarone et al. 2007; Balleza-Tapia y Pena 2009), no existe aún un mecanismo descrito que conecte la activación de la cinasa FAK con una inhibición de la actividad eléctrica de los circuitos neuronales. Como se mencionó anteriormente, una posible explicación al efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea encontrada en el presente trabajo es que la activación de la integrinas por la A β sea capaz de regular la actividad de diversos canales iónicos (Davis et al. 2002). Además, con los datos obtenidos del presente trabajo, se sugiere que la cinasa FAK, que se activa cascada debajo de las integrinas, estaría participando en la regulación de los canales iónicos también. En este sentido, se ha reportado que la interacción de la fibronectina con las integrinas promueve la formación de complejo proteico entre el canal de potasio Kv2.1 y FAK (Wei et al. 2008). En este trabajo, el canal Kv2.1 es quién regula la activación de la cinasa FAK (Wei et al. 2008; Hu et al. 2011b). Sin embargo, este trabajo también demuestra que FAK es capaz de interactuar con canales de potasio y con ello regular la excitabilidad neuronal. De hecho, la ausencia de FAK (FAK56) en la mosca *Drosophila* provoca una disminución en la velocidad de propagación de los potenciales de acción (Ueda et al. 2008), lo que demuestra la importancia de ésta cinasa en las propiedades eléctricas de las neuronas.

Los datos de la tesis demostraron también que la cinasa Fyn, que pertenece a la familia src, es necesaria para el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea de la red neuronal del hipocampo. El papel patológico de la cinasa Fyn en relación con la EA ha sido ampliamente estudiado. La participación de la cinasa en los efectos de la A β se refleja a distintos niveles. La alteración en la LTP por la A β , por ejemplo; desaparece en ratones *knock out* para la cinasa Fyn, así como los efectos neurotóxicos (Lambert et al. 1998). Los efectos sinaptotóxicos y alteraciones cognitivas en modelos animales de tipo EA parecen estar mediados por Fyn (Chin et al. 2004b). Finalmente, una de las evidencias más

directas del papel de la cinasa Fyn en la patología de la EA es su sobreexpresión en cerebros de pacientes con EA (Shirazi y Wood 1993; Ho et al. 2005a). Y más aún, existe una correlación entre la expresión de la cinasa Fyn y los niveles de demencia en los pacientes con EA (Ho et al. 2005b). Por otro lado, la asociación de la cinasa Fyn en la cascada de señalización mediada por las integrinas está bien documentada también (Wary et al. 1998; Colognato et al. 2004; Liang et al. 2004; Samayawardhena et al. 2007). Por lo tanto, dado los resultados obtenidos de la tesis, esta cinasa estaría participando en la hipotética la regulación de canales iónicos inducida por la A β a través de la activación de las integrinas y la cinasa FAK. En este sentido, se sabe que la regulación de canales iónicos a través de las integrinas necesita la señalización de cinasas de tirosinas de la familia src (Davis et al. 2002; Lin et al. 2003; Bernard-Trifilo et al. 2005; Arcangeli y Becchetti 2006). Al respecto, se ha reportado que la cinasa Fyn es capaz de regular la actividad del canal Kv2.1 y que la fosforilación y activación de este canal por Fyn es constitutiva (Sobko et al. 1998). Como se mencionó en la parte introductoria, la activación de FAK y Fyn a través de las integrinas promueve la formación de un complejo enzimático de ambas cinasas (Schaller et al. 1994; Xing et al. 1994). En los resultados obtenidos en la tesis se demostró que ambas cinasas están involucradas en el efecto de la A β sobre la actividad espontánea de hipocampo. Esto sugiere que la cascada de señalización activada a través de las integrinas puede reclutar y formar el complejo enzimático FAK/Fyn. Estudios previos han demostrado la formación de este complejo en células neuronales que han sido estimuladas con la A β (Zhang et al. 1996a; Williamson et al. 2002b). En resumen, los datos obtenidos en el presente trabajo, en conjunto con la literatura, indican que la participación de FAK y Fyn en procesos plásticos como la LTP y su capacidad para regular canales iónicos en las neuronas sugiere que una modificación de su función normal puede promover procesos patológicos que de manera crónica podrían generar un deterioro en la memoria u otros procesos cognoscitivos que se sabe están alterados en pacientes con la EA.

Los datos obtenidos en la tesis demuestran también que la GSK3 β es necesaria para el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea del

hipocampo. La participación de esta cinasa en la EA ha sido objeto de estudio de varios trabajos y a la fecha se sabe que es relevante para la EA. La GSK3 está sobreexpresada en los cerebros de pacientes con EA, principalmente en la corteza frontal (Leroy et al. 2007) y el hipocampo (Blalock et al. 2004). La GSK3 β juega un rol central en la neuropatología provocada por la A β y la sobrefosforilación de la proteína Tau (Takashima et al. 1993) e incluso se ha reportado que un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para la GSK3 β es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de la EA (Mateo et al. 2006). Cuando se inhibe a esta enzima, ya sea por métodos farmacológicos (Alvarez et al. 1999; Koh et al. 2008) o moleculares (Takashima et al. 1993), se reporta una disminución en la muerte neuronal y la sobrefosforilación de Tau provocadas por la A β . Se ha reportado incluso que la activación de esta enzima promueve deterioro cognoscitivo asociado, además, a una sobrefosforilación de Tau (Wang et al. 2008b). Esta línea de evidencia y los datos obtenidos de esta tesis sugieren que la GSK3 β puede alterar los procesos cognoscitivos en los pacientes con EA a través de inhibir las oscilaciones hipocampales; un proceso neuronal relacionado con la cognición. En este sentido, se ha demostrado que ratones transgénicos que sobreexpresan condicionalmente a la GSK3 β o bien la activación indirecta de la enzima, induce un deterioro en el aprendizaje espacial relacionado a un aumento en la actividad de la enzima en el hipocampo (Hernandez et al. 2002; Liu et al. 2003), así como alteraciones en la LTP (Hooper et al. 2007). Más aún, la inducción de la LTP en el hipocampo correlaciona con un aumento en la fosforilación de la Ser9 de la GSK3 β y por lo tanto una disminución en su actividad (Hooper et al. 2007). De igual forma, utilizando un protocolo farmacológico para activar a la GSK3, que consiste en inhibir a su cinasa reguladora con wortmanina (la PI3K), se ha observado un decremento en la LTP, relacionado con una disminución en la expresión y asociación de la sinapsina I (Zhu et al. 2007); una proteína que forma parte de las vesículas sinápticas y es importante para la liberación del neurotransmisor de las terminales presinápticas. La activación indirecta de la GSK3, a través de inhibir a la PI3K y la PKC *in vivo*, provoca una alteración en la memoria espacial (Wang et al. 2008b). Estos reportes correlacionan con los datos de esta tesis donde se

demostró que la activación de la GSK3 con el empleo de la wortmanina produce una disminución en la actividad espontánea del hipocampo similar a la aplicación de la A β . Un dato interesante que se observó en esta tesis, se refiere a los patrones de fosforilación de la GSK3 al utilizar el inhibidor de la cinasa Fyn PP2. A pesar de que el PP2 previene el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea, se puede observar que la GSK3 sigue presentando una disminución en la fosforilación de las serinas producida por la A β . Este dato sugiere fuertemente que la disminución en las serinas es un proceso independiente de Fyn que, sin embargo, no excluye la hipótesis que dicha disminución puede estar asociada con elementos cascada arriba de la misma, o, que es un proceso independiente de los receptores integrinas. Los datos sin embargo demuestran que la inhibición que la A β produce sobre la actividad espontánea del hipocampo requiere de la fosforilación de las tirosinas en la GSK3. La fosforilación en las tirosinas de la GSK3 no es un requisito para la activación de la cinasa y no altera negativamente su función catalítica (Dajani, 2001), pero si mejora la capacidad de fosforilación de la misma (Dajani, 2001). Es decir, el aumento en la fosforilación de las tirosinas facilita la fosforilación del sustrato pero no es estrictamente necesaria para la actividad de la enzima (Dajani, 2001). Esto sugiere que la A β promueve la sobreactivación de la GSK3 β permitiendo una función aberrante de la enzima. En este sentido, estímulos relacionados con procesos apoptóticos, como la aplicación de estaurosporina, el lavado del factor neurotrófico o la estimulación con ácido lisofosfatídico (LPA), incrementan la fosforilación de tirosinas de la GSK3 β y su actividad (Bhat et al. 2000; Bijur y Jope 2001; Sayas et al. 2006). Más aún, Lesort y colaboradores (Lesort et al. 1999), demostraron que la fosforilación transitoria en las tirosinas de la GSK3 β aumenta tanto la actividad de la cinasa como la fosforilación de la proteína Tau (que está implicada también en la EA). Dicho efecto, aunque transitorio, sugiere que una sobreactivación constante de la GSK3 β a través de la fosforilación en tirosinas puede desencadenar eventos patológicos. Un dato importante del trabajo de Lesort y colaboradores es que la fosforilación en tirosinas de la GSK3 β está regulada por la cinasa Fyn de manera directa. Esta serie de evidencias, más los datos obtenidos en esta tesis, sugieren fuertemente

que estas cinasas están interconectadas en un mecanismo patológico que altera la función de la red neuronal del hipocampo.

Una pregunta que permanece abierta a pesar de los resultados obtenidos en esta tesis, es la activación de la GSK3 β a través de la disminución en la fosforilación de la serina 21. Una posible explicación de éste fenómeno puede relacionarse con la capacidad de la A β de inhibir la vía de señalización de la PI3K; que está asociada a mecanismos de protección y que regula negativamente a la GSK3 (Takashima et al. 1996; Chen et al. 2009; Jimenez et al. 2011). La vía de la PI3K es la principal reguladora de la GSK3 a través de activación de la cinasa Akt, quién es la responsable directa de la fosforilación de las serina 9 de la GSK3 β (Cross et al. 1995; Shaw et al. 1997; van Weeren et al. 1998). Los datos experimentales de la tesis demostraron que la aplicación de la A β es capaz de inhibir esta vía ya que la forma activa de la Akt (fosforilada en la serina 473)(Brunet et al. 2001), se encuentra disminuida cuando se aplica la A β o (Fig. 40). Este dato sugiere que la activación de la GSK3 β por la disminución de las serinas puede estar mediada, en parte, por la inhibición de la vía de la PI3K. No obstante, si este mecanismo depende de la activación de las integrinas o de algún otro sistema de señalización está por determinarse. Otro punto importante que debe ser considerado es la propia defosforilación de las serinas. La inhibición de la vía de la PI3K solo indica que el proceso de adición de grupos fosfato a las serinas de la GSK3 β se detiene. Sin embargo, la remoción del fosfato requiere de la participación de enzimas con actividad catalítica de fosfatasa. Se sabe que la PP1, una fosfatasa de serinas/treoninas, es la responsable de la defosforilación de la GSK3 β (Hernandez et al. 2010). De hecho, existen reportes que demuestran que las integrinas interaccionan con la PP1 y pueden activarla a través de la asociación de la fosfatasa con el extremo carboxilo de la subunidad α de las integrinas (Vijayan et al. 2004; Mutz et al. 2006). De ésta manera, la activación de las integrinas por la A β puede promover una vía aberrante de señalización que sobreactiva a la GSK3 β por varias vías: al inhibir la vía de la PI3K y al reclutar a la PP1; disminuyendo así la fosforilación en serinas de la GSK3 β y, por otro lado, aumentando la fosforilación de tirosinas a través del complejo enzimático FAK/Fyn.

No obstante, es pertinente desarrollar los experimentos necesarios para demostrar que la PP1 participa en los eventos moleculares desencadenados por la A β y que finalmente inhiben la actividad espontánea del hipocampo.

Propuesta del mecanismo de activación de las cinasas FAK, Fyn y GSK3 β a través de la interacción de la A β con las Integrinas.

En este trabajo de tesis se demostró que la A β promueve una sobreactivación de la GSK3 β , que se manifiesta como una disminución de la pSer23 y aumento de la pTyr216. Así como la participación de las Integrinas y las cinasas de tirosinas FAK y Fyn tanto en el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo, cómo en la regulación de los patrones de fosforilación de la GSK3 β antes descritos. Una de las preguntas que se originan de los resultados obtenidos, es el mecanismo de activación de la GSK3 β a través de la activación de las integrinas y las cinasas FAK y Fyn. La hipótesis que se propone, en base a los resultados obtenidos y lo descrito en la literatura científica es la siguiente (Fig. 41). Una vez que las integrinas son activadas por la A β , ocurre un cambio conformacional en las integrinas que permite la interacción de su dominio citoplasmático y el dominio FARM de FAK. Esta interacción permite que FAK libere su dominio catalítico y se active a través de una autofosforilación en la tirosina 397. La cinasa Fyn, a través de su dominio SH2 interactúa con ésta tirosina formando un complejo enzimático y la interacción entre las cinasas libera el dominio catalítico de Fyn quién a su vez fosforila otras tirosinas de FAK aumentando su capacidad catalítica y su función como proteína de andamiaje (Schaller et al. 1994; Parsons y Parsons 2004; Lietha et al. 2007; Parsons et al. 2008). Posteriormente la GSK3 β interactúa con este complejo y fosforila a la serina 722 (pSer722) de FAK a través de un mecanismo dependiente de las integrinas. Se ha demostrado que esta activación ocurre de forma retardada con respecto a la fosforilación de las tirosinas (Bianchi et al. 2005). Debido a la formación del complejo enzimático FAK/Fyn, la interacción de la GSK3 β con FAK permite que las cinasa Fyn y GSK3 β se encuentren físicamente cercanas, de tal manera que éste mecanismo pudiese

regular la fosforilación de la tirosina 216 de GSK3 β por Fyn promoviendo así su sobreactivación.

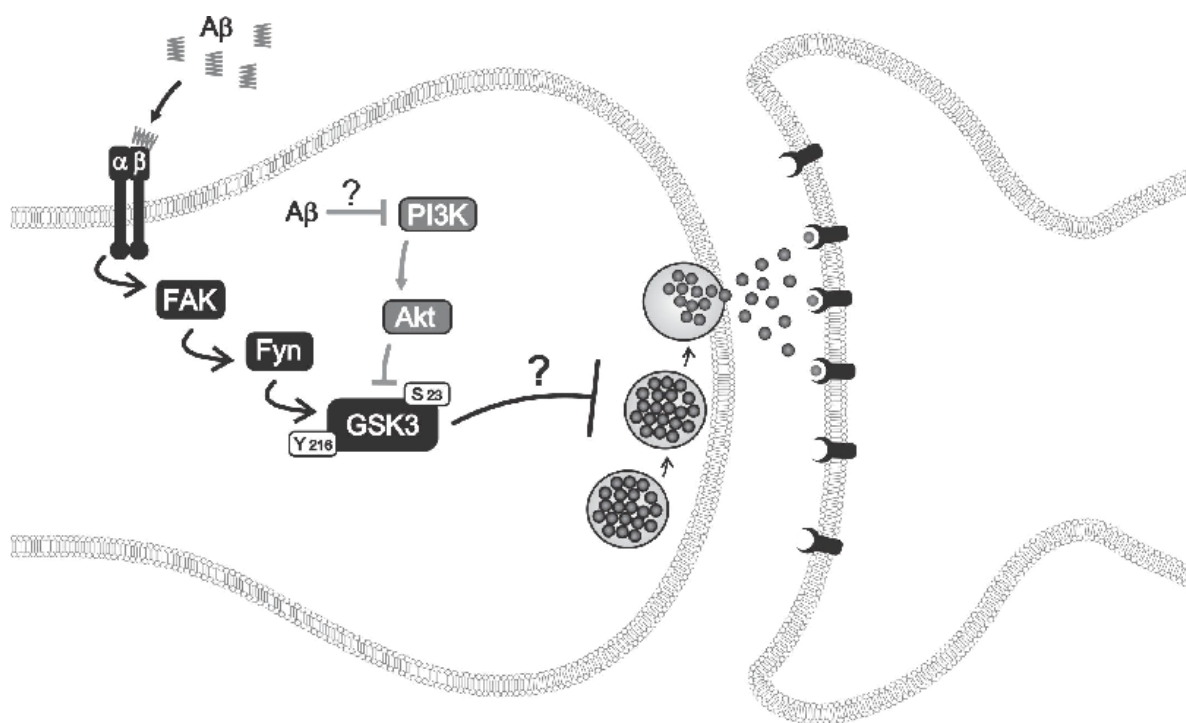


Figura 41 – Participación de la vía transduccional Integrinas/FAK/Fyn/GSK3 β en el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea poblacional del hipocampo. Esquema de la posible vía implicada en el efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea del hipocampo. La proteína beta amiloide activa a las integrinas, esta activación recluta inicialmente a la cinasa FAK y subsecuentemente a la cinasa Fyn formando un complejo enzimático. Posteriormente, la cinasa Fyn fosforila la tirosina 216 de la GSK3 β , cuyo efecto sería una activación de la cinasa. Adicionalmente, la A β es capaz de inhibir la vía de la PI3K/Akt y permite que la fosforilación en la serina 9 de la GSK3 β disminuya promoviendo así una sobreactivación de la enzima. El resultado final es la inhibición de la actividad espontánea en el hipocampo posiblemente alterando la transmisión sináptica a nivel de la presinapsis.

En conclusión, la A β promueve una sobreactivación de la GSK3 β , asociado a una inhibición de la actividad espontánea del hipocampo y este mecanismo además está regulado por la activación de las integrinas y subsecuentemente de las cinasas FAK y Fyn. La A β parece promover la activación de una vía aberrante a través de las integrinas, de manera que el constante incremento en la concentración de A β en los cerebros de pacientes con la EA podría promover una

sobre estimulación de ésta vía interfiriendo con la funcionalidad normal de la red neuronal del hipocampo y por lo tanto afectando procesos como la memoria y el aprendizaje. Es posible que al inhibir la actividad espontánea del hipocampo, la A β altera la generación de ciertos patrones oscilatorios asociados a procesos cognoscitivos que se sabe, están alterados en los pacientes con la EA.

8. CONCLUSION GENERAL

Los resultados más notables en esta tesis pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) La A β altera la actividad espontánea de la región CA1 de la red neuronal del hipocampo manifestándose como una inhibición generalizada de la misma. Dicha inhibición es reversible, específica y depende de la edad. Además, se manifiesta en concentraciones similares a las encontradas en los pacientes con EA.
- 2) La A β altera la dinámica de la red neuronal del hipocampo disminuyendo el número de estados funcionales de la red, generando un estado preferencial y altamente recurrente. La ausencia de la cinasa Fyn es suficiente para mantener la dinámica de la red en presencia de la A β .
- 3) El efecto inhibitorio de la A β sobre la actividad espontánea involucra la activación de una vía de señalización que involucra a las integrinas, las cinasas de tirosinas FAK y Fyn, así como a las cinasas de serinas/treoninas GSK3 β . La inhibición de la actividad espontánea del hipocampo está relacionada con una sobreactivación de la GSK3 β como resultado de la disminución en la pSer23 y el aumento en la pTyr216.

9. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abasolo, D., R. Hornero, et al. (2006a). "Entropy analysis of the EEG background activity in Alzheimer's disease patients." Physiol Meas **27**(3): 241-253.
- Abasolo, D., R. Hornero, et al. (2005). "Analysis of regularity in the EEG background activity of Alzheimer's disease patients with Approximate Entropy." Clin Neurophysiol **116**(8): 1826-1834.
- Abasolo, D., R. Hornero, et al. (2006b). "Analysis of EEG background activity in Alzheimer's disease patients with Lempel-Ziv complexity and central tendency measure." Med Eng Phys **28**(4): 315-322.
- Abatzoglou, I., P. Anninos, et al. (2007). "Nonlinear analysis of brain magnetoencephalographic activity in Alzheimer disease patients." Acta Neurol Belg **107**(2): 34-39.
- Abbi, S. y J. L. Guan (2002). "Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions." Histology and histopathology **17**: 1163-1171.
- Abbott, J. J., D. R. Howlett, et al. (2008). "Abeta(1-42) modulation of Akt phosphorylation via alpha7 nAChR and NMDA receptors." Neurobiol Aging **29**(7): 992-1001.
- Accardo, A., M. Affinito, et al. (1997). "Use of the fractal dimension for the analysis of electroencephalographic time series." Biol Cybern **77**(5): 339-350.
- Adaya-Villanueva, A., B. Ordaz, et al. (2010). "Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides." Peptides **31**(9): 1761-1766.
- Adler, G., S. Brassen, et al. (2003). "EEG coherence in Alzheimer's dementia." J Neural Transm **110**(9): 1051-1058.
- Aguzzi, A. y T. O'Connor (2010). "Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives." Nat Rev Drug Discov **9**(3): 237-248.
- Akiyama, H., T. Kawamata, et al. (1991). "Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue." J Neuroimmunol **32**(1): 19-28.
- Alvarado-Martinez, R., K. Salgado-Puga, et al. (2013). "Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell." PLoS ONE **8**(9): e75745.
- Alvarez, G., J. R. Munoz-Montano, et al. (1999). "Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration." FEBS Lett **453**(3): 260-264.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, et al. (1995). "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." Clin Anat **8**(6): 429-431.
- Amaral, D. y P. Lavenex (2007). Hippocampal Neuroanatomy. The Hippocampus Book. R. M. Per Andersen, David Amaral, Tim Bliss and John O'Keefe. New York, USA., Oxford University Press, Inc.: 37-110.
- Amaral, D. G. (1993). "Emerging principles of intrinsic hippocampal organization." Curr Opin Neurobiol **3**(2): 225-229.
- Amaral, D. G., C. Dolorfo, et al. (1991). "Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat." Hippocampus **1**(4): 415-435.
- Anderson, K. L. y A. Ferreira (2004). "alpha1 Integrin activation: a link between beta-amyloid deposition and neuronal death in aging hippocampal neurons." J Neurosci Res **75**(5): 688-697.
- Apostolova, L. G., G. G. Akopyan, et al. (2007). "Structural correlates of apathy in Alzheimer's disease." Dement Geriatr Cogn Disord **24**(2): 91-97.
- Araki, T., H. Kato, et al. (1997). "Age-related changes in [3H]nimodipine and [3H]rolipram binding in the rat brain." J Pharm Pharmacol **49**(3): 310-314.

- Arcangeli, A. y A. Becchetti (2006). "Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels." Trends in cell biology **16**: 631-639.
- Arcangeli, A., A. Becchetti, et al. (1993). "Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels." J Cell Biol **122**(5): 1131-1143.
- Ardiles, A. O., C. C. Tapia-Rojas, et al. (2012). "Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(34): 13835-13840.
- Arnaiz, E. y O. Almkvist (2003). "Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand Suppl **179**: 34-41.
- Artieda, J., M. Alegre, et al. (2009). "Brain oscillations: pathophysiological and therapeutic role in some neurological and psychiatric diseases." An. Sist. Sanit. Navar. **32**(Supl. 3): 45-60.
- Axmacher, N., F. Mormann, et al. (2006). "Memory formation by neuronal synchronization." Brain Res Rev **52**(1): 170-182.
- Babiloni, C., L. Benussi, et al. (2006a). "Apolipoprotein E and alpha brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric electroencephalogram study." Ann Neurol **59**(2): 323-334.
- Babiloni, C., G. Binetti, et al. (2004). "Mapping distributed sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease. A multicentric EEG study." Neuroimage **22**(1): 57-67.
- Babiloni, C., R. Ferri, et al. (2006b). "Fronto-parietal coupling of brain rhythms in mild cognitive impairment: a multicentric EEG study." Brain Res Bull **69**(1): 63-73.
- Babiloni, C., G. B. Frisoni, et al. (2009). "Hippocampal volume and cortical sources of EEG alpha rhythms in mild cognitive impairment and Alzheimer disease." Neuroimage **44**(1): 123-135.
- Backman, L., S. Jones, et al. (2004). "Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease." J Intern Med **256**(3): 195-204.
- Backman, L., S. Jones, et al. (2005). "Cognitive impairment in preclinical Alzheimer's disease: a meta-analysis." Neuropsychology **19**(4): 520-531.
- Bach, M. E., M. Barad, et al. (1999). "Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5280-5285.
- Baek, S. H., K. A. Ohgi, et al. (2002). "Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein." Cell **110**(1): 55-67.
- Baks-Te Bulte, L., F. G. Wouterlood, et al. (2005). "Entorhinal projections terminate onto principal neurons and interneurons in the subiculum: a quantitative electron microscopical analysis in the rat." Neuroscience **136**(3): 729-739.
- Balaraman, Y., A. R. Limaye, et al. (2006). "Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance." Cell Mol Life Sci **63**(11): 1226-1235.
- Balleza-Tapia, H., A. Huanosta-Gutierrez, et al. (2010). "Amyloid beta oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner." Curr Alzheimer Res **7**(5): 453-462.
- Balleza-Tapia, H. y F. Pena (2009). "Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein." Mini Rev Med Chem **9**(6): 724-740.
- Balleza-Tapia, H. y F. Peña (2009). "Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein." Mini Rev Med Chem **9**(6): 724-740.
- Bamberger, M. E., M. E. Harris, et al. (2003). "A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation." J Neurosci **23**(7): 2665-2674.
- Barnes, C. A., G. Rao, et al. (2000). "Age-related decrease in the Schaffer collateral-evoked EPSP in awake, freely behaving rats." Neural Plast **7**(3): 167-178.

- Barral, S., T. Bird, et al. (2012). "Genotype patterns at PICALM, CR1, BIN1, CLU, and APOE genes are associated with episodic memory." Neurology **78**(19): 1464-1471.
- Basar, E. (2013). "Brain oscillations in neuropsychiatric disease." Dialogues Clin Neurosci **15**(3): 291-300.
- Battaglia, F. P., K. Benchenane, et al. (2011). "The hippocampus: hub of brain network communication for memory." Trends Cogn Sci **15**(7): 310-318.
- Becchetti, A., A. Arcangeli, et al. (1992). "Response to fibronectin-integrin interaction in leukaemia cells: delayed enhancing of a K⁺ current." Proc Biol Sci **248**(1323): 235-240.
- Beggs, H. E., S. C. Baragona, et al. (1997). "NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn)." J Biol Chem **272**(13): 8310-8319.
- Bennys, K., G. Rondouin, et al. (2001). "Diagnostic value of quantitative EEG in Alzheimer's disease." Neurophysiol Clin **31**(3): 153-160.
- Benson, D. L., L. M. Schnapp, et al. (2000). "Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity." Trends in cell biology **10**: 473-482.
- Berendse, H. W., J. P. Verbunt, et al. (2000). "Magnetoencephalographic analysis of cortical activity in Alzheimer's disease: a pilot study." Clin Neurophysiol **111**(4): 604-612.
- Berg, M. M., G. A. Krafft, et al. (1997). "Rapid impact of beta-amyloid on paxillin in a neural cell line." J Neurosci Res **50**(6): 979-989.
- Bernard-Trifilo, J. a., E. a. Kramár, et al. (2005). "Integrin signaling cascades are operational in adult hippocampal synapses and modulate NMDA receptor physiology." Journal of neurochemistry **93**: 834-849.
- Bertrand, O. y C. Tallon-Baudry (2000). "Oscillatory gamma activity in humans: a possible role for object representation." Int J Psychophysiol **38**(3): 211-223.
- Besga, A., L. Ortiz, et al. (2010). "Structural and functional patterns in healthy aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **24**(1): 1-10.
- Besthorn, C., H. Forstl, et al. (1994). "EEG coherence in Alzheimer disease." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **90**(3): 242-245.
- Besthorn, C., H. Sattel, et al. (1995). "Parameters of EEG dimensional complexity in Alzheimer's disease." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **95**(2): 84-89.
- Bhat, R. V., J. Shanley, et al. (2000). "Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11074-11079.
- Bianchi, M., S. De Lucchini, et al. (2005). "Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation and kinase activity by GSK3 and PP1 during cell spreading and migration." Biochem J **391**(Pt 2): 359-370.
- Bijur, G. N. y R. S. Jope (2001). "Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β ." J Biol Chem **276**(40): 37436-37442.
- Binder, L. I., A. Frankfurter, et al. (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." J Cell Biol **101**(4): 1371-1378.
- Bitan, G., M. D. Kirkitadze, et al. (2003a). "Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 330-335.
- Bitan, G., S. S. Vollers, et al. (2003b). "Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid β -protein oligomerization." J Biol Chem **278**(37): 34882-34889.
- Blalock, E. M., J. W. Geddes, et al. (2004). "Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2173-2178.
- Bland, B. H. y L. V. Colom (1993). "Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex." Prog Neurobiol **41**(2): 157-208.

- Bland, B. H., S. D. Oddie, et al. (1999). "Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation." J Neurosci **19**(8): 3223-3237.
- Blennow, K., M. J. de Leon, et al. (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.
- Bohme, G. A., C. Bon, et al. (1991). "Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation." Eur J Pharmacol **199**(3): 379-381.
- Bon, C., G. A. Bohme, et al. (1992). "A Role for Nitric Oxide in Long-term Potentiation." Eur J Neurosci **4**(5): 420-424.
- Bon, C. L. y J. Garthwaite (2001). "Nitric oxide-induced potentiation of CA1 hippocampal synaptic transmission during baseline stimulation is strictly frequency-dependent." Neuropharmacology **40**(4): 501-507.
- Bowen, J. D., A. D. Malter, et al. (1996). "Predictors of mortality in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease." Neurology **47**(2): 433-439.
- Bozzo, C., G. Lombardi, et al. (2004). "Involvement of beta(1) integrin in betaAP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells." Mol Cell Neurosci **25**(1): 1-8.
- Braak, H., E. Braak, et al. (1993). "Staging of Alzheimer-related cortical destruction." Eur Neurol **33**(6): 403-408.
- Bracco, L., R. Gallato, et al. (1994). "Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study." Arch Neurol **51**(12): 1213-1219.
- Brenner, R. P., R. F. Ulrich, et al. (1986). "Computerized EEG spectral analysis in elderly normal, demented and depressed subjects." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **64**(6): 483-492.
- Brookmeyer, R., S. Gray, et al. (1998). "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset." Am J Public Health **88**(9): 1337-1342.
- Brookmeyer, R., E. Johnson, et al. (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **3**(3): 186-191.
- Brown, E. J. y W. A. Frazier (2001). "Integrin-associated protein (CD47) and its ligands." Trends Cell Biol **11**(3): 130-135.
- Brown, J. T., J. C. Richardson, et al. (2005a). "Synaptic transmission and synchronous activity is disrupted in hippocampal slices taken from aged TAS10 mice." Hippocampus **15**(1): 110-117.
- Brown, M. C. y C. E. Turner (2004). "Paxillin: adapting to change." Physiol Rev **84**(4): 1315-1339.
- Brown, P. (2006). "Bad oscillations in Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl **70**: 27-30.
- Brown, S. L., J. Joseph, et al. (2005b). "Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation." Nat Neurosci **8**(11): 1568-1576.
- Brunet, A., S. R. Datta, et al. (2001). "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 297-305.
- Buchan, R. J., K. Nagata, et al. (1997). "Regional correlations between the EEG and oxygen metabolism in dementia of Alzheimer's type." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **103**(3): 409-417.
- Burgaya, F., A. Menegon, et al. (1995). "Focal adhesion kinase in rat central nervous system." Eur J Neurosci **7**(8): 1810-1821.
- Burns, A., R. Jacoby, et al. (1990). "Behavioral abnormalities and psychiatric symptoms in Alzheimer's disease: preliminary findings." Int Psychogeriatr **2**(1): 25-36.
- Burns, A., G. Lewis, et al. (1991). "Factors affecting survival in Alzheimer's disease." Psychol Med **21**(2): 363-370.
- Busciglio, J., J. K. Andersen, et al. (1998). "Stress, aging, and neurodegenerative disorders. Molecular mechanisms." Ann N Y Acad Sci **851**: 429-443.

- Busche, M. A., X. Chen, et al. (2012). "Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(22): 8740-8745.
- Busche, M. A., G. Eichhoff, et al. (2008). "Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." Science **321**(5896): 1686-1689.
- Buzsáki, G. (2006). Rhythms of the brain. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Buzsaki, G., C. A. Anastassiou, et al. (2012). "The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes." Nat Rev Neurosci **13**(6): 407-420.
- Buzsaki, G. y A. Draguhn (2004). "Neuronal oscillations in cortical networks." Science **304**(5679): 1926-1929.
- Caille, I., B. Allinquant, et al. (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." Development **131**(9): 2173-2181.
- Calixto, E., A. M. Lopez-Colome, et al. (2000). "Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro." Epilepsy Res **39**(1): 13-26.
- Caltagarone, J., Z. Jing, et al. (2007). "Focal adhesions regulate Abeta signaling and cell death in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1772**(4): 438-445.
- Campbell, I. D. y M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." Cold Spring Harbor perspectives in biology **3**.
- Caporaso, G. L., K. Takei, et al. (1994). "Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3122-3138.
- Carlesimo, G. A. y M. Oscar-Berman (1992). "Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review." Neuropsychol Rev **3**(2): 119-169.
- Carrillo-Reid, L. (2008). *Estados funcionales en el disparo de las neuronas neocorticales*. Instituto de Fisiología Celular. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Tesis de Doctorado**: 156.
- Carrillo-Reid, L., F. Tecuapetla, et al. (2008). "Encoding network states by striatal cell assemblies." J Neurophysiol **99**(3): 1435-1450.
- Casasola, C., J. Vargas, et al. (2001). "Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA(A) receptors." Epilepsy Res **47**(3): 257-271.
- Casasola, C., T. Montiel, et al. (2004). "Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation." Neuroscience **126**(1): 163-171.
- Claiborne, B. J., D. G. Amaral, et al. (1986). "A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus." J Comp Neurol **246**(4): 435-458.
- Claus, J. J., V. I. Kwa, et al. (1998). "Slowing on quantitative spectral EEG is a marker for rate of subsequent cognitive and functional decline in early Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **12**(3): 167-174.
- Claus, J. J., B. W. Ongerboer De Visser, et al. (2000). "Determinants of quantitative spectral electroencephalography in early Alzheimer's disease: cognitive function, regional cerebral blood flow, and computed tomography." Dement Geriatr Cogn Disord **11**(2): 81-89.
- Coben, L. A., W. Danziger, et al. (1985). "A longitudinal EEG study of mild senile dementia of Alzheimer type: changes at 1 year and at 2.5 years." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **61**(2): 101-112.
- Coghlan, M. P., A. A. Culbert, et al. (2000). "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription." Chem Biol **7**(10): 793-803.
- Colognato, H., S. Ramachandrapa, et al. (2004). "Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development." J Cell Biol **167**(2): 365-375.

- Colom, L. V., M. T. Castaneda, et al. (2010). "Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function." Neurobiol Aging **31**(1): 46-57.
- Comi, G. C., C. Fornara, et al. (1998). "EEG coherence in alzheimer and multi-infarct dementia " Archives of Gerontology and Geriatrics **26**: 91-98.
- Corbett, B. F., S. C. Leiser, et al. (2013). "Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci **33**(16): 7020-7026.
- Corder, E. H., L. Lannfelt, et al. (1998). "The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias." Cell Mol Life Sci **54**(9): 928-934.
- Costantini, C., V. Della-Bianca, et al. (2005a). "The expression of p75 neurotrophin receptor protects against the neurotoxicity of soluble oligomers of beta-amyloid." Exp Cell Res **311**(1): 126-134.
- Costantini, C., F. Rossi, et al. (2005b). "Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death." J Mol Neurosci **25**(2): 141-156.
- Cowburn, R. F., B. Wiehager, et al. (1997). "Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor." Neurochem Res **22**(12): 1437-1442.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-789.
- Cross, D. A., A. A. Culbert, et al. (2001). "Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death." J Neurochem **77**(1): 94-102.
- Cullen, W. K., Y. H. Suh, et al. (1997). "Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments." Neuroreport **8**(15): 3213-3217.
- Cullen, W. K., J. Wu, et al. (1996). "beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus." Neuroreport **8**(1): 87-92.
- Czigler, B., D. Csikos, et al. (2008). "Quantitative EEG in early Alzheimer's disease patients - power spectrum and complexity features." Int J Psychophysiol **68**(1): 75-80.
- Chan, C.-s., J. M. Levenson, et al. (2006). "α3-Integrins are required for hippocampal long-term potentiation and working memory." 606-615.
- Chan, C.-S., E. J. Weeber, et al. (2003a). "Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **23**: 7107-7116.
- Chan, C. S., E. J. Weeber, et al. (2003b). "Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory." J Neurosci **23**(18): 7107-7116.
- Chan, R. C., D. Shum, et al. (2008). "Assessment of executive functions: review of instruments and identification of critical issues." Arch Clin Neuropsychol **23**(2): 201-216.
- Chang, H. P., F. P. Lindberg, et al. (1999). "Impaired memory retention and decreased long-term potentiation in integrin-associated protein-deficient mice." Learn Mem **6**(5): 448-457.
- Chang, H. P., Y. L. Ma, et al. (2001). "Functional blocking of integrin-associated protein impairs memory retention and decreases glutamate release from the hippocampus." Neuroscience **102**(2): 289-296.
- Chapman, J., A. D. Korczyn, et al. (2001). "The effects of APOE genotype on age at onset and progression of neurodegenerative diseases." Neurology **57**(8): 1482-1485.
- Chartier-Harlin, M. C., F. Crawford, et al. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene." Nature **353**(6347): 844-846.

- Checler, F., C. Sunyach, et al. (2007). "The gamma/epsilon-secretase-derived APP intracellular domain fragments regulate p53." Curr Alzheimer Res **4**(4): 423-426.
- Chen, Q. S., W. Z. Wei, et al. (2002). "Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus." Neurobiol Learn Mem **77**(3): 354-371.
- Chen, T. J., D. C. Wang, et al. (2009). "Amyloid-beta interrupts the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway that could be involved in brain-derived neurotrophic factor-induced Arc expression in rat cortical neurons." J Neurosci Res **87**(10): 2297-2307.
- Chiaramonti, R., G. C. Muscas, et al. (1997). "Correlations of topographical EEG features with clinical severity in mild and moderate dementia of Alzheimer type." Neuropsychobiology **36**(3): 153-158.
- Chin, J., J. J. Palop, et al. (2005). "Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **25**: 9694-9703.
- Chin, J., J. J. Palop, et al. (2004a). "Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice." J Neurosci **24**(19): 4692-4697.
- Chin, J., J. J. Palop, et al. (2004b). "Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice." J Neurosci **24**(19): 4692-4697.
- Chong, Y. H., Y. J. Shin, et al. (2006). "ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures." J Biol Chem **281**(29): 20315-20325.
- Chromy, B. A., R. J. Nowak, et al. (2003). "Self-assembly of Abeta(1-42) into globular neurotoxins." Biochemistry **42**(44): 12749-12760.
- Dajani, R., E. Fraser, et al. (2001). "Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition." Cell **105**(6): 721-732.
- Davis, M. J., X. Wu, et al. (2002). "Regulation of ion channels by integrins." Cell Biochem Biophys **36**(1): 41-66.
- De Felice, F. G., P. T. Velasco, et al. (2007). "Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." J Biol Chem **282**(15): 11590-11601.
- de Haan, W., C. J. Stam, et al. (2008). "Resting-state oscillatory brain dynamics in Alzheimer disease." J Clin Neurophysiol **25**(4): 187-193.
- de Toledo Ferraz Alves, T. C., L. K. Ferreira, et al. (2010). "Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **20**(3): 749-763.
- Delbeuck, X., M. Van der Linden, et al. (2003). "Alzheimer's disease as a disconnection syndrome?" Neuropsychol Rev **13**(2): 79-92.
- Denda, S. y L. F. Reichardt (2007). "Studies on integrins in the nervous system." Methods Enzymol **426**: 203-221.
- Deshpande, A., E. Mina, et al. (2006). "Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons." J Neurosci **26**(22): 6011-6018.
- Destexhe, A. y T. J. Sejnowski (2003). "Interactions between membrane conductances underlying thalamocortical slow-wave oscillations." Physiol Rev **83**(4): 1401-1453.
- Detera-Wadleigh, S. D. (2001). "Lithium-related genetics of bipolar disorder." Ann Med **33**(4): 272-285.

- Dierks, T., R. Ihl, et al. (1993). "Dementia of the Alzheimer type: effects on the spontaneous EEG described by dipole sources." Psychiatry Res **50**(3): 151-162.
- Dineley, K. T. (2007). "Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease." Front Biosci **12**: 5030-5038.
- Dineley, K. T., K. A. Bell, et al. (2002). "beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **277**(28): 25056-25061.
- Dineley, K. T., M. Westerman, et al. (2001). "Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(12): 4125-4133.
- Dityatev, A., R. Frischknecht, et al. (2006). "Extracellular matrix and synaptic functions." Results and problems in cell differentiation **43**: 69-97.
- Doble, B. W. y J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1175-1186.
- Doherty, P., S. V. Ashton, et al. (1991). "Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels." Cell **67**(1): 21-33.
- Domingues, A., S. Almeida, et al. (2007). "Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits." Neurochem Int **50**(6): 872-880.
- Doolette, D. J. y D. I. Kerr (1995). "Hyperexcitability in CA1 of the rat hippocampal slice following hypoxia or adenosine." Brain Res **677**(1): 127-137.
- Doraiswamy, P. M., D. C. Steffens, et al. (1998). "Early recognition of Alzheimer's disease: what is consensual? What is controversial? What is practical?" J Clin Psychiatry **59 Suppl 13**: 6-18.
- Drdla, R., M. Gassner, et al. (2009). "Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal." Science **325**(5937): 207-210.
- Drechsel, D. N., A. A. Hyman, et al. (1992). "Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau." Mol Biol Cell **3**(10): 1141-1154.
- Driver, J. E., C. Racca, et al. (2007). "Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP)." Eur J Neurosci **26**(5): 1280-1288.
- Duffy, F. H., M. S. Albert, et al. (1984). "Brain electrical activity in patients with presenile and senile dementia of the Alzheimer type." Ann Neurol **16**(4): 439-448.
- Dunkin, J. J., A. F. Leuchter, et al. (1994). "Reduced EEG coherence in dementia: state or trait marker?" Biol Psychiatry **35**(11): 870-879.
- Dunkin, J. J., S. Osato, et al. (1995). "Relationships between EEG coherence and neuropsychological tests in dementia." Clin Electroencephalogr **26**(1): 47-59.
- Eikelenboom, P., S. S. Zhan, et al. (1994). "Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease." Virchows Arch **424**(4): 421-427.
- Elmstahl, S., I. Rosen, et al. (1994). "Quantitative EEG in elderly patients with Alzheimer's disease and healthy controls." Dementia **5**(2): 119-124.
- Embi, N., D. B. Rylatt, et al. (1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase." Eur J Biochem **107**(2): 519-527.
- Engel, A. K., P. Fries, et al. (2001). "Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing." Nat Rev Neurosci **2**(10): 704-716.

- Farrer, L. A., L. A. Cupples, et al. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." JAMA **278**(16): 1349-1356.
- Fell, J., P. Klaver, et al. (2001). "Human memory formation is accompanied by rhinal-hippocampal coupling and decoupling." Nat Neurosci **4**(12): 1259-1264.
- Fernandez, A., J. Arrazola, et al. (2003). "Correlations of hippocampal atrophy and focal low-frequency magnetic activity in Alzheimer disease: volumetric MR imaging-magnetoencephalographic study." AJNR Am J Neuroradiol **24**(3): 481-487.
- Fernandez, A., R. Hornero, et al. (2006). "Quantitative magnetoencephalography of spontaneous brain activity in Alzheimer disease: an exhaustive frequency analysis." Alzheimer Dis Assoc Disord **20**(3): 153-159.
- Fernandez, A., F. Maestu, et al. (2002). "Focal temporoparietal slow activity in Alzheimer's disease revealed by magnetoencephalography." Biol Psychiatry **52**(7): 764-770.
- Filipovic, S., B. Gueguen, et al. (1989). "Dementia of the Alzheimer type: some features of the posterior cerebral electrical activity." Psychiatry Res **29**(3): 409-410.
- Fingelkurts, A. A., H. Rytala, et al. (2006). "Composition of brain oscillations in ongoing EEG during major depression disorder." Neurosci Res **56**(2): 133-144.
- Fiol, C. J., J. H. Haseman, et al. (1988). "Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1." Arch Biochem Biophys **267**(2): 797-802.
- Fiol, C. J., A. Wang, et al. (1990). "Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates." J Biol Chem **265**(11): 6061-6065.
- Fitzjohn, S. M., R. A. Morton, et al. (2001). "Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein." J Neurosci **21**(13): 4691-4698.
- Flicker, C., S. H. Ferris, et al. (1991). "Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia." Neurology **41**(7): 1006-1009.
- Flotow, H., P. R. Graves, et al. (1990). "Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action." J Biol Chem **265**(24): 14264-14269.
- Force, T. y J. R. Woodgett (2009). "Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development." J Biol Chem **284**(15): 9643-9647.
- Forstl, H. y A. Kurz (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **249**(6): 288-290.
- Franciotti, R., D. Iacono, et al. (2006). "Cortical rhythms reactivity in AD, LBD and normal subjects: a quantitative MEG study." Neurobiol Aging **27**(8): 1100-1109.
- Frank, E. M. (1994). "Effect of Alzheimer's disease on communication function." J S C Med Assoc **90**(9): 417-423.
- Frasca, G., V. Carbonaro, et al. (2008). "Integrins mediate beta-amyloid-induced cell-cycle activation and neuronal death." J Neurosci Res **86**(2): 350-355.
- Fries, P., J. H. Reynolds, et al. (2001). "Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention." Science **291**(5508): 1560-1563.
- Fu, G., W. Wang, et al. (2012). "Overview: structural biology of integrins." Methods Mol Biol **757**: 81-99.
- Fujisawa, S., N. Matsuki, et al. (2006). "Single neurons can induce phase transitions of cortical recurrent networks with multiple internal States." Cereb Cortex **16**(5): 639-654.

- Furukawa, K., B. L. Sopher, et al. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." J Neurochem **67**(5): 1882-1896.
- Gall, C. M. y G. Lynch (2004a). "Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis." Adv Exp Med Biol **548**: 12-33.
- Gall, C. M. y G. Lynch (2004b). "Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis." Advances in experimental medicine and biology **548**: 12-33.
- Gall, C. M., J. K. Pinkstaff, et al. (2003). "Integrins regulate neuronal neurotrophin gene expression through effects on voltage-sensitive calcium channels." Neuroscience **118**: 925-940.
- Gallinat, J., G. Winterer, et al. (2004). "Reduced oscillatory gamma-band responses in unmedicated schizophrenic patients indicate impaired frontal network processing." Clin Neurophysiol **115**(8): 1863-1874.
- Galluzzi, S., L. Cimaschi, et al. (2001). "Mild cognitive impairment: clinical features and review of screening instruments." Aging (Milano) **13**(3): 183-202.
- Gan, Z. R., R. J. Gould, et al. (1988). "Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*." J Biol Chem **263**(36): 19827-19832.
- Garcia-Ugalde, G., E. Galarraga, et al. (1992). "Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal." Neurosci Lett **147**(2): 229-232.
- Garsky, V. M., P. K. Lumma, et al. (1989). "Chemical synthesis of echistatin, a potent inhibitor of platelet aggregation from *Echis carinatus*: synthesis and biological activity of selected analogs." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(11): 4022-4026.
- Gauen, L. K., Y. Zhu, et al. (1994). "Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif." Mol Cell Biol **14**(6): 3729-3741.
- Gerrow, K. y A. El-Husseini (2006). "Cell adhesion molecules at the synapse." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **11**: 2400-2419.
- Gevens, A., M. E. Smith, et al. (1997). "High-resolution EEG mapping of cortical activation related to working memory: effects of task difficulty, type of processing, and practice." Cereb Cortex **7**(4): 374-385.
- Ghiso, J., A. Rostagno, et al. (1992). "A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion." Biochem J **288** (Pt 3): 1053-1059.
- Giacchino, J., J. R. Criado, et al. (2000). "In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice." Brain Res **876**(1-2): 185-190.
- Giancotti, F. G. y E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-1032.
- Giannitrapani, D., J. Collins, et al. (1991). "The EEG spectra of Alzheimer's disease." Int J Psychophysiol **10**(3): 259-269.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.
- Goedert, M. y M. G. Spillantini (2006). "A century of Alzheimer's disease." Science **314**(5800): 777-781.
- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2007a). "Analysis of MEG recordings from Alzheimer's disease patients with sample and multiscale entropies." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2007**: 6184-6187.
- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2007b). "Analysis of the magnetoencephalogram background activity in Alzheimer's disease patients with auto-mutual information." Comput Methods Programs Biomed **87**(3): 239-247.
- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2009a). "Analysis of MEG background activity in Alzheimer's disease using nonlinear methods and ANFIS." Ann Biomed Eng **37**(3): 586-594.

- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2006a). "Complexity analysis of the magnetoencephalogram background activity in Alzheimer's disease patients." Med Eng Phys **28**(9): 851-859.
- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2005). "Decreased Lempel-Ziv complexity in Alzheimer's disease patients' magnetoencephalograms." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **5**: 4514-4517.
- Gomez, C., R. Hornero, et al. (2006b). "Magnetoencephalogram background activity analysis in Alzheimer's disease patients using auto mutual information." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **1**: 6181-6184.
- Gomez, C., A. Mediavilla, et al. (2009b). "Use of the Higuchi's fractal dimension for the analysis of MEG recordings from Alzheimer's disease patients." Med Eng Phys **31**(3): 306-313.
- Gong, Y., L. Chang, et al. (2003). "Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10417-10422.
- Gortz, P., J. Opatz, et al. (2009). "Transient reduction of spontaneous neuronal network activity by sublethal amyloid beta (1-42) peptide concentrations." J Neural Transm **116**(3): 351-355.
- Gould, T. D. y H. K. Manji (2002). "The Wnt signaling pathway in bipolar disorder." Neuroscientist **8**(5): 497-511.
- Goutagny, R. y S. Krantic (2013). "Hippocampal oscillatory activity in Alzheimer's disease: toward the identification of early biomarkers?" Aging Dis **4**(3): 134-140.
- Grace, E. A. y J. Busciglio (2003). "Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid beta-induced neuronal dystrophy." J Neurosci **23**(2): 493-502.
- Grant, S. G., K. A. Karl, et al. (1995). "Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice." Genes Dev **9**(15): 1909-1921.
- Grant, S. G., T. J. O'Dell, et al. (1992). "Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice." Science **258**(5090): 1903-1910.
- Gray, C. M., P. Konig, et al. (1989). "Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties." Nature **338**(6213): 334-337.
- Greenfield, J. P., J. Tsai, et al. (1999). "Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 742-747.
- Greenstein, Y. J., C. Pavlides, et al. (1988). "Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity." Brain Res **438**(1-2): 331-334.
- Gregory, G. C., C. E. Shepherd, et al. (2007). Physiologic and Neurotoxic Properties of AβPeptides. Abeta Peptide and Alzheimer's Disease Celebrating a Century of Research. C. J. B. D. H. Small, Springer London: 179-197
- Grienberger, C., N. L. Rochefort, et al. (2012). "Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease." Nat Commun **3**: 774.
- Grimes, C. A. y R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." Prog Neurobiol **65**(4): 391-426.
- Grotewiel, M. S., C. D. O. Beck, et al. (1998). "memory in Drosophila." **391**: 455-460.
- Guderian, S., B. H. Schott, et al. (2009). "Medial temporal theta state before an event predicts episodic encoding success in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5365-5370.
- Gueguen, B., C. Derouesne, et al. (1991). "[Quantified EEG in the diagnosis of Alzheimer's type dementia]." Neurophysiol Clin **21**(5-6): 357-371.
- Guerra-López, R. (2005). "La familia y su futuro en México

" FORO «MÉXICO MÁS ALLÁ DEL 2006» FUNDACIÓN RAFAEL PRECIADO HERNÁNDEZ A.C. KONRAD ADENAUER STIFTUNG

- Guerreiro, R., A. Wojtas, et al. (2012). "TREM2 Variants in Alzheimer's Disease." N Engl J Med.
- Gutierrez-Lerma, A. I., B. Ordaz, et al. (2013). "Amyloid Beta peptides differentially affect hippocampal theta rhythms in vitro." Int J Pept **2013**: 328140.
- Haass, C., A. Y. Hung, et al. (1993a). "Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules." Ann N Y Acad Sci **695**: 109-116.
- Haass, C., A. Y. Hung, et al. (1993b). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." J Biol Chem **268**(5): 3021-3024.
- Haass, C. y D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.
- Harold, D., R. Abraham, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1088-1093.
- Harris, J. A., N. Devidze, et al. (2010). "Transsynaptic progression of amyloid-beta-induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network." Neuron **68**(3): 428-441.
- Harte, M. T., J. D. Hildebrand, et al. (1996). "p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase." J Biol Chem **271**(23): 13649-13655.
- Hartley, D. M., D. M. Walsh, et al. (1999). "Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons." J Neurosci **19**(20): 8876-8884.
- Hartmann, T., S. C. Bieger, et al. (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides." Nat Med **3**(9): 1016-1020.
- Hashimoto, Y., Y. Kaneko, et al. (2004). "Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD." J Neurochem **90**(3): 549-558.
- Hayashi, I., K. Vuori, et al. (2002). "The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin." Nat Struct Biol **9**(2): 101-106.
- Hazra, A., F. Gu, et al. (2013). "Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease." PLoS ONE **8**(5): e64318.
- Henriksen, E. J. y B. B. Dokken (2006). "Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes." Curr Drug Targets **7**(11): 1435-1441.
- Henriksen, E. J., T. R. Kinnick, et al. (2003). "Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(5): E892-900.
- Hermann, D., M. Both, et al. (2009). "Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes." Neuroscience **162**(4): 1081-1090.
- Hernandez, F., J. Borrell, et al. (2002). "Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments." J Neurochem **83**(6): 1529-1533.
- Hernandez, F., E. Langa, et al. (2010). "Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A." Mol Cell Biochem **344**(1-2): 211-215.
- Hernandez, P., G. Lee, et al. (2009). "Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide Abeta (25-35): involvement of lipid rafts." J Alzheimers Dis **16**(1): 149-156.
- Herrmann, C. S. y T. Demiralp (2005). "Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders." Clin Neurophysiol **116**(12): 2719-2733.

- Heyman, A., W. E. Wilkinson, et al. (1987). "Early-onset Alzheimer's disease: clinical predictors of institutionalization and death." Neurology **37**(6): 980-984.
- Ho, G. J., M. Hashimoto, et al. (2005a). "Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role." Neurobiol Aging **26**(5): 625-635.
- Ho, G. J., M. Hashimoto, et al. (2005b). "Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role." Neurobiology of aging **26**: 625-635.
- Hoffman, K. B. (1998). "The relationship between adhesion molecules and neuronal plasticity." Cellular and molecular neurobiology **18**: 461-475.
- Holmes, C. (2002). "Genotype and phenotype in Alzheimer's disease." Br J Psychiatry **180**: 131-134.
- Holscher, C. (2011). "Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease." Biochem Soc Trans **39**(4): 891-897.
- Holschneider, D. P. y A. F. Leuchter (1995). "Beta activity in aging and dementia." Brain Topogr **8**(2): 169-180.
- Hooijer, C., C. Jonker, et al. (1990). "Reliability, validity and follow-up of the EEG in senile dementia: sequelae of sequential measurement." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **76**(5): 400-412.
- Hooper, C., R. Killick, et al. (2008). "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease." J Neurochem **104**(6): 1433-1439.
- Hooper, C., V. Markevich, et al. (2007). "Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation." Eur J Neurosci **25**(1): 81-86.
- Howard, M. W., D. S. Rizzuto, et al. (2003). "Gamma oscillations correlate with working memory load in humans." Cereb Cortex **13**(12): 1369-1374.
- Hsia, A. Y., E. Masliah, et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3228-3233.
- Hsieh, L. T. y C. Ranganath (2014). "Frontal midline theta oscillations during working memory maintenance and episodic encoding and retrieval." Neuroimage **85 Pt 2**: 721-729.
- Hu, X., E. Pickering, et al. (2011a). "Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease." PLoS One **6**(2): e16616.
- Hu, X., L. Wei, et al. (2011b). "Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2.1 channel and FAK activation." American journal of physiology. Cell physiology **301**: C362-372.
- Huang, A. M., H. L. Wang, et al. (1998). "Expression of integrin-associated protein gene associated with memory formation in rats." J Neurosci **18**(11): 4305-4313.
- Huang, C., L. Wahlund, et al. (2000). "Discrimination of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment by equivalent EEG sources: a cross-sectional and longitudinal study." Clin Neurophysiol **111**(11): 1961-1967.
- Hughes, J. R., S. Shanmugham, et al. (1989). "The relationship between EEG changes and cognitive functions in dementia: a study in a VA population." Clin Electroencephalogr **20**(2): 77-85.
- Hughes, K., E. Nikolakaki, et al. (1993). "Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation." EMBO J **12**(2): 803-808.
- Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, et al. (1990). "Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study." Neurology **40**(11): 1721-1730.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.
- Ihl, R., T. Dierks, et al. (1996). "Topography of the maximum of the amplitude of EEG frequency bands in dementia of the Alzheimer type." *Biol Psychiatry* **39**(5): 319-325.
- Ikegaya, Y., G. Aaron, et al. (2004). "Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity." *Science* **304**(5670): 559-564.
- International, A. s. D. (2010). World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia. *Ireland: Alzheimer's Disease International.*: pp. 56.
- Jaidar-Benavides, O. P. (2010). Análisis de los estados funcionales del microcircuito neocortical en un modelo de la Enfermedad de Parkinson. *Instituto de Fisiología Celular. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Doctorado*: 119.
- Jaidar, O., L. Carrillo-Reid, et al. (2010). "Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state." *J Neurosci* **30**(34): 11326-11336.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochemistry* **32**(18): 4693-4697.
- Jelic, V., S. E. Johansson, et al. (2000). "Quantitative electroencephalography in mild cognitive impairment: longitudinal changes and possible prediction of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **21**(4): 533-540.
- Jelic, V., M. Shigeta, et al. (1996). "Quantitative electroencephalography power and coherence in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Dementia* **7**(6): 314-323.
- Jelicic, M., A. E. Bonebakker, et al. (1995). "Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review." *Int Psychogeriatr* **7**(3): 385-392.
- Jelles, B., R. L. Strijers, et al. (1999a). "Nonlinear EEG analysis in early Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand* **100**(6): 360-368.
- Jelles, B., J. H. van Bierge, et al. (1999b). "Decrease of non-linear structure in the EEG of Alzheimer patients compared to healthy controls." *Clin Neurophysiol* **110**(7): 1159-1167.
- Jensen, O. y C. D. Tesche (2002). "Frontal theta activity in humans increases with memory load in a working memory task." *Eur J Neurosci* **15**(8): 1395-1399.
- Jeong, J. (2004). "EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease." *Clin Neurophysiol* **115**(7): 1490-1505.
- Jeong, J., J. H. Chae, et al. (2001). "Nonlinear dynamic analysis of the EEG in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia." *J Clin Neurophysiol* **18**(1): 58-67.
- Jeong, J., S. Y. Kim, et al. (1998). "Non-linear dynamical analysis of the EEG in Alzheimer's disease with optimal embedding dimension." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **106**(3): 220-228.
- Jimenez, S., M. Torres, et al. (2011). "Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model." *J Biol Chem* **286**(21): 18414-18425.
- Jonsson, T., H. Stefansson, et al. (2012). "Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease." *N Engl J Med*.
- Jutras, M. J., P. Fries, et al. (2009). "Gamma-band synchronization in the macaque hippocampus and memory formation." *J Neurosci* **29**(40): 12521-12531.
- Kahana, M. J., D. Seelig, et al. (2001). "Theta returns." *Curr Opin Neurobiol* **11**(6): 739-744.
- Kamata, T., K. K. Tieu, et al. (2001). "Amino acid residues in the alpha IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin alpha IIb β 3 are clustered in the beta-propeller model." *J Biol Chem* **276**(47): 44275-44283.

- Kang, J. y B. Muller-Hill (1990). "Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain." Biochem Biophys Res Commun **166**(3): 1192-1200.
- Kantarci, K., C. R. Jack, Jr., et al. (2001). "Mild cognitive impairment and Alzheimer disease: regional diffusivity of water." Radiology **219**(1): 101-107.
- Katzman, R. (1986). "Alzheimer's disease." N Engl J Med **314**(15): 964-973.
- Kauwe, J. S., C. Cruchaga, et al. (2011). "Fine mapping of genetic variants in BIN1, CLU, CR1 and PICALM for association with cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease." PLoS One **6**(2): e15918.
- Kawaguchi, S.-y. y T. Hirano (2006). "Integrin alpha3beta1 suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron." Molecular and cellular neurosciences **31**: 416-426.
- Kelly, B. L. y A. Ferreira (2006). "beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons." J Biol Chem **281**(38): 28079-28089.
- Khazipov, R., X. Leinekugel, et al. (1997). "Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices." J Physiol **498 (Pt 3)**: 763-772.
- Kihara, T., S. Shimohama, et al. (2001). "alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity." J Biol Chem **276**(17): 13541-13546.
- Kim, H. J., S. C. Chae, et al. (2003a). "Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein." FASEB J **17**(1): 118-120.
- Kim, H. S., E. M. Kim, et al. (2003b). "C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression." FASEB J **17**(13): 1951-1953.
- Klausberger, T. y P. Somogyi (2008). "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations." Science **321**(5885): 53-57.
- Kleberg, F. I., K. Kitajo, et al. (2014). "Ongoing theta oscillations predict encoding of subjective memory type." Neurosci Res.
- Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-352.
- Klunk, W. E., B. J. Lopresti, et al. (2005). "Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain." J Neurosci **25**(46): 10598-10606.
- Klyubin, I., D. M. Walsh, et al. (2004). "Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo." Eur J Neurosci **19**(10): 2839-2846.
- Knott, V., E. Mohr, et al. (2001). "Quantitative electroencephalography in Alzheimer's disease: comparison with a control group, population norms and mental status." J Psychiatry Neurosci **26**(2): 106-116.
- Koenig, T., L. Prichep, et al. (2005). "Decreased EEG synchronization in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Neurobiol Aging **26**(2): 165-171.
- Koh, S. H., M. Y. Noh, et al. (2008). "Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3." Brain Res **1188**: 254-262.
- Kojima, N., J. Wang, et al. (1997). "Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4761-4765.
- Koo, E. H. y S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." J Biol Chem **269**(26): 17386-17389.
- Koros, E. y C. Dorner-Ciossek (2007). "The role of glycogen synthase kinase-3beta in schizophrenia." Drug News Perspect **20**(7): 437-445.

- Kowalski, J. W., M. Gawel, et al. (2001). "The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: correlation with the severity of mental impairment." J Clin Neurophysiol **18**(6): 570-575.
- Kremer, A., J. V. Louis, et al. (2011). "GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction." Front Mol Neurosci **4**: 17.
- Kuner, P., R. Schubengel, et al. (1998). "Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells." J Neurosci Res **54**(6): 798-804.
- Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, et al. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." J Biol Chem **271**(8): 4077-4081.
- Kurimoto, R., R. Ishii, et al. (2008). "Event-related synchronization of alpha activity in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: an MEG study combining beamformer and group comparison." Neurosci Lett **443**(2): 86-89.
- Lacor, P. N., M. C. Buniel, et al. (2004). "Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers." J Neurosci **24**(45): 10191-10200.
- Lambert, J. C. y P. Amouyel (2011). "Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis?" Curr Opin Genet Dev **21**(3): 295-301.
- Lambert, J. C., S. Heath, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1094-1099.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-6453.
- Lansbury, P. T., Jr. (1992). "In pursuit of the molecular structure of amyloid plaque: new technology provides unexpected and critical information." Biochemistry **31**(30): 6865-6870.
- Larson, J. y G. Lynch (1986). "Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events." Science **232**(4753): 985-988.
- Leao, R. N., L. V. Colom, et al. (2012). "Medial septal dysfunction by Abeta-induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons." Neurobiol Aging **33**(9): 2046-2061.
- Lee, E. H., Y. P. Hsieh, et al. (2000). "Induction of integrin-associated protein (IAP) mRNA expression during memory consolidation in rat hippocampus." Eur J Neurosci **12**(3): 1105-1112.
- Lee, G. (2005). "Tau and src family tyrosine kinases." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 323-330.
- Lee, J. O., P. Rieu, et al. (1995). "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." Cell **80**(4): 631-638.
- Lee, M., J. Y. Kim, et al. (2004a). "Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbol myristate acetate and H2O2." J Biol Chem **279**(47): 48692-48701.
- Lee, M., J. Y. Kim, et al. (2004b). "Apoptotic effect of PP2 a Src tyrosine kinase inhibitor, in murine B cell leukemia." J Cell Biochem **93**(3): 629-638.
- Lee, M. G., J. J. Chrobak, et al. (1994). "Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system." Neuroscience **62**(4): 1033-1047.
- Lega, B. C., J. Jacobs, et al. (2012). "Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories." Hippocampus **22**(4): 748-761.
- Lehtovirta, M., J. Partanen, et al. (1996a). "Spectral analysis of EEG in Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism." Neurobiol Aging **17**(4): 523-526.
- Lehtovirta, M., H. Soininen, et al. (1996b). "Clinical and neuropsychological characteristics in familial and sporadic Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism." Neurology **46**(2): 413-419.
- Lemus-Aguilar, I., J. Vargas, et al. (2006). "Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas." Rev Mex Ing

Biomed **27**: 82-92.

- Lennmyr, F., A. Ericsson, et al. (2004). "Src family kinase-inhibitor PP2 reduces focal ischemic brain injury." Acta Neurol Scand **110**(3): 175-179.
- Leroy, K. y J. P. Brion (1999). "Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain." J Chem Neuroanat **16**(4): 279-293.
- Leroy, K., Z. Yilmaz, et al. (2007). "Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration." Neuropathol Appl Neurobiol **33**(1): 43-55.
- Lesort, M., R. S. Jope, et al. (1999). "Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase." J Neurochem **72**(2): 576-584.
- Leuchter, A. F., T. F. Newton, et al. (1992). "Changes in brain functional connectivity in Alzheimer-type and multi-infarct dementia." Brain **115 (Pt 5)**: 1543-1561.
- Leuchter, A. F., J. E. Spar, et al. (1987). "Electroencephalographic spectra and coherence in the diagnosis of Alzheimer's-type and multi-infarct dementia. A pilot study." Arch Gen Psychiatry **44**(11): 993-998.
- Levite, M., L. Cahalon, et al. (2000). "Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins." J Exp Med **191**(7): 1167-1176.
- Lewis, H., D. Beher, et al. (2006). "Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia." Neuropathol Appl Neurobiol **32**(2): 103-118.
- Li, R., L. Yang, et al. (2004). "Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death." J Neurosci **24**(7): 1760-1771.
- Li, Y., Y. Mu, et al. (2009). "Development of neural circuits in the adult hippocampus." Curr Top Dev Biol **87**: 149-174.
- Liang, X., N. a. Draghi, et al. (2004). "Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**: 7140-7149.
- Lietha, D., X. Cai, et al. (2007). "Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase." Cell **129**(6): 1177-1187.
- Light, G. A., J. L. Hsu, et al. (2006). "Gamma band oscillations reveal neural network cortical coherence dysfunction in schizophrenia patients." Biol Psychiatry **60**(11): 1231-1240.
- Lin, B., A. C. Arai, et al. (2003). "Integrins regulate NMDA receptor-mediated synaptic currents." Journal of neurophysiology **89**: 2874-2878.
- Lipton, S. A. (2006). "Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond." Nat Rev Drug Discov **5**(2): 160-170.
- Lisman, J. E. y O. Jensen (2013). "The theta-gamma neural code." Neuron **77**(6): 1002-1016.
- Liu, Q., C. V. Zerbinatti, et al. (2007). "Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1." Neuron **56**(1): 66-78.
- Liu, S. J., A. H. Zhang, et al. (2003). "Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory." J Neurochem **87**(6): 1333-1344.
- Liu, Y., J. C. Loijens, et al. (2002). "The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly." Mol Biol Cell **13**(6): 2147-2156.
- Lizio, R., F. Vecchio, et al. (2011). "Electroencephalographic rhythms in Alzheimer's disease." Int J Alzheimers Dis **2011**: 927573.

- Lopes, M. A. y C. M. C. Bottino (2002). "Prevalencia de demencia em diversas regioes do mundo. Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000." Arq Neuropsiquiatr **60**(1): 61-69.
- Lorenzo, A. y B. A. Yankner (1994). "Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12243-12247.
- Lovestone, S. y C. H. Reynolds (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." Neuroscience **78**(2): 309-324.
- Lowell, C. A. y P. Soriano (1996). "Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories." Genes Dev **10**(15): 1845-1857.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, et al. (2004). "Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease." Neurology **63**(7): 1187-1192.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, et al. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-862.
- Luo, B. H., C. V. Carman, et al. (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." Annu Rev Immunol **25**: 619-647.
- Llinas, R. y U. Ribary (1993). "Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2078-2081.
- Maki, Y., M. Amari, et al. (2012). "Anosognosia: patients' distress and self-awareness of deficits in Alzheimer's disease." Am J Alzheimers Dis Other Dement **27**(5): 339-345.
- Manenti, R., C. Repetto, et al. (2004). "The effects of ageing and Alzheimer's disease on semantic and gender priming." Brain **127**(Pt 10): 2299-2306.
- Manoukian, A. S. y J. R. Woodgett (2002). "Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways." Adv Cancer Res **84**: 203-229.
- Mao, B. Q., F. Hamzei-Sichani, et al. (2001). "Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices." Neuron **32**(5): 883-898.
- Marcinkiewicz, C., S. Vijay-Kumar, et al. (1997). "Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alphaIIb beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site." Blood **90**(4): 1565-1575.
- Martin-Loeches, M., P. Gil, et al. (1991). "Topographic maps of brain electrical activity in primary degenerative dementia of the Alzheimer type and multiinfarct dementia." Biol Psychiatry **29**(3): 211-223.
- Masters, C. L., G. Multhaup, et al. (1985). "Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels." EMBO J **4**(11): 2757-2763.
- Masters, C. L. y D. J. Selkoe (2012). "Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(6): a006262.
- Mateo, I., J. Infante, et al. (2006). "Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease." Dement Geriatr Cogn Disord **21**(4): 228-232.
- Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-1132.
- Mattson, M. P., B. Cheng, et al. (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." J Neurosci **12**(2): 376-389.
- Maurer, U., F. Preiss, et al. (2014). "GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival." J Cell Sci **127**(Pt 7): 1369-1378.
- McCarthy, M. M., C. Moore-Kochlacs, et al. (2011). "Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(28): 11620-11625.
- McDonald, D. R., K. R. Brunden, et al. (1997). "Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia." J Neurosci **17**(7): 2284-2294.

- McGeachie, A. B., L. A. Cingolani, et al. (2011). "Stabilising influence: integrins in regulation of synaptic plasticity." Neurosci Res **70**(1): 24-29.
- McLean, C. A., R. A. Cherny, et al. (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Ann Neurol **46**(6): 860-866.
- McNaughton, N., M. Ruan, et al. (2006). "Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze." Hippocampus **16**(12): 1102-1110.
- Mena-López, R., J. Luna-Muñoz, et al. (2003). "Histopatología molecular de la enfermedad de Alzheimer." Revista Digital Universitaria **30 de noviembre de 2003**.
- Mills, J. y P. B. Reiner (1999). "Regulation of amyloid precursor protein cleavage." J Neurochem **72**(2): 443-460.
- Mitra, S. K., D. A. Hanson, et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.
- Mitra, S. K. y D. D. Schlaepfer (2006). "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 516-523.
- Miyamoto, S., S. K. Akiyama, et al. (1995). "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." Science **267**(5199): 883-885.
- Moechars, D., I. Dewachter, et al. (1999). "Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain." J Biol Chem **274**(10): 6483-6492.
- Montiel, T., R. Quiroz-Baez, et al. (2006). "Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants." Exp Neurol **200**(2): 496-508.
- Moretti, D. V., C. Babiloni, et al. (2004). "Individual analysis of EEG frequency and band power in mild Alzheimer's disease." Clin Neurophysiol **115**(2): 299-308.
- Morrison, J. H. y P. R. Hof (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." Science **278**(5337): 412-419.
- Mu, Y. y F. H. Gage (2011). "Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **6**: 85.
- Mucke, L., E. Masliah, et al. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." J Neurosci **20**(11): 4050-4058.
- Mucke, L. y D. J. Selkoe (2012). "Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006338.
- Musha, T., T. Asada, et al. (2002). "A new EEG method for estimating cortical neuronal impairment that is sensitive to early stage Alzheimer's disease." Clin Neurophysiol **113**(7): 1052-1058.
- Mutz, D., C. Weise, et al. (2006). "Integrin alpha3beta1 interacts with I1PP2A/lanp and phosphatase PP1." J Neurosci Res **84**(8): 1759-1770.
- Naber, P. A., F. H. Lopes da Silva, et al. (2001). "Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum." Hippocampus **11**(2): 99-104.
- Naslund, J., V. Haroutunian, et al. (2000). "Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline." JAMA **283**(12): 1571-1577.
- Neumann, H. y M. J. Daly (2012). "Variant TREM2 as Risk Factor for Alzheimer's Disease." N Engl J Med.
- Nikoulina, S. E., T. P. Ciaraldi, et al. (2000). "Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes." Diabetes **49**(2): 263-271.

- Nimmrich, V., C. Grimm, et al. (2008). "Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents." J Neurosci **28**(4): 788-797.
- Nishimura, S. L., K. P. Boylen, et al. (1998). "Synaptic and glial localization of the integrin alphavbeta8 in mouse and rat brain." Brain Res **791**(1-2): 271-282.
- Nobili, F., F. Copello, et al. (1999). "Timing of disease progression by quantitative EEG in Alzheimer's patients." J Clin Neurophysiol **16**(6): 566-573.
- Nomura, I., N. Kato, et al. (2005). "Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Neurosci Lett **391**(1-2): 1-6.
- Nordstedt, C., G. L. Caporaso, et al. (1993). "Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells." J Biol Chem **268**(1): 608-612.
- Nunez, P. L., R. B. Silberstein, et al. (1999). "EEG coherency II: experimental comparisons of multiple measures." Clin Neurophysiol **110**(3): 469-486.
- Nunez, P. L., R. Srinivasan, et al. (1997). "EEG coherency. I: Statistics, reference electrode, volume conduction, Laplacians, cortical imaging, and interpretation at multiple scales." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **103**(5): 499-515.
- O'Mara, S. (2005). "The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us." J Anat **207**(3): 271-282.
- O'Mara, S. M., S. Commins, et al. (2001). "The subiculum: a review of form, physiology and function." Prog Neurobiol **64**(2): 129-155.
- Oda, Y., T. Onitsuka, et al. (2012). "Gamma band neural synchronization deficits for auditory steady state responses in bipolar disorder patients." PLoS ONE **7**(7): e39955.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.
- Ohsawa, I., C. Takamura, et al. (1999). "Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells." Eur J Neurosci **11**(6): 1907-1913.
- Onitsuka, T., N. Oribe, et al. (2013). "Neurophysiological findings in patients with bipolar disorder." Suppl Clin Neurophysiol **62**: 197-206.
- Orban, G., K. Volgyi, et al. (2010). "Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats." Brain Res **1354**: 227-235.
- Orena, S. J., A. J. Torchia, et al. (2000). "Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **275**(21): 15765-15772.
- Osipova, D., J. Ahveninen, et al. (2005). "Altered generation of spontaneous oscillations in Alzheimer's disease." Neuroimage **27**(4): 835-841.
- Osipova, D., A. Takashima, et al. (2006). "Theta and gamma oscillations predict encoding and retrieval of declarative memory." J Neurosci **26**(28): 7523-7531.
- Osterhout, D. J., A. Wolven, et al. (1999). "Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase." J Cell Biol **145**(6): 1209-1218.
- Ozerdema, A., B. Guntekind, et al. (2013). "Brain oscillations in bipolar disorder in search of new biomarkers." Suppl Clin Neurophysiol **62**: 207-221.
- Palop, J. J., J. Chin, et al. (2007). "Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." Neuron **55**(5): 697-711.

- Palop, J. J. y L. Mucke (2009a). "Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(4): 435-440.
- Palop, J. J. y L. Mucke (2009b). "Synaptic Depression and Aberrant Excitatory Network Activity in Alzheimer's Disease: Two Faces of the Same Coin?" Neuromolecular Med.
- Palop, J. J. y L. Mucke (2010). "Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." Nat Neurosci **13**(7): 812-818.
- Pap, M. y G. M. Cooper (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway." J Biol Chem **273**(32): 19929-19932.
- Pap, M. y G. M. Cooper (2002). "Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway." Mol Cell Biol **22**(2): 578-586.
- Pardossi-Piquard, R., A. Petit, et al. (2005). "Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP." Neuron **46**(4): 541-554.
- Parsons, J. T. (2003a). "Focal adhesion kinase: the first ten years." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1409-1416.
- Parsons, J. T. (2003b). "Focal adhesion kinase: the first ten years." Journal of Cell Science **116**: 1409-1416.
- Parsons, J. T., J. Slack-Davis, et al. (2008). "Focal adhesion kinase: targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **14**: 627-632.
- Parsons, S. J. y J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." Oncogene **23**(48): 7906-7909.
- Pavlidis, C., Y. J. Greenstein, et al. (1988). "Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm." Brain Res **439**(1-2): 383-387.
- Pei, J. J., T. Tanaka, et al. (1997). "Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain." J Neuropathol Exp Neurol **56**(1): 70-78.
- Pena-Ortega, F. (2013). "Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction." Journal of Neurodegenerative Diseases **2013**: 8.
- Pena-Ortega, F. y R. Bernal-Pedraza (2012). "Amyloid Beta Peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations." Int J Pept **2012**.
- Pena-Ortega, F., A. Solis-Cisneros, et al. (2012). "Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3." Curr Alzheimer Res **9**(7): 857-863.
- Pena, F., B. Ordaz, et al. (2010). "Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase." Hippocampus **20**(1): 78-96.
- Penttila, M., J. V. Partanen, et al. (1985). "Quantitative analysis of occipital EEG in different stages of Alzheimer's disease." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **60**(1): 1-6.
- Peña, F. y N. Alavez-Perez (2006). "Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro." Epilepsia **47**(1): 47-54.
- Peña, F., A. Gutierrez-Lerma, et al. (2006). "The Role of beta-Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer's Disease Therapy." Curr Neuropharmacol **4**(2): 149-163.
- Peña, P., B. Ordaz, et al. (2009). "Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase." Hippocampus **(In-press)**.
- Perez-Madrinan, G., S. E. Cook, et al. (2004). "Alzheimer disease with psychosis: excess cognitive impairment is restricted to the misidentification subtype." Am J Geriatr Psychiatry **12**(5): 449-456.
- Pernecky, R., C. Pohl, et al. (2006). "Complex activities of daily living in mild cognitive impairment: conceptual and diagnostic issues." Age Ageing **35**(3): 240-245.

- Perry, E. K., J. Kerwin, et al. (1990). "Visual hallucinations and the cholinergic system in dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **53**(1): 88.
- Petersen, R. C., R. Doody, et al. (2001). "Current concepts in mild cognitive impairment." Arch Neurol **58**(12): 1985-1992.
- Pijnenburg, Y. A., Y. v d Made, et al. (2004). "EEG synchronization likelihood in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease during a working memory task." Clin Neurophysiol **115**(6): 1332-1339.
- Pike, C. J., A. J. Walencewicz, et al. (1991). "Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures." Eur J Pharmacol **207**(4): 367-368.
- Plyte, S. E., K. Hughes, et al. (1992). "Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development." Biochim Biophys Acta **1114**(2-3): 147-162.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-1851.
- Ponomareva, N. V., G. I. Korovaitseva, et al. (2008). "EEG alterations in non-demented individuals related to apolipoprotein E genotype and to risk of Alzheimer disease." Neurobiol Aging **29**(6): 819-827.
- Ponomareva, N. V., N. D. Selesneva, et al. (2003). "EEG alterations in subjects at high familial risk for Alzheimer's disease." Neuropsychobiology **48**(3): 152-159.
- Poza, J., R. Hornero, et al. (2007a). "Analysis of spontaneous MEG activity in patients with Alzheimer's disease using spectral entropies." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2007**: 6180-6183.
- Poza, J., R. Hornero, et al. (2007b). "Extraction of spectral based measures from MEG background oscillations in Alzheimer's disease." Med Eng Phys **29**(10): 1073-1083.
- Poza, J., R. Hornero, et al. (2008a). "Evaluation of spectral ratio measures from spontaneous MEG recordings in patients with Alzheimer's disease." Comput Methods Programs Biomed **90**(2): 137-147.
- Poza, J., R. Hornero, et al. (2008b). "Regional analysis of spontaneous MEG rhythms in patients with Alzheimer's disease using spectral entropies." Ann Biomed Eng **36**(1): 141-152.
- Prichep, L. S., E. R. John, et al. (1994). "Quantitative EEG correlates of cognitive deterioration in the elderly." Neurobiol Aging **15**(1): 85-90.
- Primavera, A., P. Novello, et al. (1990). "Correlation between mini-mental state examination and quantitative electroencephalography in senile dementia of Alzheimer type." Neuropsychobiology **23**(2): 74-78.
- Prinz, P. N. y M. V. Vitiello (1989). "Dominant occipital (alpha) rhythm frequency in early stage Alzheimer's disease and depression." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **73**(5): 427-432.
- Pritchard, W. S., D. W. Duke, et al. (1991). "Altered EEG Dynamical Responsivity Associated with Normal Aging and Probable Alzheimer's Disease." Dementia **2**: 102-105.
- Pritchard, W. S., D. W. Duke, et al. (1994). "EEG-based, neural-net predictive classification of Alzheimer's disease versus control subjects is augmented by non-linear EEG measures." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **91**(2): 118-130.
- Pucci, E., G. Cacchio, et al. (1998). "EEG spectral analysis in Alzheimer's disease and different degenerative dementias." Arch Gerontol Geriatr **26**(3): 283-297.
- Raber, J., Y. Huang, et al. (2004). "ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology." Neurobiol Aging **25**(5): 641-650.
- Rae-Grant, A., W. Blume, et al. (1987). "The electroencephalogram in Alzheimer-type dementia. A sequential study correlating the electroencephalogram with psychometric and quantitative pathologic data." Arch Neurol **44**(1): 50-54.
- Raghavachari, S., J. E. Lisman, et al. (2006). "Theta oscillations in human cortex during a working-memory task: evidence for local generators." J Neurophysiol **95**(3): 1630-1638.

- Reisberg, B., S. R. Auer, et al. (1996). "Behavioral disturbances of dementia: an overview of phenomenology and methodologic concerns." Int Psychogeriatr **8 Suppl 2**: 169-180; discussion 181-162.
- Religa, D., H. Laudon, et al. (2003). "Amyloid beta pathology in Alzheimer's disease and schizophrenia." Am J Psychiatry **160**(5): 867-872.
- Resh, M. D. (1998). "Fyn, a Src family tyrosine kinase." The international journal of biochemistry & cell biology **30**: 1159-1162.
- Roberson, E. D., B. Halabisky, et al. (2011). "Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease." J Neurosci **31**(2): 700-711.
- Rodriguez, G., F. Copello, et al. (1999). "EEG spectral profile to stage Alzheimer's disease." Clin Neurophysiol **110**(10): 1831-1837.
- Rodriguez, G., F. Nobili, et al. (1998). "Quantitative electroencephalography and regional cerebral blood flow: discriminant analysis between Alzheimer's patients and healthy controls." Dement Geriatr Cogn Disord **9**(5): 274-283.
- Rodriguez, R., F. Lopera, et al. (2014). "Spectral Analysis of EEG in Familial Alzheimer's Disease with E280A Presenilin-1 Mutation Gene." Int J Alzheimers Dis **2014**: 180741.
- Rohan de Silva, H. A., A. Jen, et al. (1997). "Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes." Brain Res Mol Brain Res **47**(1-2): 147-156.
- Rombouts, S. A. R. B., R. W. M. Keunen, et al. (1995). "Investigation of nonlinear structure in multichannel EEG." Physics Letters A **202**: 352-358.
- Ronicke, R., M. Mikhaylova, et al. (2011). "Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors." Neurobiol Aging **32**(12): 2219-2228.
- Rosenzweig, E. S. y C. A. Barnes (2003). "Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition." Prog Neurobiol **69**(3): 143-179.
- Rosenzweig, E. S., G. Rao, et al. (1997). "Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits." Hippocampus **7**(5): 549-558.
- Roux, F., M. Wibrat, et al. (2012). "Gamma-band activity in human prefrontal cortex codes for the number of relevant items maintained in working memory." J Neurosci **32**(36): 12411-12420.
- Rowan, M. J., I. Klyubin, et al. (2004). "Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity." Exp Gerontol **39**(11-12): 1661-1667.
- Rowan, M. J., I. Klyubin, et al. (2007). "Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1219-1223.
- Roweis, S. T. y L. K. Saul (2000). "Nonlinear dimensionality reduction by locally linear embedding." Science **290**(5500): 2323-2326.
- Rui, Y., R. Li, et al. (2006). "Acute effect of beta amyloid on synchronized spontaneous Ca²⁺ oscillations in cultured hippocampal networks." Cell Biol Int **30**(9): 733-740.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 697-715.
- Rutishauser, U., I. B. Ross, et al. (2010). "Human memory strength is predicted by theta-frequency phase-locking of single neurons." Nature **464**(7290): 903-907.
- Ryan, K. A. y S. W. Pimplikar (2005). "Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain." J Cell Biol **171**(2): 327-335.
- Ryves, W. J. y A. J. Harwood (2003). "The interaction of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) with the cell cycle." Prog Cell Cycle Res **5**: 489-495.

- Sabo, S., M. P. Lambert, et al. (1995). "Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line." Neurosci Lett **184**(1): 25-28.
- Salmon, D. P. (2012). "Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease." Curr Top Behav Neurosci **10**: 187-212.
- Samayawardhena, L. A., R. Kapur, et al. (2007). "Involvement of Fyn kinase in Kit and integrin-mediated Rac activation, cytoskeletal reorganization, and chemotaxis of mast cells." Blood **109**(9): 3679-3686.
- Sasaki, T., N. Matsuki, et al. (2007). "Metastability of active CA3 networks." J Neurosci **27**(3): 517-528.
- Sayas, C. L., A. Ariaens, et al. (2006). "GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction." Mol Biol Cell **17**(4): 1834-1844.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Mol Cell Biol **14**(3): 1680-1688.
- Schaller, M. D. y J. T. Parsons (1994). "Focal adhesion kinase and associated proteins." Curr Opin Cell Biol **6**(5): 705-710.
- Scheltens, P., N. Fox, et al. (2002). "Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion." Lancet Neurol **1**(1): 13-21.
- Schlaepfer, D. D. y T. Hunter (1996). "Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases." Mol Cell Biol **16**(10): 5623-5633.
- Schreiter-Gasser, U., T. Gasser, et al. (1993). "Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: a controlled study." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **86**(1): 15-22.
- Schreiter-Gasser, U., T. Gasser, et al. (1994). "Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: correlations with severity, clinical characteristics, visual EEG and CCT." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **90**(4): 267-272.
- Schwab, B. C., T. Heida, et al. (2013). "Synchrony in Parkinson's disease: importance of intrinsic properties of the external globus pallidus." Front Syst Neurosci **7**: 60.
- Schwartz, M. A. (2001). "Integrin signaling revisited." Trends Cell Biol **11**(12): 466-470.
- Schwartz, M. A. y R. K. Assoian (2001). "Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2553-2560.
- Sederberg, P. B., A. Schulze-Bonhage, et al. (2007). "Hippocampal and neocortical gamma oscillations predict memory formation in humans." Cereb Cortex **17**(5): 1190-1196.
- Self, R. L., K. J. Smith, et al. (2005). "Ethanol exposure and withdrawal sensitizes the rat hippocampal CA1 pyramidal cell region to beta-amyloid (25-35)-induced cytotoxicity: NMDA receptor involvement." Alcohol Clin Exp Res **29**(11): 2063-2069.
- Selkoe, D. J. (1993). "Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease." Trends Neurosci **16**(10): 403-409.
- Selkoe, D. J. (1997). "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments." Science **275**(5300): 630-631.
- Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." Nature **399**(6738 Suppl): A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001a). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-766.
- Selkoe, D. J. (2001b). "Clearing the brain's amyloid cobwebs." Neuron **32**(2): 177-180.
- Selkoe, D. J. (2003). "Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman." Neurochem Res **28**(11): 1705-1713.
- Seshadri, S., A. L. Fitzpatrick, et al. (2010). "Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease." JAMA **303**(18): 1832-1840.

- Seubert, P., T. Oltersdorf, et al. (1993). "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide." *Nature* **361**(6409): 260-263.
- Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." *Nature* **359**(6393): 325-327.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, et al. (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." *J Neurosci* **27**(11): 2866-2875.
- Shaw, M., P. Cohen, et al. (1997). "Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216." *FEBS Lett* **416**(3): 307-311.
- Shaw, S., M. Bencherif, et al. (2002). "Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid." *J Biol Chem* **277**(47): 44920-44924.
- Shimohama, S. y T. Kihara (2001). "Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity." *Biol Psychiatry* **49**(3): 233-239.
- Shin, S., L. Wolgamott, et al. (2011). "Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(47): E1204-1213.
- Shinkai, Y., M. Yoshimura, et al. (1997). "Amyloid beta-protein deposition in the leptomeninges and cerebral cortex." *Ann Neurol* **42**(6): 899-908.
- Shioi, J., A. Georgakopoulos, et al. (2007). "FAD mutants unable to increase neurotoxic Abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Abeta." *J Neurochem* **101**(3): 674-681.
- Shirazi, S. K. y J. G. Wood (1993). "The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology." *Neuroreport* **4**(4): 435-437.
- Shoji, M., T. E. Golde, et al. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science* **258**(5079): 126-129.
- Signorino, M., E. Pucci, et al. (1995). "EEG spectral analysis in vascular and Alzheimer dementia." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **94**(5): 313-325.
- Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6075-6079.
- Slack-Davis, J. K., K. H. Martin, et al. (2007). "Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor." *J Biol Chem* **282**(20): 14845-14852.
- Small, B. J., E. Gagnon, et al. (2007). "Early identification of cognitive deficits: preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Geriatrics* **62**(4): 19-23.
- Smetters, D., A. Majewska, et al. (1999). "Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging." *Methods* **18**(2): 215-221.
- Smith, D. G., M. Buffet, et al. (2001). "3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)." *Bioorg Med Chem Lett* **11**(5): 635-639.
- Sobko, A., A. Peretz, et al. (1998). "Constitutive activation of delayed-rectifier potassium channels by a src family tyrosine kinase in Schwann cells." *EMBO J* **17**(16): 4723-4734.
- Soininen, H., J. Partanen, et al. (1989). "Longitudinal EEG spectral analysis in early stage of Alzheimer's disease." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **72**(4): 290-297.
- Soininen, H., J. Partanen, et al. (1991a). "Serial EEG in Alzheimer's disease: 3 year follow-up and clinical outcome." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **79**(5): 342-348.
- Soininen, H., J. Partanen, et al. (1991b). "Changes in absolute power values of EEG spectra in the follow-up of Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand* **83**(2): 133-136.

- Soininen, H., K. J. Reinikainen, et al. (1992). "Slowing of electroencephalogram and choline acetyltransferase activity in post mortem frontal cortex in definite Alzheimer's disease." Neuroscience **49**(3): 529-535.
- Spaan, P. E., J. G. Raaijmakers, et al. (2003). "Alzheimer's disease versus normal ageing: a review of the efficiency of clinical and experimental memory measures." J Clin Exp Neuropsychol **25**(2): 216-233.
- Stam, C. J., W. de Haan, et al. (2009). "Graph theoretical analysis of magnetoencephalographic functional connectivity in Alzheimer's disease." Brain **132**(Pt 1): 213-224.
- Stam, C. J., B. Jelles, et al. (1995). "Investigation of EEG non-linearity in dementia and Parkinson's disease." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **95**(5): 309-317.
- Stam, C. J., B. Jelles, et al. (1996). "Diagnostic usefulness of linear and nonlinear quantitative EEG analysis in Alzheimer's disease." Clin Electroencephalogr **27**(2): 69-77.
- Stam, C. J., B. F. Jones, et al. (2006). "Magnetoencephalographic evaluation of resting-state functional connectivity in Alzheimer's disease." Neuroimage **32**(3): 1335-1344.
- Stam, C. J., T. Montez, et al. (2005). "Disturbed fluctuations of resting state EEG synchronization in Alzheimer's disease." Clin Neurophysiol **116**(3): 708-715.
- Stam, C. J., A. M. van Cappellen van Walsum, et al. (2002). "Generalized synchronization of MEG recordings in Alzheimer's Disease: evidence for involvement of the gamma band." J Clin Neurophysiol **19**(6): 562-574.
- Stam, C. J., Y. van der Made, et al. (2003). "EEG synchronization in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand **108**(2): 90-96.
- Stam, K. J., D. L. Tavy, et al. (1994). "Non-linear dynamical analysis of multichannel EEG: clinical applications in dementia and Parkinson's disease." Brain Topogr **7**(2): 141-150.
- Staunton, D. E., M. L. Luper, et al. (2006). "Targeting integrin structure and function in disease." Adv Immunol **91**: 111-157.
- Stephan, A., S. Laroche, et al. (2001). "Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits." J Neurosci **21**(15): 5703-5714.
- Stern, Y., M. X. Tang, et al. (1997). "Predicting time to nursing home care and death in individuals with Alzheimer disease." JAMA **277**(10): 806-812.
- Steward, O. (1976). "Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat." J Comp Neurol **167**(3): 285-314.
- Strijers, R. L., P. Scheltens, et al. (1997). "Diagnosing Alzheimer's disease in community-dwelling elderly: a comparison of EEG and MRI." Dement Geriatr Cogn Disord **8**(3): 198-202.
- Sturchler, E., A. Galichet, et al. (2008). "Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity." J Neurosci **28**(20): 5149-5158.
- Sun, M. K. y D. L. Alkon (2002). "Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35)." J Neurophysiol **87**(5): 2441-2449.
- Susen, K. y A. Blochl (2005). "Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75." J Mol Med **83**(9): 720-735.
- Swearer, J. M., B. F. O'Donnell, et al. (1996). "Rate of progression in familial Alzheimer's disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **9**(1): 22-25.
- Taipale, J. y P. A. Beachy (2001). "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer." Nature **411**(6835): 349-354.
- Takahashi, N., S. Oba, et al. (2011). "High-speed multineuron calcium imaging using Nipkow-type confocal microscopy." Curr Protoc Neurosci **Chapter 2**: Unit 2 14.
- Takahashi, N., T. Sasaki, et al. (2007). "Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fMCI)." Neurosci Res **58**(3): 219-225.

- Takahashi, R. H., E. E. Nam, et al. (2002). "Alzheimer beta-amyloid peptides: normal and abnormal localization." Histol Histopathol **17**(1): 239-246.
- Takashima, A., K. Noguchi, et al. (1996). "Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta." Neurosci Lett **203**(1): 33-36.
- Takashima, A., K. Noguchi, et al. (1993). "Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7789-7793.
- Taler, V. y N. A. Phillips (2008). "Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review." J Clin Exp Neuropsychol **30**(5): 501-556.
- Tallon-Baudry, C. y O. Bertrand (1999). "Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation." Trends Cogn Sci **3**(4): 151-162.
- Tamamaki, N. y Y. Nojyo (1993). "Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin." Hippocampus **3**(4): 471-480.
- Tamamaki, N. y Y. Nojyo (1995). "Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats." J Comp Neurol **353**(3): 379-390.
- Tanaka, S., S. Nakamura, et al. (1988). "Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **157**(2): 472-479.
- Tanzi, R. E., D. M. Kovacs, et al. (1996). "The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **3**(3): 159-168.
- Tatosyan, A. G. y O. A. Mizenina (2000). "Kinases of the Src family: structure and functions." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 49-58.
- Taylor, J. M., J. D. Hildebrand, et al. (1998). "Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(14): 8063-8070.
- Tesche, C. D. y J. Karhu (2000). "Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 919-924.
- Texido, L., M. Martin-Satue, et al. (2011). "Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors." Cell Calcium **49**(3): 184-190.
- Thammaroj, J., C. Santosh, et al. (2005). "The Hippocampus: Modern Imaging of its Anatomy and Pathology." Practical Neurology **5**(3): 150-159.
- Thatcher, R. W., P. J. Krause, et al. (1986). "Cortico-cortical associations and EEG coherence: a two-compartmental model." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **64**(2): 123-143.
- Thibault, O. y P. W. Landfield (1996). "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging." Science **272**(5264): 1017-1020.
- Thinakaran, G. y E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.
- Thomas, G. M., S. Frame, et al. (1999). "A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin." FEBS Lett **458**(2): 247-251.
- Thomas, S. M. y J. S. Brugge (1997). "Cellular functions regulated by Src family kinases." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 513-609.
- Townsend, M., T. Mehta, et al. (2007). "Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway." J Biol Chem **282**(46): 33305-33312.
- Townsend, M., G. M. Shankar, et al. (2006). "Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers." J Physiol **572**(Pt 2): 477-492.
- Traub, R. D., J. G. Jefferys, et al. (1999). "Functionally relevant and functionally disruptive (epileptic) synchronized oscillations in brain slices." Adv Neurol **79**: 709-724.

- Tsukamoto, E., Y. Hashimoto, et al. (2003). "Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells." J Neurosci Res **73**(5): 627-636.
- Ueda, A., C. Grabbe, et al. (2008). "Mutation of Drosophila focal adhesion kinase induces bang-sensitive behavior and disrupts glial function, axonal conduction and synaptic transmission." Eur J Neurosci **27**(11): 2860-2870.
- Uhlhaas, P. J., C. Haenschel, et al. (2008). "The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia." Schizophr Bull **34**(5): 927-943.
- Uhlhaas, P. J. y W. Singer (2010). "Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia." Nat Rev Neurosci **11**(2): 100-113.
- Um, J. W., H. B. Nygaard, et al. (2012). "Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons." Nat Neurosci **15**(9): 1227-1235.
- Um, J. W. y S. M. Strittmatter (2012). "Amyloid-ss induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease." Prion **6**(5).
- van't Hof, W. y M. D. Resh (1997). "Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59fyn: selective requirement for NH2-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3." J Cell Biol **136**(5): 1023-1035.
- van der Hiele, K., A. A. Vein, et al. (2007a). "EEG correlates in the spectrum of cognitive decline." Clin Neurophysiol **118**(9): 1931-1939.
- van der Hiele, K., A. A. Vein, et al. (2007b). "EEG and MRI correlates of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **28**(9): 1322-1329.
- van Deursen, J. A., E. F. Vuurman, et al. (2008). "Increased EEG gamma band activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." J Neural Transm **115**(9): 1301-1311.
- Van Gool, D., G. Carmeliet, et al. (1994). "Appearance of localized immunoreactivity for the alpha 4 integrin subunit and for fibronectin in brains from Alzheimer's, Lewy body dementia patients and aged controls." Neurosci Lett **170**(1): 71-73.
- van Strien, N. M., N. L. Cappaert, et al. (2009). "The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network." Nat Rev Neurosci **10**(4): 272-282.
- van Weeren, P. C., K. M. de Bruyn, et al. (1998). "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB." J Biol Chem **273**(21): 13150-13156.
- Vanderwolf, C. H. (1969). "Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **26**(4): 407-418.
- Vasilyev, D. V. y M. E. Barish (2003). "Regulation of an inactivating potassium current (IA) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurones." J Physiol **547**(Pt 3): 859-871.
- Verdier, Y., E. Huszar, et al. (2005). "Identification of synaptic plasma membrane proteins co-precipitated with fibrillar beta-amyloid peptide." J Neurochem **94**(3): 617-628.
- Verdier, Y. y B. Penke (2004). "Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease." Curr Protein Pept Sci **5**(1): 19-31.
- Verdier, Y., M. Zarandi, et al. (2004). "Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease." J Pept Sci **10**(5): 229-248.
- Verret, L., E. O. Mann, et al. (2012). "Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model." Cell **149**(3): 708-721.
- Vijayan, K. V., Y. Liu, et al. (2004). "Protein phosphatase 1 associates with the integrin alphaIIb subunit and regulates signaling." J Biol Chem **279**(32): 33039-33042.

- Villanueva Castillo, C. A. (2010). Efecto de la exposición prolongada a la proteína beta amiloide en el circuito neocortical. Departamento de Farmacobiología. México, D.F., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. **Maestría**: 67.
- Villette, V., F. Poindessous-Jazat, et al. (2010). "Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat." J Neurosci **30**(33): 10991-11003.
- von Rotz, R. C., B. M. Kohli, et al. (2004). "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4435-4448.
- Vonderheide, R. H., T. F. Tedder, et al. (1994). "Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4." J Cell Biol **125**(1): 215-222.
- Vreugdenhil, M. y E. C. Toescu (2005). "Age-dependent reduction of gamma oscillations in the mouse hippocampus in vitro." Neuroscience **132**(4): 1151-1157.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002a). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-539.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002b). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." Biochem Soc Trans **30**(4): 552-557.
- Walsh, D. M. y D. J. Selkoe (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." J Neurochem **101**(5): 1172-1184.
- Wang, H. W., J. F. Pasternak, et al. (2002). "Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus." Brain Res **924**(2): 133-140.
- Wang, H. Y., D. H. Lee, et al. (2000a). "beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology." J Biol Chem **275**(8): 5626-5632.
- Wang, H. Y., D. H. Lee, et al. (2000b). "Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors." J Neurochem **75**(3): 1155-1161.
- Wang, J., D. W. Dickson, et al. (1999). "The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging." Exp Neurol **158**(2): 328-337.
- Wang, J. Z. y F. Liu (2008). "Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons." Prog Neurobiol **85**(2): 148-175.
- Wang, Q., I. Klyubin, et al. (2008a). "Alpha v integrins mediate beta-amyloid induced inhibition of long-term potentiation." Neurobiol Aging **29**(10): 1485-1493.
- Wang, Q., M. J. Rowan, et al. (2004a). "Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide." J Neurosci **24**(27): 6049-6056.
- Wang, Q., D. M. Walsh, et al. (2004b). "Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5." J Neurosci **24**(13): 3370-3378.
- Wang, Q., J. Wu, et al. (2005). "Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor." Eur J Neurosci **22**(11): 2827-2832.
- Wang, Y., G. Zhang, et al. (2009). "Opposite effects of low and high doses of Abeta42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex." PLoS ONE **4**(12): e8366.

- Wang, Y., J. X. Zhang, et al. (2008b). "Temporal correlation of the memory deficit with Alzheimer-like lesions induced by activation of glycogen synthase kinase-3." J Neurochem **106**(6): 2364-2374.
- Wary, K. K., A. Mariotti, et al. (1998). "A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth." Cell **94**(5): 625-634.
- Wei, J. F., L. Wei, et al. (2008). "Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility." J Cell Physiol **217**(2): 544-557.
- Williamson, R., T. Scales, et al. (2002a). "Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases." J Neurosci **22**(1): 10-20.
- Williamson, R., T. Scales, et al. (2002b). "Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**: 10-20.
- Williamson, R., A. Usardi, et al. (2008). "Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism." FASEB J **22**(5): 1552-1559.
- Wimo, A., B. Winblad, et al. (2003). "The magnitude of dementia occurrence in the world." Alzheimer Dis Assoc Disord **17**(2): 63-67.
- Winson, J. (1978). "Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat." Science **201**(4351): 160-163.
- Witter, M. P. (2010). Connectivity of the Hippocampus. Hippocampal Microcircuits: A Computational Modeler's Resource Book. B. G. Vassilis Cutsuridis, Stuart Cobb, Imre Vida. New York, USA., Springer Science+Business Media, LLC. **5**: 5-26.
- Witter, M. P., A. W. Griffioen, et al. (1988). "Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway." Neurosci Lett **85**(2): 193-198.
- Witter, M. P. y H. J. Groenewegen (1990). "The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex." Prog Brain Res **83**: 47-58.
- Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." EMBO J **9**(8): 2431-2438.
- Woodgett, J. R. (2001). "Judging a protein by more than its name: GSK-3." Sci STKE **2001**(100): re12.
- Wright, S., N. L. Malinin, et al. (2007). "Alpha2beta1 and alphaVbeta1 integrin signaling pathways mediate amyloid-beta-induced neurotoxicity." Neurobiol Aging **28**(2): 226-237.
- Wszolek, Z. K., G. K. Herkes, et al. (1992). "Comparison of EEG background frequency analysis, psychologic test scores, short test of mental status, and quantitative SPECT in dementia." J Geriatr Psychiatry Neurol **5**(1): 22-30.
- Wyble, B. P., C. Linster, et al. (2000). "Size of CA1-evoked synaptic potentials is related to theta rhythm phase in rat hippocampus." J Neurophysiol **83**(4): 2138-2144.
- Wymann, M. P., G. Bulgarelli-Leva, et al. (1996). "Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction." Mol Cell Biol **16**(4): 1722-1733.
- Xiao, T., J. Takagi, et al. (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." Nature **432**(7013): 59-67.
- Xie, L., E. Helmerhorst, et al. (2002). "Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor." J Neurosci **22**(10): RC221.
- Xing, Z., H. C. Chen, et al. (1994). "Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain." Mol Biol Cell **5**(4): 413-421.
- Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." Science **294**(5541): 339-345.

- Xu, H., D. Sweeney, et al. (1997). "Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3748-3752.
- Yaar, M., S. Zhai, et al. (2002). "Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling." J Biol Chem **277**(10): 7720-7725.
- Yaar, M., S. Zhai, et al. (1997). "Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease." J Clin Invest **100**(9): 2333-2340.
- Ye, C., D. M. Walsh, et al. (2004). "Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation." Neurosci Lett **366**(3): 320-325.
- Yun, S. H., G. Gamkrelidze, et al. (2006). "Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus." Neurosci Lett **403**(1-2): 162-165.
- Zhang, C., M. P. Lambert, et al. (1994). "Focal adhesion kinase expressed by nerve cell lines shows increased tyrosine phosphorylation in response to Alzheimer's A beta peptide." J Biol Chem **269**(41): 25247-25250.
- Zhang, C., H. E. Qiu, et al. (1996a). "A beta peptide enhances focal adhesion kinase/Fyn association in a rat CNS nerve cell line." Neurosci Lett **211**(3): 187-190.
- Zhang, C., H. E. Qiu, et al. (1996b). "Protein kinase C and F-actin are essential for stimulation of neuronal FAK tyrosine phosphorylation by G-proteins and amyloid beta protein." FEBS Lett **386**(2-3): 185-188.
- Zhang, Y., Y. Hong, et al. (2003). "p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity." J Neurosci **23**(19): 7385-7394.
- Zhang, Y. W., R. Thompson, et al. (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.
- Zhang, Y. W., R. Wang, et al. (2007). "Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10613-10618.
- Zhao, W. Q., F. G. De Felice, et al. (2008). "Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors." FASEB J **22**(1): 246-260.
- Zhu, J., B. H. Luo, et al. (2008). "Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces." Mol Cell **32**(6): 849-861.
- Zhu, L. Q., S. H. Wang, et al. (2007). "Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments." J Neurosci **27**(45): 12211-12220.
- Zúñiga, E. y D. Vega (2005). "Envejecimiento de la Población de México. Reto del siglo XXI " Secretaría de Gobernación-Conapo, México.

10. PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO

- 10.1. **Balleza-Tapia** H, Peña F. Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. Mini Rev Med Chem. 2009 Jun;9(6):724-40. PMID: 19519498. **180**

- 10.2. **Balleza-Tapia** H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F. Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. Curr Alzheimer Res. 2010 Aug;7(5):453-62. PMID: 20043810. **197**

- 10.3. Peña F, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. Hippocampus. 2010 Jan;20(1):78-96. PMID: 19294646. **207**

- 10.4. Adaya-Villanueva A, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F. Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. Peptides. 2010 Sep;31(9):1761-6. PMID: 20558221. **226**

- 10.5. Pena-Ortega F, Solis-Cisneros A, Ordaz B, **Balleza-Tapia** H, Javier Lopez-Guerrero J. Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3. Curr Alzheimer Res. 2012 Sep;9(7):857-63. PMID: 22631612. **232**

Pharmacology of the Intracellular Pathways Activated by Amyloid Beta Protein

Hugo Balleza-Tapia and Fernando Peña*

Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Sede Sur, México, D.F., México

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a late-life cognitive disorder associated, among other things, to the presence of extracellular aggregates of fibrillar amyloid beta protein (A β). However, there is growing evidence that early stages of AD may be due to neuronal network dysfunction produced by the actions of soluble forms of A β . Therefore, the development of new therapeutic strategies to treat AD, at least during its first stages, may be focused on preventing or reversing the deleterious effects that soluble A β exerts on neuronal circuit function. In order to do so, it is necessary to elucidate the pathophysiological processes involved in A β -induced neuronal network dysfunction and the molecular processes underlying such dysfunction. Over the last decades, there has been extensive research about the molecular mechanisms involved in the effects of A β as well as possible neuroprotective strategies against such effects. Here we are going to review some of the intracellular pathways triggered by A β , which involve membrane receptors such as nicotinic-R, NMDA-R, integrins, TNF-R1, RAGE, FPRL and p75NTR and their intracellular mediators such as GSK3, PKC, PI3K, Akt, FAK, MAPK family, Src family and cdk5. Several of these pathways may constitute therapeutic targets for the treatment of the A β -induced neuronal network dysfunction which is, at least in part, the basis for cognitive dysfunction in AD.

Key Words: Alzheimer's disease, A β -signaling pathways, neuronal network dysfunction, A β -related receptors and pharmacological targets.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), the most common of the late-life dementias, frequently begins after the age of 60 years and its prevalence rises exponentially with age, reaching more than 40% of people over 85 [1]. Symptomatically, AD is characterized by a progressive impairment in cognitive function [2-5] whereas histopathologically, AD is characterized by the presence of extracellular aggregates of fibrillar amyloid beta protein (A β) [4, 6] and intracellular aggregates of hyperphosphorylated Tau-protein [7, 8]. Up to date, there is increasing evidence indicating that early soluble forms of A β , rather than late fibrillar conformations, might interfere with normal neuronal network function and consequently lead to the early deficits in learning and memory observed in AD patients [5, 9, 10] as well as in transgenic AD animal models, long before any neurodegeneration is observed [5, 11-15].

The A β is a 39-43 amino acid peptide cleavage product derived from the amyloid precursor protein (APP) [4, 16, 17], which is generated by the sequential processing of two proteases, β -secretase and γ -secretase, through the amyloidogenic pathway. Alternatively APP can be processed by α -secretase, which precludes the formation of A β in the nonamyloidogenic pathway [18].

A β -induced dysfunction seems to be associated to neuronal network alterations both at the physiological and bio-

chemical levels, and involves a complex mixture of effects on neurons and glia [5, 19]. Altogether, the deleterious effects of A β on neuronal networks may affect cognitive-related processes such as long term potentiation (LTP) *in vivo* and *in vitro* [15, 20-27], neuronal network oscillations *in vivo* and *in vitro* [28-30] as well as neuronal codification *in vivo* [31]. These effects might represent the basis for the cognitive decline observed, at least, during the early stages of AD [15, 20-23, 25-29]. Accordingly with this line of evidence, we have recently shown that acute application of A β affects hippocampal network functioning from single cell to network level both *in vitro* and *in vivo* [30]. But what is the biochemical source of such network dysfunction?

Finding the biochemical events involved in A β -induced neuronal network dysfunction will provide with proper therapeutic targets to treat AD, at least during its initial phase. This is an important issue due to the fact that there are no therapeutic interventions available that halt or reverse AD and that the currently approved anti-AD therapies, including the cholinesterase inhibitors and the N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDA-R) antagonists (for review see [32-35]), just offer modest symptomatic relief [36]. We believe that new therapeutic targets might be revealed through the study of the putative A β membrane receptors and the intracellular pathways triggered by A β . Here we are going to review the intracellular pathways involved in the generation of A β -induced neuronal network dysfunction. We are including the receptors and the intracellular pathways altered by A β on all types of nerve cells, since it is well known that brain function is generated by the complex interaction of a neurological network and since it is very likely that A β -induced neuronal network dysfunction is the product of a complex altera-

*Address correspondence to this author at the Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, Calz. de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, 14330, México, D.F., México; Tel: +52 (55) 5483 2852; Fax: +52 (55) 5483 2863; E-mail: jfpena@cinvestav.mx

tion induced by A β in both neurons and all types of glial cells [5, 37, 38]. Finally, it is important to mention that we are going to review the receptors and the intracellular pathways known to be directly activated or modified by A β . In almost all the cases the reviewed data refers to the intracellular pathways activated by acute A β application, however we also include few data involving effects produced by long-lasting A β application, in such cases we indicated that the biochemical events were evoked by long-lasting A β application. The review of several neuroprotective intracellular pathways that might prevent the effects of A β , but that are not directly activated by such protein, has been previously done and are not going to be reviewed here (see [38-41]).

A β -RELATED RECEPTORS AND ITS INTRACELLULAR PATHWAYS

As was previously described, A β is a peptide related to neurodegeneration and the progressive impairment of cognitive function in AD, therefore a great effort has been done to determine if such effects are mediated by putative A β receptors. The literature shows that A β can bind to several types of membrane receptors and can activate different signaling pathways through them [42, 43]. Such receptors include a) Ion channels like NMDA-R and nicotinic receptors (nAChR); b) G-protein-coupled receptors such as the formyl-peptide receptor-like-1 (FPRL1); c) Adhesion receptors like integrins; d) Cytokines receptors like p75 neurotrophin receptor (p75NTR) and tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1); e) Tyrosine kinase receptors like insulin receptors (IR); and f) A variety of receptors that share their participation in the immune response, such as the receptor for advanced glycation end products (RAGE), scavenger receptor A (SR-A) and BI (SR-BI), as well as cluster of differentiation 36 (CD36), 14 (CD14) and 47 (CD47) [42, 43]. All those receptors, and their interactions with A β , will be reviewed next.

NMDA-R

One of the major targets for A β seems to be the glutamatergic NMDA-R, to which directly binds (Fig. 1) [44]. There is overwhelming evidence that NMDA-R play a major role in A β -induced neurotoxicity and synaptotoxicity [5, 45-49]. Accordingly, A β -induced increase of intracellular Ca $^{2+}$ results from the interaction of A β and NMDA-R (Fig. 1) [50, 51] and A β -induced neurotoxicity is usually reverted by NMDA-R antagonists [49, 52]. A recent report indicates that those neurons that express NMDA-R with the NR1/NR2A subunit composition are more vulnerable to A β -induced neurotoxicity [53]. Furthermore a recent report has shown that A β -induced activation of NMDA receptors requires a tyrosin phosphorylation of the NR2B subunit [54].

As mentioned, A β -induced neuronal death involves the activation of NMDA-R. Accordingly, in MES 23.5 neuroblastoma cell line, A β -induced neuronal death is enhanced in Mg $^{2+}$ free media and inhibited in Ca $^{2+}$ free media, as well as by the application of 5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), an NMDA-R antagonist [55]. A β -induced, NMDA-mediated, neuronal death involves the increase of Ca $^{2+}$ -dependent nitric oxide (NO) synthesis and the subsequent overproduction of guanosine cyclic monophosphate (GMPc) and the radical oxygen spe-

cies (ROS) (Fig. 1) [55]. Beyond the possible direct activation of NMDA-R by A β , a possible indirect activation of the same receptor seems to be achieved by the effect of A β on microglia. *In vitro* studies have shown that activation of microglia by A β produce the secretion of both tumor necrosis factor- α (TNF α) and glutamate, as part of the pro-inflammatory reaction [56-58]. Both TNF α and glutamate synergistically promote neuronal death through the activation of TNF receptor 1 (TNFR1) and NMDA-R. This conclusion is based on the fact that memantine and 2-amino-phosphonovaleric acid (APV), both NMDA-R antagonists, as well as soluble TNFR1, protects neurons from A β -induced neuronal death [59]. Related to this finding, it has been observed that, at chronic level, cholinergic denervation produced by A β correlates with an increase of NO production, which is mediated by Ca $^{2+}$ influx *via* NMDA-R activation. Interestingly, chronic exposure to ifenprodil tartrate, which selectively binds to the NMDA-R2B subunit, prevented all the described effects [60, 61]. In contrast to the evidence just reviewed, a recent report has shown that prolonged exposure of organotypic hippocampal slices to A β dimers and trimers can induce a progressive loss of dendritic spines and a decrease in excitatory synapses. Such effects can be prevented with antibodies against A β or with an A β aggregation inhibitor called scyllo-inositol (AZD-103) [62]. This A β -induced spine loss seems to be produced by a reduction of Ca $^{2+}$ influx through NMDA-R, since a subsaturating concentration of 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP), a NMDA antagonist, mimicked A β -induced effect [62]. It is important to mention that this finding contrast with published literature showing the A β activates NMDA-R and induce Ca $^{2+}$ influx through them (Fig. 1) [50, 51].

A β interaction with NMDA is not exclusively related to Ca $^{2+}$ influx and neurotoxicity (Fig. 1), it can also induce the activation of several transduction pathways that may lead to changes in neuronal function before cell death (Fig. 1) [5]. Electrophysiological experiments have shown that A β increases NMDA-R dependent currents [63] or NMDA-dependent responses [64] and that this potentiation of NMDA-currents is involved in the increase of LTP produced by A β [65]. A β interaction with NMDA-R, triggers the activation of different protein kinases such as Src-like kinases (including Fyn), Ras, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Fig. 1). In granule neurons A β -induced, NMDA-R-mediated, nuclear factor κ B (NF κ B) activation is inhibited by 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*n*-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2), manumycin A, PD98059 and LY294002, inhibitors of the mentioned proteins, respectively (Fig. 1) [66]. The activation of MAPK by A β , through NMDA-R activation, has also been observed in hippocampal neurons [67]. Furthermore A β induces Akt phosphorylation through the activation of both NMDA and α 7nAChRs; effect blocked by ifenprodil and methyllycaconitine (MLA), both antagonists of the mentioned receptors, respectively (Fig. 1) [54]. Altogether the evidence reviewed show that blocking the potentiation of NMDA-dependent mechanisms produced by A β represents an attractive therapeutic target against AD. In fact it might constitute the cellular basis for the beneficial clinical effects observed with NMDA-R antagonists, being the more successful example that of memantine [49, 52, 68, 69].

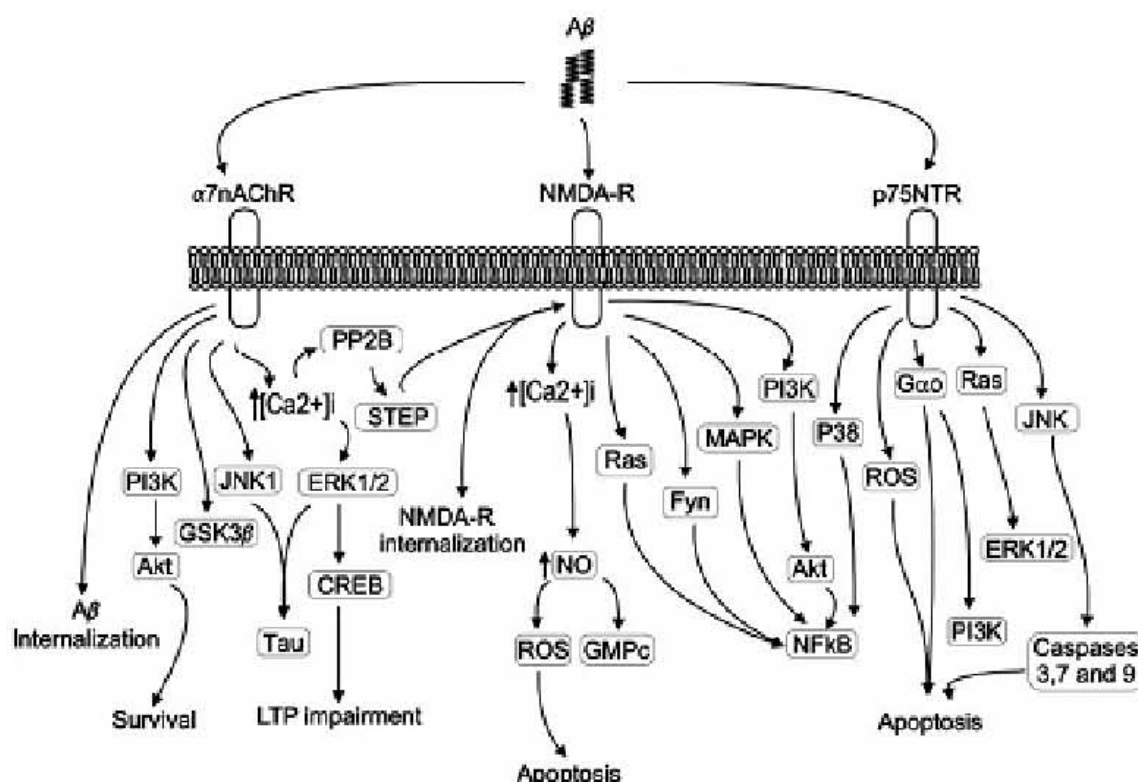


Fig. (1). Main receptors and intracellular pathways activated by A β in neurons. Without ignoring other neuronal receptors, A β can bind and activate nicotinic-, NMDA- and p75NT receptors in neurons. Activation of such receptors induces both ion movements and biochemical cascades. A major component of the response to A β in neurons is a raise in intracellular calcium through the nicotinic and the NMDA receptors. It is important to mention that such receptors activate several biochemical pathways as well. Both receptors, along with p75NTR, share the activation of members of the MAPK-family as a key players of their triggered intracellular pathways. Abbreviations: A β : amyloid beta protein; CREB: cAMP response element binding; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; GMPc: guanosine cyclic mono-phosphate; GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; JNK1: c-Jun N-terminal kinase 1; MAPK: the mitogen-activated protein kinase; NF κ B: nuclear factor κ B; NMDA-R: N-methyl-D-aspartic acid receptor; NO: nitric oxide; p75NTR: p75 neurotrophin receptor; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PP2B: protein phosphatase 2B; ROS: reactive oxygen species; STEP: striatal-enriched phosphatase; α 7nAChR: α 7 nicotinic receptors.

Nicotinic Receptors

The nicotinic receptors (nAChR) are ligand-gated ion channels [70-73], consisting of five subunits with eight different α (α 2- α 9) subunits and three different β (β 2- β 4) components [74]. Of these nAChR, α 7 and α 4 β 2 are the most abundant combinations in the brain [75]. The α 7nAChR is highly expressed in the hippocampus and the cortex. Those brain areas, which are related to memory and cognition, are highly innervated by the basal forebrain cholinergic neurons, and are the most disturbed brain areas in AD [71, 73, 76-84].

Although there are some reports showing that A β acts independently of nicotine receptors [4, 85], a great pool of evidence has proven that A β can bind nicotine receptors and activate intracellular pathways through them (Fig. 1): immunohistochemical studies have shown that A β and α 7nAChR colocalized on neurons surrounding neuritic plaques in hippocampal and cortical tissues from AD brains [86, 87]. Both

A β and α 7nAChR co-immunoprecipitate when antibodies against either A β or α 7nAChR are used [86, 87]. Furthermore, binding assays have shown that A β bind with high affinity to α 7nAChR (Fig. 1) [86, 87]. Whether or not A β acts as an agonist or as an antagonist for α 7nAChR remains controversial and will be discussed later [88-90]. In relation to intracellular signalling, A β interaction with α 7nAChR activates PI3K, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt (Fig. 1) [88, 91-93]. Binding of A β to α 7nAChR can activate ERK2, in a Ca²⁺-dependent manner (Fig. 1). This effect is blocked by the α 7nAChR antagonists MLA and α -bungarotoxin (BTX) [88]. Related to this finding, it has been observed that a transgenic AD mouse model (Tg2576), shows an age-dependent increase both in α 7nAChR expression as well as in ERK2 activation in the hippocampus and the cortex [88]. A similar effect has been observed using organotypic hippocampal slices incubated chronically with A β [88]. Chronic exposure to A β also induces changes in the

expression of nAChR. For instance, when PC12 cells are exposed chronically to A β , a down regulation of the mRNA encoding for $\alpha 3$, $\alpha 7$ and $\beta 2$ nAChRs is observed [94]. In contrast, when A β is applied to neuroblastoma cell line SK-N-MC, that overexpress $\alpha 7$ nAChR, a rapid binding, internalization and intracellular accumulation of A β is observed [95]. Incubation with the $\alpha 7$ nAChR antagonist BTX, as well as with the endocytosis inhibitor phenylarsine oxide, prevents such internalization [88, 95]. Accordingly, the intracellular accumulation of A β observed in AD brain, colocalize with the presence of $\alpha 7$ nAChR [86, 95].

A β interaction with $\alpha 7$ nAChRs may eventually lead to Tau phosphorylation (Fig. 1). In SK-N-MC cells expressing $\alpha 7$ nAChR, as well as in cortical and hippocampal neurons, A β interaction with $\alpha 7$ nAChR lead to the activation of ERK and c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and the subsequent phosphorylation of Tau (Fig. 1) [96]. Such A β -induced Tau phosphorylation was suppressed with the $\alpha 7$ nAChR antagonists BXT and MLA, as well as with the specific ERK inhibitors 5-iodotubercidin and roscovitine, and the JNK1 inhibitor SP600125 [96]. In differentiated PC12 cells, A β interaction with $\alpha 7$ nAChR increases phosphorylation of Tau through the activation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), such effect is blocked by the GSK3 β inhibitor CHIR99023 (Fig. 1). Surprisingly the effect was blocked by both an agonist (A-582941) and antagonists (MLA and BTX) of $\alpha 7$ nAChR [97]. Based on this findings, authors suggested that blockade of A β -induced Tau phosphorylation by both an agonists and antagonists of $\alpha 7$ nAChR, may be result of a net inhibition of $\alpha 7$ nAChR either by the desensitization of the receptor with agonists or its inhibition with antagonists [97]. A β interaction with $\alpha 7$ nAChR may also affect the function of NMDA-R. Snyder *et al.* have reported that A β can induce a $\alpha 7$ nAChR-dependent reduction of NMDA-mediated responses. Such effect involves the activation of protein phosphatase 2B (PP2B) and tyrosine phosphatase striatal-enriched phosphatase (STEP) (Fig. 1), since A β -induced $\alpha 7$ nAChR-mediated reduction of NMDA responses is blocked by the $\alpha 7$ nAChR inhibitors BTX and MLA, the PP2B inhibitor cyclosporine and a dominant-negative STEP protein [98].

As mentioned before, whether or not A β acts as an agonist or as an antagonist for $\alpha 7$ nAChR remains controversial [88-90]. Regarding the agonistic action of A β on $\alpha 7$ nAChR it has been reported a direct activation of recombinant rat $\alpha 7$ nAChR by A β in *Xenopus* oocytes [99]. Same activation has been observed in native rat $\alpha 7$ nAChR in synaptosomal preparations isolated from the hippocampus, the striatum and the cortex [100]. Accordingly, A β potentiates nicotine-induced Ca²⁺ influx in rat basal forebrain neurons [101]. Furthermore, as mentioned, A β application to hippocampal slices activates, *via* $\alpha 7$ nAChRs, ERK2 [88]. Finally, in primary neuronal cultures, blockade of $\alpha 7$ nAChR with MLA, protects against A β -induced neurotoxicity [102].

Despite the evidence suggesting that A β may activate $\alpha 7$ nAChR, there are reports suggesting otherwise. For instance, binding of A β to $\alpha 7$ nAChR blocks native $\alpha 7$ nAChR currents in hippocampal neurons [89, 103]. Same effect is observed in $\alpha 7$ nAChR currents expressed in *Xenopus* oocytes [104-106] or in SH-EP1 human epithelial cells [107].

Similarly, A β application can impair LTP *in vivo* and *in vitro* by blocking $\alpha 7$ nAChR activity [84, 108]. It has also been reported that $\alpha 7$ nAChR activation either with nicotine and the specific agonist 3-(2,4)-dimethoxybenzylidene (DMXB) provide protection against A β -induced neurotoxicity [109, 110]. The neuroprotective effect of nicotine can be block by the nAChR antagonist hexamethonium and mecamylamine as well as the selective $\alpha 7$ nAChR antagonist BTX [91, 109]. Furthermore, it has been reported that A β -induced cell death in SK-N-MC cell line, can be prevented either by nicotine or epibatidine, a potent $\alpha 7$ nAChR agonist [86]. The neuroprotective effect of nicotine against A β -induced neurotoxicity can also be blocked by the PI3K inhibitors LY294002 and wortmannin as well as a Src-family inhibitor PP2, suggesting that these kinases are involve in the neuroprotective actions of nicotine [91, 93]. It has been proposed that, at least in the neuronal cell line PC12, nicotine competes with A β for the binding to $\alpha 7$ nAChR and therefore prevents the A β -induction of caspase 3 and apoptosis [92]. This effect appears to be mediated by $\alpha 7$ nAChR, because the protection is blocked by BTX and is mimicked by the $\alpha 7$ nAChR agonist TC-1698 [92, 111, 112]. Interestingly, treatment with nicotine for ten days in the APPsw mice model reduced insoluble amyloid by 80% in the brain cortex of 9 month-old mice [113]. This effect is mediated, at least in part, by the $\alpha 7$ nAChR as shown by using MLA [113]. Overall, despite the controversy regarding the agonistic or antagonistic actions of A β on $\alpha 7$ nAChR, the evidence reviewed, clearly point toward $\alpha 7$ nAChR as a very likely candidate for pharmacological manipulation in order to overcome A β -induced effects.

The evidence just reviewed support the notion that nicotinic receptors may constitute a promising target to treat AD. It is well know that smokers have less accumulation of A β [114] and a reduced risk to develop AD [115, 116]. Preliminary clinical studies have shown that transdermal application of nicotine improves memory and attention in AD patients [117, 118]. Similar improvements have been achieved through the administration of the nicotinic receptor agonist ABT-418 [119]. Furthermore, in AD transgenic models, it has been found that nicotine administration reduces A β accumulation [120] and improves the memory deficit observed in these animals [121]. Interestingly, it has been shown that immunization against $\alpha 7$ receptors improves the memory deficit observed in an AD animal model [122].

p75NTR

p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is a transmembrane protein with a structure similar to the tumor necrosis factor receptor and CD40 [123]. A β can bind p75NTR (K_d = 23 nM) with a lower affinity than its natural ligand nerve growth factor (NGF) (K_d = 4-7 nM) in NIH 3T3 cells as well as rat cortical neurons (Fig. 1) [124]. A β -p75NTR complex can contain either a sole p75NTR receptor (80 kDa) or a receptor complex of 230 kDa, proposed to be a trimer of p75NTR [123, 125]. A variety of different-length A β peptides interact with and activate p75NTR signaling (Fig. 1); including aggregated A β 1-40 [123-125], soluble oligomeric and aggregated A β 1-42 [126-130] and oligomeric and aggregated A β 25-35 [123, 126, 131]. Binding of A β to p75NTR leads to cell death trough the interaction of A β with

the receptor's amino-terminal domain and the activation of a neurotoxic function of the receptor localized in its carboxyl-terminal domain [132]. The specificity of this interaction is revealed by the fact that A β induces cell death in NIH 3T3 cells overexpressing p75NTR but has no effect on non-transfected cells [124]. Similar data was obtained using human neural crest-derived melanocytes [124]. These findings are confirmed by *in vivo* experiments showing that A β -induced neurodegeneration of basal forebrain cholinergic neurons is not observed in p75NTR-deficient mice [133]. Interestingly, basal forebrain cholinergic neurons have the highest levels of p75NTR in the brain and are one of the most affected neurons in AD [134]. A β binding to p75NTR triggers activation of the downstream signalling molecules such as JNK, G α_o -proteins, NF κ B and PI3K (Fig. 1) [135]. The induction of cell death upon interaction of p75NTR with A β is mediated by the activation of caspases-8 and -3 and the production of ROS intermediates (Fig. 1). Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK), a non-selective caspases inhibitor, and Z-IETD-FMK, a specific caspase 8 inhibitor, prevented such cell death [132]. As mentioned A β -induced p75NTR-mediated cell death, involves the activation of JNK and p38, as well as the mitogen-activated protein kinases MKK3, 4 and 6 and p53 activity (Fig. 1) [126, 131, 132]. The activation of these proteins was found to require the death domain region of p75NTR [131, 132]. On F11-neuron hybrid cells, transfected with p75NTR, A β -induced p75NTR-mediated cell death, was mediated by G α_o (Fig. 1). This was demonstrated by using the G α_o inhibitor pertussis toxin (PTX) [126]. In this case, JNK and caspases 3, 7 and 9 are also involved in A β -induced p75NTR-mediated cell death (Fig. 1), since the inhibitor of caspases 3/7 Ac-DEVD-CHO (DEVD), the inhibitor of caspase 9 Ac-LEHD-CHO (LEHD) and the JNK inhibitor SP600125, prevented cell death [126]. On human neuroblastoma cell line, the transcriptional factor NF κ B is also activated during cell death promoted by A β (Fig. 1) [123]. By blocking the interaction A β -p75NTR with NGF or the inhibition of NF κ B activation by curcumin or NF κ B SN50, respectively, A β -induced cell death was prevented [123]. Low concentrations of A β can activate Ras and ERK1/2 *via* p75NTR, in MDCK and RN22 cells as well as in cerebellar neurons (Fig. 1) [129]. Interestingly, using a neuroblastoma cell line devoid of neurotrophin receptors and engineered to express either a full-length or a death domain (DD)-truncated form of p75NTR, Constatini *et al.*, 2005 demonstrated that A β activates p38 and JNK and induces NF κ B translocation through its carboxyl-terminal domain [131]. In a recent report it has been shown that blocking binding of A β to p75NTR, with an antagonist peptide (sequence CATDIKGAEC), produced a reduction in A β -induced neurotoxicity in NIH-3T3 cells and cortical neurons [136], as well as the neuroinflammatory response induced by A β in B57BL/6 mice [137]. Altogether, the evidence shows that p75NTR and its associated intracellular pathways, constitute very interesting candidates for the development of pharmacological strategies against A β neuronal network disruption.

Integrin Signal Pathway

Integrins are members of a superfamily of membrane glycoproteins that are well expressed in all cell types [138].

Such glycoproteins form heterodimers composed of α and β subunits that act as receptors for extracellular matrix proteins and counterreceptors on adjacent cells [138]. Integrin-mediated cell to cell interactions are necessary for cell survival, since loss of this function can cause apoptosis [139]. Furthermore, in the central nervous system, integrins are widely expressed in synapses and dendritic spines and can regulate synaptic transmission and plasticity [27, 138, 140-142]. For instance, integrins regulate the memory-related plastic mechanism called long-term potentiation (LTP) [139]. Integrins contain the Arg-Gly-Asp attachment site that allows their interactions with other proteins during cell adhesion process [143]. Interestingly for this review, it is known that integrins bind A β in an analog domain composed of the aminoacid sequence Arg-His-Asp-Ser (Fig. 2) [144, 145]. Therefore, integrins and the intracellular pathways that can be evoked upon their activation have been related to AD (Fig. 2).

Integrins co-localize with senile plaques and dystrophic neurites in AD patients, as well as in transgenic animal models of this disease [146-149]. Several are the consequences of A β binding to integrins (Fig. 1); for instance, binding of A β to the integrin heterodimer α 1 β 1, activate the MAPKK-ERK2 pathway and induces neurite degeneration and cell death in hippocampal neurons (Fig. 2) [150], such effects were blocked by the general integrin inhibitor echistatin, as well as by antibodies against both α 1 and β 1 integrins [150]. When A β bind to α 1 and β 1 integrins, produce their internalization, and secondarily lead to apoptosis in SH-SY5Y cells [151]. In the same report, it was shown that treatment with integrin-binding proteins, such as fibronectin, laminin and collagen, protected against A β -induced apoptosis, and treatment with antibodies against both α 1 and β 1 integrins enhanced A β -induced neurotoxicity [151]. The later finding, was explained by suggesting that A β binding to integrins may disrupt their normal interaction with the extracellular matrix, which then triggers apoptosis, at least in SH-SY5Y cells. Another study, using the same cell line, showed that A β binds to α 1 integrin and activates focal adhesion kinase (FAK) and ERK1/2 (possibly through a Fyn-dependent mechanism), inducing the reactivation of the cell cycle and ultimately cell death (Fig. 2) [152]. The involvement of Fyn in this pathway was suggested by the inhibition of both processes with the Fyn inhibitor PP2, whereas the participation of FAK was revealed by its knock-down with an specific siRNA [152]. Other reports, using the SH-SY5Y cell line along with B103 cell and cortical neurons, have shown that A β increased the phosphorylation levels of FAK (Fig. 2) [149, 153, 154]. It is important to mention that FAK is a tyrosine kinase [139, 155], closely related to Fyn kinase [156-159]. FAK and Fyn, which are overexpressed in AD brains [160, 161], participate along with PI3K, in A β -induced tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein 2c (MAP2c) and TAU [154] (see Fig. 2). We have recently shown that A β -induced hippocampal network dysfunction is precluded in Fyn-knockout mice suggesting that Fyn kinase play an important role in A β -induced pathology [30].

The disruption of normal integrin function by A β may lead neurons to the reactivation of cell cycle and ultimately death [152]. This might explain why there is a reexpression in

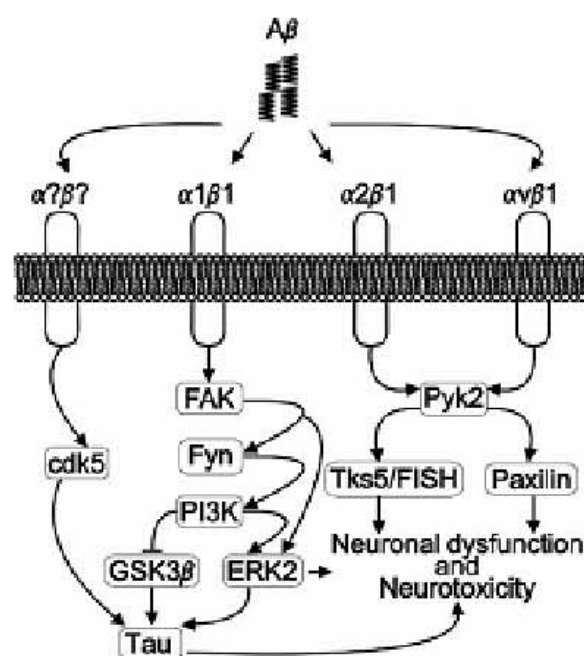


Fig. (2). A β activates integrin-mediated pathways. A β can bind and activate different types of integrins, including $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha v\beta 1$. Such activation induces several intracellular pathways that include as key players Pyk2, as a convergence kinase, and tyrosine kinases such as FAK and Fyn. Abbreviations: A β : amyloid beta protein; cdk5: cyclin-dependent kinase 5; ERK: extracellular signal-regulated kinase; FAK: focal adhesion kinase; GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; Pyk2: proline-rich tyrosine kinase 2; Tks/FISH: adapter protein.

the brain of AD patients of proteins related with the cell cycle like cell division cycle 2 (cdc2), cyclin B1, cyclin-dependent kinase 4 (cdk4), cyclin D, p16 and cyclin E, [162-166], as well as in the brain of AD transgenic mice [167]. As known, most normal neurons do not express cell cycle-related proteins, due to the fact that they are arrested in G₀, thus A β -induced reactivation of neuronal cell cycle destabilize their neuronal function and lead them to death [152].

An alternative pathway activated by the interaction between A β and $\alpha v\beta 1$ integrins, is the activation of proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) (Fig. 2) [149, 168-170]. Such activation of Pyk2 then activates the adaptor proteins Tks5/FISH or Paxillin, which are involved in neuronal dysfunction and neurotoxicity [149, 168-170]. Interestingly, endogenous ligands of integrins, such as fibronectin and collagen, prevent the neurotoxic effects just described [168]. Finally, a recent report has shown that the reduction of LTP induced by soluble A β is blocked by antibodies against αv integrin both *in vivo* and *in vitro* [27]. Overall, the information reviewed shows that integrins are a major target of A β . The intracellular pathways triggered by this interaction may lead to both neuronal dysfunction and death, and therefore this molecular system constitutes a potential therapeutic target against A β -induced neuronal network dysfunction and possibly against AD.

Microglial Receptors (SR-A, FPRL1 and CD36/ $\alpha 6\beta 1$ /CD47)

A hallmark in the AD disease is a potent inflammation response promoted by activated microglial cells [171]. It has been reported that microglial cells surround senile plaques [172, 173] and that A β promotes cytokines production by those cells [174-176]. Furthermore microglial cells are not just activated by A β but phagocytose it [177-179]. Overall, these results indicate that microglial cells represent a key factor for understanding AD and for providing with therapeutic target against the disease. Several are the putative receptors that may be involved in A β -induced activation of microglial cells (Fig. 3), including receptor for advanced glycation end products (RAGE), tumor necrosis factor receptor (TNF-R) as well as several microglial receptors such as scavenger receptor A (SR-A), formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) and a complex called CD36/ $\alpha 6\beta 1$ /CD47 (Fig. 3). We will review the interaction of A β with these four receptors next.

It is well known that senile plaques are surrounded by microglial cells that express the SR-A (Fig. 3) [180-182]. SR-A was the first receptor shown to participate in binding and internalization of A β by microglial cells (Fig. 3) [183, 184]. Subsequently, it has been reported that microglia from SR-A knockout mice bind A β less efficiently [185, 186]. Using human monocytes, N9 microglia cell line and primary rat microglial cells, it was found that A β binds to SR-A [183]. Upon binding to SR-A, A β inhibits cell migration (chemotaxis) and also promotes ROS production in those cells [183]. Also it has been reported that microglial cells internalize A β in a SR-A-dependent manner [184]. Similarly, the type B1 SR receptor (SR-B1) also binds and internalize A β and induce ROS production in microglial cultures (Fig. 3) [186].

The FPRL1, a G_i protein-coupled receptor involved in immune response [187, 188], is highly expressed by inflammatory cells infiltrating senile plaques in brain tissues from AD patients [189, 190]. A β binds and activates human FPRL1 (Fig. 3) as well as its mouse counterpart FPR2, which activates microglial cells, promoting chemotaxis [190, 191]. Such effect can be blocked by desensitizing FPRL1 with its agonist fMLF [191]. When FPRL1 is overexpressed in HEK293 cells, A β activation of this receptor induces calcium influx and chemotaxis [190, 191]. A β can also be internalized upon binding to FPRL1, such internalization is involved in the intracellular aggregation of A β into microglia [187, 192]. Recently it has been shown that the FPRL1-mediated A β internalization is a phospholipase D (PLD)-dependent processes (Fig. 3), which can be observed either in microglia or astrocytes [193]. Such process can be reverted using the FPRL1 antagonist WRW4, as well as PTX [194].

The cluster of differentiation 14 (CD14) is the lipopolysaccharide (LPS) receptor [195], which is localized in microglial cells and seem to be another putative receptor for A β (Fig. 3). For instance, coimmunoprecipitation of A β with CD14 was confirmed with binding assays, which show that A β binds CD14 with high affinity (K_d = 1 nM) [196]. Moreover, flow cytometry, confocal microscopy and two-photon fluorescence lifetime imaging (FLIM), combined

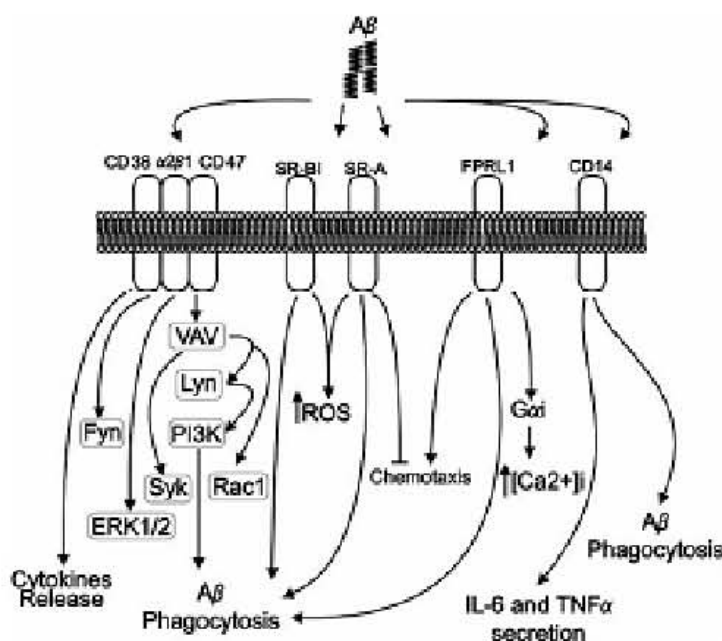


Fig. (3). Main receptors and intracellular pathways activated by A β in microglia. Most of the pro-inflammatory response induced by A β , involves microglial activation. This event is triggered by binding of A β to several types of receptors including scavenger receptors and "cluster of differentiation" (CD) receptors. In all cases, A β activation of such receptors leads to phagocytosis and/or cytokines release. It is important to mention that tyrosine kinases play a major role in the transduction of the receptor complex form by CD36 and 47 associated to integrin $\alpha 2\beta 1$. Abbreviations: A β : amyloid beta protein; CD14: cluster of differentiation 14; CD36: cluster of differentiation 36; CD47: cluster of differentiation 47; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; FPRL1: formyl peptide receptor-like 1; IL-6: interleukin 6; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; ROS: reactive oxygen species. SR-A: scavenger receptor A; SR-BI: BI SR receptor; TNF α : tumor necrosis factor α .

with fluorescence resonance energy transfer (FRET), confirmed a direct interaction between A β and CD14 in CHO cells transfected with human CD14 receptor [197]. Interestingly, the A β -induced cytokine secretion (IL-6 or TNF- α) is not observed in microglial cells obtained from CD14 knockout mice [196]. As mentioned for the other microglial receptors, binding of A β to CD14 induces its internalization; which is dramatically reduced in microglial cells obtained from CD14 knockout mice [197].

At the microglial cell membrane, A β also interacts with a receptor complex composed of the B class scavenger receptor (CD36), $\alpha 6\beta 1$ -integrin and CD47, an integrin-associated protein (Fig. 3) [198-200]. A β activation of this receptor complex induces tyrosine phosphorylation of several proteins; it also induces activation of Fyn kinase, ERK and eventually induces cytokine release (Fig. 3) [198]. Inhibition of such receptor complex, with the scavenger receptor antagonist fucoidan, the CD47 inhibitor 4N1K, as well as with inhibitory peptides for CD36 and $\alpha 6\beta 1$ -integrin, reverted the effects just described [198]. A β interaction with this receptor complex also induces A β internalization in the immortalized murine microglia cell line BV-2 and primary microglia cultures [199]. Accordingly, application of some antagonists for several members of such receptor complex reduced A β internalization [199]. Such A β internalization seems to be mediated by the activation of Syk kinase (a member of Src-

family tyrosin kinases) as well as by PI3K (Fig. 3), since the application of the specific Syk inhibitor picotanol, the Src inhibitor PP2 and the PI3K inhibitor LY294002, blocked A β internalization [199]. A recent report has suggested that tyrosine kinase Vav is involved in the signaling pathway triggered by A β -induced activation of the receptor complex in human THP-1 monocytes [200]. This suggestion is based on the fact that A β -induced activation of the receptor complex in human THP-1 monocytes produces the activation of Lyn and Syk kinases in a Vav-dependent manner [200-202].

RAGE

The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a member of the immunoglobulin superfamily, composed of three extracellular Ig-like domains (V_d , C_{1d} , C_{2d}), a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail [203, 204]. Interestingly for this review, RAGE is overexpressed in the brain of AD patients [205, 206] and constitutes a membrane binding site for A β (K_d = 50-100 nM) at neurons, microglial cells, as well as endothelial cells [205-209]. In those cells, A β -induced RAGE activation induces cell death [205, 210]. Accordingly, an antibody against RAGE prevents A β -induced cell death on SHSY-5Y cells overexpressing RAGE and rat cortical neurons stimulated with A β [203]. The receptor domains implicated in the neurotoxic effect were the V_d for A β oligomeric forms and C_{1d} for A β fibrillar

forms [203]. Regarding intracellular signaling, interaction of A β with RAGE, in SH-SY5Y cells, induces ERK1/2 and Akt phosphorylation through MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) and PI3K respectively, since the MEK1 inhibitor PD98059, and the PI3K-inhibitor LY294002, abolished such activation [211]. A β interaction with RAGE also induces activation of I κ B α and the NF κ B translocation inhibitor SN50 [211]. However the activation of the two pathways just described seems not to be involved in A β -induced RAGE-mediated neurotoxicity. In contrast the JNK-inhibitor I and SB203580, a p38 inhibitor, reduced A β -induced RAGE-mediated neurotoxicity [211].

A β -induced RAGE activation in neuroblastoma cells increase the levels of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through the activation of NF κ B [212]. Interestingly M-CSF as well as VCAM-1 expression is increased in the brain of AD patients [212, 213] as well as the brain of AD mouse models [214]. Interestingly, M-CSF can activate microglia cells and enhance A β induced interleukin-1, interleukin-6 and NO production by such cells [215]. Microglial cells isolated from AD patients can release M-CSF upon A β activation of RAGE, since such release can be inhibited with antibodies anti-RAGE [206]. M-CSF is able to induce expression of RAGE which creates a positive loop that could favor the inflammatory process in AD [206].

A transgenic AD mouse model which overexpresses murine amyloid precursor protein (mAPP) and RAGE, displays functional abnormalities in spatial learning and memory, accompanied by promoting synaptic dysfunction and LTP reduction, as well as a progressive density decrease of cholinergic fibers and synapses, long before the same changes are expressed in mAPP transgenic mice [216]. An increase of NF κ B translocation, microgliosis and astrocytosis surrounding senile plaques, phosphorylated forms of cAMP response element binding (CREB), p38, ERK1/2, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), was detected in the mAPP/RAGE mouse [216]. In contrast a transgenic mouse overexpressing mAPP along with a dominant-negative RAGE, shows a reduction in the alterations in spatial learning and memory, well as a decrease in neuropathologic changes, compared with the mAPP transgenic mice [216].

Despite many evidence that RAGE could mediate A β -induced neurodegeneration, in a report using PC12 cells, B12 cells or rat primary cortical neurons, it was shown that neurotoxicity by A β was not affected when RAGE was inactivated with trypsin [217].

TNF-R1

Tumor necrosis factor (TNF, cachexin or cachectin and formally known as tumor necrosis factor- α , TNF α) is a cytokine involved in inflammation. Both TNF α and its receptor (TNF-R1) are increased in brain AD patients [218-222]. AD patients carrying the TNF α -308 A/G polymorphism and the apolipoproteinE (APOE) 4 allele had a lower mean age of AD onset [223]. AD brain microglia produce 1.5 times more TNF α than age with matched controls [224]. A β binds and activates TNF-R1 high affinity ($K_d = 0.42$ nM). A β -induced activation of TNF-R1 promotes neuronal death by inducing the activation of NF κ B and by altering the expression of the

apoptotic protease-activating factor (Apaf-1) [220]. Such A β -induced TNF-R1-mediated apoptosis, along with the intracellular mechanisms just mentioned, is absent in a TNF-R1 knock out mice [220]. Recently it has been reported that the spatial learning alteration and the reduction of nerve terminals, observed in a mouse model of AD, are dependent on TNF-R1 [225]. Furthermore, it has been shown that the A β -induced inhibition of hippocampus LTP occurs as a consequence of release of endogenous TNF α and the subsequent activation of TNF-R1 mediated by A β oligomers [27]. Accordingly, A β -induced inhibition of hippocampus LTP is not observed in a mouse knock out for TNF-R1 [226]. Interestingly a prospective pilot study of 15 AD patients given a TNF α antagonist, etanercept, for 6 months showed significant improvement in 3 cognitive tests instead of the decline seen for untreated patients [227]. Furthermore, deletion of TNFR1 in APP23 transgenic mice prevents learning and memory deficits [228].

Insulin Receptor

A β can also competitively bind and coimmunoprecipitate with insulin receptor (IR; K_d 8-25 mM); inhibiting receptor autophosphorylation and therefore blocking its signaling pathway [229-231]. A β also blocks IR-induced activation of ERK, CaMKII and Akt and these effects might be related to A β -induced inhibition of LTP, since the the A β -induced reduction in the activation of ERK, CaMKII and Akt is mimicked by the the IR antagonist AG1024 and A β -induced inhibition of LTP can partially be reverted by insulin [230]. A β can also induce the redistribution of IR, since A β application to hippocampal cultures produces a rapid and substantial loss of IR at dendrites surface, whereas produces an increased receptor immunoreactivity in the cell body [229]. Concomitantly with receptor redistribution, A β increases IR-mediated phosphorylation of Akt at serine473. The later is a molecular event related to neurodegeneration and insulin resistance [229].

INTRACELLULAR PATHWAYS EVOKED BY A β WITH NOT IDENTIFIED MEMBRANE RECEPTOR ("ORPHAN" INTRACELLULAR PATHWAYS)

So far, we have reviewed several putative A β receptors and the intracellular pathways associated to them, however a careful review of the literature, shows a great amount of reports indicating that A β modulates several elements of different intracellular pathways, however the membrane receptor involved in such modulation remains undetermined [232-235]. However, due to the fact that several of those enzymes seem to be strongly related to the A β -induced effect and may constitute promising therapeutic targets against A β -induced effects, we want to mention some of them.

As already mentioned, several kinases known to phosphorylate Tau protein are activated by A β on neurons, including GSK3 β and Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) [232-235]. A β also induce the activation of MAPKs in hippocampal and cortical neurons, as well as PC12 and SH-SY5Y human neuroblastoma cells, producing neurotoxicity [67, 236-238]. On THP-1 monocytic cell line, A β can activate ERK1/2 kinases [201]. Pretreatment with PPI (the Src-family tyrosine kinase inhibitor) and piceatannol (a Syk kinase inhibitor) inhibited such ERK activation. Furthermore the calcium

ATPase inhibitors 2,5-ditert-butylhydroquinone (DTBHQ) and thapsigargin, the ryanodine receptor inhibitor dantrolene, as well as the calcium chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), also decrease such A β -induced ERK activation suggesting that Lyn, Syk and intracellular store-mediated calcium rising are activated upon A β application to these cells [201]. The protein kinase C (PKC) inhibitor Go6976 (specific for calcium dependent PKC isoforms) also prevents A β -induced ERK activation. Same effect is achieved inhibiting Pyk2 and Lyn with the broad Src-like inhibitor PP1 [201]. A Pyk2 target called paxillin is also activated by A β in THP-1 monocytes; such activation is blocked by the PKC inhibitor Go6976, the Src-like inhibitor PP1 and the calcium ATPase inhibitor DTBHQ [201].

It has been reported that A β induces the expression, in a PKC-dependent manner, of cyclooxygenase 2 (COX-2) which subsequent increases prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes, such effect of A β can be blocked by the PKC inhibitor GF109203X [239]. Related to this finding, it has also being reported that A β can induce cyclooxygenase 1 activation and prostaglandin D2 production [240].

Intracerebroventricular injection of A β induces an inflammatory response in response the hippocampal CA1 area, characterized by astrocytes infiltration and the overexpression of interleukin-1b, caspase 3 and the pro-apoptotic protein FasL, as well as the activation of p38 MAPK [241]. In contrast, A β injection reduces the expression of several surviving-related proteins such as ERK1/2 and Akt/PKB [241]. Sodium ferulate (SF), which is extracted from *Scrophularia frutescens*, blocks the A β -induced increase in the the apoptotic pathway (p38MAPK, Caspase 3 and FasL) and the decrease of the survival pathway (ERK1/2 and Akt/PKB) [242]. Using the same experimental paradigm, intracerebroventricular injection of A β activates MKK3/MKK6, p38 MAPK and promotes an increase in IL-1b levels, while reduces activation of MAPKAPK-2 and its downstream target Hsp27 [243]. SF and the p38MAPK inhibitor SB203580 reverted such A β -induced effects [243].

A β application to retinal pericytes results in arachidonic acid (AA) production, such effect is reduced by applying the MEK inhibitor PD98059, the p38 MAPK inhibitor SB203580 and the PKC inhibitor GF109203X [176]. Same inhibitors also prevented A β -induced phosphorylation and overexpression of phospholipase A2 [176].

As already mentioned, GSK3 β is a major player in A β -induced neurotoxicity. For instance, the A β -induced neurotoxicity observed in primary cultures of embryonic rat hippocampal neurons is reduced when the culture is pretreated with a GSK3 β antisense oligonucleotide [232]. Furthermore, A β -induced GSK3 β -mediated neurotoxicity and Tau phosphorylation, seem to involve the inhibition of PI3K by A β [244]. In this experiment PI3K activity was determined by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) production, and a decrease in PIP3 levels was observed upon A β application [244]. Finally, inhibiting GSK3 β either with lithium or with the GSK3 β inhibitor VIII prevents A β -induced Tau phosphorylation and neuronal death [234, 240]. These evidences are in agreement with clinical observations in AD

patients. First of all, there is increased GSK3 β activity in the frontal cortex in AD patients, as evidenced by immunoblotting for GSK3 β phosphorylated at Tyr216 [245]. Furthermore, GSK3 β expression is up-regulated in the hippocampus of AD patients [246] and in post-synaptosomal supernatants derived from AD brain [247]. GSK3 β expression is also up-regulated in circulating peripheral lymphocytes in both AD and in mild cognitive impairment patients [248]. It has also been reported that a polymorphism in the GSK3 β promoter as a risk factor for late onset AD [249]. Furthermore it has been observed that GSK3 β co-localize with dystrophic neurites and neurofibrillar tangles [233, 247, 250, 251] and that active GSK3 β is observed in neurons with pre-tangle changes [252].

Calcium/calmodulin regulated phosphatase or calcineurin, seem to be involved in A β -induced effects. For instance, A β -induced reduction of late-phase LTP in the hippocampal dentate gyrus involves A β -induced calcineurin activation [253]. Furthermore A β -induced neurotoxicity also involved the activation of calcineurin in cortical neuron primary cultures [254]. As known, calcineurin dephosphorylates and activates BAD, a proapoptotic member of Bcl-2 family, which triggers cytochrome c release and caspase 3 activation [255, 256]. Blocking calcineurin activity with FK506 or cyclosporine prevents neurotoxicity [253-256]. Interestingly in a transgenic mouse AD model, calcineurin activity is elevated and, on top of that, A β induces a further activation of calcineurin activity which then dephosphorylates and activates CREB, promoting cell death [257].

Finally A β -induced effects also seem to be dependent on the activation of a protein kinase called Fyn, a Src family tyrosine kinase member, which is widely expressed on the nervous system [157-159] and is increased in the brain of AD patients [160, 161]. Interestingly the described A β -induced LTP disruption and neurotoxicity is not observed in Fyn KO mice [21]. Furthermore the synaptotoxicity and cognitive impairments in a AD mouse model of AD seem to be mediated by Fyn [258]. As already mentioned, we have recently shown that A β -induced hippocampal network dysfunction is precluded in Fyn-knockout mice suggesting that Fyn kinase play an important role in A β -induced pathology [30].

CONCLUDING REMARKS

The evidence reviewed show that A β interacts with a wide variety of membrane receptors and this interaction produces a complex response, involving several cell types, that eventually lead to neuronal network dysfunction, which then may be responsible for the early cognitive deficits observed in AD patients. The review of these receptors, along with the intracellular pathways associated with them, provide with promising therapeutic targets against A β -induced brain dysfunction and cognitive decline. However, it is important to identify which of these molecules, when pharmacologically activated or inhibited in order to overcome A β -induced effects, are associated with less side effects. It is important to take into account that the receptors and the intracellular pathways mentioned in this review are involved in several neuronal, and non-neuronal processes, which are important for normal brain function and that its pharmacological altera-

tion may be more harmful than the A β -induced effect. Thus the challenge for the coming years is to carefully dissect the A β -mediated molecular mechanisms to identify those therapeutic targets that may inhibit the A β -mediated neuronal network dysfunction without affecting normal brain function.

ABBREVIATIONS

AA	=	Arachidonic acid	LEHD	=	Ac-LEHD-CHO
AD	=	Alzheimer's disease	LPS	=	Lipopolysaccharide
Apaf-1	=	Apoptotic protease-activating factor	LTP	=	Long term potentiation
APOE	=	apolipoprotein	MAP2c	=	Microtubule-associated protein 2c
APP	=	Amyloid precursor protein	MAPK	=	The mitogen-activated protein kinase
APV	=	2-amino-phosphonovaleric acid	mAPP	=	Murine amyloid precursor protein
AZD-103	=	Scyllo-inositol	M-CSF	=	Macrophage colony-stimulating factor
A β	=	Amyloid beta protein	MEK1	=	MAPK/ERK kinase 1
BAPTA	=	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid	MK-801	=	5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
BTX	=	α -bungarotoxin	MLA	=	Methyllycaconitine
CAMKII	=	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	NF κ B	=	Nuclear factor κ B
CD14	=	Cluster of differentiation 14	NGF	=	Nerve growth factor
CD36	=	Cluster of differentiation 36	NMDA-R	=	N-methyl-D-aspartic acid receptor
CD47	=	Cluster of differentiation 47	NO	=	Nitric oxide
cdc2	=	Cell division cycle 2, also referred to as cyclin-dependent kinase 1	p75NTR	=	p75 neurotrophin receptor
cdk4	=	Cyclin-dependent kinase 4	PI3K	=	Phosphoinositide 3-kinase
cdk5	=	Cyclin-dependent kinase 5	PIP3	=	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
COX-2	=	Cyclooxygenase 2	PKC	=	Protein kinase C
CPP	=	3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid	PLD	=	Phospholipase D
CREB	=	cAMP response element binding	PP2	=	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i>]pyrimidine
DEVD	=	Ac-DEVD-CHO	PP2B	=	Protein phosphatase 2B
DMXB	=	3-(2,4)-dimethoxybenzylidene	PTX	=	Pertussis toxin
DTBHQ	=	2,5-ditert-butylhydroquinone	Pyk2	=	Proline-rich tyrosine kinase 2
ERK	=	Extracellular signal-regulated kinase	RAGE	=	Receptor for advanced glycation end products
FAK	=	Focal adhesion kinase	ROS	=	Reactive oxygen species
FLIM	=	Fluorescence lifetime imaging	SF	=	Sodium ferulate
FPRL1	=	Formyl peptide receptor-like 1	siRNA	=	Small interfering RNA
FRET	=	Fluorescence resonance energy transfer	SR-A	=	Scavenger receptor A
GMpC	=	Guanosine cyclic monophosphate	SR-BI	=	BI SR receptor
GSK3 β	=	Glycogen synthase kinase 3 β	STEP	=	Striatal-enriched phosphatase
IR	=	Insulin receptor	TNFR1	=	TNF receptor 1
JNK1	=	c-Jun N-terminal kinase 1	TNF α	=	Tumor necrosis factor- α
			VCAM-1	=	Vascular cell adhesion molecule-1
			Z-VAD-FMK	=	Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone
			α 7nChRs	=	α 7 nicotinic receptors

REFERENCES

- [1] Hebert, L.E.; Scherr, P.A.; Bienias, J.L.; Bennett, D.A.; Evans, D.A. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.*, 2003, 60, 1119-22.
- [2] Terry, R.D.; Masliah, E.; Salmon, D.P.; Butters, N.; DeTeresa, R.; Hill, R.; Hansen, L.A.; Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.*, 1991, 30, 572-80.
- [3] Nowotny, P.; Kwon, J.M.; Chakraverty, S.; Nowotny, V.; Morris, J.C.; Goate, A.M. Association studies using novel polymorphisms in BACE1 and BACE2. *Neuroreport*, 2001, 12, 1799-802.
- [4] Selkoe, D.J. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem. Res.*, 2003, 28, 1705-13.
- [5] Peña, F.; Gutiérrez-Lerma, A.; Quiroz-Raez, R.; Arias, C. The Role of beta-Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer's Disease Therapy. *Curr. Neuropharmacol.*, 2006, 4, 149-63.
- [6] Braak, H.; Braak, E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1997, 18, S85-8.
- [7] Luna-Munoz, J.; Chavez-Macias, L.; Garcia-Sierra, F.; Mena, R. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2007, 12, 365-75.
- [8] Luna-Munoz, J.; Garcia-Sierra, F.; Falcon, V.; Menendez, I.; Chavez-Macias, L.; Mena, R. Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Abz-50 antibody in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2005, 8, 29-41.
- [9] Lue, L.F.; Kuo, Y.M.; Roher, A.E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J.H.; Rydel, R.E.; Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1999, 155, 853-62.
- [10] Nashund, J.; Haroutunian, V.; Mohs, R.; Davis, K.L.; Davies, P.; Greengard, P.; Buxbaum, J.D. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 2000, 283, 1571-7.
- [11] Hsia, A.Y.; Masliah, E.; McConlogue, L.; Yu, G.Q.; Tatsumo, G.; Ihu, K.; Kholodenko, D.; Malenka, R.C.; Nicoll, R.A.; Mucke, L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96, 3228-33.
- [12] Moechars, D.; Dewachter, I.; Lorent, K.; Reverse, D.; Baekelandt, V.; Naidu, A.; Tesseur, I.; Spittaels, K.; Haute, C.V.; Checler, F.; Godaux, E.; Cordell, B.; Van Leuven, F. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 6483-92.
- [13] Giacchino, J.; Criado, J.R.; Games, D.; Henriksen, S. In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res.*, 2000, 876, 185-90.
- [14] Mucke, L.; Masliah, E.; Yu, G.Q.; Mallory, M.; Rockenstein, E.M.; Tatsumo, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Johnson-Wood, K.; McConlogue, L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid precursor protein transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.*, 2000, 20, 4050-8.
- [15] Stephan, A.; Laroche, S.; Davis, S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 5703-14.
- [16] Glenner, G.G.; Wong, C.W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 122, 1131-5.
- [17] Masters, C.L.; Multhaup, G.; Simms, G.; Potgiesser, J.; Martins, R.N.; Beyreuther, K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.*, 1985, 4, 2757-63.
- [18] Kojro, E.; Gimpl, G.; Lammich, S.; Marz, W.; Fahrenholz, F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 5815-20.
- [19] Small, D.H. Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends. Mol. Med.*, 2008, 14, 103-8.
- [20] Cullen, W.K.; Suh, Y.H.; Anwyl, R.; Rowan, M.J. Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*, 1997, 8, 3213-7.
- [21] Lambert, M.P.; Barlow, A.K.; Chromy, B.A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T.E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K.L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C.E.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, 95, 6448-53.
- [22] Walsh, D.M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J.V.; Cullen, W.K.; Anwyl, R.; Wolfe, M.S.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 2002, 416, 535-9.
- [23] Rowan, M.J.; Klyubin, I.; Wang, Q.; Anwyl, R. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. *Exp. Gerontol.*, 2004, 39, 1661-7.
- [24] Wang, H.W.; Pasternak, J.F.; Kuo, H.; Ristic, H.; Lambert, M.P.; Chromy, B.; Viola, K.L.; Klein, W.L.; Stine, W.B.; Krafft, G.A.; Trommer, B.L. Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.*, 2002, 924, 133-40.
- [25] Wang, Q.; Rowan, M.J.; Anwyl, R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J. Neurosci.*, 2004, 24, 6049-56.
- [26] Wang, Q.; Walsh, D.M.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J.; Anwyl, R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated *via* activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J. Neurosci.*, 2004, 24, 3370-8.
- [27] Rowan, M.J.; Klyubin, I.; Wang, Q.; Hu, N.W.; Anwyl, R. Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35, 1219-23.
- [28] Sun, M.K.; Alkon, D.L. Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35). *J. Neurophysiol.*, 2002, 87, 2441-9.
- [29] Driver, J.E.; Raccia, C.; Cunningham, M.O.; Towers, S.K.; Davies, C.H.; Whittington, M.A.; LeBeau, F.E. Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations *in vivo* in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP). *Eur. J. Neurosci.*, 2007, 26, 1280-8.
- [30] Peña, P.; Ordaz, B.; Balleza-Tapia, H.; Bernal-Pedraza, R.; Márquez-Ramos, A.; Carmona-Aguirre, L.; Girordano, M. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus*, 2009, (In press).
- [31] Cacucci, F.; Vi, M.; Wills, T.J.; Chapman, P.; O'Keefe, J. Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576 Alzheimer mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, 105, 7863-8.
- [32] Rubins, P.V.; Lyketsos, C.G. Cholinesterase inhibitors and memantine have a role in the treatment of Alzheimer's disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2006, 2, 578-9.
- [33] Munoz-Torres, D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15, 2433-55.
- [34] Castro, A.; Martinez, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.*, 2006, 12, 4377-87.
- [35] Doody, R.S. Cholinesterase inhibitors and memantine: best practices. *CNS Spectr.*, 2008, 13, 34-5.
- [36] Zimmermann, M.; Gardoni, F.; Marcello, E.; Colciaghi, F.; Borroni, B.; Padovani, A.; Cattabeni, F.; Di Luca, M. Acetylcholinesterase inhibitors increase ADAM10 activity by promoting its trafficking in neuroblastoma cell lines. *J. Neurochem.*, 2004, 90, 1489-99.
- [37] Aguado, F.; Espinosa-Parrilla, J.F.; Carmona, M.A.; Soriano, E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes *in situ*. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 9430-44.
- [38] Farfara, D.; Lifshitz, V.; Frenkel, D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, 12, 762-80.

- [39] Scatena, R.; Martorana, G.E.; Bottoni, P.; Botta, G.; Pastore, P.; Giardina, B. An update on pharmacological approaches to neurodegenerative diseases. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 2007, 16, 59-72.
- [40] Ramassamy, C.; Longpre, F.; Christen, Y. Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr. Alzheimer Res.*, 2007, 4, 253-62.
- [41] Spencer, B.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Marr, R.; Masliah, E. Novel strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2007, 7, 1853-67.
- [42] Verdier, Y.; Penke, B. Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 2004, 5, 19-31.
- [43] Verdier, Y.; Zarandi, M.; Penke, B. Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci.*, 2004, 10, 229-48.
- [44] Cowburn, R.F.; Wiehager, B.; Trief, E.; Li-Li, M.; Sundstrom, E. Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem. Res.*, 1997, 22, 1437-42.
- [45] Cullen, W.K.; Wu, J.; Anwyl, R.; Rowan, M.J. beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport*, 1996, 8, 87-92.
- [46] Ye, C.; Walsh, D.M.; Selkoe, D.J.; Hartley, D.M. Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neurosci. Lett.*, 2004, 366, 320-5.
- [47] Self, R.L.; Smith, K.J.; Mulholland, P.J.; Prendergast, M.A. Ethanol exposure and withdrawal sensitizes the rat hippocampal CA1 pyramidal cell region to beta-amyloid (25-35)-induced cytotoxicity: NMDA receptor involvement. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2005, 29, 2063-9.
- [48] Montiel, T.; Quiroz-Baez, R.; Massieu, L.; Arias, C. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp. Neurol.*, 2006, 200, 498-508.
- [49] Lipton, S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2006, 5, 160-70.
- [50] Kelly, B.L.; Ferreira, A. beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 28079-89.
- [51] Pellistri, F.; Bucciantini, M.; Relini, A.; Nosi, D.; Gliozzi, A.; Robello, M.; Stefani, M. Non-specific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with NMDA and AMPA receptors results in Ca²⁺ increase in primary neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 2008.
- [52] De Felice, F.G.; Velasco, P.T.; Lambert, M.P.; Viola, K.; Fernandez, S.J.; Ferreira, S.T.; Klein, W.L. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 11590-601.
- [53] Domingues, A.; Almeida, S.; da Cruz e Silva, E.F.; Oliveira, C.R.; Rego, A.C. Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Neurochem. Int.*, 2007, 50, 872-80.
- [54] Abbott, J.J.; Howlett, D.R.; Francis, P.T.; Williams, R.J. Abeta(1-42) modulation of Akt phosphorylation via alpha7 nAChR and NMDA receptors. *Neurobiol. Aging*, 2008, 29, 992-1001.
- [55] Le, W.D.; Colom, L.V.; Xie, W.J.; Smith, R.G.; Alexianu, M.; Appel, S.H. Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res.*, 1995, 686, 49-60.
- [56] Klegeris, A.; Walker, D.G.; McGeer, P.L. Regulation of glutamate in cultures of human monocyte THP-1 and astrocytoma U-373 MG cells. *J. Neuroimmunol.*, 1997, 78, 152-61.
- [57] Galimberti, D.; Baron, P.; Meda, L.; Prat, E.; Scarpini, E.; Delgado, R.; Catania, A.; Lipton, J.M.; Scarlato, G. Alpha-MSH peptides inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by microglial cells activated with beta-amyloid and interferon gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 263, 251-6.
- [58] Combs, C.K.; Karlo, J.C.; Kao, S.C.; Landreth, G.E. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 1179-88.
- [59] Floden, A.M.; Li, S.; Combs, C.K. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 2005, 25, 2566-75.
- [60] O'Mahony, S.; Harkany, T.; Rensink, A.A.; Abraham, I.; De Jong, G.J.; Varga, J.L.; Zarandi, M.; Penke, B.; Nyakas, C.; Luiten, P.G.; Leonard, B.E. Beta-amyloid-induced cholinergic denervation correlates with enhanced nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex: reversal by NMDA receptor blockade. *Brain Res. Bull.*, 1998, 45, 405-11.
- [61] Nomura, I.; Kato, N.; Kita, T.; Takechi, H. Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.*, 2005, 391, 1-6.
- [62] Shankar, G.M.; Bloodgood, B.L.; Townsend, M.; Walsh, D.M.; Selkoe, D.J.; Sabatini, B.L. Nanolar oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.*, 2007, 27, 2866-75.
- [63] Wu, J.; Anwyl, R.; Rowan, M.J. beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport*, 1995, 6, 2409-13.
- [64] Molnar, Z.; Soos, K.; Lengyel, I.; Penke, B.; Szegedi, V.; Budai, D. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus *in vivo*. *Neuroreport*, 2004, 15, 1649-52.
- [65] Wu, J.; Anwyl, R.; Rowan, M.J. beta-Amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 284, R1-3.
- [66] Kawamoto, E.M.; Lepsch, L.B.; Boaventura, M.P.; Munhoz, C.D.; Lima, L.S.; Yshii, L.M.; Avellar, M.C.; Curi, R.; Mattson, M.P.; Scavone, C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J. Neurosci. Res.*, 2008, 88, 845-60.
- [67] Rapoport, M.; Ferreira, A. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J. Neurochem.*, 2000, 74, 125-33.
- [68] Scholtzova, H.; Wadghiri, Y.Z.; Douadi, M.; Sigurdsson, E.M.; Li, Y.S.; Quartermain, D.; Banerjee, P.; Wisniewski, T. Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's disease-model transgenic mice shown as by magnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Res.*, 2008, 86, 2784-91.
- [69] Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pasca, N.; McClymont, D.W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M.L.; Minarini, A.; Tumiati, V.; Andrisano, V.; Mellor, I.R.; Melchiorre, C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 4381-4.
- [70] Nordberg, A.; Alafuzoff, I.; Wimblad, B. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J. Neurosci. Res.*, 1992, 31, 103-11.
- [71] Breese, C.R.; Adams, C.; Logel, J.; Drebing, C.; Rollins, Y.; Barnhart, M.; Sullivan, B.; Demasters, B.K.; Freedman, R.; Leonard, S. Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 mRNA and [125I]-alpha-bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J. Comp. Neurol.*, 1997, 387, 385-98.
- [72] Hellstrom-Lindahl, E.; Mousavi, M.; Zhang, X.; Ravid, R.; Nordberg, A. Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1999, 66, 94-103.
- [73] Paterson, D.; Nordberg, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.*, 2000, 61, 75-111.
- [74] Gotti, C.; Clementi, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.*, 2004, 74, 363-96.
- [75] Buisson, B.; Bertrand, D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002, 23, 130-6.
- [76] Wevers, A.; Schroder, H. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 1999, 1, 207-19.
- [77] Burghaus, L.; Schutz, U.; Krempel, U.; de Vos, R.A.; Jansen Steur, E.N.; Wevers, A.; Lindstrom, J.; Schroder, H. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral

- cortex of Alzheimer patients. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2000, 76, 383-8.
- [78] Kern, W.R. The brain $\alpha 7$ nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBBA (GTS-21). *Behav. Brain Res.*, 2000, 113, 169-81.
- [79] Perry, E. Cholinergic signaling in Alzheimer disease: therapeutic strategies. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 1995, 9 Suppl 2, 1-2.
- [80] McQuisston, A.R.; Madison, D.V. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 2887-96.
- [81] Couturier, S.; Bertrand, D.; Matter, J.M.; Hernandez, M.C.; Bertrand, S.; Millar, N.; Valera, S.; Barkas, T.; Ballivet, M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron*, 1990, 5, 847-56.
- [82] Couturier, S.; Erkmann, L.; Valera, S.; Rungger, D.; Bertrand, S.; Boulter, J.; Ballivet, M.; Bertrand, D. $\alpha 5$, $\alpha 3$, and non- $\alpha 3$. Three clustered avian genes encoding neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related subunits. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 17560-7.
- [83] Frazier, C.J.; Rollins, Y.D.; Breese, C.R.; Leonard, S.; Freedman, R.; Dunwiddie, T.V. Acetylcholine activates an α -bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 1998, 18, 1187-95.
- [84] Freir, D.B.; Holscher, C.; Herron, C.E. Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus *in vivo*. *J. Neurophysiol.*, 2001, 85, 708-13.
- [85] Santos-Torres, J.; Fuente, A.; Criado, J.M.; Riobobos, A.S.; Heredia, M.; Vajeyia, J. Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta-peptide in the medial septum. *J. Neurosci. Res.*, 2007, 85, 634-48.
- [86] Wang, H.Y.; Lee, D.H.; D'Andrea, M.R.; Peterson, P.A.; Shank, R.P.; Reitz, A.B. beta-Amyloid(1-42) binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 5626-32.
- [87] Wang, H.Y.; Lee, D.H.; Davis, C.B.; Shank, R.P. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.*, 2000, 75, 1155-61.
- [88] Dineley, K.T.; Westerman, M.; Bui, D.; Bell, K.; Ashe, K.H.; Sweatt, J.D. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade *via* hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: *In vitro* and *in vivo* mechanisms related to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4125-33.
- [89] Pemit, D.L.; Shao, Z.; Yakel, J.L. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J. Neurosci.*, 2001, 21, RC120.
- [90] Spencer, J.P.; Weil, A.; Hill, K.; Hussain, I.; Richardson, J.C.; Cusdin, F.S.; Chen, Y.H.; Randall, A.D. Transgenic mice over-expressing human beta-amyloid have functional nicotinic $\alpha 7$ receptors. *Neuroscience*, 2006, 137, 795-805.
- [91] Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Honda, K.; Nakamizo, T.; Shibasaki, H.; Kume, T.; Akaike, A. $\alpha 7$ nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 13541-6.
- [92] Shaw, S.; Bencherif, M.; Marrero, M.B. Janus kinase 2, an early target of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta(1-42) amyloid. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 44920-4.
- [93] Shimohama, S.; Kihara, T. Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol. Psychiatry*, 2001, 49, 233-9.
- [94] Guan, Z.Z.; Miao, H.; Tian, J.Y.; Unger, C.; Nordberg, A.; Zhang, X. Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nanomolar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *J. Neural Transm.*, 2001, 108, 1417-33.
- [95] Nagele, R.G.; D'Andrea, M.R.; Anderson, W.J.; Wang, H.Y. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2002, 110, 199-211.
- [96] Wang, H.Y.; Li, W.; Benedetti, N.J.; Lee, D.H. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 31547-53.
- [97] Hu, M.; Waring, J.F.; Gopalakrishnan, M.; Li, J. Role of GSK-3 β activation and $\alpha 7$ nAChRs in Abeta(1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. *J. Neurochem.*, 2008, 106, 1371-7.
- [98] Snyder, E.M.; Nong, Y.; Almeida, C.G.; Paul, S.; Moran, T.; Choi, E.Y.; Naim, A.C.; Salter, M.W.; Lombroso, P.J.; Gouras, G.K.; Greengard, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.*, 2005, 8, 1051-8.
- [99] Dineley, K.T.; Bell, K.A.; Bui, D.; Sweatt, J.D. beta-Amyloid peptide activates $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 25056-61.
- [100] Dougherty, J.J.; Wu, J.; Nichols, R.A. Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 6740-7.
- [101] Chun, J.H.; Tse, F.W.; Harris, K.; Jhamandas, J.H. Beta-amyloid enhances intracellular calcium rises mediated by repeated activation of intracellular calcium stores and nicotinic receptors in acutely dissociated rat basal forebrain neurons. *Brain Cell. Biol.*, 2006, 35, 173-86.
- [102] Martin, S.E.; de Fiebre, N.E.; de Fiebre, C.M. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-selective antagonist, methyllycaconitine, partially protects against beta-amyloid(1-42) toxicity in primary neuron-enriched cultures. *Brain Res.*, 2004, 1022, 254-6.
- [103] Liu, Q.; Kawai, H.; Berg, D.K. beta-Amyloid peptide blocks the response of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 4734-9.
- [104] Tozaki, H.; Matsumoto, A.; Kanno, T.; Nagai, K.; Nagata, T.; Yamamoto, S.; Nishizaki, T. The inhibitory and facilitatory actions of amyloid-beta peptides on nicotinic ACh receptors and AMPA receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 294, 42-5.
- [105] Grassi, F.; Palma, E.; Tonini, R.; Amici, M.; Ballivet, M.; Eusebi, F. Amyloid beta(1-42) peptide alters the gating of human and mouse α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J. Physiol.*, 2003, 547, 147-57.
- [106] Pym, L.; Kemp, M.; Raymond-Delpedch, V.; Buckingham, S.; Boyd, C.A.; Sattelle, D. Subtype-specific actions of beta-amyloid peptides on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 2005, 146, 964-71.
- [107] Wu, J.; Kuo, Y.P.; George, A.A.; Xu, L.; Hu, J.; Lukas, R.J. beta-Amyloid directly inhibits human $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in human SH-EP1 cells. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 37842-51.
- [108] Ji, D.; Lape, R.; Dani, J.A. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 2001, 31, 131-41.
- [109] Kihara, T.; Shimohama, S.; Sawada, H.; Kimura, J.; Kume, T.; Kochiyama, H.; Maeda, T.; Akaike, A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.*, 1997, 42, 159-63.
- [110] Chen, L.; Yamada, K.; Nabeshima, T.; Sokabe, M. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology*, 2006, 50, 254-68.
- [111] Marrero, M.B.; Papke, R.L.; Bhatti, B.S.; Shaw, S.; Bencherif, M. The neuroprotective effect of 2-(3-pyridyl)-1-azabicyclo[3.2.2]nonane (TC-1698), a novel $\alpha 7$ ligand, is prevented through angiotensin II activation of a tyrosine phosphatase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, 309, 16-27.
- [112] Shaw, S.; Bencherif, M.; Marrero, M.B. Angiotensin II blocks nicotine-mediated neuroprotection against beta-amyloid (1-42) *via* activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 11224-8.
- [113] Hellstrom-Lindahl, E.; Court, J.; Keverne, J.; Svedberg, M.; Lee, M.; Marufo, A.; Thomas, A.; Perry, E.; Bednar, I.; Nordberg, A. Nicotine reduces A beta in the brain and cerebral vessels of APPsw mice. *Eur. J. Neurosci.*, 2004, 19, 2703-10.
- [114] Hellstrom-Lindahl, E.; Mousavi, M.; Ravid, R.; Nordberg, A. Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol. Dis.*, 2004, 15, 351-60.
- [115] Brenner, D.E.; Kukull, W.A.; van Belle, G.; Bowen, J.D.; McCormick, W.C.; Teri, L.; Larson, E.B. Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology*, 1993, 43, 293-300.

- [116] Wang, P.N.; Wang, S.J.; Hong, C.J.; Liu, T.T.; Fuh, J.L.; Chi, C.W.; Liu, C.Y.; Liu, H.C. Risk factors for Alzheimer's disease: a case-control study. *Neuroepidemiology*, 1997, 16, 234-40.
- [117] White, H.K.; Levin, E.D. Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl.)*, 1999, 143, 158-65.
- [118] Wilson, A.L.; Langley, L.K.; Monley, J.; Bauer, T.; Rottunda, S.; McFall, E.; Kovera, C.; McCarten, J.R. Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1995, 51, 509-14.
- [119] Potter, A.S.; Newhouse, P.A. Effects of acute nicotine administration on behavioral inhibition in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2004, 176, 182-94.
- [120] Liu, Q.; Zhang, J.; Zhu, H.; Qin, C.; Chen, Q.; Zhao, B. Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB J.*, 2007, 21, 61-73.
- [121] Shim, S.B.; Lee, S.H.; Chae, K.R.; Kim, C.K.; Hwang, D.Y.; Kim, B.G.; Jee, S.W.; Sin, J.S.; Bae, C.J.; Lee, B.C.; Lee, H.H.; Kim, Y.K. Nicotine leads to improvements in behavioral impairment and an increase in the nicotine acetylcholine receptor in transgenic mice. *Neurochem. Res.*, 2008, 33, 1783-8.
- [122] Volkova, O.M.; Volkova, T.D.; Titova, M.A.; Gershevitsh, G.; medvinskaya, N.I.; Samokhin, A.N.; Kamynina, A.V.; Shalgunov, V.S.; Koroev, D.O.; Filatova, M.P.; Obzornaya, M.B.; Bobkova, N.V. New approaches to the immunotherapy of Alzheimer's disease with the synthetic fragments of alpha7 subunit of the acetylcholine receptor. *Bioorg. Khim.*, 2008, 34, 50-5.
- [123] Kuner, P.; Schubert, R.; Hertel, C. Beta-amyloid binds to p75NTR and activates NF-kappaB in human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.*, 1998, 54, 798-804.
- [124] Yaar, M.; Zhai, S.; Pilch, P.F.; Doyle, S.M.; Eisenhauer, P.B.; Fine, R.E.; Gilchrist, B.A. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 2333-40.
- [125] Yaar, M.; Zhai, S.; Fine, R.E.; Eisenhauer, P.B.; Arble, B.L.; Stewart, K.B.; Gilchrist, B.A. Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 7720-5.
- [126] Tsukamoto, E.; Hashimoto, Y.; Kametani, K.; Nikiura, T.; Aiso, S.; Nishimoto, I. Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells. *J. Neurosci. Res.*, 2003, 73, 627-36.
- [127] Zhang, Y.; Hong, Y.; Bounhar, Y.; Blacker, M.; Roucou, X.; Tounekti, O.; Vereker, E.; Bowser, W.J.; Federoff, H.J.; Goodyer, C.G.; LeBlanc, A. p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 7385-94.
- [128] Costantini, C.; Della-Bianca, V.; Formaggio, E.; Chiamulera, C.; Montessor, A.; Rossi, F. The expression of p75 neurotrophin receptor protects against the neurotoxicity of soluble oligomers of beta-amyloid. *Exp. Cell. Res.*, 2005, 311, 126-34.
- [129] Susen, K.; Blochl, A. Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *J. Mol. Med.*, 2005, 83, 720-35.
- [130] Hashimoto, Y.; Kametani, Y.; Tsukamoto, E.; Frankowski, H.; Kouyama, K.; Kita, Y.; Nikiura, T.; Aiso, S.; Bredesen, D.E.; Matsuoka, M.; Nishimoto, I. Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD. *J. Neurochem.*, 2004, 90, 549-58.
- [131] Costantini, C.; Rossi, F.; Formaggio, E.; Bernardoni, R.; Cecconi, D.; Della-Bianca, V. Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death. *J. Mol. Neurosci.*, 2005, 25, 141-56.
- [132] Perini, G.; Della-Bianca, V.; Polini, V.; Della Valle, G.; Dal-Pra, I.; Rossi, F.; Armato, U. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J. Exp. Med.*, 2002, 195, 907-18.
- [133] Sothibundhu, A.; Sykes, A.M.; Fox, B.; Underwood, C.K.; Thangnipon, W.; Coulson, E.J. Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci.*, 2008, 28, 3941-6.
- [134] Woolf, N.J.; Gould, E.; Butcher, L.L. Nerve growth factor receptor is associated with cholinergic neurons of the basal forebrain but not the pontomesencephalon. *Neuroscience*, 1989, 30, 143-52.
- [135] Coulson, E.J. Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.*, 2006, 98, 654-60.
- [136] Yaar, M.; Zhai, S.; Panova, I.; Fine, R.E.; Eisenhauer, P.B.; Blusztajn, J.K.; Lopez-Coviella, L.; Gilchrist, B.A. A cyclic peptide that binds p75(NTR) protects neurons from beta amyloid (1-40)-induced cell death. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2007, 33, 533-43.
- [137] Yaar, M.; Arble, B.L.; Stewart, K.B.; Qureshi, N.H.; Kowall, N.W.; Gilchrist, B.A. p75(NTR) Antagonistic cyclic peptide decreases the size of beta amyloid-induced brain inflammation. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2008.
- [138] Denda, S.; Reichardt, L.F. Studies on integrins in the nervous system. *Met. Enzymol.*, 2007, 426, 203-21.
- [139] Caltagarone, J.; Jing, Z.; Bowser, R. Focal adhesions regulate Abeta signaling and cell death in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1772, 438-45.
- [140] Nishimura, S.L.; Boylen, K.P.; Einheber, S.; Milner, T.A.; Ramos, D.M.; Pytela, R. Synaptic and glial localization of the integrin alpha5beta1 in mouse and rat brain. *Brain Res.*, 1998, 791, 271-82.
- [141] Chan, C.S.; Weeber, E.J.; Kunup, S.; Sweatt, J.D.; Davis, R.L. Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 7107-16.
- [142] Gall, C.M.; Lynch, G. Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2004, 548, 12-33.
- [143] Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1996, 12, 697-715.
- [144] Ghiso, J.; Rostagno, A.; Gardella, J.E.; Liem, L.; Gorevic, P.D.; Frangione, B. A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDSt-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.*, 1992, 288 (Pt 3), 1053-9.
- [145] Sabo, S.; Lambert, M.P.; Kessey, K.; Wade, W.; Krafft, G.; Klein, W.L. Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci. Lett.*, 1995, 184, 25-8.
- [146] Akiyama, H.; Kawamata, T.; Dedhar, S.; McGeer, P.L. Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-5 integrin in Alzheimer brain tissue. *J. Neuroimmunol.*, 1991, 32, 19-28.
- [147] Eikelenboom, P.; Zhan, S.S.; Kamphorst, W.; van der Valk, P.; Rozemuller, J.M. Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1994, 15, 421-7.
- [148] Van Gool, D.; Carmeliet, G.; Trias, E.; Cassiman, J.J.; Dom, R. Appearance of localized immunoreactivity for the alpha 4 integrin subunit and for fibronectin in brains from Alzheimer's, Lewy body dementia patients and aged controls. *Neurosci. Lett.*, 1994, 170, 71-3.
- [149] Grace, E.A.; Busciglio, J. Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid beta-induced neuronal dystrophy. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 493-502.
- [150] Anderson, K.L.; Ferreira, A. alpha1 Integrin activation: a link between beta-amyloid deposition and neuronal death in aging hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2004, 75, 688-97.
- [151] Bozzo, C.; Lombardi, G.; Santoro, C.; Canonico, P.L. Involvement of beta(1) integrin in betaAP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2004, 25, 1-8.
- [152] Frasca, G.; Carbonaro, V.; Merlo, S.; Copani, A.; Sortino, M.A. Integrins mediate beta-amyloid-induced cell-cycle activation and neuronal death. *J. Neurosci. Res.*, 2008, 86, 350-5.
- [153] Zhang, C.; Lambert, M.P.; Burch, C.; Barber, K.; Wade, W.S.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Focal adhesion kinase expressed by nerve cell lines shows increased tyrosine phosphorylation in response to Alzheimer's A beta peptide. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 25247-50.
- [154] Williamson, R.; Scales, T.; Clark, B.R.; Gibb, G.; Reynolds, C.H.; Kellie, S.; Bird, I.N.; Vamdel, I.M.; Sheppard, P.W.; Everall, I.; Anderton, B.H. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 10-20.
- [155] Schlaepfer, D.D.; Hunter, T. Signal transduction from the extracellular matrix—a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell. Struct. Funct.*, 1996, 21, 445-50.

- [156] Zhang, C.; Qiu, H.E.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Protein kinase C and F-actin are essential for stimulation of neuronal FAK tyrosine phosphorylation by G-proteins and amyloid beta protein. *FEBS Lett.*, 1996, **386**, 185-8.
- [157] Umemori, H.; Wanaka, A.; Kato, H.; Takeuchi, M.; Tohyama, M.; Yamamoto, T. Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1992, **16**, 303-10.
- [158] Yagi, T.; Shigetani, Y.; Furuta, Y.; Nada, S.; Okado, N.; Ikawa, Y.; Aizawa, S. Fyn expression during early neurogenesis in mouse embryos. *Oncogene*, 1994, **9**, 2433-40.
- [159] Yagi, T.; Shigetani, Y.; Okado, N.; Tokunaga, T.; Ikawa, Y.; Aizawa, S. Regional localization of Fyn in adult brain: studies with mice in which fyn gene was replaced by lacZ. *Oncogene*, 1993, **8**, 3343-51.
- [160] Ho, G.J.; Hashimoto, M.; Adame, A.; Izu, M.; Alford, M.F.; Thal, L.J.; Hansen, L.A.; Masliah, E. Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiol. Aging*, 2005, **26**, 625-35.
- [161] Shirazi, S.K.; Wood, J.G. The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport*, 1993, **4**, 435-7.
- [162] Bussier, J.; Geldmacher, D.S.; Herrup, K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.*, 1998, **18**, 2801-7.
- [163] Husseman, J.W.; Noehlin, D.; Vincent, L. Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*, 2000, **21**, 815-28.
- [164] McShea, A.; Wahl, A.F.; Smith, M.A. Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Med. Hypotheses*, 1999, **52**, 525-7.
- [165] Nagy, Z.; Esiri, M.M.; Cato, A.M.; Smith, A.D. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 1997, **94**, 6-15.
- [166] Vincent, I.; Jicha, G.; Rosado, M.; Dickson, D.W. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.*, 1997, **17**, 3588-98.
- [167] Herrup, K.; Neve, R.; Ackerman, S.L.; Copani, A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J. Neurosci.*, 2004, **24**, 9232-9.
- [168] Wright, S.; Malinin, N.L.; Powell, K.A.; Yednock, T.; Rydel, R.E.; Griswold-Prenner, I. Alpha2beta1 and alpha5beta1 integrin signaling pathways mediate amyloid-beta-induced neurotoxicity. *Neurobiol. Aging*, 2007, **28**, 226-37.
- [169] Berg, M.M.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Rapid impact of beta-amyloid on paxillin in a neural cell line. *J. Neurosci. Res.*, 1997, **50**, 979-89.
- [170] Brown, M.C.; Turner, C.E. Paxillin: adapting to change. *Physiol. Rev.*, 2004, **84**, 1315-39.
- [171] D'Alimonte, I.; Flati, V.; D'Auro, M.; Toniato, E.; Martinotti, S.; Rathbone, M.P.; Jiang, S.; Ballerini, P.; Di Iorio, P.; Caciagli, F.; Ciccarelli, R. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. *J. Immunol.*, 2007, **178**, 720-31.
- [172] Haga, S.; Akai, K.; Ishii, T. Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol.*, 1989, **77**, 569-75.
- [173] Itagaki, S.; McGeer, P.L.; Akiyama, H.; Zhu, S.; Selkoe, D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.*, 1989, **24**, 173-82.
- [174] Ito, S.; Sawada, M.; Haneda, M.; Fujii, S.; Oh-Hashi, K.; Kinchi, K.; Takahashi, M.; Isohe, K. Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells. *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 1995-2000.
- [175] Meda, L.; Cassatella, M.A.; Szendrei, G.I.; Orvos, L., Jr.; Baron, P.; Villalba, M.; Ferrari, D.; Rossi, F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 1995, **374**, 647-50.
- [176] Yates, S.L.; Burgess, L.H.; Kocsis-Angle, J.; Antal, J.M.; Dority, M.D.; Embury, P.B.; Piotrowski, A.M.; Brunden, K.R. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J. Neurochem.*, 2000, **74**, 1017-25.
- [177] Frautschy, S.A.; Cole, G.M.; Baird, A. Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am. J. Pathol.*, 1992, **140**, 1389-99.
- [178] Rogers, J.; Strohmeier, R.; Kovelowski, C.J.; Li, R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*, 2002, **40**, 260-9.
- [179] Wyss-Coray, T.; Lin, C.; Yan, F.; Yu, G.Q.; Rohde, M.; McConlogue, L.; Masliah, E.; Mucke, L. TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.*, 2001, **7**, 612-8.
- [180] Christie, R.H.; Freeman, M.; Hyman, B.T. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1996, **148**, 399-403.
- [181] Wisniewski, H.M.; Robe, A.; Zigman, W.; Silverman, W. Neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1989, **48**, 606-9.
- [182] Alarcon, R.; Fuenzalida, C.; Santibanez, M.; von Bernhardi, R. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 30406-15.
- [183] El Khoury, J.; Hickman, S.E.; Thomas, C.A.; Cao, L.; Silverstein, S.C.; Loike, J.D. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*, 1996, **382**, 716-9.
- [184] Paresce, D.M.; Ghosh, R.N.; Maxfield, F.R. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, 1996, **17**, 553-65.
- [185] Chung, H.; Brazil, M.J.; Irizarry, M.C.; Hyman, B.T.; Maxfield, F.R. Uptake of fibrillar beta-amyloid by microglia isolated from MSR-A (type I and type II) knockout mice. *Neuroreport*, 2001, **12**, 1151-4.
- [186] Husemann, J.; Loike, J.D.; Kodama, T.; Silverstein, S.C. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *J. Neuroimmunol.*, 2001, **114**, 142-50.
- [187] Cui, Y.; Le, Y.; Yazawa, H.; Gong, W.; Wang, J.M. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, **72**, 628-35.
- [188] Migonotte, L.; Communi, D.; Parmentier, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2006, **17**, 501-19.
- [189] Iribarren, P.; Zhou, Y.; Hu, J.; Le, Y.; Wang, J.M. Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPR1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. *Immunol. Res.*, 2005, **31**, 165-76.
- [190] Le, Y.; Gong, W.; Tiffany, H.L.; Tumanov, A.; Nedospasov, S.; Shen, W.; Dunlop, N.M.; Gao, J.L.; Murphy, P.M.; Oppenheim, J.J.; Wang, J.M. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemotactant receptor, FPR-like-1. *J. Neurosci.*, 2001, **21**, RC123.
- [191] Tiffany, H.L.; Lavigne, M.C.; Cui, Y.H.; Wang, J.M.; Leno, T.L.; Gao, J.L.; Murphy, P.M. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 23645-52.
- [192] Yazawa, H.; Yu, Z.X.; Takeda, T.; Le, Y.; Gong, W.; Ferrans, V.J.; Oppenheim, J.J.; Li, C.C.; Wang, J.M. Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPR1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J.*, 2001, **15**, 2454-62.
- [193] Shen, Y.; Xu, L.; Foster, D.A. Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell Biol.*, 2001, **21**, 595-602.
- [194] Brandenburg, L.O.; Konrad, M.; Wruck, C.; Koch, T.; Pufe, T.; Lucius, R. Involvement of formyl-peptide-receptor-like-1 and phospholipase D in the internalization and signal transduction of amyloid beta 1-42 in glial cells. *Neuroscience*, 2008, **156**, 266-76.
- [195] Wright, S.D.; Ramos, R.A.; Tobias, P.S.; Ulevitch, R.J.; Mathison, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, **249**, 1431-3.
- [196] Fassbender, K.; Walter, S.; Kuhl, S.; Landmann, R.; Ishii, K.; Bertsch, T.; Stalder, A.K.; Muehlhauser, F.; Liu, Y.; Ulmer, A.J.; Rivest, S.; Lentsch, A.; Gulbins, E.; Jucker, M.; Staufenbiel, M.; Brechtel, K.; Walter, J.; Multhaup, G.; Penke, B.; Adachi, Y.; Hartmann, T.; Beyreuther, K. The LPS receptor (CD14) links in-

- nate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 2004, 18, 203-5.
- [197] Liu, Y.; Walter, S.; Stagi, M.; Cherny, D.; Letiembre, M.; Schultze-Schaeffer, W.; Heine, H.; Penke, B.; Neumann, H.; Fassbender, K. LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 2005, 128, 1778-89.
- [198] Bamberger, M.E.; Harris, M.E.; McDonald, D.R.; Husemann, J.; Landreth, G.E. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 2665-74.
- [199] Koenigsnecht, J.; Landreth, G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J. Neurosci.*, 2004, 24, 9838-46.
- [200] Wilkinson, B.; Koenigsnecht-Talbot, J.; Grommes, C.; Lee, C.Y.; Landreth, G. Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 20842-50.
- [201] Combs, C.K.; Johnson, D.E.; Cannady, S.B.; Lehman, T.M.; Landreth, G.E. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 928-39.
- [202] McDonald, D.R.; Brunden, K.R.; Landreth, G.E. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J. Neurosci.*, 1997, 17, 2284-94.
- [203] Sturchler, E.; Galichet, A.; Weibel, M.; Leclerc, E.; Heizmann, C.W. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 2008, 28, 5149-58.
- [204] Chaney, M.O.; Stine, W.B.; Kokjohn, T.A.; Kuo, Y.M.; Esh, C.; Rahman, A.; Luehrs, D.C.; Schmidt, A.M.; Stern, D.; Yan, S.D.; Roher, A.E. RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1741, 199-205.
- [205] Yan, S.D.; Chen, X.; Fu, J.; Chen, M.; Zhu, H.; Roher, A.; Slaterry, T.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Morser, J.; Miguchi, A.; Nawroth, P.; Stern, D.; Schmidt, A.M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, 382, 685-91.
- [206] Lue, L.F.; Walker, D.G.; Brachova, L.; Beach, T.G.; Rogers, J.; Schmidt, A.M.; Stern, D.M.; Yan, S.D. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp. Neurol.*, 2001, 171, 29-45.
- [207] Sasaki, N.; Toki, S.; Chowei, H.; Saito, T.; Nakano, N.; Hayashi, Y.; Takeuchi, M.; Makita, Z. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 2001, 888, 256-62.
- [208] Deane, R.; Du Yan, S.; Subramanyam, R.K.; LaRue, B.; Jovanovic, S.; Hogg, E.; Welch, D.; Maness, L.; Lin, C.; Yu, J.; Zhu, H.; Ghiso, J.; Frangione, B.; Stern, A.; Schmidt, A.M.; Armstrong, D.L.; Arnold, B.; Liliensiek, B.; Nawroth, P.; Hoffman, F.; Kindy, M.; Stern, D.; Zlokovic, B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.*, 2003, 9, 907-13.
- [209] Yan, S.D.; Stern, D.; Kane, M.D.; Kuo, Y.M.; Lampert, H.C.; Roher, A.E. RAGE-Abeta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 1998, 12, 167-73.
- [210] Haddad, A.; Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C. Overexpression of receptor of advanced glycation end products hypersensitizes cells for amyloid beta peptide-induced cell death. *Biochem. Biophys. Acta*, 2004, 1691, 67-72.
- [211] Onyango, I.G.; Tuttle, J.B.; Bennett, J.P., Jr. Altered intracellular signaling and reduced viability of Alzheimer's disease neuronal hybrids is reproduced by beta-amyloid peptide acting through receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Mol. Cell. Neurosci.*, 2005, 29, 333-43.
- [212] Du Yan, S.; Zhu, H.; Fu, J.; Yan, S.F.; Roher, A.; Tourtellotte, W.W.; Rajavashisth, T.; Chen, X.; Godman, G.C.; Stern, D.; Schmidt, A.M. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94, 5296-301.
- [213] Akiyama, H.; Nishimura, T.; Kondo, H.; Ikeda, K.; Hayashi, Y.; McGeer, P.L. Expression of the receptor for macrophage colony stimulating factor by brain microglia and its upregulation in brains of patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.*, 1994, 639, 171-4.
- [214] Murphy, G.M., Jr.; Zhao, F.; Yang, L.; Cordell, B. Expression of macrophage colony-stimulating factor receptor is increased in the AbetaPP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 2000, 157, 895-904.
- [215] Murphy, G.M., Jr.; Yang, L.; Cordell, B. Macrophage colony-stimulating factor augments beta-amyloid-induced interleukin-1, interleukin-6, and nitric oxide production by microglial cells. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 20967-71.
- [216] Arancio, O.; Zhang, H.P.; Chen, X.; Lin, C.; Trinchese, F.; Puzzo, D.; Liu, S.; Hegde, A.; Yan, S.F.; Stern, A.; Luddy, J.S.; Lue, L.F.; Walker, D.G.; Roher, A.; Butini, M.; Mucke, L.; Li, W.; Schmidt, A.M.; Kindy, M.; Hyslop, P.A.; Stern, D.M.; Du Yan, S.S. RAGE potentiates Aβ-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.*, 2004, 23, 4096-105.
- [217] Liu, Y.; Dargusch, R.; Schubert, D. Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237, 37-40.
- [218] Bruunsgaard, H.; Andersen-Ranberg, K.; Jeune, B.; Pedersen, A.N.; Skinhoj, P.; Pedersen, B.K. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 1999, 54, M357-64.
- [219] Fillit, H.; Ding, W.H.; Buee, L.; Kalman, J.; Altstiel, J.; Lawlor, B.; Wolf-Klein, G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 1991, 129, 318-20.
- [220] Li, R.; Yang, L.; Lindholm, K.; Konishi, Y.; Yue, X.; Hampel, H.; Zhang, D.; Shen, Y. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J. Neurosci.*, 2004, 24, 1760-71.
- [221] Tarkowski, E.; Blennow, K.; Wallin, A.; Tarkowski, A. Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J. Clin. Immunol.*, 1999, 19, 223-30.
- [222] Zhao, M.; Cribbs, D.H.; Anderson, A.J.; Cummings, B.J.; Su, J.H.; Wasserman, A.J.; Cotman, C.W. The induction of the TNFalpha death domain signaling pathway in Alzheimer's disease brain. *Neurochem. Res.*, 2003, 28, 307-18.
- [223] Lio, D.; Annoni, G.; Licastro, F.; Crivello, A.; Forte, G.J.; Scola, L.; Colonna-Romano, G.; Candore, G.; Arosio, B.; Galimberti, L.; Vergani, C.; Caruso, C. Tumor necrosis factor-alpha -308A/G polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.*, 2006, 127, 567-71.
- [224] Lue, L.F.; Rydel, R.; Brigham, E.F.; Yang, L.B.; Hampel, H.; Murphy, G.M., Jr.; Brachova, L.; Yan, S.D.; Walker, D.G.; Shen, Y.; Rogers, J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and non-demented elderly microglia *in vitro*. *Glia*, 2001, 33, 72-9.
- [225] Medeiros, R.; Prediger, R.D.; Passos, G.F.; Pandolfo, P.; Duarte, F.S.; Franco, J.L.; Dafre, A.L.; Di Giunta, G.; Figueiredo, C.P.; Takahashi, R.N.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J. Neurosci.*, 2007, 27, 5394-404.
- [226] Wang, Q.; Wu, J.; Rowan, M.J.; Anwyl, R. Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor. *Eur. J. Neurosci.*, 2008, 22, 2827-32.
- [227] Tobinick, E.; Gross, H.; Weinberger, A.; Cohen, H. TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *Med. Gen. Med.*, 2006, 8, 25.
- [228] He, P.; Zhong, Z.; Lindholm, K.; Benning, L.; Lee, W.; Lemere, C.; Staufenbiel, M.; Li, R.; Shen, Y. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell. Biol.*, 2007, 178, 829-41.
- [229] Zhao, W.Q.; De Felice, F.G.; Fernandez, S.; Chen, H.; Lambert, M.P.; Quon, M.J.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J.*, 2008, 22, 246-60.
- [230] Townsend, M.; Mehta, T.; Selkoe, D.J. Soluble Aβ inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 33305-12.
- [231] Xie, L.; Helmerhorst, E.; Taddai, K.; Plewright, B.; Van Bronswijk, W.; Martins, R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J. Neurosci.*, 2002, 22, RC221.

- [232] Takashima, A.; Noguchi, K.; Sato, K.; Hoshino, T.; Imahori, K. Tau protein kinase 1 is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, *90*, 7789-93.
- [233] Imahori, K.; Uchida, T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J. Biochem.*, **1997**, *121*, 179-88.
- [234] Alvarez, G.; Muñoz-Montano, J.R.; Sotrustegui, J.; Avila, I.; Bogomez, E.; Diaz-Nido, J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.*, **1999**, *453*, 260-4.
- [235] Lee, M.S.; Kwon, Y.T.; Li, M.; Peng, J.; Friedlander, R.M.; Tsai, L.H. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, **2000**, *405*, 360-4.
- [236] Ferreira, A.; Lu, Q.; Oroschko, I.; Kosik, K.S. Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol. Cell. Neurosci.*, **1997**, *9*, 220-34.
- [237] Elkincl, P.J.; Malik, K.U.; Shea, T.B. Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 30322-7.
- [238] Elkincl, P.J.; Shea, T.B. Hyperactivation of mitogen-activated protein kinase increases phospho-tau immunoreactivity within human neuroblastoma: additive and synergistic influence of alteration of additional kinase activities. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **1999**, *19*, 249-60.
- [239] Hull, M.; Muksch, B.; Akundi, R.S.; Waschbisch, A.; Hoozemans, J.J.; Veerhuis, R.; Fiebich, B.L. Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem. Int.*, **2006**, *48*, 663-72.
- [240] Koh, S.H.; Noh, M.Y.; Kim, S.H. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Res.*, **2008**, *1188*, 254-62.
- [241] Jin, Y.; Yan, E.Z.; Fan, Y.; Zong, Z.H.; Qi, Z.M.; Li, Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2005**, *26*, 943-51.
- [242] Fernandez, M.A.; Saenz, M.T.; Garcia, M.D. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1998**, *50*, 1183-6.
- [243] Jin, Y.; Fan, Y.; Yan, E.Z.; Liu, Z.; Zong, Z.H.; Qi, Z.M. Effects of sodium ferulate on amyloid-beta-induced MKK3/MKK6-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway and apoptosis in rat hippocampus. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2006**, *27*, 1309-16.
- [244] Takashima, A.; Noguchi, K.; Michel, G.; Mercken, M.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Imahori, K. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci. Lett.*, **1996**, *203*, 33-6.
- [245] Leroy, K.; Yilmaz, Z.; Brion, J.P. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **2007**, *33*, 43-55.
- [246] Blalock, E.M.; Geddes, J.W.; Chen, K.C.; Porter, N.M.; Markesbery, W.R.; Landfield, P.W. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 2173-8.
- [247] Pei, J.J.; Tanaka, T.; Tung, Y.C.; Braak, E.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **1997**, *56*, 70-8.
- [248] Hye, A.; Kerr, F.; Archer, N.; Foy, C.; Poppe, M.; Brown, R.; Hamilton, G.; Powell, J.; Anderton, B.; Lovestone, S. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **2005**, *373*, 1-4.
- [249] Mateo, I.; Infante, J.; Llorca, J.; Rodriguez, E.; Berciano, J.; Combarros, O. Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **2006**, *21*, 228-32.
- [250] Yamaguchi, H.; Ishiguro, K.; Uchida, T.; Takashima, A.; Lemere, C.A.; Imahori, K. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol.*, **1996**, *92*, 232-41.
- [251] Ishizawa, T.; Sahara, N.; Ishiguro, K.; Kersh, J.; McGowan, E.; Lewis, J.; Hutton, M.; Dickson, D.W.; Yen, S.H. Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *163*, 1057-67.
- [252] Pei, J.J.; Braak, E.; Braak, H.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Winblad, B.; Cowburn, R.F. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **1999**, *58*, 1010-9.
- [253] Chen, Q.S.; Wei, W.Z.; Shimahara, T.; Xie, C.W. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2002**, *77*, 354-71.
- [254] Agostinho, P.; Oliveira, C.R. Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur. J. Neurosci.*, **2003**, *17*, 1189-96.
- [255] Agostinho, P.; Lopes, J.P.; Velez, Z.; Oliveira, C.R. Overactivation of calcineurin induced by amyloid-beta and prion proteins. *Neurochem. Int.*, **2008**, *52*, 1226-33.
- [256] Cardoso, S.M.; Oliveira, C.R. The role of calcineurin in amyloid-beta-peptides-mediated cell death. *Brain Res.*, **2005**, *1050*, 1-7.
- [257] Reese, L.C.; Zhang, W.; Dineley, K.T.; Kayed, R.; Taghialatela, G. Selective induction of calcineurin activity and signaling by oligomeric amyloid beta. *Agng Cell*, **2008**, *7*, 284-35.
- [258] Chin, J.; Palop, J.J.; Yu, G.Q.; Kojima, N.; Masliah, E.; Mucke, L. Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*, 4692-7.

Received: 14 January, 2009

Revised: 04 March, 2009

Accepted: 09 March, 2009

Amyloid β Oligomers Decrease Hippocampal Spontaneous Network Activity in an Age-Dependent Manner

H. Balleza-Tapia, A. Huanosta-Gutiérrez, A. Márquez-Ramos, N. Arias and F. Peña*

Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Sede Sur, México, D.F., México

Abstract: Soluble amyloid β (A β) oligomers might trigger early cognitive deficit in Alzheimer's Disease (AD) through the impairment of proper neuronal network function. We have recently shown that the short sequence A β_{25-35} affects the spontaneous activity in hippocampal slices, when was added to the bath, at high nanomolar concentrations. In the present study, we aimed to characterize the effects of the oligomerized full length sequence A β_{1-42} on the spontaneous network activity in the CA1 hippocampal area testing whether such effects are age dependent. By performing extracellular field recordings of spontaneous network activity of hippocampal slices, we found that an oligomerized solution of A β_{1-42} (osA β) potently inhibit, in a dose-dependent manner, the spontaneous hippocampal network activity with an IC₅₀ of 0.4 ± 3.2 nM and a maximal effect reached around 10 nM. While spontaneous hippocampal network activity is unaffected by age, the sensitivity of spontaneous hippocampal network activity to osA β (10 nM) appears to be increased in slices from older animals. Moreover, to see a significant reduction in spontaneous network activity in slices from animals in their second week of life 100nM osA β was needed. The osA β -induced reduction in hippocampal network activity is accompanied by a presynaptic reduction in both spontaneous and miniature synaptic potentials. Finally, we demonstrated that the effect produced by osA β on spontaneous network activity was specific, reversible and unrelated with cell death. In conclusion, our data show that osA β alters hippocampal network activity at concentrations commonly observed in AD patients and that such effect of osA β increases with age.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid β oligomers, hippocampal spontaneous activity, age.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive impairment in cognitive function [1-3]. There is increasing clinical evidence indicating that soluble forms of A β , rather than fibrillar conformations, lead to the early deficits in learning and memory observed in AD patients [1, 4, 5]. Similarly, in transgenic AD animal models, soluble forms of A β interfere with memory and learning long before any neurodegeneration is observed [1, 6-10].

A β -induced cognitive impairment seems to be associated to neuronal network dysfunction [1, 11, 12]. Possibly by affecting cognitive-related processes such as long term plasticity [13-18], neuronal network oscillations [11, 19, 20] or neuronal codification [21]. Accordingly with this line of evidence, we have recently shown that acute application of high nanomolar concentrations of mostly monomeric forms of A β_{25-35} affects hippocampal network functioning from single cell to network level, both *in vitro* and *in vivo* [11]. However, those high concentrations have been observed rarely in the brain of AD patients [22-26]. In contrast, recent reports have shown that oligomeric forms of A β may be more potent than monomers, producing their effects at clinically relevant concentrations [27-30]. Thus, our first aim was to test if an oligomerized solution of A β (osA β) affects hippocampal spontaneous network activity at clinically relevant concentrations.

There is evidence that neuronal network activity declines with age and that this alteration is reflected in reduction of synaptic transmission and changes in plasticity [31, 32]. Moreover, gamma hippocampal oscillations decrease with age [33]. Based on the fact that AD symptoms develop over age, we also tested whether or not osA β effects on hippocampal spontaneous network activity are age dependent. By recording hippocampal spontaneous network activity and treating hippocampal slices with different concentrations of osA β , we found that osA β potently disrupts hippocampal spontaneous network activity in a dose- and age-dependent manner. Such effect, which correlates to a reduction in synaptic transmission, is reversible, specific and not related to cell death.

METHODS

The experimental protocols were approved by The Local Committee of Ethics on Animal Experimentation (CICUAL-Cinvestav) and followed the regulations established in the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals ('Norma Oficial Mexicana' NOM-062-ZOO-1999). Animals used in this study included 1 to 32 weeks old Swiss Webster mice. Although for most of the experiments, including the dose-response and viability experiments, we used 8 to 12 weeks old animals. All animals were housed at 22°C and maintained on a 12:12-h light/dark cycle with free access to food and water.

*Address correspondence to this author at the Calz. de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, 14330, México, D.F., México; Tel: +52 (55) 5483 2852; Fax: +52 (55) 5483 2863; E-mail: jfpena@cinvestav.mx

A β Oligomers Preparation

A β_{1-42} and A β_{42-1} peptides were obtained from Bachem (Heidelberg, Germany). The oligomerization protocol used for both peptides was performed as described by Klein, 2002 [34]; based on Lambert et al, 1998 [13]. Briefly, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) was added to solid A β_{1-42} , or A β_{42-1} , at a final peptide concentration of 1mM, and incubated for 60 min at room temperature. HFIP was allowed to evaporate overnight. Then a 5mM solution was prepared by adding DMSO. Such solution was then diluted with F12 medium to reach a final concentration of 100 μ M. This solution was incubated, at 5°C, for 24 h. Finally, such solution was centrifugated at $14,000 \times g$ for 10 min in the cold and the supernatant containing the A β oligomers, as well as monomers, was collected and used for the experiments. We characterized the A β_{1-42} solution by standard SDS-PAGE electrophoresis followed by silver staining [11, 35]. The Fig. (1) shows that our oligomerized solution (osA β) contains the A β peptide in different levels of aggregation, being the monomers the more abundant species, followed by hexamers as the main A β oligomeric form.

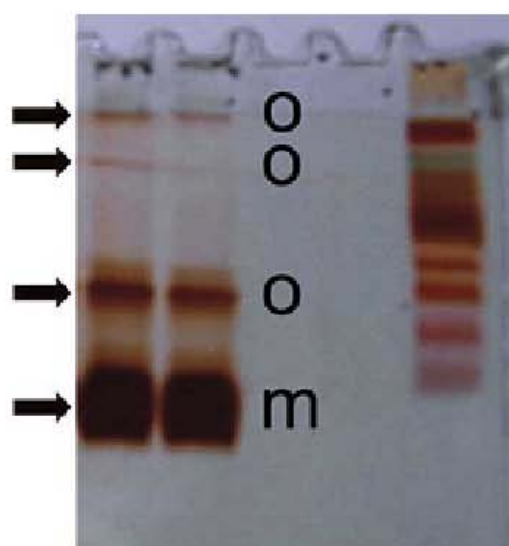


Fig. (1). Oligomerized A β solution (osA β) composition. The SDS-PAGE silver stained gel shows the different aggregated levels of the oligomerized A β_{1-42} solution used in this study (m = monomers; o = oligomers).

Hippocampal Slices Preparation

To obtain 400 μ m thick horizontal hippocampal slices, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/Kg) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid containing 238 mM sucrose, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Then, animals were decapitated and brains removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 119 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). One cerebral hemisphere was mounted onto an agar block with a 30° inclination and slices containing the

hippocampal formation were cut with a vibratome (Vibratome, St. Louis, MO, U.S.A.). Slices were left to recover, at room temperature, for at least 60 minutes before any further experimental manipulation.

Extracellular Field Recordings

For extracellular field recordings, the hippocampal slices were transferred to a submerged recording chamber continuously perfused at 17-20 ml/min with oxygenated aCSF at $30 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature. The field recordings were obtained with suction electrodes filled with aCSF and positioned on the pyramidal layer of the hippocampal area CA1. As a comparison, a group of slices were recorded with the electrode positioned in the striatum radiatum. The signal was amplified and filtered (highpass, 0.5 Hz; lowpass, 1.5 KHz) with a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A.). The basal activity of the slices was recorded 15-20 min previous to any pharmacological treatment (control recording). The oligomerized solution of either A β_{1-42} or A β_{42-1} peptides was added to the bath, at different concentrations, and their effects were tested for at least 1 hour. Then, lidocaine 1 mM was added to the bath to block any neuronal activity, as a control of the viability of the slice. Finally, a recording with the electrode positioned just in the bath was performed to quantify the amount of electrical noise present in any given experiment. In general the electrical noise represented just 43% of the recorded signal. All the quantifications represent just the "biological activity".

Patch-Clamp Recordings

Whole cell patch-clamp recordings were obtained from CA1 pyramidal neurons using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) and a Nomarsky-DIC equipped microscope (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY). The patch electrodes (4-8 M Ω) were manufactured from filamented borosilicate glass tubes (Clarke GC 150TF) and filled with a solution containing (in mM): 140 K-glucuronate, 1 CaCl₂·6H₂O, 10 EGTA, 2 MgCl₂·6H₂O, 4 Na₂ATP, 10 HEPES. This pipette solution resulted in small LJP (<3mV), which was not corrected in this study. Neurons were maintained in current clamp conformation, at their resting membrane potential, and square pulses of both depolarizing and hyperpolarizing current were delivered in order to identify the neuronal type recorded. All neurons included in this study were identified as regular spiking, more likely pyramidal neurons. After characterizing the recorded neurons as pyramidal neurons, we recorded the neurons at their resting membrane potential to quantify their spontaneous synaptic activity. In some cases we bath applied tetrodotoxin 500 nM to quantify their miniature synaptic potentials. Both types of synaptic potentials were recorded for 10 minutes as a control and then we added osA β_{1-42} to the bath perfusion and tested its effect for 15 minutes.

LDH Activity

As an indication of cell death injury, we performed a lactate dehydrogenase (LDH) release assayed using a commercial kit (Roche Laboratories). LDH release was measured as the increase of NADH absorbance at 490 nm in the collected samples from the perfusion bath 1 hr after the slices were treated with or without osA β 10 nM.

Data Analysis

Recordings were digitized at 3-9 KHz and were stored on a personal computer with an acquisition system from National Instruments (Austin, TX, U.S.A.) and custom made software designed in the LabView environment [36]. The recordings obtained were analyzed off-line. Population recordings were analyzed using classical power spectrum analysis [11, 37]. Segments of 5 seconds were analyzed using a Rapid Fourier Transform Algorithm, with a Hamming window, in Clampfit (Molecular Devices). The power spectra, from 1 to 60 Hz, were integrated. Spontaneous and miniature synaptic potentials were identified and analyzed with custom made programs written in IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). We calculate their frequency and amplitude before and after $\text{osA}\beta_{1-42}$ application. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. To test for statistical differences we performed ANOVA and Student's *t* test using the GraphPad Prism software package.

RESULTS

In order to test effect of the $\text{osA}\beta$ on hippocampal network activity, we recorded the spontaneous network activity

of CA1 area in normal conditions and after treatment with $\text{osA}\beta$ 10 nM in slices obtained from 8-12 weeks old animals. $\text{osA}\beta$ 10 nM application produced a reduction of spontaneous network activity of $70 \pm 7\%$ (Fig. 2A). A smaller, but not significantly different, reduction was observed when spontaneous population activity was recorded in the striatum radium ($44 \pm 7\%$, $n=6$). To test if $\text{osA}\beta$ -induced reduction of spontaneous network activity was reversible, we washed out $\text{osA}\beta$ from the bath solution and observed that after 30 min spontaneous network activity recovered and increased beyond control values (Fig. 2A). As a negative and specificity control we tested the effect of the inverse peptide sequence $\text{A}\beta_{42-1}$. The inverse control peptide did not affect spontaneous network activity (Fig. 2B). To corroborate that the effects of $\text{osA}\beta$ were not due to cell damage, we measured the viability of a separate set of hippocampal slices after $\text{osA}\beta$ treatment by measuring lactate-dehydrogenase (LDH) release. For these experiments the slices were manipulated using the same protocol for electrophysiological experiments and media samples from the bath were collected to test for the presence of LDH activity. As shown in Fig. (2C), $\text{osA}\beta$ did not increased LDH release compared with control samples obtained from slices not exposed to $\text{osA}\beta$. These find-

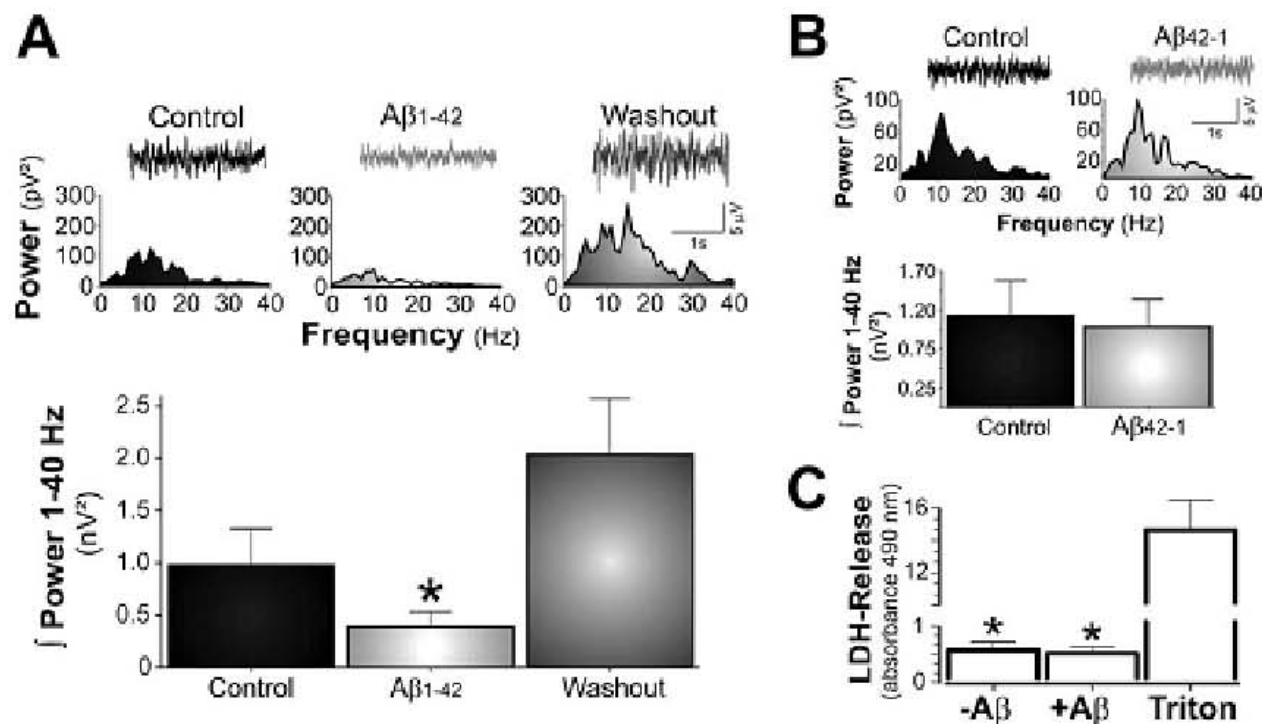


Fig. (2). $\text{osA}\beta$ inhibits spontaneous network activity, effect that is reversible and do not correlate with cell death. **A)** Representative recordings and their correspondent power spectra of the hippocampal spontaneous network activity in hippocampal slices obtained from 8 to 12 week old mice in control conditions (black, left trace and power spectrum), after 30 min of $\text{osA}\beta$ exposition (light gray, middle trace and power spectrum) and after 30 min of washout (dark gray, right trace and power spectrum). The lower graph shows the quantification of the integrated power from the experiment represented in the upper panel ($n = 9$). **B)** Representative recordings and their correspondent power spectra of the hippocampal spontaneous network activity in hippocampal slices obtained from 8 to 12 week old mice in control conditions (black, left trace and power spectrum), after 30 min of exposition of the inverse sequence $\text{A}\beta_{42-1}$ (light gray, right trace and power spectrum). The lower graph shows the quantification of the integrated power from the experiment represented in the upper panel ($n = 8$). **C)** Quantification of LDH release from hippocampal slices treated with ($n=4$) and without $\text{osA}\beta$ ($n=4$). As a positive control the Triton-induced LDH release is presented. The values of the integrated power and LDH release are presented as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference relative to control with a $P < 0.05$.

ings demonstrate that the effects of the osA β are reversible and specific, but also strongly suggest that such effects are not due to any cell damage which, by definition, is not reversible.

To test the stability of the spontaneous network activity as well as the time course of the osA β -induced inhibition of such activity, we evaluated the hippocampal spontaneous network activity over time in the absence and presence of osA β 10 nM. We found that spontaneous network activity is stable and maintains comparable values of the integrated power for long periods of time (Fig. 3A). In contrast, after osA β application there is a continuous decrease in spontaneous network activity over the first minutes that causes a stable inhibition of network activity at 15 minutes from the beginning of osA β application. Such inhibition remains stable as long as osA β is present in the bath (Fig. 3A). Continuous application of osA β for 30 min reaches an inhibition of $66 \pm 16\%$, which is similar to the inhibition reported earlier (Fig. 3B, compare with Fig. 2A). Because the network inhibition remained unchanged, as well as the level of activity in untreated slices (Fig. 3B), we decided to use this time point for quantified comparisons.

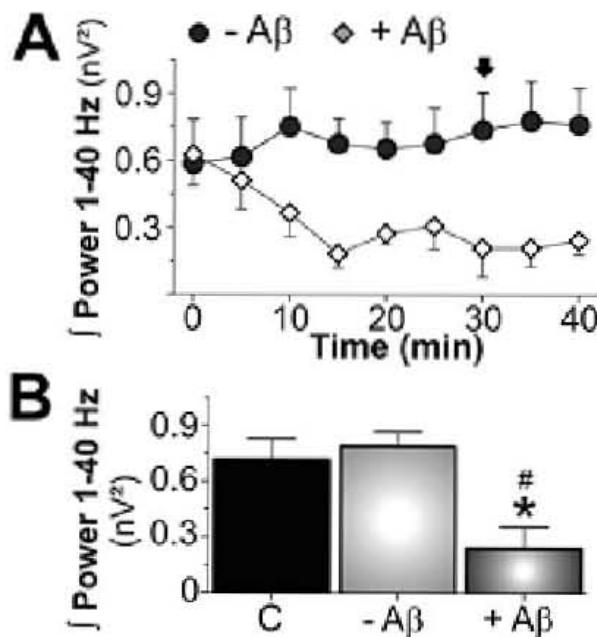


Fig. (3). Hippocampal spontaneous network activity is stable and rapidly reduced by osA β . A) Time course of the integrated power obtained from the spontaneous network activity in slices exposed either to 10 nM of osA β (light gray diamonds, $n = 7$) or vehicle (dark gray circles, $n = 6$). B) Quantification of the spontaneous activity after 30 min in the presence of either osA β or vehicle. The values of the integrated power are presented as the mean $\pm$ SEM; (#) denotes a significant difference relative to control with a $P < 0.05$.

In order to test the potency of osA β to reduce spontaneous network activity, we evaluated the effect of different concentrations of osA β , added to the bath, on hippocampal slices obtained from 8-12 weeks old animals (Fig. 4). As shown in Fig. (4A) and quantified in Fig. (4B) and C: osA β

reduced, in a dose-dependent manner, hippocampal spontaneous population activity (Fig. 4); the inhibitory effects of osA β can be directly observed in the traces or in their correspondent power spectra (Fig. 4A). The averaged power spectra (Fig. 4B), clearly show that osA β induces a dose-dependent reduction in the power of all frequencies components recorded in our experimental conditions. When the effect of different concentrations of osA β are plotted as % of inhibition of the integrated power (Fig. 4C), a typical sigmoidal dose-response relationship is obtained. From this dose-response curve we observed that the smaller osA β concentrations (0.01 and 0.1 nM) did not produce any significant effect on spontaneous activity. In contrast, 1 nM and higher concentrations produced significant inhibition in hippocampal spontaneous network activity that reaches a saturating level at the concentration of 10 nM. Fitting a logistic Hill equation to this dose-response relationship reveals an IC_{50} of 0.4 ± 3.2 nM, a Hill coefficient close to -1 and a maximal effect of $69 \pm 14\%$.

In order to test if the effect of osA β on spontaneous network activity is affected by age, we evaluated the effect of the saturating concentration of osA β 10 nM on hippocampal slices obtained from animals at different ages. While control spontaneous hippocampal network activity is maintained at different ages, up to 32 weeks of age, the inhibitory effect of osA β on such activity increases with age (Fig. 5). Fig. (5A) shows representative recordings, along with their respective power spectra, showing that at the 1st week of age osA β did not affect the spontaneous hippocampal network activity (Fig. 5A,B); a similar situation was observed until the 6th week of age (Fig. 5B). Starting at the next week (7th week of age) osA β 10 nM produce a significant reduction in the integrated spontaneous network activity ($57 \pm 20\%$, Fig. 5B); such reduction remained significant with respect to control, up to 32nd week of age (Fig. 5A). It is important to notice that there was a tendency of the control spontaneous network activity to decrease during age, but did not reach statistical significance (Fig. 5B).

To test if the lack of effect of osA β 10 nM on spontaneous network activity of the slices obtained from neonates is due to a reduced sensitivity to the peptide, we used a higher osA β concentration to determine if osA β would still inhibit spontaneous network activity in slices from neonates. While slices from animals two weeks of age were insensitive to 10 nM osA β , 100 nM osA β decreased spontaneous network activity ($41 \pm 13\%$; Fig. 6A). For purposes of comparison we plotted the effect of osA β at both concentrations and compared with the sigmoidal curve obtained in the dose-response from slices obtained from older animals (Fig. 6A).

Interestingly, hippocampal slices obtained from animals during the first two weeks of age exhibited spontaneous population spikes (Fig. 6B) [37, 38], which, in contrast to spontaneous "background" network activity, is almost abolished by osA β 10 nM. The same osA β concentration that did not affect spontaneous "background" network activity (10 nM), reduced the amplitude of the population spikes in $59 \pm 7\%$ and in $49 \pm 11\%$ after 30 and 60 min of osA β application, respectively. osA β 10 nM application also reduces the frequency of population spikes in $47 \pm 7\%$ and in $79 \pm 7\%$ after 30 and 60 min of osA β application, respectively; in

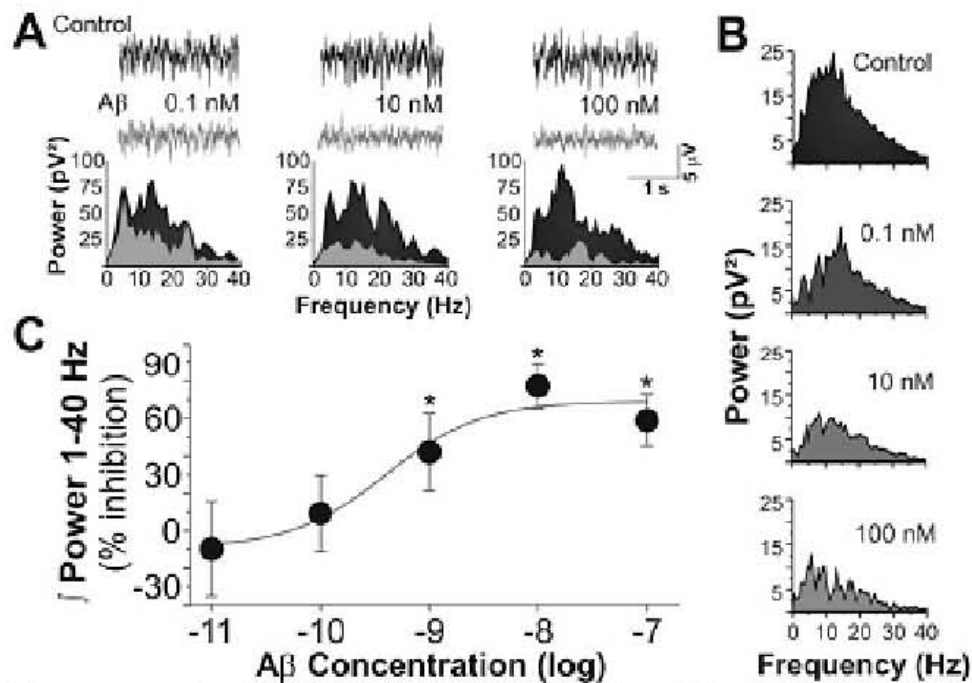


Fig. (4). osA β affect spontaneous network activity at low nanomolar concentrations. **A)** Representative recordings and their correspondent power spectra of the hippocampal spontaneous network activity in hippocampal slices obtained from 8 to 12 week old mice in control conditions (black, upper traces and back power spectra) and after 30 min of exposition to osA β at the different concentrations (light gray, lower traces and front power spectra). **B)** Mean power spectra from the spontaneous network activity in control conditions and after 30 min of exposition to osA β at the different concentrations. **C)** Concentration-response curve of the inhibition of spontaneous network activity after the application of osA β at 0.01 (n = 5), 0.1 (n = 8), 1 (n = 6), 10 (n = 7) and 100 nM (n = 6). The values, plotted as % of inhibition of the integrated power, are presented as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference relative to control with a P < 0.05. The sigmoid curve results from a sigmoidal fitting of the data.

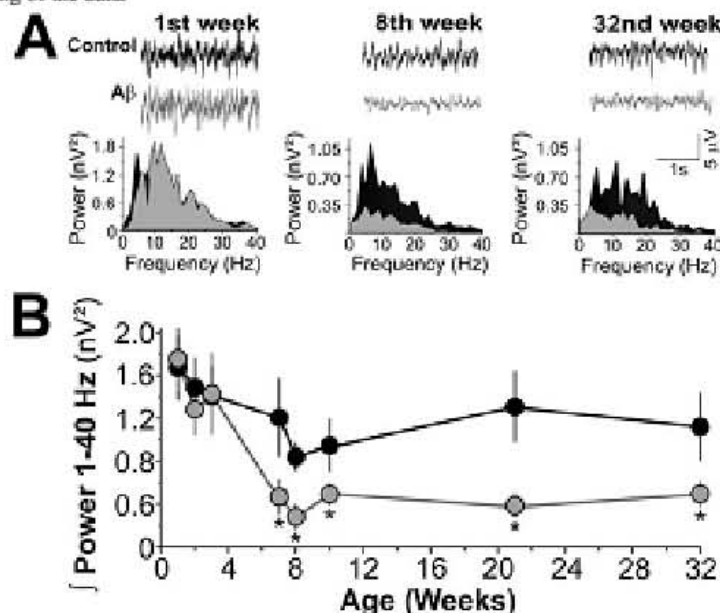


Fig. (5). osA β -induced reduction of spontaneous network activity depends on age. **A)** Representative recordings and their correspondent power spectra of the hippocampal spontaneous network activity in hippocampal slices obtained from animal at different ages (as indicated) in control conditions (black, upper traces and back power spectra) and after 30 min of exposition to osA β 10 nM (light gray, lower traces and front power spectra). **B)** Quantification of the spontaneous network activity in control conditions (black circles) and after 30 min of osA β application (gray circles) throughout age (1 week n = 7; 2 weeks n = 8; 3 weeks n = 6; 7 weeks n = 6; 8 weeks n = 6; 10 weeks n = 8; 21 weeks n = 5; 32 weeks n = 9). The values of the integrated power are presented as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference (P < 0.05) relative both to control of activity at 1 week old and between control condition at any given age.

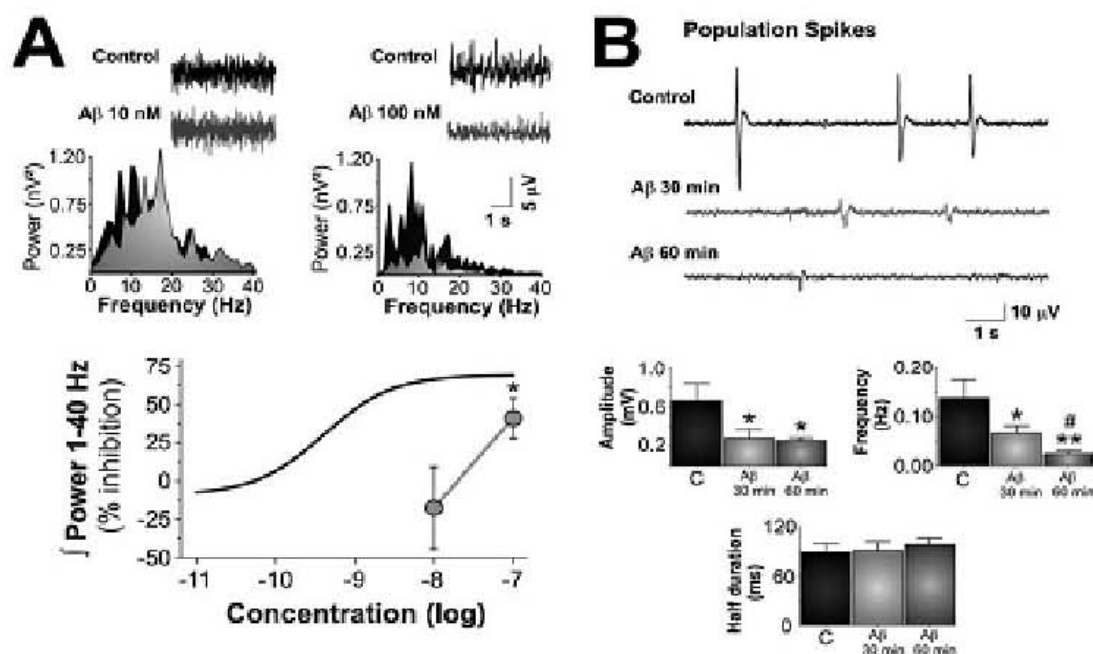


Fig. (6). Population spikes are more sensitive to osAβ than spontaneous network activity in slices obtained from neonates. **A)** Representative recordings and their correspondent power spectra of the hippocampal spontaneous network activity in hippocampal slices obtained from neonatal mice in control conditions (black, upper traces and back power spectra) and after 30 min of exposition to osAβ at the different concentrations (light gray, lower traces and front power spectra). Lower graph shows the quantification of the experiments presented in the upper panel (gray circles). The fitted sigmoidal curve from the data in Figure 4C is presented for comparison purposes. The values, plotted as % of inhibition of the integrated power, are presented as the mean $\pm$ SEM. **B)** Representative recordings of the population spikes recorded in hippocampal slices obtained from neonates in control conditions (upper black trace) as well as after 30 min (middle light gray trace) or 60 min (lower dark gray trace) of exposition to osAβ 10 nM. Lower graphs show the quantification of the population spikes amplitude, frequency and half-duration. The values are presented as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference relative to control with a $P < 0.05$ and (**) for $P < 0.01$. (#) denotes a significant difference relative to osAβ 30 min with a $p < 0.05$.

contrast, osAβ did not affected population spikes half duration (Fig. 6B).

Finally, in order to test for the cellular mechanisms underlying the reduction in spontaneous network activity induced by osAβ, we tested the effect of osAβ 10 nM on both spontaneous and miniature postsynaptic potentials (sPSP and mPSP, respectively). Recordings of such synaptic activity in pyramidal CA1 shown that bath application of osAβ 10 nM reduces the frequency, but not the amplitude, of both sPSPs (Fig. 7A) and mPSPs (Fig. 7B), suggesting that osAβ reduces synaptic activity by a presynaptic mechanism.

DISCUSSION

Here, we report that an oligomerized Aβ₁₋₄₂ solution (osAβ) potently alters hippocampal spontaneous network activity at clinically relevant concentrations. We also found that osAβ-induced reduction of spontaneous network activity depends on age and is not related to cell death. Interestingly, osAβ seems to differentially affect particular types of hippocampal network activity, since osAβ 10 nM was unable to affect "background" spontaneous network activity in slices obtained from neonates whereas osAβ 10 nM almost abolished the paroxysmal population spikes proper of that age [37, 38]. Finally, we show that the osAβ-induced reduction in spontaneous network activity is due, at least in part, to a

reduction in synaptic activity. In view that the amyloid hypothesis indicates that the soluble Aβ oligomers are responsible for cognitive dysfunction [1, 39] and cognition correlates with the generation of certain types of spontaneous oscillatory activity [40-42], our findings suggest that the Aβ-induced cognitive dysfunction correlates with disturbances in the generation of spontaneous network activity in the aged hippocampus.

One of the major findings of this study is that we demonstrated that osAβ-induces hippocampal network dysfunction at concentrations (low nanomolar) very close to those found in the brain of AD patients [1, 4, 5]. This finding may have substantial relevance with respect to the clinical perspective as the low nanomolar concentration of Aβ closely correlate with the level of dementia as well as with the severity of the EEG alteration ("EEG-slowing") in these patients [43-47]. Based on this correlation, we propose that Aβ oligomers alter the spontaneous network activity of the hippocampus and that such alteration might be related with the early impairments in memory and learning in AD [1, 11].

As the brain becomes older, it becomes sensitive to several insults; including the deleterious effects of Aβ. Aging is associated with specific impairments of hippocampal function, which is reflected in learning and memory deficit [31, 48]. These deficits could be associated with the loss of syn-

aptic contacts [49], silencing of synapses [32, 50] or decrease of postsynaptic responsiveness [51] (for review see [52]). This is reflected in deficits in the generation of long term plasticity [31, 52, 53] as well as alterations in the generation of certain spontaneous oscillatory activities [33]. In our experimental conditions, the spontaneous activity does not appear to be affected during postnatal development, at least until the 32nd week of age. However, such spontaneous activity becomes increasingly sensitive to osA β with age. Our findings, which temporally correlate with the beginning of the cognitive deficits observed in AD transgenic mice [7, 9, 54-58], suggest that in AD patients there is a coincident increment in A β concentration within an aged hippocampal

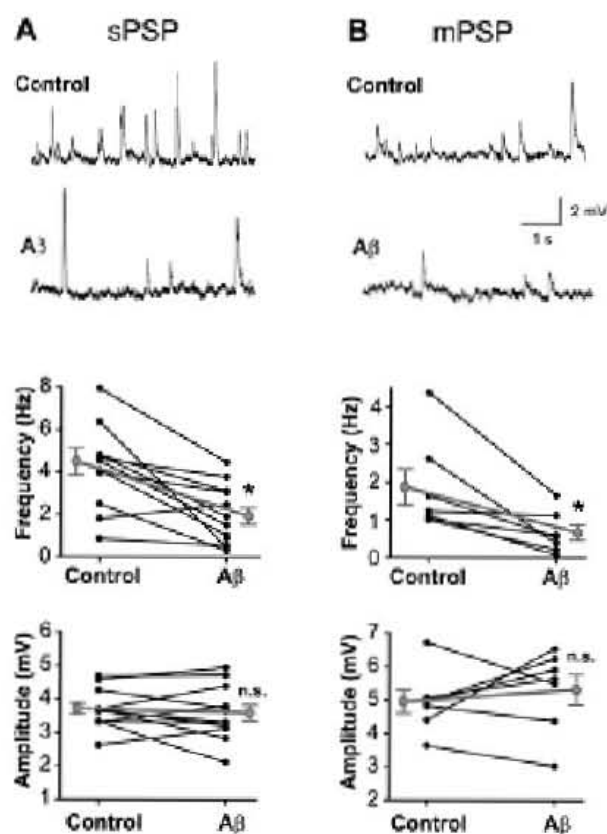


Fig. (7). osA β presynaptically reduce synaptic transmission. **A)** Representative recordings of spontaneous postsynaptic potentials (sPSP) in control conditions (upper trace) and after application of osA β 10 nM (lower trace; $n = 11$). The lower panel shows the quantification of the frequency (upper graph) and the amplitude (lower graph) of the sPSP before and after osA β 10 nM application. **B)** Representative recordings of miniature postsynaptic potentials (mPSP), in the presence of tetrodotoxin 500 nM, in control conditions (upper trace) and after application of osA β 10 nM (lower trace; $n = 7$). The lower panel shows the quantification of the frequency (upper graph) and the amplitude (lower graph) of the mPSP before and after osA β 10 nM application. Data are presented individually (black circles) and the mean $\pm$ SEM is presented as gray circles; (*) denotes a significant difference relative to control with a $P < 0.05$. n. s. denotes not significant difference.

circuit that becomes vulnerable to the effect of this peptide. This may provide the switch between normal aging and pathogenic conditions related to the beginning of AD [4, 26, 59].

It has been previously reported that A β oligomers can induce neuronal death [60-64], even at concentrations very closed to those used in our experiments [13]. For instance, Lambert *et al* (1998) reported that A β oligomers 5 nM induce a reduction in cell viability if is applied for 24 hrs. Thus, it was necessary to evaluate whether or not osA β -induced reduction of spontaneous network activity was related to neuronal death. Here we show that acute application of osA β induces a reduction in spontaneous network activity that is "reversible" and does not correlate with any release of LDH, suggesting that the described effects do not correlate with cell death. We believe that A β oligomers can induce cell damage after prolonged exposures in contrast to the acute A β exposure that induces neuronal network dysfunction by reversibly altering specific cellular mechanism [11]. This is supported by the same report by Lambert *et al.*, (1998), which shows that 500 nM of A β oligomers can acutely disrupt long term potentiation in the hippocampus without any neuronal death.

An interesting observation from the just described "reversibility" experiments is that after 30 min of osA β washout the spontaneous network activity not just recovered but increased its power to higher levels than those recorded in control conditions. This finding suggests that the neuronal networks that recovered from osA β -induced inhibition might become hyperexcitable. This is supported by previous findings of washout-induced hyperexcitability after the recovering of the application of GABA [65-68], opioids agonists [69], nitric oxide [70-72] and adenosine [73]. It is possible that such osA β -washout-induced hyperexcitability play a role in the generation of the epileptic-like activity observed in AD animal models [74-76] as well as in AD patients (for review see [75, 76]).

It has been extensively reported that during early postnatal age the spontaneous network activity coexists with paroxysmal population spikes, which eventually disappear as the animal becomes older [37, 38]. Interestingly, we have found that osA β differentially affect those network activity in the same slices. Whereas spontaneous network activity is spared after application of A β to slices obtained from neonates, the population spikes produced in the same slices are almost abolished by the same application. Similarly, a previous report has shown that 4-aminopyridine-induced population spikes are reduced in slices obtained from a transgenic model of AD [77]. Despite the fact that population spikes might not be related to any particular cognitive process but be necessary for proper circuit wiring [78], our observation support the notion that A β oligomers differentially affect specific network activities. This is a very important issue because on one hand the differential effect of A β on several network activities might give some hints about the cellular mechanisms involved in A β -induced network dysfunction and, on the other hand, it might create a false controversy regarding the effect, or the absence of effect, of A β on network activity. A similar controversy is already in place for the effect, or absence of effect, of A β on long term potentiation, which

might just being explained by the diversity of cellular mechanisms involved in different types of long term plasticity [10, 13-18, 20, 79-82]. It will be very important, for the future pharmacological experiments, to identify which population activities are affected by A β and moreover which of those network activities is involved in the A β -induced cognitive impairment. For this purpose it is important to correlate the findings *in vitro* with more physiological approaches. For instance, we have tried, in the past, to correlate our findings *in vitro* with *in vivo* recordings of similar network activities [11].

It is very likely that A β -induced neuronal network dysfunction is produced by the alteration of specific cellular mechanisms involved in the generation of spontaneous network activity [1, 11]. One of these mechanisms seems to be the hippocampal synaptic transmission. We have found that osA β , in our experimental conditions, can presynaptically alter synaptic transmission. This finding correlates with previous works describing that A β disrupts synaptic transmission or its plasticity [12, 14, 83]. Interestingly, several studies in AD mouse models have suggested that a reduction in synaptic transmission occurs before any neuronal death and plaque formation and correlated with the cognitive deficit observed in these animals [7, 9, 54-56, 58]. It looks like that A β not just affect the synapses at the functional level, but can decrease presynaptic and postsynaptic molecular makers and induce the reduction of both presynaptic terminals and dendritic spines [7, 84-91].

In conclusion, our study shows that acute application of A β induces an age-dependent hippocampal network disruption; such disruption occurs at clinically relevant concentrations, is not related to cell death and correlates with a reduction in synaptic transmission. We believe that our study provide a very robust model to study the cellular and molecular mechanisms involved in A β -induced cognitive deficits that might be the source of the early cognitive impairment of AD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We like to thank Alfredo García at Washington University for reviewing the manuscript. Bertha González-Pedrajo, Julio Morán and Valentin Mendoza at UNAM for providing us with materials and their expertise regarding the silver staining. Juan Javier López-Guerrero, José Rodolfo Fernández and Arturo Franco at Cinvestav for technical assistance. This study was supported by Conacyt Grant Number: 59187, AP-LIC-102738.

This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) of Hugo Balleza-Tapia that received a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- [1] Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol* 4(2): 149-163 (2006).
- [2] Selkoe DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res* 28(11): 1705-1713 (2003).
- [3] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30(4): 572-580 (1991).
- [4] Lue LF, Kuo YM, Rober AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, *et al.* Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155(3): 853-862 (1999).
- [5] Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, *et al.* Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283(12): 1571-1577 (2000).
- [6] Giacchino J, Criado JR, Games D, Henriksen S. *In vivo* synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* 876(1-2): 185-190 (2000).
- [7] Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, *et al.* Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6): 3228-3233 (1999).
- [8] Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, *et al.* Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274(10): 6483-6492 (1999).
- [9] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, *et al.* High-level neuronal expression of beta 142 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20(11): 4050-4058 (2000).
- [10] Stephan A, Lanoche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21(15): 5703-5714 (2001).
- [11] Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, *et al.* Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus* 20(1): 78-96 (2010).
- [12] Small DH. Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends Mol Med* 14(3): 103-108 (2008).
- [13] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11): 6448-6453 (1998).
- [14] Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. *Exp Gerontol* 39(11-12): 1661-1667 (2004).
- [15] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416(6880): 535-539 (2002).
- [16] Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924(2): 133-140 (2002).
- [17] Wang Q, Rowan MJ, Anwyl R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24(27): 6049-6056 (2004).
- [18] Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24(13): 3370-3378 (2004).
- [19] Driver JE, Racca C, Cunningham MO, Towers SK, Davies CH, Whittington MA, *et al.* Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations *in vitro* in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP). *Eur J Neurosci* 26(5): 1280-1288 (2007).
- [20] Sun MK, Alkon DL. Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35). *J Neurophysiol* 87(5): 2441-2449 (2002).
- [21] Cacucci F, Yi M, Wills TJ, Chapman P, O'Keefe J. Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in

- Tg2576 Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(22): 7863-7868 (2008).
- [22] Fonte J, Miklosy J, Atwood C, Martins R. The severity of cortical Alzheimer's type changes is positively correlated with increased amyloid-beta Levels: Resolubilization of amyloid-beta with transition metal ion chelators. *J Alzheimers Dis* 3(2): 209-219 (2001).
- [23] Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, *et al.* Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252(3): 711-715 (1998).
- [24] Patel JR, Brewer GJ. Age-related changes to tumor necrosis factor receptors affect neuron survival in the presence of beta-amyloid. *J Neurosci Res* 86(10): 2303-2313 (2008).
- [25] Shinkai Y, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Shimada H, Yanagisawa K, *et al.* Amyloid beta-protein deposition in the leptomeninges and cerebral cortex. *Ann Neurol* 42(6): 899-908 (1997).
- [26] Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158(2): 328-337 (1999).
- [27] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, *et al.* Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8(1): 79-84 (2005).
- [28] Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G, *et al.* A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29(4): 918-929 (2009).
- [29] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192(1): 106-113 (2008).
- [30] Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572(Pt 2): 477-492 (2006).
- [31] Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, *et al.* Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation *in vitro* and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9): 5280-5285 (1999).
- [32] Barnes CA, Rao G, Orr G. Age-related decrease in the Schaffer collateral-evoked EPSP in awake, freely behaving rats. *Neural Plast* 7(3): 167-178 (2000).
- [33] Vreugdenhil M, Toescu EC. Age-dependent reduction of gamma oscillations in the mouse hippocampus *in vitro*. *Neuroscience* 132(4): 1151-1157 (2005).
- [34] Klein WL. Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5): 345-352 (2002).
- [35] Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 355(Pt 1): 215-222 (2001).
- [36] Lernas-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla F, Galarraga E, Carrillo-Reid L. Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Rev Mex Ing Biomed* 27: 82-92 (2006).
- [37] Peña F, Alvarez-Perez N. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus *in vitro*. *Epilepsia* 47(1): 47-54 (2006).
- [38] Khazipov R, Leinekugel X, Khalilov I, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J Physiol* 498 (Pt 3): 763-772 (1997).
- [39] Selkoe DJ. Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16(10): 403-409 (1993).
- [40] Buzsaki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304(5679): 1926-1929 (2004).
- [41] Engel AK, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci* 2(10): 704-716 (2001).
- [42] Traub RD, Jefferys JG, Whittington MA. Functionally relevant and functionally disruptive (epileptic) synchronized oscillations in brain slices. *Adv Neurol* 79: 709-724 (1999).
- [43] Hughes JR, Shannugham S, Wetzel LC, Bellur S, Hughes CA. The relationship between EEG changes and cognitive functions in dementia: a study in a VA population. *Clin Electroencephalogr* 20(2): 77-85 (1989).
- [44] Ihl R, Dierks T, Martin EM, Froelich L, Maurer K. Topography of the maximum of the amplitude of EEG frequency bands in dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 39(5): 319-325 (1996).
- [45] Kowalski JW, Gawel M, Pfeffer A, Bareikowska M. The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: correlation with the severity of mental impairment. *J Clin Neurophysiol* 18(6): 570-575 (2001).
- [46] Nobili F, Copello F, Vitali P, Prastaro T, Carozzo S, Perego G, *et al.* Timing of disease progression by quantitative EEG in Alzheimer's patients. *J Clin Neurophysiol* 16(6): 566-573 (1999).
- [47] Schreier-Gasser U, Gasser T, Ziegler P. Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: correlations with severity, clinical characteristics, visual EEG and CCT. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 90(4): 267-272 (1994).
- [48] Busciglio J, Andersen JK, Schipper HM, Gilad GM, McCarty R, Marzatico F, *et al.* Stress, aging, and neurodegenerative disorders. Molecular mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 851: 429-443 (1998).
- [49] Chen QS, Wei WZ, Shimahara T, Xie CW. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 77(3): 354-371 (2002).
- [50] Araki T, Kato H, Shuto K, Itoyama Y. Age-related changes in [3H]nimodipine and [3H]rolipram binding in the rat brain. *J Pharm Pharmacol* 49(3): 310-314 (1997).
- [51] Thibault O, Landfield PW. Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272(5264): 1017-1020 (1996).
- [52] Rosenzweig ES, Barnes CA. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69(3): 143-179 (2003).
- [53] Rosenzweig ES, Rao G, McNaughton BL, Barnes CA. Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7(5): 549-558 (1997).
- [54] Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, *et al.* APP processing and synaptic function. *Neuron* 37(6): 925-937 (2003).
- [55] Lacor PN, Bumil MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, *et al.* Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24(45): 10191-10200 (2004).
- [56] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594): 789-791 (2002).
- [57] Selkoe DJ, Podlisny MB. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 67-99 (2002).
- [58] Small DH, Mok SS, Bornstein JC. Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* 2(8): 595-598 (2001).
- [59] Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, *et al.* Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271(8): 4077-4081 (1996).
- [60] Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kayed R, Glabe CG, Tenner AJ. ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* 281(29): 20315-20325 (2006).
- [61] Costantini C, Della-Bianca V, Formaggio E, Chiamuleta C, Montresor A, Rossi F. The expression of p75 neurotrophin receptor protects against the neurotoxicity of soluble oligomers of beta-amyloid. *Exp Cell Res* 311(1): 126-134 (2005).
- [62] Deshpande A, Kawai H, Metherate R, Glabe CG, Busciglio J. A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci* 29(13): 4004-4015 (2009).
- [63] Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, Lee SC, Park YC, *et al.* Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *FASEB J* 17(1): 118-120 (2003).
- [64] Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, Heizmann CW. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci* 28(20): 5149-5158 (2008).
- [65] Calixto E, Lopez-Colome AM, Casasola C, Montiel T, Bargas J, Brailowsky S. Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal *in vitro*. *Epilepsy Res* 39(1): 13-26 (2000).
- [66] Casasola C, Bargas J, Arias-Montano JA, Calixto E, Montiel T, Galarraga E, *et al.* Hippocampal hyperexcitability induced by

- GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res* 47(3): 257-271 (2001).
- [67] Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S. Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 126(1): 163-171 (2004).
- [68] Garcia-Ugalde G, Galarraga E, Bargas J, Brailowsky S. Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci Lett* 147(2): 229-232 (1992).
- [69] Dreda R, Gassner M, Gingl E, Sandkuhler J. Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. *Science* 325(5937): 207-210 (2009).
- [70] Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199(3): 379-381 (1991).
- [71] Bon C, Bohme GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC. A role for nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 4(5): 420-424 (1992).
- [72] Bon CL, Garthwaite J. Nitric oxide-induced potentiation of CA1 hippocampal synaptic transmission during baseline stimulation is strictly frequency-dependent. *Neuropharmacology* 40(4): 501-507 (2001).
- [73] Doolette DJ, Kerr DL. Hyperexcitability in CA1 of the rat hippocampal slice following hypoxia or adenosine. *Brain Res* 677(1): 127-137 (1995).
- [74] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55(5): 697-711 (2007).
- [75] Palop JJ, Mucke L. Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: Two Faces of the Same Coin? *Neuromolecular Med* 12(1): 48-55 (2010).
- [76] Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66(4): 435-440 (2009).
- [77] Brown JT, Richardson JC, Collingridge GL, Randall AD, Davies CH. Synaptic transmission and synchronous activity is disrupted in hippocampal slices taken from aged Tg2576 mice. *Hippocampus* 15(1): 110-117 (2005).
- [78] Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87(4): 1215-1284 (2007).
- [79] Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport* 8(15): 3213-3217 (1997).
- [80] Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, et al. Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 21(13): 4691-4698 (2001).
- [81] Klyubin I, Walsh DM, Cullen WK, Fadeeva JV, Anwyl R, Selkoe DJ, et al. Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Eur J Neurosci* 19(10): 2839-2846 (2004).
- [82] Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R. Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1219-1223 (2007).
- [83] Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14(8): 837-842 (2008).
- [84] Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, et al. Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20(2): 187-198 (2005).
- [85] Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 8(1): 87-92 (1996).
- [86] Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52(5): 831-843 (2006).
- [87] Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis* 13(3): 246-253 (2003).
- [88] Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, et al. Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25(48): 11061-11070 (2005).
- [89] Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27(11): 2866-2875 (2007).
- [90] Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8): 1051-1058 (2005).
- [91] Spies TL, Meyer-Luchmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, et al. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25(31): 7278-7287 (2005).

Beta-Amyloid Protein (25–35) Disrupts Hippocampal Network Activity: Role of Fyn-Kinase

Fernando Peña,^{1*} Benito Ordaz,¹ Hugo Balleza-Tapia,¹ Ramón Bernal-Pedraza,¹ Abraham Márquez-Ramos,^{1,2} Liliana Carmona-Aparicio,¹ and Magda Giordano²

ABSTRACT: Early cognitive deficit characteristic of early Alzheimer's disease seems to be produced by the soluble forms of β -amyloid protein. Such cognitive deficit correlates with neuronal network dysfunction that is reflected as alterations in the electroencephalogram of both Alzheimer patients and transgenic murine models of such disease. Correspondingly, recent studies have demonstrated that chronic exposure to β AP affects hippocampal oscillatory properties. However, it is still unclear if such neuronal network dysfunction results from a direct action of β AP on the hippocampal circuit or it is secondary to the chronic presence of the protein in the brain. Therefore, we aimed to explore the effect of acute exposure to β AP_{25–35} on hippocampal network activity both in vitro and in vivo, as well as on intrinsic and synaptic properties of hippocampal neurons. We found that β AP_{25–35}, reversibly, affects spontaneous hippocampal population activity in vitro. Such effect is not produced by the inverse sequence β AP_{35–25} and is reproduced by the full-length peptide β AP_{1–42}. Correspondingly β AP_{25–35}, but not the inverse sequence β AP_{35–25}, reduces theta-like activity recorded from the hippocampus in vivo. The β AP_{25–35}-induced disruption in hippocampal network activity correlates with a reduction in spontaneous neuronal activity and synaptic transmission, as well as with an inhibition in the subthreshold oscillations produced by pyramidal neurons in vitro. Finally, we studied the involvement of Fyn-kinase on the β AP_{25–35}-induced disruption in hippocampal network activity in vitro. Interestingly, we found that such phenomenon is not observed in slices obtained from Fyn-knockout mice. In conclusion, our data suggest that β AP acutely affects proper hippocampal function through a Fyn-dependent mechanism. We propose that such alteration might be related to the cognitive impairment observed, at least, during the early phases of Alzheimer's disease. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Alzheimer's disease; network activity; synaptic transmission; intrinsic properties; intracellular pathways

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive impairment in cognitive function (Terry et al., 1991; Nowotny et al., 2001; Selkoe, 2003; Peña et al., 2006) as well as by the presence of extracellular aggregates

of fibrillar beta amyloid protein (β AP; Braak and Braak, 1997; Selkoe, 2003; Peña et al., 2006). There is increasing evidence that early soluble forms of β AP, rather than late fibrillar conformations, might interfere with neuronal network function and therefore be responsible for the early deficits in learning and memory observed in AD patients (Lue et al., 1999; Naslund et al., 2000) as well as in transgenic AD animal models (Hsia et al., 1999; Moechars et al., 1999; Giacchino et al., 2000; Mucke et al., 2000; Stephan et al., 2001).

Extracellular aggregates of β AP, observed in AD patients, contain β AP in its most predominant sequences of β AP_{1–40} or β AP_{1–42} (Glenner and Wong, 1984); however, they also contain peptides with shorter sequences such as β AP_{25–35} (GSNKGAIIGLM; Pike et al., 1995; Kubo et al., 2002; Gruden et al., 2007). β AP_{25–35} can be produced in AD patients by enzymatic cleavage of β AP_{1–40} at its hydrophobic C-terminal (Kaneko et al., 2001; Gruden et al., 2004). β AP_{25–35}, which itself forms β -sheet structure (Pike et al., 1995), produces similar effects to those produced by its parent sequence. For instance, β AP_{25–35} induces neuronal cell death (Yankner et al., 1990; Pike et al., 1995), neurite atrophy (Grace et al., 2002; Tohda et al., 2004), synaptic loss (Grace et al., 2002; Tohda et al., 2004), as well as disruption of synaptic plasticity (Freir and Herron, 2003; Freir et al., 2003; Holscher et al., 2007), and memory (Maurice et al., 1996; Delobette et al., 1997; Stepanichev et al., 1997; Yamaguchi and Kawashima, 2001; Sun and Alkon, 2002), in a similar way to β AP_{1–42} or β AP_{1–40} (Yamaguchi and Kawashima, 2001; Stepanichev et al., 2003, 2004). Previously, it has been proposed that β AP_{25–35} constitutes the biologically active fragment of β AP (Yankner et al., 1990; Mattson et al., 1992; Pike et al., 1995), and in fact, a recent report showed that a single intracerebroventricular injection of β AP_{25–35} induced major neuropathological signs related to early stages of Alzheimer's disease in rats (Klementiev et al., 2007). Interestingly, it has been reported that β AP_{25–35}, which is more soluble and easier to inject in vivo than β AP_{1–42}, is more rapidly toxic and causes more oxidative damage than the parent peptide β AP_{1–42} (Varadarajan et al., 2001), furthermore, β AP_{25–35} does not

¹Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Sede Sur, México, D.F., México; ²Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. 76230, México

*Correspondence to: Fernando Peña, Calz. de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, 14330, México, D.F., México. E-mail: jfpena@cinvestav.mx

Accepted for publication 2 February 2009

DOI: 10.1002/hipo.20592

Published online 17 March 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

form dense core amyloid plaques (Gengler et al., 2007). Therefore, β AP_{25–35} constitutes a very useful tool, if proper control experiments are performed, to understand the pathophysiological events related with neuronal dysfunction induced by soluble β AP. In this study, we are going to use several amyloid peptides (β AP_{25–35}, the inverse peptide β AP_{35–52} and β AP_{1–42}) at 1 μ M or less. We selected these concentrations because, even though it has been reported that soluble β AP concentrations both in AD patients (Kuo et al., 1996; Klunk et al., 2005; Matsui et al., 2007; Ikonovic et al., 2008; Steiner et al., 2008) and AD transgenic mice are in the low nM range (Dewachter et al., 2000; Praticó et al., 2002; Lee et al., 2004; Jankowsky et al., 2007), there are some reports showing that soluble amyloid concentrations in AD patients can reach hundreds of nM (Shinkai et al., 1997; Wang et al., 1999; Fonte et al., 2001) or even μ M concentrations (Kuo et al., 1998; Patton et al., 2006, for a review see Gregory and Halliday, 2005; Bates et al., 2008). The same scenario can be found in the case of AD transgenic mice (Hsiao et al., 1996; Lemere et al., 2001; Bayer et al., 2003; Klunk et al., 2005; Levites et al., 2006; Abramowski et al., 2008).

But, what are the pathophysiological events produced by β AP that lead to cognitive dysfunction? Neurons do not function in isolation and cognition arises from the activity of neural networks, so the origin of β AP-induced cognitive dysfunction must be found at the basic mechanisms involved in proper neuronal network function (Peña et al., 2006; Small, 2008). For instance, it has been suggested that β AP affects long-term potentiation (LTP) in vivo and in vitro (Lambert et al., 1998; Stephan et al., 2001; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2004a,b; Rowan et al., 2004, 2007). However, there are reports showing that β AP does not affect LTP (Fitzjohn et al., 2001) or even increases it (Wu et al., 1995; Parent et al., 1999; Jolas et al., 2002; Koudinov and Berezov, 2004). These controversial findings indicate that β AP-induced cognitive dysfunction might be associated with other neuronal network mechanisms (Sun and Alkon, 2002; Peña et al., 2006; Driver et al., 2007; Cacucci et al., 2008).

Oscillatory network activity, particularly the one produced in the hippocampus, seems to be important for cognitive functions (Buzsáki, 1989, 2002; Kahana et al., 1999, 2001; Buzsáki and Draguhn, 2004). Such coherent circuit activity may constitute an operational state that provides a temporal frame for cell assembly formation and information processing (Traub et al., 1999; Engel et al., 2001; Harris et al., 2003; Buzsáki and Draguhn, 2004). Interestingly, a disruption of oscillatory network activity has been detected in the EEG of AD patients (Hughes et al., 1989; Schreier-Gasser et al., 1994; Ihl et al., 1996; Nobili et al., 1999; Kowalski et al., 2001) and transgenic AD animals (Wang et al., 2002). Accordingly, Sun and Alkon (2002) have shown that intracerebroventricular application of β AP_{25–35} in rats, which impaired learning and memory 3 days after injection, was associated with a failure of hippocampal neurons to produce membrane potential oscillations upon carbachol application in vitro. More recently, it has been shown that transgenic mice that overproduce β AP show disrupted hip-

poampal oscillatory activity (Driver et al., 2007) and altered firing of place cells (Cacucci et al., 2008). Although these studies correlate chronic exposure to β AP with hippocampal network dysfunction, it is still unclear if such hippocampal dysfunction results from a direct action of β AP on the neuronal circuit or if it is a secondary consequence of chronic exposure to increased levels of β AP. In this study, we aimed to explore whether or not acute β AP application affects the intrinsic oscillatory activity of the hippocampus both in vitro and in vivo, as well as some intrinsic cellular activities associated with such oscillatory activity. As indicated earlier, most of the experiments were performed using β AP_{25–35}, however, we also used the full-length peptide β AP_{1–42} and the inverse sequence β AP_{25–35} as controls. Finally, in a first attempt to explore the molecular mechanisms involved in β AP-induced hippocampal dysfunction, we tested whether or not the effects of β AP were observed in hippocampal slices obtained from Fyn-knockout mice. Fyn is a member of the Src tyrosine kinase family that is expressed in the brain (Yagi et al., 1993, 1994; Umemori et al., 1999), but is particularly overexpressed in the brain of AD patients (Shirazi and Wood, 1993; Ho et al., 2005). Interestingly, Fyn-kinase seems to be involved in β AP-induced neurodegeneration (Lambert et al., 1998; Kihara et al., 2001; Chin et al., 2004, 2005); microglial activation (Moore et al., 2002); and neuronal Arc induction (Chin et al., 2005).

MATERIALS AND METHODS

Experimental protocols were approved by The Local Committee of Ethics on Animal Experimentation (CICUAL-Cinvestav) and followed the regulations established in the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals ("Norma Oficial Mexicana" NOM-062-ZOO-1999). Animals used in this study included Wistar rats (8–10 weeks old for population recordings and 2–3 weeks old for patch clamping and epifluorescence). We also used Swiss Webster mice, and wild-type and Fyn-knockout mice from the 129S1/SvImJ strain which were kindly provided by Dra. Claudia González Espinosa. Mice were 8–10 weeks old. All animals were housed at 22°C and maintained on a 12:12-h light/dark cycle with free access to food and water.

Preparation of β AP_{25–35} Solution and Characterization of Its Conformation Composition

All β A peptides were obtained from Sigma (Sigma-RBI, St. Louis, MO) and freshly dissolved in distilled water at 1,000 times concentrated stocks. To explore the conformation composition of the most commonly used solution, β AP_{25–35} 1 mM, we characterized such solution by standard SDS-PAGE electrophoresis followed by silver staining (Vilchis-Landeros et al., 2001). We also characterized the solution by transmission electronic microscopy. For that purpose, 5 μ l of the stock solution

was adsorbed onto Formvar-carbon-coated 300-mesh copper grids and dried. Then the preparation was stained with uranyl acetate and examined using a JEOL JEM1010 electron microscope at 80 kV.

In Vitro Experiments

Details of the hippocampal slice preparation have been previously described (Peña and Tapia, 2000; Peña and Alavez-Pérez, 2006). The most important steps are summarized here. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/Kg) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF) with the following composition (in mM): 238 sucrose, 3 KCl, 2.5 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). After a maximum of 1.5 min of transcardial perfusion, animals were decapitated, and the brains were removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing the following (in mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose, pH 7.4. One cerebral hemisphere was mounted onto an agar block with a 30° inclination. Slices (350–400 μm thick), containing the hippocampal formation, were cut with a vibratome (Vibratome, St. Louis, MO). Slices were left to recover, at room temperature, for at least 90 min, before any experimental manipulation.

Population recordings

For these experiments, performed on slices obtained from rats and all strains of mice, the slices were transferred to a submerged recording chamber continuously superfused at 17–20 ml/min with oxygenated aCSF. The temperature was kept constant at 29 ± 2°C. Extracellular field recordings were obtained with suction electrodes filled with aCSF and positioned over the pyramidal layer of the hippocampal area CA1. The signal was amplified and filtered (highpass, 0.5 Hz; lowpass, 1.5 KHz) with a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA). After recording basal activity for 30 min, the active amyloid peptide β AP_{25–35} was added to the bath perfusion, at the concentration of 0.5 μM and its effect was tested for 30 min after that, then β AP_{25–35} concentration was increased to 1 μM and its effects were tested for another 30 min. We used the higher concentration of β AP_{25–35} 1 μM for the experiments performed in slices obtained from mice. Finally, we added Cd²⁺ 200 μM, to the bath, to block synaptic transmission-dependent activity and subsequently added lidocaine 1 mM to block action potential-dependent activity. We tested the effect of either the inactive inverse sequence β AP_{35–25} 1 μM or the full-length peptide β AP_{1–42} 0.5 μM, using the same protocol as described for β AP_{25–35}. To assess synaptic transmission with population recordings, field stimulation was applied with a concentric bipolar electrode, measuring 50 μm diameter at the tip, placed in the stratum radiatum to activate the Schaffer collateral input to CA1, which responds with orthodromic or synaptically driven population spikes. Paired brief square current pulses (100–200 μs, 0.05 Hz) were applied, and normally, the stimulus intensity was fixed at half

the maximal threshold stimulation, which was determined in each experiment, so that in each set of experiments, the same point in the I/O plot was used (Peña et al., 2002). This stimulus strength produced paired pulse facilitation in the control condition and was not changed throughout the duration of the experiment. Paired pulse stimulations were given at 50 ms of interstimulus intervals.

Unicellular recordings

Whole cell patch-clamp recordings were obtained from CA1 pyramidal neurons, from rat hippocampal slices, using an Axo-clamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) and a Nomarsky-DIC equipped microscope (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY). The patch electrodes (4–8 MΩ) were manufactured from filamented borosilicate glass tubes (Clarke GC 150TF) and filled with a solution containing the following (in mM): 120 K-gluconic acid, 20 KCl, 1 CaCl₂ · 6H₂O, 10 EGTA, 2 MgCl₂ · 6H₂O, 4 Na₃ATP, 1 LiGTP, and 10 HEPES. This pipette solution resulted in small LJP (<3 mV), which was not corrected in this study. Neurons were maintained in current clamp conformation, at their resting membrane potential, and square pulses of both depolarizing and hyperpolarizing current (1 s), were delivered to identify the neuronal type recorded, as well as to evoke trains of action potentials or to measure any change in input resistance during the experimental conditions. All neurons included in this study were identified as regular spiking, more likely pyramidal neurons. In a separate set of neurons, we also applied constant depolarizing direct current to reach a subthreshold level under which intrinsic membrane potential oscillations could be observed. In some experiments, neurons were just maintained at their resting membrane potential to record from spontaneous synaptic potentials. Basal subthreshold oscillations, input resistance, or current-induced firing were recorded for 10 min and then β AP_{25–35} was added to the bath perfusion and tested its effect for 15 min.

Calcium imaging

Rat hippocampal slices were incubated at room temperature, in the dark, for 20–30 min in the presence of 10 μM fluo 4-AM (Tef Labs, Austin, TX) and 0.3% pluronic acid in aCSF equilibrated with carbogen (Carrillo-Reid et al., 2008). Then, slices were transferred and immobilized, with a nylon mesh, into a perfusion chamber on a microscope adapted to an epifluorescence system (Eclipse E600FN; Nikon, Melville, NY). Slices were continuously perfused with aCSF equilibrated with carbogen at 30–32°C. Excitation at 488 nm was performed with a Lambda LS illuminator (Sutter instruments, Novato CA). Images were acquired with a cooled digital camera (CoolSNAP-ES, Roper Scientific, Tucson, AZ). Imaging software used was RS Image (Photometrics; Roper Scientific, Tucson, AZ). The imaged field was 800 × 600 μm in size. Short movies (160 s, 40 μs exposure, four images per second) were taken at time intervals of 10 min during 1 h. Cells active during the experiment were analyzed.

In Vivo Experiments

For these experiments, 8 weeks old rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (20 mg/kg, i.p.) and implanted with a bipolar stainless steel electrode (California Fine Wires), in the right CA1 radial layer of the dorsal hippocampus (coordinates AP, -3.6; ML, 2.6; and DV, 3.1) and a guiding cannula above the right ventricle (AP, -0.7; ML, 2; and DV, 3.5; according to Paxinos and Watson 1998) using standard stereotaxic procedures. The electrode was attached to male connector pins, which were inserted into a connector strip. A stainless steel screw was placed over the olfactory bulb to serve as a reference electrode. All the assembly was fixed to the skull with dental acrylic and the animals were allowed to recover for 7 days before any treatment began. On day 7, animals were anesthetized with urethane (1.3 g/Kg, i.p.) and hippocampal field recordings were obtained using the same amplification conditions as for the *in vitro* recordings. Theta rhythm was elicited upon sensory stimulation, consisting of a tail pinch produced by a plastic clamp positioned on the tail 2 cm from its base. A tail pinch, lasting 75 s, was applied each 10–20 min for at least 1 h in control conditions. Then either β AP_{25–35} or β AP_{35–25} (200 nmoles/5 μ l) was injected intracerebroventricularly (i.c.v. at 1 μ l/min), by introducing an injector through the guide cannula which was connected to a Hamilton syringe (Hamilton Company), mounted on dual perfusion pump (Harvard Apparatus Co. Mass). The effect of β A peptides was monitored for at least 3 h. At the end of the hippocampal field recordings, all animals were processed for histological location of the electrode and the guide cannula (Peña and Tapia, 1999, 2000; Carmona-Aparicio et al., 2007). The recording site was visually confirmed to be located in the hippocampal fissure and the injection site to be located in the right ventricle.

Data Analysis

Electrophysiological recordings

All recordings were digitized at 3–9 KHz and were stored on a personal computer with an acquisition system from National Instruments (Austin, TX) by using custom made software designed in the LabView environment (Lemus-Aguilar et al., 2006). The recordings obtained were analyzed off-line. It is important to mention that we always recorded one slice per animal or one neuron per slice. In the case of population recordings, we performed two types of analysis, classical power spectrum analysis (Peña and Alvarez-Pérez, 2006) and wavelet time-frequency analysis (Romcy-Pereira et al., 2008). For classical power spectrum analysis, segments of 5 s were analyzed using a Rapid Fourier Transform Algorithm with a Hamming window in Clampfit (Molecular Devices). The power spectra, from 1 to 60 Hz, were integrated and normalized to control, meaning that control power spectrum was integrated and this value was arbitrarily set as 100%. For time-frequency analysis, segments of 2–5 s were analyzed, using the Morlet wavelet basis. Such analysis is plotted as a time-frequency representation

(TFR), in which the energy or “intensity” of each frequency, at any given time, is represented by a color scale: the lowest intensity is represented by brown and the highest intensity is represented by white (Romcy-Pereira et al., 2008). The data obtained from the wavelet transform was binarized to produce a black-and-white TFR image. Binarization is accomplished by using Otsu’s thresholding method (Otsu, 1979). TFR image binarization converts a continuous TFR into a 0–1 matrix, where the main oscillatory events are highlighted. All the algorithms and procedures, written for MATLAB, were downloaded from the free access website <http://www.neuroimago.usp.br/BPT/>.

In the case of synaptic transmission experiments, we analyzed the data as follows: We averaged the evoked field potentials in a minute (from a total of 3) and measured the amplitude of the first population spike (S1) in control condition, after β AP_{25–35} application and upon washout. Paired pulse facilitation (PPF) is expressed as the ratio S2/S1, where S2 is the amplitude of the second field potential and S1 the amplitude of the first one (Peña et al., 2002). Spontaneous postsynaptic potential (sPSP) were identified and analyzed with custom made programs written in IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). We calculated sPSP frequency and amplitude during 10 min before and after β AP_{25–35} application.

Subthreshold oscillations, evoked in pyramidal neurons by injecting DC current to depolarize the membrane potential near threshold level, were analyzed using the power spectrum analysis exactly as used for spontaneous population activity. In the case of the trains of evoked action potentials, those were identified and analyzed with custom made programs written in IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR), as reported before (Peña and Ramirez, 2002; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). The frequency of evoked action potentials was evaluated from five consecutive pulses for each neuron. In addition, we evaluated the adaptation index of the action potentials in the train using the following formula: P2/P1, with P2 being the period between the last two action potentials in the train and P1 being the period between the first two action potentials in the train. An index >1 represents frequency adaptation.

Image analysis

Image processing was carried out with Image J (v1.36, National Institutes of Health) and custom made programs written in IDL (Carrillo-Reid et al., 2008). All active neurons in a field were semi-automatically identified, and their mean fluorescence was measured as a function of time. Single pixel noise was discarded using a 5-pixel ratio mean filter. Calcium-dependent fluorescence signals were computed as $(F_i - F_o)/F_o$, where F_i is the fluorescence intensity at any frame, and F_o is the resting fluorescence, i.e., average fluorescence of the first four frames of the movie. Calcium signals were detected based on a threshold value given by their first time derivative (2.5 times the standard deviation (SD) of the noise value). Thus, we obtained a $C \times F$ binary matrix; where C represents the number of active cells and F the number of frames for each movie. Recordings were inspected manually to remove artifacts and

slow calcium transients which are likely to correspond to glial cells (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008). After defining all neuronal-like calcium transients, we quantified both the number of active neurons and the number of neuronal-like calcium transients per neuron.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) ($n \geq 5$). To analyze parametric data, which was very rare, repeated measures of analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test or Student's *t*-test was used. When dealing with nonparametric data, which was in most of the cases, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was used. A $P < 0.05$ was accepted as significant.

RESULTS

Extracellular population recordings of the hippocampal CA1 region revealed spontaneous low-voltage network activity in vitro (Fig. 1A, left upper trace). Power spectrum analysis (Fig. 1A, right upper graph), as well as wavelet analysis (Fig. 1A, middle upper graphs), showed that such spontaneous network activity occurs at variable intermixed frequencies, ranging from 1 to 60 Hz (with peak-power frequency at 8.3 ± 1.8 Hz; $n = 10$; Fig. 1A). Wavelet analysis shows no sustained oscillatory activity, but the succession of spots of activity with variable frequencies (Fig. 1A, middle upper graphs). The absence of sustained oscillatory activity was confirmed by autocorrelation analysis, which shows a flat autocorrelation function (data not shown). Bath application of freshly dissolved β AP_{25–35} inhibits, in a dose-dependent manner (0.5 and 1.0 μ M), such spontaneous hippocampal network activity. β AP-induced reduction in hippocampal population activity can be observed directly from the traces (Fig. 1A, middle and lower left traces) or in the power spectra obtained from those traces (Fig. 1A, middle and lower right graphs). Such reduction cannot be easily seen by directly comparing individual time-frequency representations since, for any given data set, the color representation changes, meaning that it is rescaled considering the lowest and highest intensity in each trace. Similarly, binary time-frequency representation (bTFR) changes the scale to 0 (lowest; black) and 1 (highest, white) in each trace. Therefore, to avoid this problem, we compiled all the traces into one (to maintain the same color scale for all of them) and then a clear reduction in intensity is seen after application of both concentrations of β AP_{25–35} (Fig. 1B). β AP_{25–35} 500 nM significantly reduced the integrated power to $74.8 \pm 10.6\%$ of control (Fig. 1C; $n = 10$), whereas peak frequency remained unchanged (9.7 ± 2.2 Hz; $n = 10$). Increasing the concentration of β AP_{25–35} further to 1 μ M reduced the power of population activity to $56.1 \pm 8.8\%$ of control (Fig. 1C; $n = 10$), whereas peak frequency remained unchanged (8.6 ± 1.8 Hz; $n = 10$). Interestingly, subsequent application of 200 μ M Cd^{2+} did not produce any additional

decrement in the power of population activity ($45.6 \pm 11.3\%$ of control; Figs. 1A–C; $n = 10$). It is important to mention that 200 μ M Cd^{2+} , tested in an independent set of slices ($n = 6$), produced a reduction in population activity power to $56.82 \pm 15.34\%$ of control. Finally, addition of lidocaine 1 mM, to the bath perfusion, abolished all spontaneous population activity (power reduction to $7.5 \pm 2.2\%$ of control; Figs. 1A–C; $n = 10$). It is important to mention that the characterization of the freshly prepared β AP_{25–35} solution used for these experiments, and for several of the next ones, reveals a mixture of monomers and aggregates that can be seen in the electrophoresis gel as well as in the electronic micrograph inserted in Figure 1C. It is important to mention that the gel inserted was the only one in which we were able to observe monomeric forms of β AP_{25–35}, in the other five attempts, we observed just the band that corresponds to the aggregated form of β AP_{25–35}. It is likely that the aggregated protein observed in the gel corresponds to the protein aggregates observed in the electronic micrograph (Fig. 1C).

To strengthen the findings observed with β AP_{25–35}, we performed several control experiments. In the first one (Fig. 2A), we found that bath application of the inverse sequence β AP_{35–25} 1 μ M did not alter population activity in the hippocampus (Fig. 2A left traces). Neither the TFR (Fig. 2A middle graphs) nor the power spectra (Fig. 2A right graphs) showed differences before and after application of β AP_{35–25} 1 μ M. In the presence of the inverse sequence β AP_{35–25} 1 μ M, the integrated power spectrum remained in $110.9 \pm 11.2\%$ of control (Fig. 2D; $n = 7$), with a peak frequency of 7.98 ± 2.1 Hz (compared with 10.15 ± 2.3 Hz in control; $n = 7$). In a second control experiment (Fig. 2B), we found that the effect produced by β AP_{25–35} 0.5 μ M (Fig. 2B middle trace) can be reversed upon washout (Fig. 2B lower trace). As reported in Figure 1, β AP_{25–35} 0.5 μ M reduced hippocampal population activity as observed in the trace (Fig. 2B, middle trace) as well as either in the binarized TFR (Fig. 2B, middle graph) or in the power spectrum obtained from those traces (Fig. 2B, right graph). Interestingly, after 30 min of washout, spontaneous hippocampal population activity not only recovered but increased beyond control conditions (Fig. 2B lower trace and graphs). In fact, integrated power spectrum increased to $311.64 \pm 43.22\%$ of control (Fig. 2D; $n = 6$). Finally, in a third control experiment (Fig. 2B), we found that the full-length peptide β AP_{1–42} 0.5 μ M (Fig. 2C middle trace) reduced hippocampal population activity in a very similar manner to β AP_{25–35} (cf. Fig. 2C with Figs. 1A and 2B). β AP_{1–42} 0.5 μ M reduced hippocampal population activity as observed in the trace (Fig. 2C, middle trace) as well as either in the binarized TFR (Fig. 2C, middle graph) or in the power spectrum obtained from those traces (Fig. 2C, right graph). As with β AP_{25–35}, when β AP_{1–42} is washed out spontaneous hippocampal population activity not only recovered but increased beyond control conditions (Fig. 2C lower trace and graphs). In fact, integrated power spectrum increased to $235.65 \pm 71.58\%$ of control (Fig. 2D; $n = 8$).

To explore the physiological relevance of the effect of β AP_{25–35} on the hippocampal activity observed in vitro, we

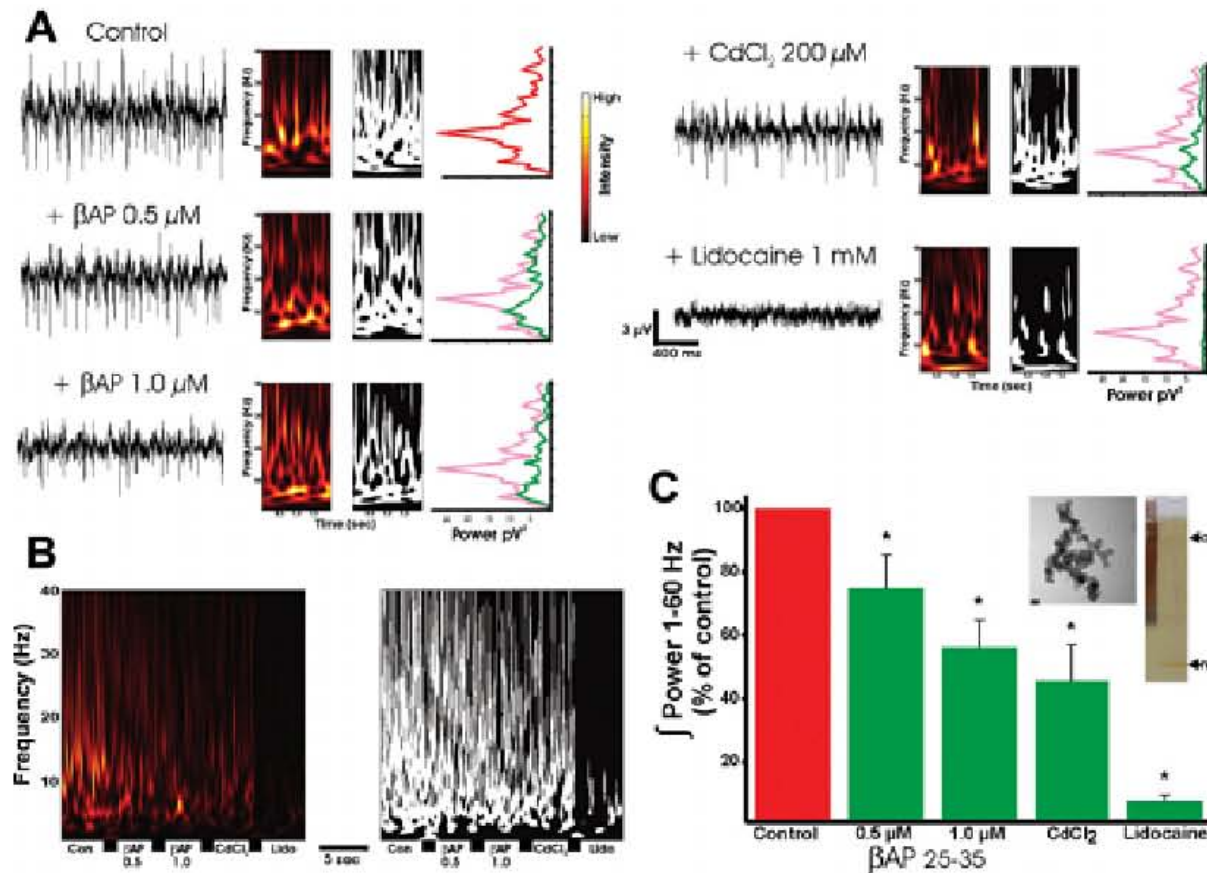


FIGURE 1. β AP_{25–35} affects spontaneous population activity in the hippocampal CA1 region. In all cases, traces on the left are representative recordings of spontaneous population activity from CA1. Calibration applies for all recordings. Middle graphs are time-frequency representations (TFR) obtained directly from wavelet analysis (left) and after TFR binarization (bTFR, right). The upper right power spectrum (red), corresponding to the control recording, is preserved as a pink spectrum in the other graphs for comparison purposes; the power spectrum of the corresponding left recordings is shown in green. The frequency axis has the same scale as the frequency axis of the associated TFR. (A) β AP_{25–35} affects spontaneous population activity in a dose dependent manner. Upper left recording, and corresponding graphs were obtained in control conditions. The middle and lower traces, and corresponding graphs, show the β AP_{25–35}-induced reduction of spontaneous population activity at 0.5 and 1 μ M, respectively. Upper right traces, and corresponding graphs, show population hippo-

campal activity after subsequent addition Cd²⁺ 200 μ M and then lidocaine 1 mM. Note that Cd²⁺ does not produce additional reduction to that achieved by β AP_{25–35} and that lidocaine abolishes spontaneous population activity. (B) Compilation of all traces, to maintain the same intensity scale for all of them, shows the reduction in the intensity of spontaneous activity after application of β AP_{25–35} and subsequent lidocaine application. Quantification of the experiments just described is presented in (C) ($n = 10$). The values of the integrated power are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control. Inserted in (C) is an electrophoresis gel showing that freshly dissolved β AP_{25–35} solution already contains both monomers (m) and aggregates (a) and an electronic micrograph showing the putative aggregates. Bar scale represents 50 nm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

studied the effect of intracerebroventricular application of both β AP_{25–35} and β AP_{35–25}, 200 nmoles, on rhythmic theta oscillations induced by sensory stimulation in urethane-anesthetized rats (Fig. 3). Under urethane anesthesia, hippocampal local field potential showed spontaneous slow wave activity (Fig. 3A) that switched into rhythmic oscillatory activity, in the theta range, upon sensory stimulation (tail pinch). The temporal dynamics of such activity can be observed either in the traces or in the binarized TFRs (Fig. 3A). Power spectrum obtained

of stable sensorial-induced theta rhythm showed a peak frequency of 3.2 ± 0.2 Hz ($n = 8$). Such oscillatory activity recorded *in vivo* is altered upon intracerebroventricular injection of β AP_{25–35}. In the presence of β AP_{25–35}, the tail pinch-induced switch from slow rhythm activity to theta rhythm was maintained (Fig. 3A), however, theta rhythm recorded under these conditions showed reduced temporal stability and reduced power (Fig. 3A). A statistically significant reduction in the power of theta oscillation was observed (to $78.8 \pm 4.7\%$ of

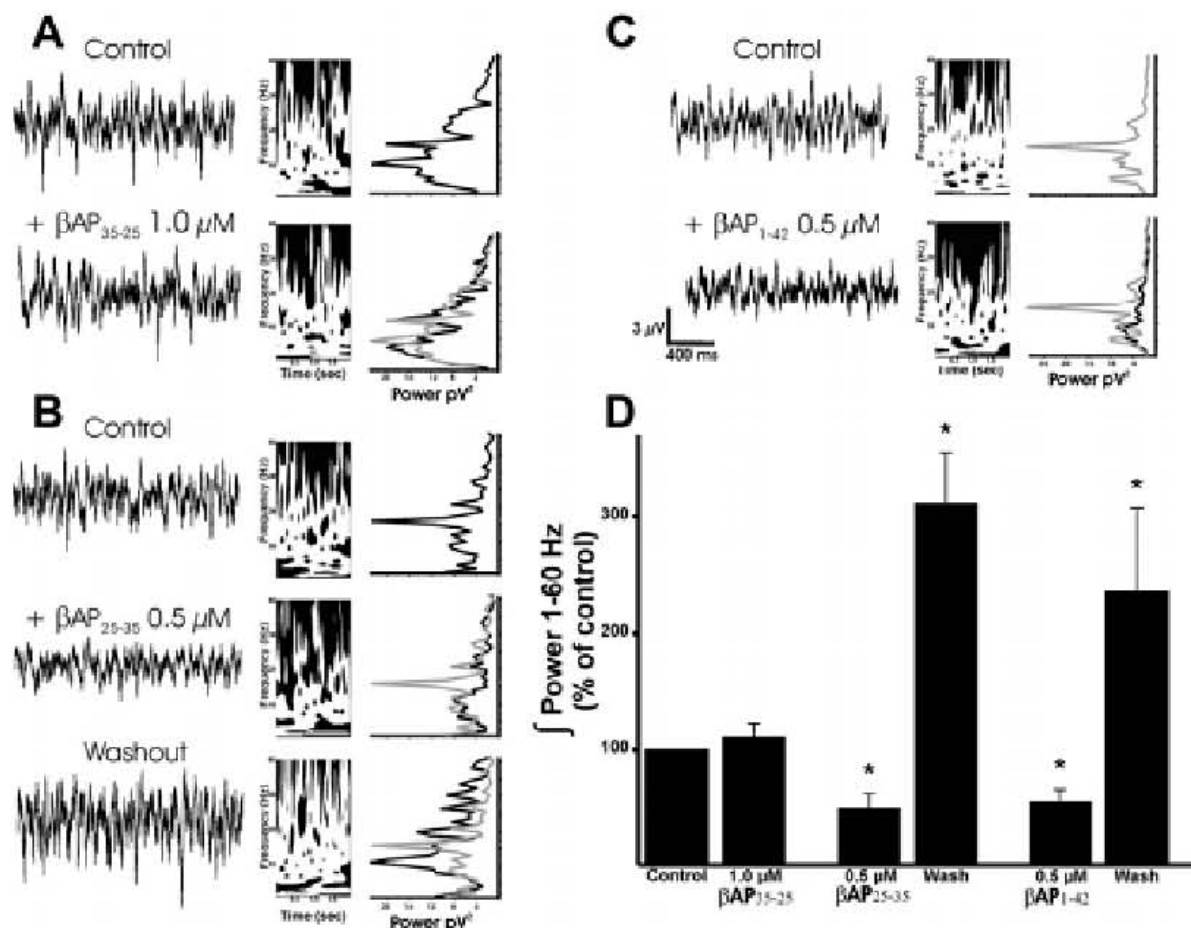


FIGURE 2. β AP₂₅₋₃₅-induced inhibition of hippocampal spontaneous population activity is reversible, not reproduced by the reverse peptide β AP₃₅₋₂₅ and reproduced by the full length peptide β AP₁₋₄₂. In all cases traces, on the left are representative recordings of spontaneous population activity from the CA1 region. Calibration applies for all recordings. Middle graphs are bTFR. The right control power spectrum is preserved as a gray spectrum in the other graphs for comparison purposes, the power spectrum of the corresponding left recordings are shown in black. The frequency axis has the same scale as the frequency axis of the associated TFR. (A) β AP₃₅₋₂₅ does not affect the hippocampal spontaneous population activity ($n = 7$). No differences, neither in the

traces nor in the graphs, can be observed after application of β AP₃₅₋₂₅. (B) The reduction in spontaneous population activity produced by β AP₂₅₋₃₅ (middle trace and graphs) is reverted upon washout (lower trace and graphs). Note that after washout spontaneous activity increases beyond control conditions. (C) The full-length β AP₁₋₄₂ reproduces the effects of β AP₂₅₋₃₅. Quantification of the experiments just described is presented in (D). The values of the integrated power are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control. Note that β AP₂₅₋₃₅ ($n = 6$) and β AP₁₋₄₂ ($n = 8$) produce very similar effects, consisting of a reduction in the spontaneous activity and a rebound increase upon washout.

control; $n = 8$), although no change in peak frequency was detected (3.5 ± 0.1 Hz; $n = 8$). In contrast to spontaneous population activity recorded *in vitro*, *in vivo* theta activity shows clear rhythmicity. This can be revealed by autocorrelation plots, which show autocorrelation peaks at regular basis (Fig. 3B). The autocorrelation is reduced upon application of β AP₂₅₋₃₅. In contrast to β AP₂₅₋₃₅, that significantly reduced theta rhythm *in vivo* (Fig. 3C), the inverse sequence β AP₃₅₋₂₅, also injected intracerebroventricularly, did not affect sensory-evoked theta rhythm since the integrated power remained at $109.42 \pm 21.24\%$ of control (Fig. 3C; $n = 5$).

At the cellular level, we tested the effect of β AP₂₅₋₃₅ on the intrinsic properties of pyramidal neurons as well as on spontaneous activity of hippocampal neurons reflected as calcium transients measured by fluorescence imaging. As shown in Figure 4A, membrane depolarization of pyramidal neurons, at voltages close to threshold level, induced voltage-dependent subthreshold oscillations that disappeared once membrane potential returned to its resting level (Fig. 4A). Power spectrum analysis showed that the peak frequency of such subthreshold membrane potential oscillations is 3.6 ± 0.2 Hz ($n = 14$). Bath perfusion of β AP₂₅₋₃₅ reduced, in a concentration

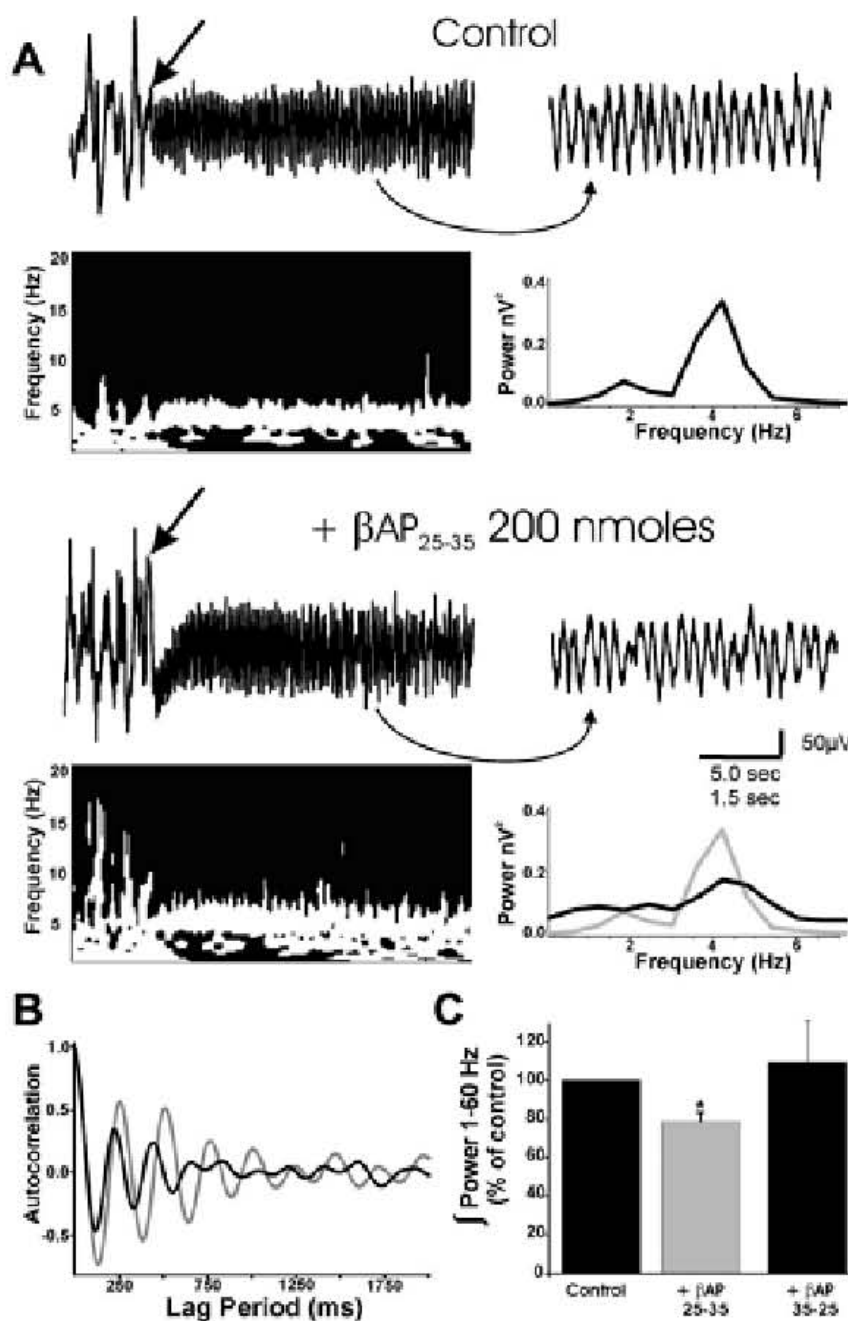


FIGURE 3. β AP₂₅₋₃₅, but not β AP₃₅₋₂₅, reduces sensory-evoked hippocampal theta-like activity. In all cases, traces on the left are representative hippocampal field recordings of urethane-anesthetized rats before and during sensory stimulation (tail pinch that begins at the arrow). On the right there are expanded traces taken during stable sensory stimulation. Voltage calibration applies for all recordings. The 5.0 s calibration applies for the left traces and the 1.5 s calibration applies for the right traces. Below the traces, bTFR of left recordings and a power spectrum of the right recordings are presented. The control power spectrum is preserved as a gray spectrum in the power spectrum in the presence β AP₂₅₋₃₅ for comparison purposes. (A) Comparison of theta activity before (control; upper traces and graphs) and after intracerebroventricular injection of β AP₂₅₋₃₅ 200 nmoles (lower traces and graphs), showing a reduction in sensory-induced hippocampal theta activity. (B) Autocorrelation analysis shows a reduction in rhythmicity of the hippocampal field potential in the presence of β AP₂₅₋₃₅ (black) compared to control (gray). Quantification of the experiments just described is presented in (C). Quantification of the effect of intracerebroventricular injection of the inverse peptide β AP₃₅₋₂₅ 200 nmoles is presented as well. Note that whereas β AP₂₅₋₃₅ ($n = 8$) induces a significant reduction of the integrated power β AP₃₅₋₂₅ does not produce any effect ($n = 5$). The values of the integrated power are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control.

tion of β AP₂₅₋₃₅ 200 nmoles (lower traces and graphs), showing a reduction in sensory-induced hippocampal theta activity. (B) Autocorrelation analysis shows a reduction in rhythmicity of the hippocampal field potential in the presence of β AP₂₅₋₃₅ (black) compared to control (gray). Quantification of the experiments just described is presented in (C). Quantification of the effect of intracerebroventricular injection of the inverse peptide β AP₃₅₋₂₅ 200 nmoles is presented as well. Note that whereas β AP₂₅₋₃₅ ($n = 8$) induces a significant reduction of the integrated power β AP₃₅₋₂₅ does not produce any effect ($n = 5$). The values of the integrated power are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control.

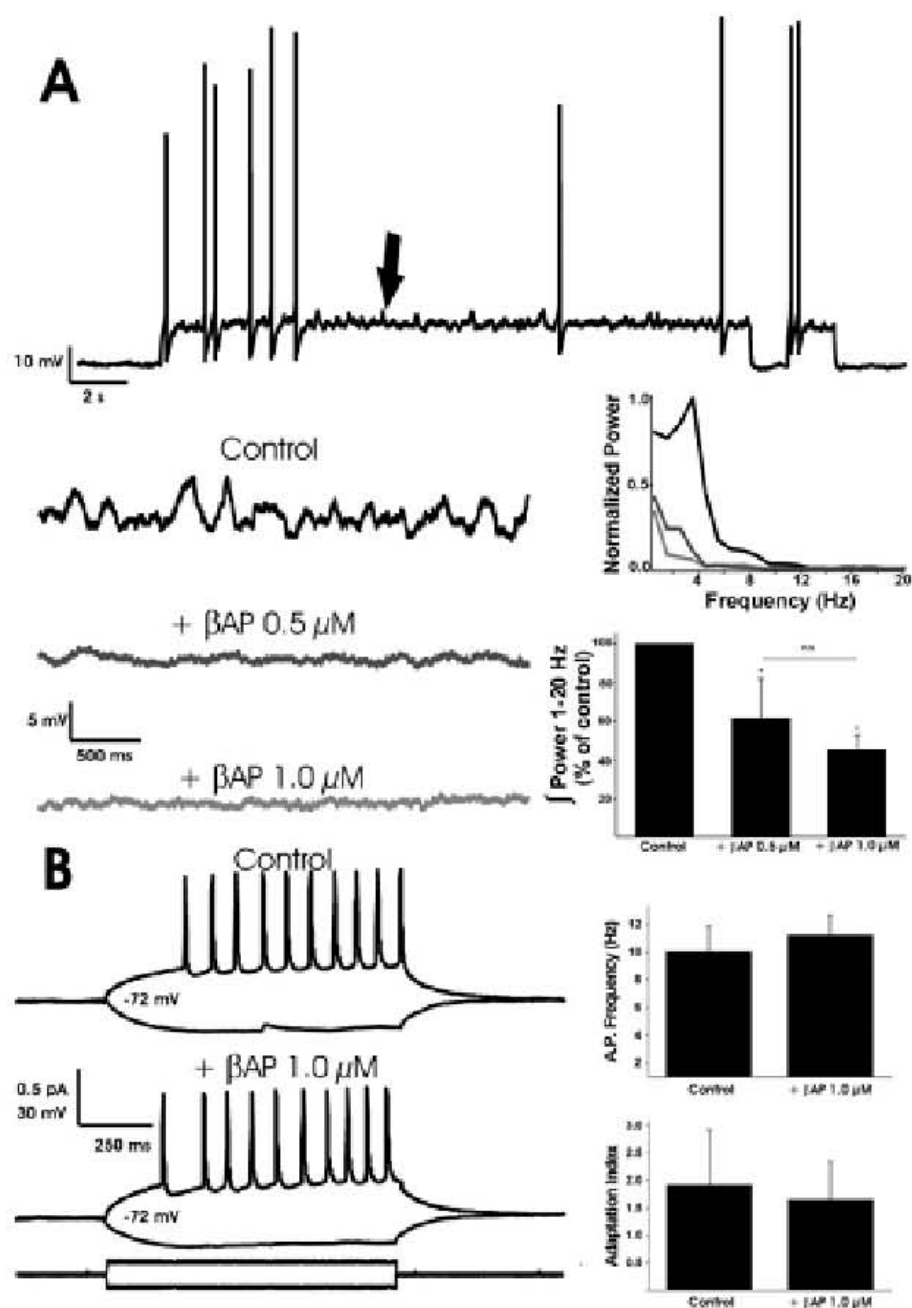


FIGURE 4. β AP₂₅₋₃₅ differentially affects intrinsic properties of CA1 pyramidal neurons. (A) β AP₂₅₋₃₅ reduces subthreshold oscillation of pyramidal neurons. The upper trace shows a current clamp recording of a CA1, regular spiking, pyramidal neuron. Application of depolarizing DC current, enough to reach a membrane potential near threshold, allows the appearance of intrinsic membrane potential subthreshold oscillations (pointed by the arrow). Below, there are expanded subthreshold membrane potentials in control conditions (upper trace) and after application of β AP₂₅₋₃₅ 0.5 μ M (middle trace) and β AP₂₅₋₃₅ 1.0 μ M (lower trace). Calibration applies for all recordings. Note that β AP₂₅₋₃₅ reduces, in a concentration-dependent manner, membrane potential subthreshold oscillation of pyramidal neurons. On the right a power spectrum, obtained from these recordings, is presented.

Control power spectrum is showed in black and the power spectrum of the membrane potential after the application of β AP₂₅₋₃₅ 0.5 and 1.0 μ M are showed in darker and lighter gray, respectively. Below the power spectrum a quantification of the experiments is presented ($n = 14$). (B) β AP₂₅₋₃₅ does not affect the response of pyramidal neurons neither to hyperpolarizing ($n = 10$) nor to depolarizing ($n = 7$) square pulses. Hyperpolarizing square pulses were applied in order to evaluate input resistance of pyramidal neurons, which was not affected by β AP₂₅₋₃₅. Depolarizing square pulses were applied to induce trains of action potentials and to evaluate both action potential frequency and frequency adaptation during the pulse. None of these parameters were affected by β AP₂₅₋₃₅. On the right a quantification of these two parameters is presented. The values are indicated as the mean $\pm$ SEM.

dependent manner, such membrane potential subthreshold oscillations. Quantification of the effect showed that βAP_{25-35} 0.5 μM reduced to $61.9 \pm 20.2\%$ of control the power of the subthreshold oscillations, without affecting their peak frequency (3.4 ± 0.1 Hz; $n = 14$). Increasing βAP_{25-35} concentration to 1 μM produced even further reduction in the power of the subthreshold oscillations to $45.6 \pm 7.3\%$ of control and indeed produced a significant decrease in the peak frequency to 2.9 ± 0.1 Hz ($n = 14$). In response to square-pulses of depolarizing current, pyramidal neurons responded with a train of action potentials on which we were able to quantify both action potential frequency and frequency adaptation before and after βAP_{25-35} 1 μM application (Fig. 4B). As shown in Figure 4B, βAP_{25-35} did not significantly affect neither the action potential frequency nor the adaptation index of evoked trains of action potentials ($n = 10$). From the voltage response to hyperpolarizing square pulses, we calculated membrane input resistance (R_i) of some pyramidal neurons, before and after βAP_{25-35} 1 μM application (Fig. 4B). Under control conditions, R_i was 118 ± 20.2 M Ω ($n = 7$) and did not significantly change upon βAP_{25-35} application (111.11 ± 19.08 M Ω ; $n = 7$). Membrane potential did not change either after βAP_{25-35} 1 μM application (-69 ± 7.3 mV in control and -66 ± 9.6 in the presence of βAP_{25-35} ; Fig. 4B; $n = 7$).

As mentioned earlier, we also tested the effect of βAP_{25-35} on individual spontaneous neuronal activity in the hippocampus measured as action potential-dependent calcium transients (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008). As reported before, it is possible to differentiate between glial and neuronal calcium transients (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005). Glial calcium transients are characterized by longer rise time and decay time as well as longer duration compared with neuronal calcium transients (Fig. 5A upper traces; Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008). As corroboration, we performed cell-attached recordings of putative pyramidal neurons and observed their electrical activity simultaneously to the calcium signal. We observed that, as reported before (Ikegaya et al., 2004, 2005; Kerr et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008), the epifluorescence signal recorded with this technique allows for accurate identification of calcium transients evoked for at least two action potentials but not for a single action potential (Fig. 5A). We also confirmed that the kinetics of the calcium transients recorded from neurons could be clearly differentiated from those observed in glial cells (Fig. 5A). Based on these results, we decided to restrict our analysis to neuronal-like activity. In control conditions, when spontaneous neuronal activity was recorded, there was a small population of hippocampal neurons that showed calcium transients (20.9 ± 4.5 neurons; Fig. 5B, raster plots; $n = 8$). By recording their spontaneous activity over 3 min, we observed that those neurons showed in average 3.8 ± 1.0 calcium transients (events/neuron; Fig. 5C, right graph; $n = 8$) during this period of time. We were not able to find neither synchronic nor correlated cellular activity in our basal conditions (data not shown). As expected, βAP_{25-35} reduced hippocampal spontaneous neuronal activity measured

with fluorescence imaging (Fig. 5B, raster plots). After bath application of βAP_{25-35} 1 μM , there was a progressive decrease in the number of active neurons (8.6 ± 1.8 neurons at 10 min; 5.7 ± 1.0 neurons at 20 min and 3.6 ± 0.9 neurons at 30 min; Fig. 5C, left graph; $n = 8$), although the number of calcium transients of the residual neurons remained unchanged (2.2 ± 0.2 events/neuron at 10 min; 2.8 ± 0.4 events/neuron at 20 min and 3.3 ± 0.6 events/neuron at 30 min; Fig. 5C, right graph; $n = 8$). Blocking calcium channels with Cd^{2+} 200 μM completely abolished all calcium transients in our hippocampal slices (data not shown; $n = 8$).

Since the experiments showed in Figure 1 suggested that βAP_{25-35} occluded the effect of Cd^{2+} , suggesting that βAP_{25-35} might be affecting synaptic transmission, we decided to directly explore this possibility. We then performed two types of experiments, on the first one, we recorded population spikes in the CA1 pyramidal layer evoked by Schaffer collateral fiber stimulation (Peña et al., 2002), and on the second one, we recorded spontaneous postsynaptic potentials (sPSP) in CA1 pyramidal neurons. In both cases, we tested the effects of βAP_{25-35} 1 μM . As shown in Figure 6A, βAP_{25-35} 1 μM significantly reduced the amplitude of the evoked population spike (S1) to $64.38 \pm 9.43\%$ of control ($n = 7$), upon washout the population spike recovered to $121.25 \pm 10.19\%$ of control ($n = 7$), which indeed was significantly higher than the amplitude recorded under control conditions (Fig. 6A). βAP_{25-35} 1 μM also inhibited sPSP, as shown in Figure 6B, in the presence of βAP_{25-35} 1 μM a significant reduction in both sPSP amplitude (to $76.24 \pm 6.86\%$ of control; $n = 5$) and sPSP frequency (to $60.64 \pm 18.01\%$ of control; $n = 5$) was observed. Unfortunately, we were not able to maintain long-term patch recordings to test whether or not the effects of βAP_{25-35} 1 μM on sPSP might be reversed upon washout.

Finally, to test the role of Fyn-kinase in the βAP_{25-35} -induced hippocampal dysfunction, we performed extracellular population recordings of the CA1 region in hippocampal slices obtained from two control strains of control mice and in Fyn-knockout mice. As shown in Figure 7, both Swiss Webster (left traces) and 129S1/SvImJ wild type (middle traces) mice showed spontaneous population activity sensitive to βAP_{25-35} . Such spontaneous population activity, recorded under control conditions, showed peak frequencies of 7.0 ± 0.6 Hz ($n = 12$) and 7.8 ± 0.6 Hz ($n = 6$), respectively. In contrast, spontaneous population activity in slices obtained from 129S1/SvImJ Fyn-Knockout mice (right traces), which had a peak frequency of 8.2 ± 0.8 Hz ($n = 8$), were not affected by βAP_{25-35} 1 μM . All these effects can be observed directly from the traces in Figure 7A but also in the power spectrum graphs as well as in the bTFR (Fig. 7A). In slices obtained from Swiss Webster mice, population activity power was reduced to $41.8 \pm 12.3\%$ of control 30 min after βAP_{25-35} 1 μM application and to $51.4 \pm 12.2\%$ of control 60 min after βAP_{25-35} 1 μM (Fig. 7B; $n = 12$). In both cases, peak frequency remained unchanged (of 7.2 ± 0.4 Hz and 8.3 ± 0.1 Hz, respectively; $n = 12$). In slices obtained from 129S1/SvImJ wild type mice, population activity power was reduced to $55.6 \pm 7.2\%$ of control 30 min

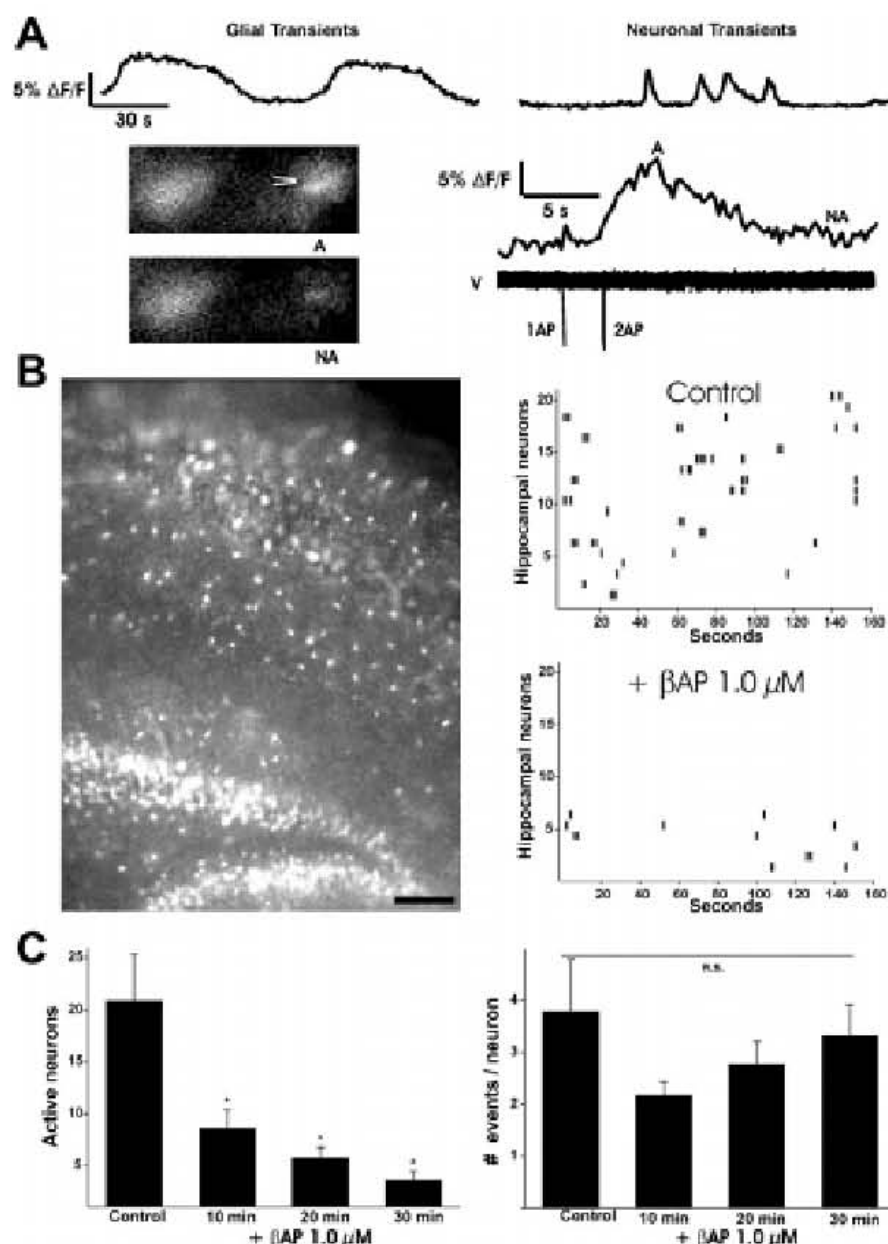


FIGURE 5. βAP_{25-35} affects hippocampal neuronal-like spontaneous activity. **A.** The upper traces are representative calcium signals obtained from glial (left trace) and neuronal (right trace) cells. Note that calcium transients in glial cells are characterized by longer rise-time and decay time as well as longer duration compared to calcium transients in neurons. The micrographs on the lower left show two cells, loaded with the calcium indicator Fluo-4, at the time on which one is active (A, upper micrograph) and when the same neuron is nonactive (NA; lower micrograph). The calcium signal ($\Delta F/F$) of the active neuron, simultaneously recorded in cell-attached, is shown on the right (the recording pipette is indicated by an arrow head on the micrograph). Note that when the neuron fires more than one action potential a distinguishable calcium signal is observed. The exact time corresponding to the micrographs on the left are indicated as A and NA on the calcium trace. **(B)** The micrograph shows an hippocampal slice

loaded with the same calcium indicator (scale represents 50 μm). On the right two raster plots show the calcium transients recorded from active neurons, obtained from the represented slice, either in control conditions (upper raster) or in the presence of βAP_{25-35} 1 μM (lower raster). Note that the density of calcium transients is dramatically reduced in the presence of βAP_{25-35} 1 μM . **(C)** Quantification of the effects of βAP_{25-35} 1 μM both on the number of active neurons and on the mean number of calcium transients per neuron. Note that βAP_{25-35} 1 μM reduces, in a time-dependent manner, the number of hippocampal active neurons (left graph; $n = 8$) and that there is a subset of βAP_{25-35} -resistant hippocampal neurons that not only remain active in the presence of the peptide but maintain the frequency of calcium transients (right graph; $n = 8$). The values are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control. (n.s.) denotes no statistically significant difference.

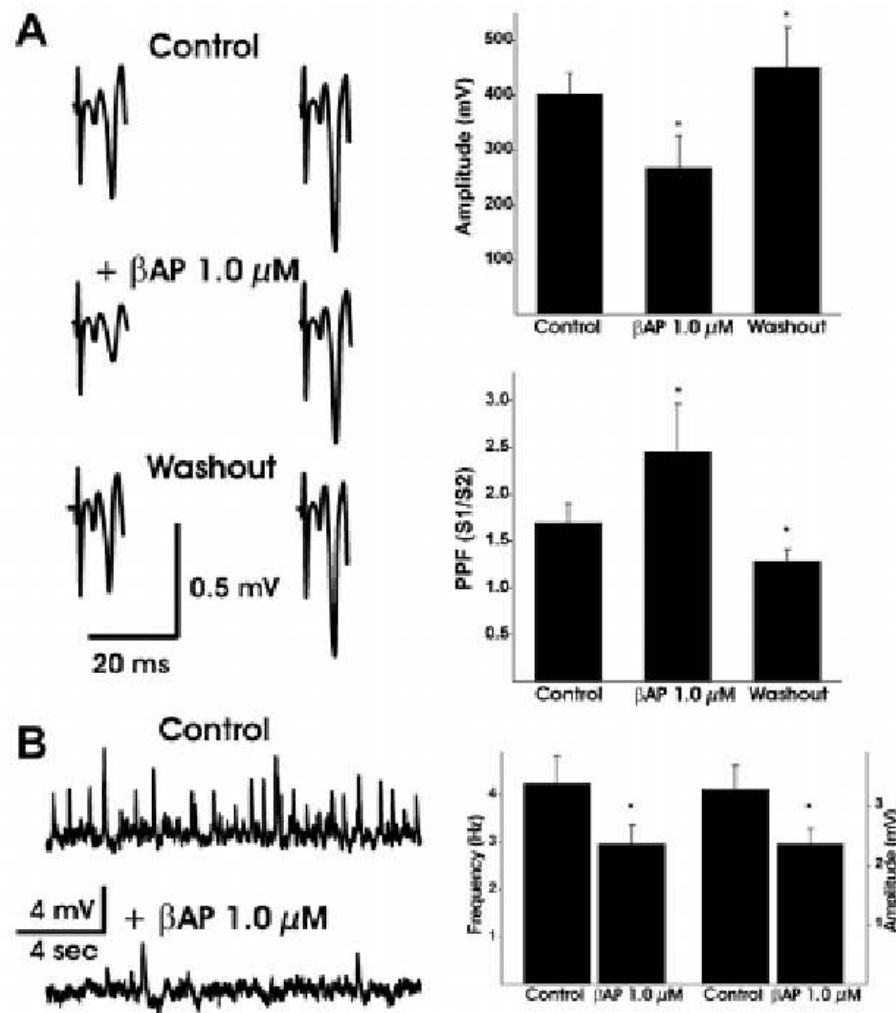


FIGURE 6. β AP_{25–35} affects both evoked and spontaneous synaptic transmission. (A) The upper left traces are representative evoked responses S1 and S2 in control conditions, the middle left traces correspond to the evoked responses in same slice after β AP_{25–35} 1 μ M application and the lower left traces correspond to the evoked responses after washout. Calibration applies for all recordings. Note that β AP_{25–35} reduces evoked synaptic transmission ($n = 7$). The graphs on the right show the quantification of the S1 amplitude (upper graph) and the paired pulse facilitation (PPF) of the described experiments. Note that the reversible reduction

in S1 response produced by β AP_{25–35} is associated with an increase in PPF. (B) The upper left trace shows spontaneous post-synaptic potentials (sPSP) in control conditions and after application of β AP_{25–35} 1 μ M (lower trace). Calibration applies for all recordings. Note that β AP_{25–35} reduces sPSP ($n = 5$). The graph on the right shows the quantification of sPSP frequency (left bars) and sPSP amplitude (right bars). Note that β AP_{25–35} reduces both sPSP frequency and amplitude. The values are indicated as the mean $\pm$ SEM; (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control.

after β AP_{25–35} 1 μ M application and to $41.03 \pm 10.6\%$ of control 60 min after β AP_{25–35} 1 μ M (Fig. 7B; $n = 6$). In both cases, peak frequency remained unchanged (of 7.4 ± 0.5 Hz and 7.5 ± 0.7 Hz, respectively; $n = 6$). In slices obtained from 129S1/SvImJ Fyn-knockout mice, β AP_{25–35} 1 μ M did not affect population activity neither 30 min after β AP_{25–35} 1 μ M application ($114.2 \pm 46.0\%$ of control; $n = 9$) nor 60 min after β AP_{25–35} 1 μ M ($103.2 \pm 29.7\%$ of control; Fig. 7B; $n = 9$). Accordingly, in both cases peak frequency remained

unchanged (of 7.4 ± 0.5 Hz and 7.5 ± 0.7 Hz, respectively; $n = 9$).

DISCUSSION

Our results demonstrate, for the first time, that acute β AP_{25–35} administration disrupts hippocampal network activity

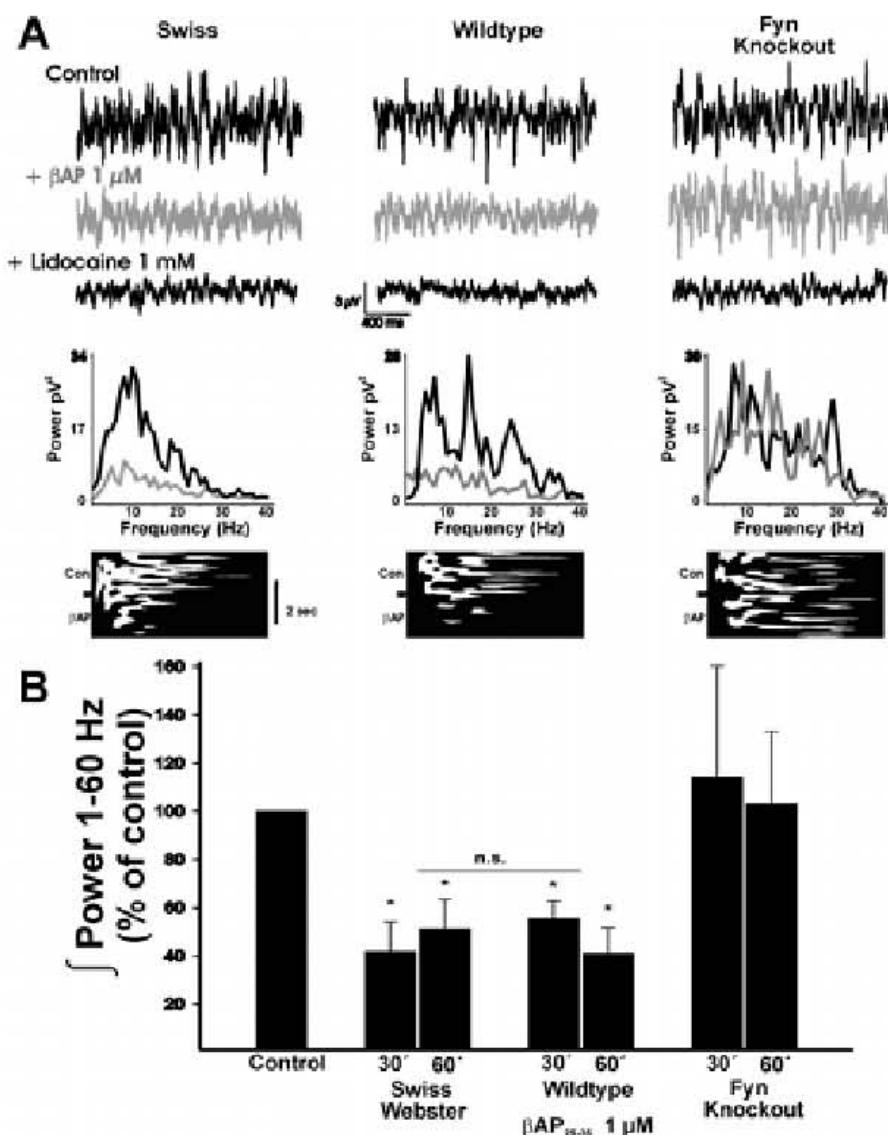


FIGURE 7. β AP₂₅₋₃₅-induced inhibition of the hippocampal spontaneous population activity is not observed in slices obtained from Fyn knockout mice. (A) Upper traces are representative recordings of spontaneous population activity recorded from CA1 in slices obtained from three different types of mice, as indicated. The upper recordings were obtained in control conditions, the middle traces (in gray) were obtained in the presence of β AP₂₅₋₃₅ 1 μ M, and the lower traces were obtained in the presence of lidocaine 1 mM. Calibration applies for all recordings. Note that β AP₂₅₋₃₅ 1 μ M affects spontaneous population activity in slices obtained from both the Swiss Webster and the wild type mice but not in slices obtained from Fyn knockout mice. Graphs in the middle are the power spectra obtained from the representative recordings. Control power spectrum is shown in black and the power spectrum of the population activity in the presence of

β AP₂₅₋₃₅ is shown in gray. Lower graphs are compiled bTFR of the representative recordings including just those of control and in the presence of β AP₂₅₋₃₅. The frequency axis has the same scale as the frequency axis of the associated power spectrum. (B) Quantification of the experiments regarding the effect of β AP₂₅₋₃₅ on the slices obtained from the three types of mice is shown. The integrated power obtained from 1 to 60 Hz was normalized to the control power spectrum (100%) of each slice and reported as % of control. Note that β AP₂₅₋₃₅ reduces the power of spontaneous population activity in slices obtained from both the Swiss Webster ($n = 12$) and the wild type ($n = 6$) mice but not in slices obtained from Fyn knockout mice ($n = 9$). The values of the integrated power are indicated as the mean $\pm$ SEM. (*) denotes a significant difference ($P < 0.05$) relative to control. (n.s.) denotes no statistically significant difference.

at cellular and network levels and that Fyn-kinase seems to be involved in such effect. At the cellular level, β AP₂₅₋₃₅ affects spontaneous synaptic activity, subthreshold oscillations produced

by pyramidal neurons, and spontaneous activity reflected as calcium transients of individual neurons. Such reduction in neuronal activity correlates with a disruption in population activity

both in vitro and in vivo, as well as with a reduction in synaptic transmission. Interestingly, the disruption in population activity was not observed in hippocampal slices obtained from Fyn-Knockout mice. Overall, our data suggest that β AP acutely disrupts normal hippocampal network function and that this dysfunction might be related to the cognitive decline observed in Alzheimer Disease (AD).

It is important to mention that the effects described here might be related to the cognitive dysfunction observed in AD patients, at the early stages, and does not seem related to neuronal death. This assertion is based on the fact that β AP-induced effects were reversible (Figs. 2 and 6). Moreover, it is important to point out that washout of β AP produced a rebound in population activity, which by itself is an interesting finding that might help to explain the hyperexcitability observed in transgenic AD animals (Palop et al., 2007; Busche et al., 2008) or the increased susceptibility to epilepsy in AD patients (Risse et al., 1990; Menéndez, 2005; Hommet et al., 2007), and AD mice models (Del Vecchio et al., 2004; Westmark et al., 2008).

Spontaneous oscillations are a network mechanism closely associated to cognition (Buzsáki, 1989, 2002; Kahana et al., 1999, 2001; Buzsáki and Draguhn, 2004). In particular, hippocampal oscillations seem to be essential for several cognitive processes such as learning and memory (Buzsáki, 1989, 2002; Kahana et al., 1999, 2001; Buzsáki and Draguhn, 2004). As mentioned earlier, network oscillations provide with an operational background that allows hippocampal neuronal ensembles the proper representation, processing, storage, and recall of information (Traub et al., 1999; Engel et al., 2001; Harris et al., 2003; Buzsáki and Draguhn, 2004). The tight relation between oscillations and memory is reinforced by the finding of drugs that increase or reduce memory processing simultaneously increase or reduce network oscillations (Leung and Desborough, 1988; Kinney et al., 1999).

In contrast to previous reports showing that chronic exposure to β AP affected network oscillations both in vivo and in vitro (Sun and Alkon, 2002; Wang et al., 2002; Driver et al., 2007), here we report that β AP acutely affects hippocampal functionality from single cells to neuronal networks in vitro and in vivo. Our experiments, along with those of others (Sun and Alkon, 2002; Wang et al., 2002; Driver et al., 2007) provide with a neuronal network explanation for both the EEG alterations observed in patients with AD and the cognitive deficits closely associated with such EEG dysfunctions (Hughes et al., 1989; Schreier-Gasser et al., 1994; Ihl et al., 1996; Nobili et al., 1999; Kowalski et al., 2001).

Based on our experimental observations, several cellular mechanisms could be suggested to explain the hippocampal network disruption induced by β AP. For instance, our population experiments suggest that β AP affects synaptic transmission. Our unicellular recordings, using patch clamp, suggest that β AP might be affecting the ion currents associated with the generation of subthreshold oscillations. Finally, our unicellular recordings, using fluorescence imaging, suggest that there are, at least, two subsets of hippocampal neurons according to their

sensitivity to β AP, some of them affected by the peptide, whereas a small subset of hippocampal neurons appear to be resistant to β AP.

Regarding the possibility that β AP might be affecting synaptic transmission, we found that β AP 1 μ M occludes the effect of Cd^{2+} 200 μ M at the population level. It is well-known that Cd^{2+} 200 μ M blocks voltage-dependent calcium channels and therefore synaptic transmission in several preparations (Peña and Ramirez, 2004; Peña et al., 2004). Previous observations, obtained from AD transgenic mice, have shown alterations in synaptic transmission produced by soluble β AP (for a review see Peña et al., 2006). For instance, Hsia et al. (1999) showed a 40% reduction of basal synaptic transmission in hippocampal slices obtained from PDAPP transgenic mice. In the same report, a second mouse line with the Swedish mutation also showed decreased synaptic transmission (Hsia et al., 1999). Basal synaptic dysfunction has also been reported in the hippocampus of APP23 transgenic mice (Röder et al., 2003) and the APP695-SWE transgenic mice (Fitzjohn et al., 2001). Finally, it has been reported that β AP, injected intracerebroventricularly, produces a reduction in basal synaptic transmission in vivo (Cullen et al., 1996; Stephan et al., 2001), this finding has been recently corroborated in vitro (Nimmrich et al., 2008). Although it is important to mention that there is another set of reports, obtained from transgenic mice as well as from β AP application in vivo and in vitro, showing that β AP does not affect neither basal synaptic transmission nor paired pulse facilitation (Cullen et al., 1997; Giacchino et al., 2000; Sun and Alkon, 2002; Wang et al., 2002). Despite this controversy, we have found that, in our experimental conditions, β AP₂₅₋₃₅ reduces both evoked synaptic transmission, which was associated with an increase in paired pulse facilitation (Fig. 6A) and also decreases both amplitude and frequency of spontaneous synaptic potentials (Fig. 6B). The increase in paired pulse facilitation, associated with the reduction in frequency of spontaneous synaptic potentials strongly suggests that β AP₂₅₋₃₅-induced reduction in synaptic transmission is associated with a presynaptic effect (Peña et al., 2002), whereas the β AP₂₅₋₃₅-induced reduction in the amplitude of spontaneous synaptic potentials suggests that β AP₂₅₋₃₅-induced reduction in synaptic transmission also involves effects at the postsynapsis. However, putative β AP₂₅₋₃₅-induced postsynaptic effects are not reflected as a change in pyramidal neuron input resistance (see the results section).

We have shown that β AP inhibits subthreshold oscillations in CA1 pyramidal neurons and based on this finding, we suggest that β AP could be affecting one or several of the ionic currents involved in such intrinsic mechanism. It is well-known that several neurons in the CNS exhibit subthreshold oscillations and such oscillations play a role in controlling spike timing and network activity (Klink and Alonso, 1993; Leung and Yu, 1998; Hu et al., 2002; Hsiao et al., 2007). Although the specific mixture of ionic currents responsible for subthreshold membrane potential oscillations may vary in different neuronal populations (Klink and Alonso, 1993; Leung and Yu, 1998; Hu et al., 2002), there is evidence that key players in the generation of subthreshold oscillations are inward currents such as

the persistent Na^+ current (Klink and Alonso, 1993; Hu et al., 2002; Hsiao et al., 2007), and the I_h (White et al., 1995; Hu et al., 2002), as well as several K^+ outward currents such as leak currents (Klink and Alonso, 1993), the I_M (Hu et al., 2002; Yoshida and Alonso, 2007) and the I_A (Hsiao et al., 2007). No effect of β AP on the persistent sodium current, leak current, I_h or I_M has been reported so far (Peña et al., 2006), however, several reports have suggested that β AP may modulate I_A . Whereas some reports indicate that β AP promotes I_A (Yu et al., 1998; Ramsden et al., 2001; Angulo et al., 2004), other reports indicate that β AP inhibits such current (Jhamandas et al., 2001; Ye et al., 2003). It is still necessary to determine the effect of β AP on all the currents involved in the generation of subthreshold oscillations and if such effect contributes to network dysfunction. It is important to take into account that the possible effects of β AP on these currents does not seem to affect other intrinsic properties at the suprathreshold level, such as action potential firing or action potential frequency adaptation (Fig. 4B) or not even changes in resting membrane potential (see the results section).

From our calcium imaging experiments, we found that despite the fact that β AP produces a dramatic reduction in the number of active neurons in the hippocampus, there is a subset of hippocampal neurons that not only maintain their spontaneous activity but also maintain their frequency of calcium transients intact in the presence of β AP. It is well-known that some regions of the brain are more susceptible to β AP toxicity than others (Braak and Braak, 1997). Even more, there seems to be differences in the sensitivity of neurons within one specific circuit. For instance the entorhinal cortex (EC), the CA1 field, and the subicular region are all heavily affected in the early stages of AD (Hyman et al., 1984; Van Hoesen and Hyman, 1990), whereas CA2 and CA3 fields are relatively spared (Hyman et al., 1984). The simplest explanation for such differences is that neurons with different sensitivities to β AP may express different amounts of the putative β AP receptors or binding sites (Romito-DiGiacomo et al., 2007). Another possible explanation for this variability is that there are regional intrinsic factors that regulate neuronal susceptibility to toxicity (Romito-DiGiacomo et al., 2007). It has been suggested that one of these factors are differences in the neuronal ability to buffer changes in cytoplasmic calcium (Cecci et al., 2005). Alternatively, Small (2008) proposed that since intracellular calcium levels are controlled by neuronal excitability, which, in turn, is related to the total amount of inputs that a neuron receive, the pathological affection in Alzheimer's disease might be determined by the number and type of synaptic inputs that neurons receive (Small, 2008).

Finally, in this study, we have shown that β AP-induced hippocampal network dysfunction involves Fyn kinase. As previously mentioned, the brain of AD patients shows increased levels of Fyn (Shirazi and Wood, 1993; Ho et al., 2005); and several of the effects of β AP have been associated to Fyn-kinase (Lambert et al., 1998; Kihara et al., 2001; Moore et al., 2002; Chin et al., 2004, 2005; Chin et al., 2005). It is interesting to mention that there are several molecular pathways associ-

ated with Fyn that might represent potential therapeutic targets to prevent the β AP-induced network dysfunction. For instance, β AP interacts with integrins (Sabo et al., 1995; Bi et al., 2002; Grace et al., 2002), and recently, it has been shown that antibodies against integrins prevent the effect of β AP on LTP (Rowan et al., 2007). Fyn has also been associated to other receptors that bind β AP and produce deleterious effect on the nervous system such as nicotinic receptors (Dineley et al., 2001; Kihara et al., 2001) as well as the p75 neurotrophin receptor (Yaar et al., 1997). Finally, potential phosphorylation targets of Fyn are both GSK3 and cdk5, which seem to play a key role in TAU phosphorylation and network dysfunction associated to β AP. Inhibitors of both kinases have been shown to prevent several alterations induced by β AP (for reviews see Tsai et al., 2004; Smith et al., 2006; Hooper et al., 2008). All these findings suggest that it is possible to prevent the deleterious effects of β AP by interfering with the intracellular pathways activated by this peptide and therefore, it is necessary to carefully dissect such β AP-activated pathways to identify potential therapeutic targets.

Acknowledgments

The authors like to thank Claudia González-Espinosa for providing them with the transgenic mice. Bertha González-Pedrajo, Julio Morán and Valentin Mendoza for providing them with materials and their expertise regarding the silver staining. Lourdes Palma for the electronic microscopy as well as Juan Javier López-Guerrero, José Rodolfo Fernandez, and Arturo Franco for technical assistance.

REFERENCES

- Abramowski D, Wiederhold KH, Furrer U, Jaton AL, Neuenschwander A, Runser MJ, Danner S, Reichwald J, Ammaturo D, Straub D, Stoeckli M, Rueeger H, Neumann U, Staufenbiel M. 2008. Dynamics of A β turnover and deposition in different beta-amyloid precursor protein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 327:411–424.
- Angulo E, Noc V, Casado V, Mallol J, Gomez-Isla T, Luis C, Ferrer I, Ciudad CJ, Franco R. 2004. Up-regulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 91:547–557.
- Bi X, Gall CM, Zhou J, Lynch G. 2002. Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1–42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112:827–840.
- Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL, Martins RN. 2008. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: Implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* (in press).
- Bayer TA, Schiffer S, Simons A, Kemmling A, Karner T, Tepest R, Eckert A, Schüssel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G. 2003. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid A β production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14187–14192.

- Braak H, Braak E. 1997. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Int Psychogeriatr* 1:257-261.
- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321:1686-1689.
- Buzsaki G. 1989. Two-stage model of memory trace formation: A role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31:551-570.
- Buzsaki G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.
- Buzsaki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.
- Cacucci F, Yi M, Wills TJ, Chapman P, O'Keefe J. 2008. Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576 Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7863-7868.
- Carmona-Aparicio L, Peña F, Borsoodi A, Rocha L. 2007. Effects of nociceptin on the spread and seizure activity in the rat amygdala kindling model: Their correlations with 3H-leucyl-nociceptin binding. *Epilepsy Res* 77:75-84.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galaraga E, Drucker-Colin R, Vargas J. 2008. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435-1450.
- Cecchi C, Baglioni S, Fiorillo C, Pensalfini A, Liguri G, Nozi D, Rigacci S, Bucciantini M, Stefani M. 2005. Insights into the molecular basis of the differing susceptibility of varying cell types to the toxicity of amyloid aggregates. *J Cell Sci* 118:3459-3470.
- Chin J, Palop JJ, Yu G-Q, Kojima N, Masliah E, Mucke L. 2004. Fyn kinase modulates synaptotoxicity but not aberrant sprouting in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 24:4692-4697.
- Chin J, Palop JJ, Puolivalli J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, Scease-Levie K, Masliah E, Mucke L. 2005. Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:9694-9703.
- Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. 1996. Beta-amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *NeuroReport* 8:87-92.
- Del Vecchio RA, Gold LH, Novick SJ, Wong G, Hyde LA. 2004. Increased seizure threshold and severity in young transgenic CRND8 mice. *Neurosci Lett* 367:164-167.
- Delobrette S, Privat A, Maurice T. 1997. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 319:1-4.
- Dewachter I, Van Dorpe J, Smeijers L, Gills M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van Leuven F. 2000. Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APPV7171 transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20:6452-6458.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. 2001. β -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125-4133.
- Driver JE, Racca C, Cunningham MO, Towers SK, Davies CH, Whittington MA, LeBeau FE. 2007. Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations in vitro in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP). *Eur J Neurosci* 26:1280-1288.
- Engel AK, Fries P, Singer W. 2001. Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci* 2:704-716.
- Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, Smith D, Reynolds DS, Davies CH, Collingridge GL, Seabrook GR. 2001. Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APT695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 21:4691-4698.
- Fonte J, Miklosy J, Atwood C, Martins R. 2001. The severity of cortical Alzheimer's type changes is positively correlated with increased amyloid-beta levels: Resolubilization of amyloid-beta with transition metal ion chelators. *J Alzheimers Dis* 3:209-219.
- Freir DB, Herron CE. 2003. Nicotine enhances the depressive actions of A beta 1-40 on long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region in vivo. *J Neurophysiol* 89:2917-2922.
- Freir DB, Costello DA, Herron CE. 2003. A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil. *J Neurophysiol* 89:3061-3069.
- Gengler S, Gault VA, Harriott P, Hölscher C. 2007. Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid (25-35) are dependent on stimulation-protocol and genetic background. *Exp Brain Res* 179:621-630.
- Giachino J, Criado JR, Games D, Henriksen S. 2000. In vivo synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* 876:185-190.
- Glennier GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Grace EA, Rabiner CA, Busciglio J. 2002. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid β : Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 114:265-273.
- Gregory GC, Halliday GM. 2005. What is the dominant A beta species in human brain tissue? A review. *Neurotox Res* 7:29-41.
- Gruden MA, Davidova TB, Malisaukas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. 2004. Autoimmune responses to amyloid structures of A beta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:165-171.
- Gruden MA, Davidova TB, Malisaukas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Wilhelm K, Elistratova EI, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. 2007. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to A beta(25-35) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J Neuroimmunol* 186:181-192.
- Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, Dragoi G, Buzsaki G. 2003. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424:552-556.
- Ho GJ, Hashimoto M, Adame A, Izu M, Alford ME, Thal LJ, Hansen LA, Masliah E. 2005. Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: Implications for its functional role. *Neurobiol Aging* 26:625-635.
- Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallor HA. 2007. Soluble beta-amyloid(25-35) reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur J Pharmacol* 561:85-90.
- Hommet C, Hureauux R, Barré J, Constans T, Berrut G. 2007. Epileptic seizures in clinically diagnosed Alzheimer's disease: Report from a geriatric medicine population. *Aging Clin Exp Res* 19:430-431.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S. 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 106:1433-1439.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3228-3233.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. 1996. Correlative memory deficits, A beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hsiao CF, Gougat K, Asai J, Chandler SH. 2007. Intrinsic membrane properties and morphological characteristics of interneurons in the rat supratrigeminal region. *J Neurosci Res* 85:3673-3686.
- Hu H, Vervaeke K, Storm JF. 2002. Two forms of electrical resonance at theta frequencies generated by M-current h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 545:783-805.

- Hughes JR, Shanmugham S, Wetzel LC, Bellur S, Hughes CA. 1989. The relationship between EEG changes and cognitive functions in dementia: A study in a VA population. *Clin Electroencephalogr* 20:77-85.
- Ihl R, Dierks T, Martin EM, Frolich L, Maurer K. 1996. Topography of the maximum of the amplitude of EEG frequency bands in dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 39:319-325.
- Ikegaya Y, Aaron G, Csicsvari R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. 2004. Synfire chains and cortical songs: Temporal modules of cortical activity. *Science* 304:559-564.
- Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R. 2005. Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52:132-138.
- Ikonomic MD, Klunk WF, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Ziolkowski S, Bi W, Paljug WR, Debnath ML, Hope CE, Isanski BA, Hamilton RL, DeKosky ST. 2008. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* 131:1630-1645.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR. 2007. Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 282:22707-22720.
- Jhamandas JH, Cho C, Jassar B, Harris K, MacTavish D, Easaw J. 2001. Cellular mechanisms for amyloid β -protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J Neurophysiol* 86:1312-1320.
- Jolas T, Zhang XS, Zhang Q, Wong G, Del Vecchio R, Gold L, Priestley T. 2002. Long-term potentiation is increased in the CA1 area of the hippocampus of APP(swe/ind) CRND8 mice. *Neurobiol Dis* 11:394-409.
- Kahana MJ, Sekuler R, Caplan JB, Kirschen M, Madsen JR. 1999. Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. *Nature* 399:781-784.
- Kahana MJ, Seelig D, Madsen JR. 2001. Theta returns. *Curr Opin Neurobiol* 11:739-744.
- Kaneko I, Morimoto K, Kubo T. 2001. Drastic neuronal loss in vivo by beta-amyloid racemized at Ser(26) residue: Conversion of non-toxic [D-Ser(26)]beta-amyloid 1-40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience* 104:1003-1011.
- Kerr JN, Greenberg D, Helmchen F. 2005. Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14063-14068.
- Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A. 2001. Alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* 276:13541-13546.
- Kinney GG, Patino P, Mermet-Bouvier Y, Starrett JE Jr, Gribkoff VK. 1999. Cognition-enhancing drugs increase stimulated hippocampal theta rhythm amplitude in the urethane-anesthetized rat. *J Pharmacol Exp Ther* 291:99-106.
- Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, Walmod PS, Dmytriyeva O, Pakkenberg B, Berezin V, Bock E. 2007. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35. *Neuroscience* 145:209-224.
- Klink R, Alonso A. 1993. Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 70:144-157.
- Klunk WE, Lopresti BJ, Ikonomic MD, Lefterov IM, Koldamova RP, Abrahamson EE, Debnath ML, Holt DF, Huang GF, Shao L, DeKosky ST, Price JC, Mathis CA. 2005. Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci* 25:10598-10606.
- Koudinov AR, Berezov TT. 2004. Alzheimer's amyloid-beta (A beta) is an essential synaptic protein not neurotoxic junk. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 64:71-79.
- Kowalski JW, Gawel M, Pfeffer A, Barcikowska M. 2001. The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: Correlation with the severity of mental impairment. *J Clin Neurophysiol* 18:570-575.
- Kubo T, Nishimura S, Kumagai Y, Kaneko I. 2002. In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res* 70:474-483.
- Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ, Roher AE. 1996. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271:4077-4081.
- Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain Abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252:711-715.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 1998. Diffusible nonfibrillar ligands derived from A β_{1-42} are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448-6453.
- Lee JY, Friedman JE, Angel I, Kozak A, Koh JY. 2004. The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 25:1315-1321.
- Lemere CA, Maron R, Selkoe DJ, Weiner HL. 2001. Nasal vaccination with beta-amyloid peptide for the treatment of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol* 20:705-711.
- Lemus-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla E, Galanaga E, Carrillo-Reid L. 2006. Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Rev Mex Ing Biomed* 27:82-92.
- Leung LS, Yu HW. 1998. Theta-frequency resonance in hippocampal CA1 neurons in vitro demonstrated by sinusoidal current injection. *J Neurophysiol* 79:1592-1596.
- Leung LW, Desborough KA. 1988. APV an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist blocks the hippocampal theta rhythm in behaving rats. *Brain Res* 463:148-152.
- Levites Y, Smithson LA, Price RW, Dakin RS, Yuan B, Sierks MR, Kim J, McGowan E, Reed DK, Rosenberry TL, Das P, Golde TE. 2006. Insights into the mechanisms of action of anti-Abeta antibodies in Alzheimer's disease mouse models. *FASEB J* 20:2576-2578.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irfary MC, Hyman BT. 2007. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1161:116-123.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. 1992. Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376-389.
- Maurice T, Lockhart BP, Privat A. 1996. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706:181-193.
- Menéndez M. 2005. Down syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Dev* 27:246-252.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW. 2002. A CD36-initiated signaling cascade mediates

- inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem* 277:47373–47379.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: Synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050–4058.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283:1571–1577.
- Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruhl C. 2008. Amyloid beta oligomers (A beta(1–42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci* 28:788–797.
- Nobili F, Copello F, Vitali P, Prastaro T, Carozzo S, Perego G, Rodriguez G. 1999. Timing of disease progression by quantitative EEG in Alzheimer's patients. *J Clin Neurophysiol* 16:566–573.
- Nowotny P, Kwon JM, Chakraverty S, Nowotny V, Morris JC, Goate AM. 2001. Association studies using novel polymorphisms in BACE1 and BACE2. *NeuroReport* 12:1799–1802.
- Otsu N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 9:62–66.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. 2007. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697–711.
- Parent A, Linden DJ, Sisodia SS, Borchelt DR. 1999. Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1. *Neurobiol Dis* 6:56–62.
- Patterson RL, Kalback WM, Esh CL, Koljohn TA, Van Veldre GD, Luehrs DC, Kuo YM, Lopez J, Brune D, Ferrer I, Masliah E, Newell AJ, Beach TG, Castano EM, Roher AE. 2006. Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: A biochemical analysis. *Am J Pathol* 169:1048–1063.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. San Diego, CA: Academic Press.
- Péña F, Alavez-Pérez N. 2006. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47:47–54.
- Péña F, Ramírez JM. 2002. Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci* 22:11055–11064.
- Péña F, Ramírez JM. 2004. Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J Neurosci* 24:7549–7556.
- Péña F, Tapia R. 1999. Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *J Neurochem* 72:2006–2014.
- Péña F, Tapia R. 2000. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: Role of glutamate and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101:547–561.
- Péña F, Vargas J, Tapia R. 2002. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology* 42:807–812.
- Péña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramírez JM. 2004. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43:105–117.
- Péña F, Gutiérrez-Lerma AI, Quiroz-Baez R, Arias C. 2006. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: Implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* 4:149–163.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: Contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64:253–265.
- Praticò D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM. 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16:1138–1140.
- Ramsden M, Plant LD, Webster NJ, Vaughan PF, Henderson Z, Pearson HA. 2001. Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid b-protein (1–40) on K⁺ channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurons. *J Neurochem* 79:699–712.
- Risse SC, Lampe TH, Bird TD, Nochlin D, Sumi SM, Keenan T, Cumberley L, Peskind E, Raskind MA. 1990. Myoclonus, seizures, and paratonia in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 4:217–225.
- Röder S, Danosier L, Pozza MF, Lingenhöhl K, Wiederhold KH, Olpe HR. 2003. Electrophysiological studies on the hippocampus and prefrontal cortex assessing the effects of amyloidosis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *Neuroscience* 120:705–720.
- Romcy-Pereira RN, de Araujo DB, Leite JP, Garcia-Cairasco N. 2008. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: A wavelet-based time frequency and coherence analysis. *J Neurosci Methods* 167:384–392.
- Romito-DiGiacomo RR, Menegay H, Cicero SA, Hernup K. 2007. Effects of Alzheimer's disease on different cortical layers: The role of intrinsic differences in Abeta susceptibility. *J Neurosci* 27:8496–8504.
- Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. 2004. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. *Exp Gerontol* 39:1661–1667.
- Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R. 2007. Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem Soc Trans* 35:1219–1223.
- Sabo S, Lambert MP, Kesey K, Wade W, Krafft G, Klein WL. 1995. Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci Lett* 184:25–28.
- Schreiner-Gasser U, Gasser T, Ziegler P. 1994. Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: Correlations with severity clinical characteristics visual EEG, CCT. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 90:267–272.
- Selkoe DJ. 2003. Aging amyloid and Alzheimer's disease: A perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res* 28:1705–1713.
- Shinkai Y, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Shimada H, Yanagisawa K, Ihara Y. 1997. Amyloid beta-protein deposition in the leptomeninges and cerebral cortex. *Ann Neurol* 42:899–908.
- Shirazi SK, Wood JG. 1993. The protein tyrosine kinase fyn in Alzheimer's disease pathology. *NeuroReport* 4:435–437.
- Small DH. 2008. Network dysfunction in Alzheimer's disease: Does synaptic scaling drive disease progression? *Trends Mol Med* 14:103–108.
- Smith WW, Gorospe M, Kusiak JW. 2006. Signaling mechanisms underlying Abeta toxicity: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:355–361.
- Steinerman JR, Izizary M, Scarmeas N, Raju S, Brandt J, Albert M, Blacker D, Hyman B, Stern Y. 2008. Distinct pools of beta-amyloid in Alzheimer disease-affected brain: A clinicopathologic study. *Arch Neurol* 65:906–912.
- Stepanichev MI, Lazareva NA, Onufriev MV, Mitrokhina OS, Moiseeva IuV, Gulyaeva NV. 1997. The effect of the administration of beta-amyloid peptide fragment (25–35) on behavior in rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 47:597–600.
- Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV. 2003. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bull* 61:197–205.

- Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko IL, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV. 2004. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80:647-655.
- Stephan A, Laroche S, Davis S. 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21:5703-5714.
- Sun MK, Alkon DL. 2002. Impairment of hippocampal CA1 hetero-synaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid (25-35). *J Neurophysiol* 87:2441-2449.
- Tohda C, Matsumoto N, Zou K, Meselhy MR, Komatsu K. 2004. Abeta(25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins. *Neuropsychopharmacology* 29:860-868.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Traub RD, Jefferys JG, Whittington MA. 1999. Functionally relevant and functionally disruptive (epileptic) synchronized oscillations in brain slices. *Adv Neurol* 79:709-724.
- Tsai LH, Lee MS, Cruz J. 2004. Cdk5 a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta* 1697:137-142.
- Umemori H, Wanaka A, Kato H, Takeuchi M, Tohyama M, Yamamoto T. 1999. Specific expressions of Fyn and Lyn lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 16:303-310.
- Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. 2001. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1-42) and A beta(25-35). *J Am Chem Soc* 123:5625-5631.
- Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 355:215-222.
- Walsh DM, Klyubin L, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Amyloid-beta oligomers: Their production toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans* 30:552-557.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. 1999. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158:328-337.
- Wang J, Ikonen S, Gurevicius K, van Groen T, Tanila H. 2002. Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene. *Brain Res* 943:181-190.
- Wang Q, Rowan MJ, Anwyl R. 2004a. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24:6049-6056.
- Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R. 2004b. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase/cyclin-dependent kinase 5 and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24:3370-3378.
- Westmark CJ, Westmark PR, Beard AM, Hildebrandt SM, Malter JS. 2008. Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int J Clin Exp Pathol* 1:157-168.
- White JA, Budde T, Kay AR. 1995. A bifurcation analysis of neuronal subthreshold oscillations. *Biophys J* 69:1203-1217.
- Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. 1995. Beta-amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol* 284:R1-R3.
- Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrist BA. 1997. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 100:2333-2340.
- Yagi T, Shigetani Y, Okado N, Tokunaga T, Ikawa Y, Aizawa S. 1993. Regional localization of Fyn in adult brain; studies with mice in which fyn gene was replaced by lacZ. *Oncogene* 8:3343-3351.
- Yagi T, Shigetani Y, Furuta Y, Nada S, Okado N, Tokunaga T, Ikawa Y. 1994. Fyn expression during neurogenesis in mouse embryo. *Oncogene* 9:2433-2440.
- Yamaguchi Y, Kawashima S. 2001. Effects of amyloid-beta(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur J Pharmacol* 412:265-272.
- Yanker BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
- Ye CP, Selkoe DJ, Hartley DM. 2003. Protofibrils of amyloid h-protein inhibit specific K⁺ currents in neocortical cultures. *Neurobiol Dis* 13:177-190.
- Yoshida M, Alonso A. 2007. Cell-type specific modulation of intrinsic firing properties and subthreshold membrane oscillations by the M(Kv7)-current in neurons of the entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 98:2779-2794.
- Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW. 1998. Enhancement of outward potassium current may participate in B-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis* 5:81-88.



Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides

Alvaro Adaya-Villanueva¹, Benito Ordaz¹, Hugo Balleza-Tapia, Abraham Márquez-Ramos, Fernando Peña-Ortega^{*}

Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2009

Received in revised form 5 June 2010

Accepted 6 June 2010

Available online 14 June 2010

Keywords:

Alzheimer's disease

Network activity

Kainate receptors

Amyloid beta protein

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD) patients show alterations in both neuronal network oscillations and the cognitive processes associated to them. Related to this clinical observation, it has been found that amyloid beta protein (A β) differentially affects some hippocampal network activities, reducing theta and gamma oscillations, without affecting sharp waves and ripples. Beta-like oscillations is another cognitive-related network activity that can be evoked in hippocampal slices by several experimental manipulations, including bath application of kainate and increasing extracellular potassium. Here, we tested whether or not different A β peptides differentially affect beta-like oscillatory patterns. We specifically tested the effects of fresh dissolved A β_{25-35} and oligomerized A β_{1-42} and found that kainate-induced oscillatory network activity was affected, in a slightly concentration dependent-manner, by both fresh dissolved (mostly monomeric) A β_{25-35} and oligomeric A β_{1-42} . In contrast, potassium-induced oscillatory activity, which is reduced by oligomeric A β_{1-42} , is not affected by monomeric A β_{25-35} at any of the concentrations tested. Our results support the idea that different amyloid peptides might alter specific cellular mechanisms related to the generation of specific neuronal network activities, instead of a generalized inhibitory effect of A β peptides on neuronal network function.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oscillatory activity, which is a prominent feature of the hippocampal network, has been associated to several cognitive functions [16,38]. Alterations in such network activity have been closely related to the cognitive decline observed in patients with Alzheimer Disease (AD) [19,22,37]. Accordingly, recent reports have shown that animals overexpressing the mutated human amyloid precursor protein (APP), and consequently producing high levels of A β , have a deficit in the induction of gamma oscillations *in vitro* [7] but not in the generation of sharp waves and ripples *in vivo* [15]. Despite some similarities in the network properties involved in the generation of different oscillations, specific mixtures of not yet completely determined intrinsic and synaptic properties participate in the generation of different oscillatory patterns [33,44,48]. As reviewed by several authors, the differences of cellular mechanisms involved in dif-

ferent oscillations include the involvement of different subsets of interneurons as well as differential contributions of recurrent excitation or electric coupling [4,8,14,24,27,43]. Due to the fact that similar oscillatory patterns may rely on slightly different cellular mechanisms, it has been found that those oscillations exhibit different pharmacological sensitivities [4,27]. Therefore, it is possible that different A β species, which affect different intrinsic and synaptic properties [2,17,21,30,34–36,46], may differentially affect distinct network oscillations. Here, we tested this possibility on similar oscillatory activities induced *in vitro* by kainate [8,14] or by slightly increasing the extracellular potassium concentration [24,43]. Our results show that whereas kainate-induced beta-like activity is affected by both A β_{25-35} and A β_{1-42} , potassium-induced beta-like activity is resistant to A β_{25-35} .

2. Materials and methods

We performed the experiments using hippocampal slices obtained from 3- to 4-week-old Wistar rats [29]. The experimental protocols were approved by The Local Committee of Ethics on Animal Experimentation (CICUAL-Cinvestav) and followed the regulations established in the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals ('Norma Oficial Mexicana' NOM-062-

^{*} Corresponding author at: Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Coapa, Calz. de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, 14330 México, D.F., México. Tel.: +52 55 5061 2852; fax: +52 55 5061 2863.

E-mail addresses: jfpena@yahoo.com.mx, jfpena@cinvestav.mx (F. Peña-Ortega).

¹ Both authors contributed equally to this paper.

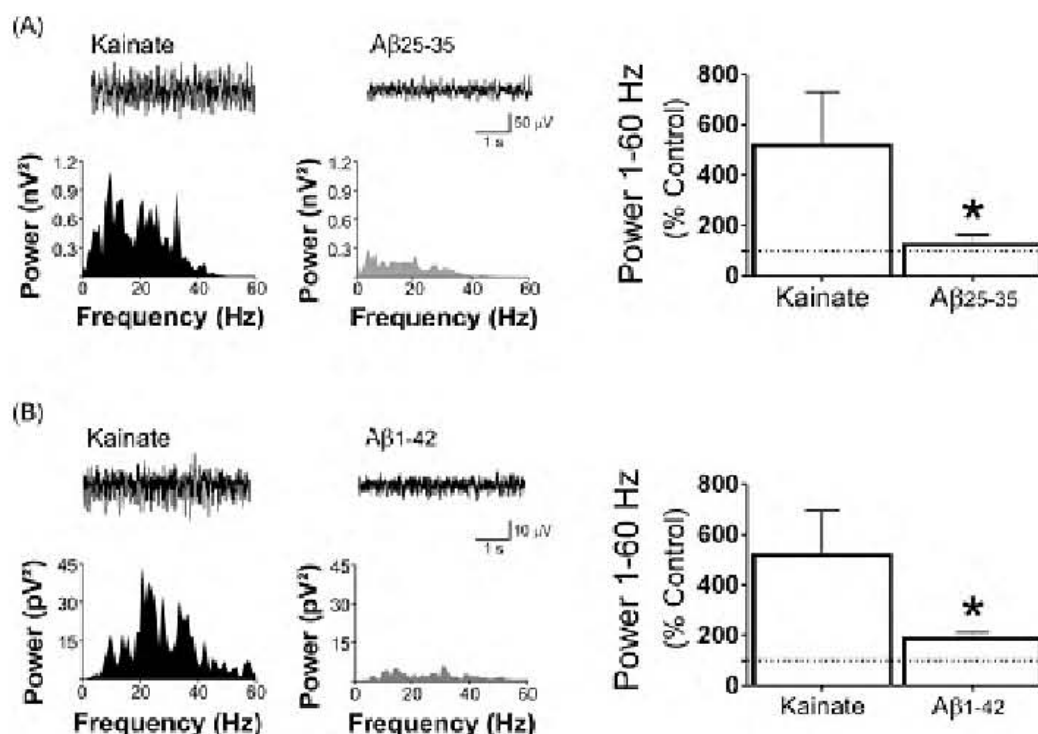


Fig. 1. Both Aβ₂₅₋₃₅ and Aβ₁₋₄₂ inhibit kainate-evoked hippocampal beta-like activity. (A) Traces are representative recordings of the spontaneous CA1 population activity in the presence of kainate 200 nM (left trace) and after application of Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM (right trace). The correspondent power spectra are shown in black for the recording in the presence of kainate and in gray for the recording after Aβ₂₅₋₃₅ application. Note the reduction in oscillatory activity upon Aβ₂₅₋₃₅ application that is quantified on the right graph as a % of control spontaneous network activity. (B) Traces are representative recordings of the spontaneous CA1 population activity in the presence of kainate 200 nM (left trace) and after application of Aβ₁₋₄₂ 10 nM (right trace). The correspondent power spectra are shown in black for the recording in the presence of kainate and in gray for the recording after Aβ₁₋₄₂ application. Note the reduction in oscillatory activity upon Aβ₁₋₄₂ application, that is quantified on the right graph as a % of control spontaneous network activity. The values of the integrated power are indicated as the mean ± SEM, (*) denotes a significant difference relative to control ($P < 0.05$).

ZOO-1999). All animals were housed at 22°C and maintained on a 12:12-h light/dark cycle with free access to food and water.

2.1. Aβ preparation

Aβ₂₅₋₃₅ was purchased from Sigma (St. Louis, U.S.A.) and was freshly dissolved in distilled water just before being used for the experiments. We have previously shown that characterization of this solution by electrophoresis and electronic microscopy reveals the presence of Aβ monomers [20]. Aβ₁₋₄₂ was obtained from Bachem (Heidelberg, Germany) and oligomerized through a standard protocol described before [3]. Briefly, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) was added to solid Aβ₁₋₄₂, at a final peptide concentration of 1 mM, and incubated for 50 min at room temperature. HFIP was allowed to evaporate overnight and a 5-mM solution was prepared by adding DMSO. Such solution was then diluted with F12 medium to reach a final concentration of 100 μM. This solution was incubated, at 5°C, for 24 h. Then the solution was centrifuged at 14,000 × g for 10 min in the cold. The supernatant, containing the Aβ oligomers, was collected and used for the experiments [3]. Characterization of this solution by electrophoresis showed the presence of both Aβ monomers and oligomers [3].

2.2. Slice preparation

To obtain hippocampal slices, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/kg) and perfused transcardially with

cold protective saline containing 238 mM sucrose, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Then, animals were decapitated and brains removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 119 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). One cerebral hemisphere was mounted onto an agar block with a 30° inclination and horizontal 400 μm thick slices, containing the hippocampal formation, were cut with a vibratome (Vibratome, St. Louis, MO, U.S.A.). Slices were left to recover in aCSF, at room temperature, for at least 60 min before any further experimental manipulation.

2.3. Recordings

For extracellular field recordings, the hippocampal slices were transferred to a submerged recording chamber continuously perfused at 17–20 ml/min with oxygenated aCSF at 30 ± 2°C temperature. The field recordings were obtained with suction electrodes filled with aCSF and positioned on the pyramidal layer of the hippocampal area CA1. The signal was amplified and filtered (highpass, 0.5 Hz, lowpass, 1.5 KHz) with a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A.). Basal hippocampal activity was recorded 15–20 min previous to any pharmacological treatment (control recording). Then, one of two experimental conditions was applied to induce oscillatory activity (kainate 200 nM or increasing extracellular potassium concentration from

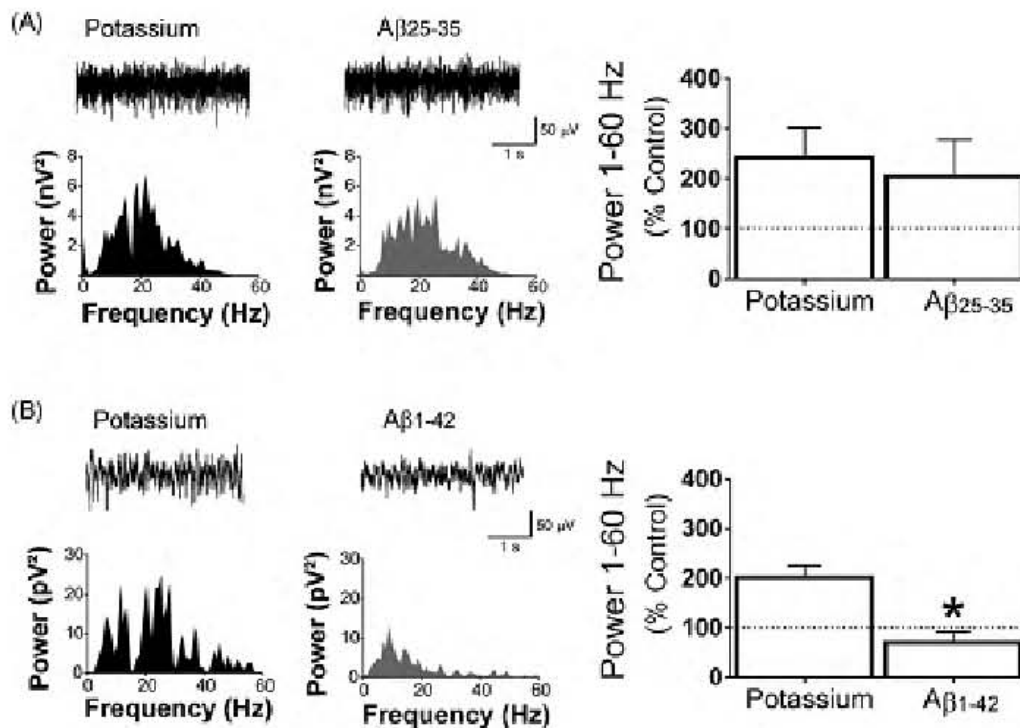


Fig. 2. Aβ₁₋₄₂, but not Aβ₂₅₋₃₅, reduces K⁺-evoked hippocampal beta-like activity. (A) Traces are representative recordings of the oscillatory activity induced by increasing extracellular potassium from 3 to 5 mM (left trace) and after application of Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM (right trace). The correspondent power spectra are shown in black for the recording in elevated potassium and in gray for the recording after Aβ₂₅₋₃₅ application. Note that potassium-induced oscillations are not affected by Aβ₂₅₋₃₅ application. The quantification is presented in the right graph as a % of control spontaneous network activity. (B) Traces are representative recordings of the oscillatory activity induced by increasing extracellular potassium from 3 to 5 mM (left trace) and after application of Aβ₁₋₄₂ 10 nM (right trace). The correspondent power spectra are shown in black for the recording in the presence of elevated potassium and in gray for the recording after Aβ₁₋₄₂ application. Note the reduction in oscillatory activity upon Aβ₁₋₄₂ application, that is quantified on the right graph as a % of control spontaneous network activity. The values of the integrated power are indicated as the mean ± SEM. (*) denotes a significant difference relative to control ($P < 0.05$).

3 to 5 mM). Once the oscillatory activity remained constant (after 30 min), either freshly dissolved Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM [31] or oligomerized Aβ₁₋₄₂ 10 nM [3] was added to the bath and their effects were followed for 60 min. Initially, we used those concentrations based on the fact that we have previously determined that produced similar inhibition of spontaneous hippocampal network activity [3,31]. Moreover, we also independently tested a lower (half-logarithm) and a higher (half-logarithm) concentrations. Finally, lidocaine 1 mM was added to the bath aiming to block any neuronal activity, as a control of the viability of the slice.

All recordings were digitized at 3–9 KHz and were stored on a personal computer with an acquisition system from National Instruments (Austin, TX, U.S.A.) using custom made software designed in the LabView environment. The recordings obtained were analyzed off-line by performing classical power spectrum analysis [3,31]. Segments of 5 s were analyzed using a Rapid Fourier Transform Algorithm, with a Hamming window, in Clampfit (Molecular Devices). The power spectra, from 1 to 60 Hz, were integrated. Data are expressed as mean ± SEM. To test for statistical differences we used ANOVA and Student's *t*-test using the GraphPad Prism software package.

3. Results

Bath application of kainate 200 nM produces oscillatory activity in hippocampal slices, which exhibit variable peak frequency averaging in 18.1 ± 1.3 Hz (beta-like activity, Fig. 1, left power

spectra). Kainate also produces a stable increase in power that reaches $518.4 \pm 129.9\%$ of control ($n = 12$). Once oscillatory activity remained stable (usually after 30 min of kainate application), we initially bath applied either freshly dissolved, mostly monomeric, Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM, [31] or oligomeric Aβ₁₋₄₂ (10 nM, [3]) and quantified their effects after 30 min of constant application, which correspond to a steady-state effect (which is already reached after 15 min from the beginning of Aβ application) [3,31]. As shown in Fig. 1, both Aβ peptides significantly reduced the power of kainate-induced oscillatory activity to $121.6 \pm 43.4\%$ of control after application of Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM ($n = 5$, Fig. 1A) and to $183.6 \pm 29.0\%$ of control after application of Aβ₁₋₄₂ 10 nM ($n = 7$, Fig. 1B). Note that such reduction was very similar despite the difference in concentration used. Such reduction in power was not accompanied by any change in oscillatory peak frequency (17.2 ± 4.0 Hz after application of Aβ₂₅₋₃₅, and 17.7 ± 1.0 Hz after application of Aβ₁₋₄₂). We also tested a lower and a higher concentration (half-logarithm) of both peptides and the data is summarized in Fig. 3A and B, respectively.

In a separate set of experiments, rising extracellular potassium concentration from 3 to 5 mM produces oscillatory activity with a peak frequency of 16.6 ± 1.3 Hz (Fig. 2, left power spectra). High extracellular potassium also produces an increase in power to $220.9 \pm 32.0\%$ of control ($n = 10$). Once oscillatory activity remained stable (after 30 min of increased extracellular potassium) we initially bath applied either monomeric Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM or oligomeric Aβ₁₋₄₂ 10 nM. As shown in Fig. 2, there are differences in the effect of those Aβ peptides on potassium-induced

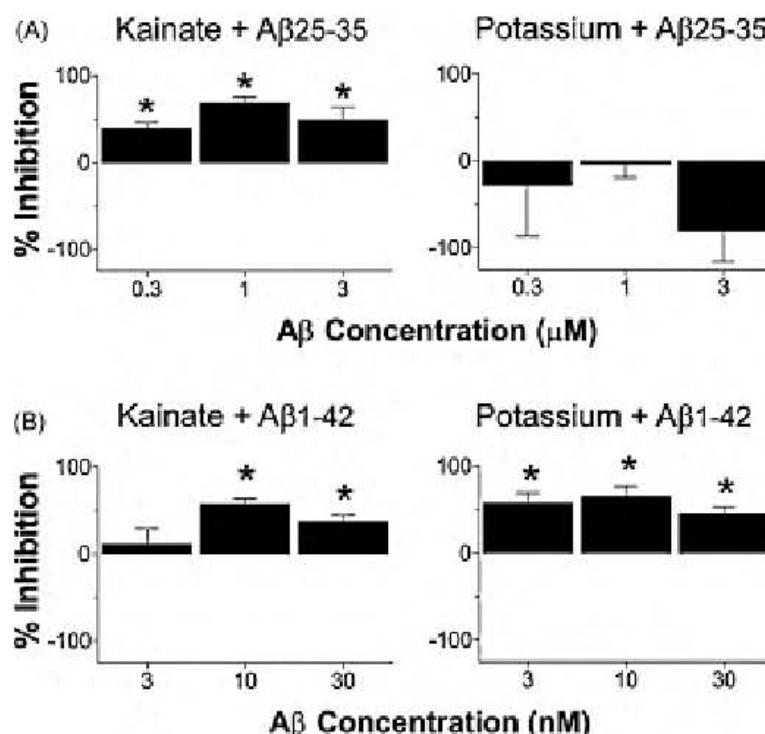


Fig. 3. Concentration-response relation of the effect of Aβ₁₋₄₂ and Aβ₂₅₋₃₅ on beta-like oscillatory. (A) Quantification of the effect of different concentrations of Aβ₂₅₋₃₅ (0.3–3.0 μM, represented as % of inhibition) on the oscillatory activity induced by kainate (left graph) or high potassium (right graph). Note that whereas Aβ₂₅₋₃₅ affected kainate-induced hippocampal activity at all concentrations tested, same peptide did not affect potassium-induced hippocampal activity at any of the concentrations tested. (B) Quantification of the effect of different concentrations of Aβ₁₋₄₂ (3.0–30.0 nM, represented as % of inhibition) on the oscillatory activity induced by kainate (left graph) or high potassium (right graph). Note that whereas Aβ₁₋₄₂ affected kainate-induced hippocampal activity at 10 and 30 nM, same peptide affected potassium-induced hippocampal activity at all concentrations tested. In general no clear concentration-response effect is observed with either of the peptides. In these cases looks-like a none-or-nothing effect. The values of % of inhibition are indicated as the mean ± SEM, (*) denotes a significant difference relative to control ($P < 0.05$).

oscillatory activity. Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM did not significantly reduced the power of the potassium-induced oscillatory activity, which remained in $205.5 \pm 73.0\%$ of control after application of the peptide ($n = 5$, Fig. 2A). In contrast, Aβ₁₋₄₂ 10 nM reduced the power of the potassium-induced oscillatory activity to $69.2 \pm 22.7\%$ of control after application of the peptide ($n = 5$, Fig. 2B). The reduction in power produced by Aβ₁₋₄₂ was not accompanied by a change in oscillatory peak frequency (17.7 ± 1.0 Hz). In contrast, despite the lack of effect on power observed after application of Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM, such peptide significantly increased the peak frequency to 20.6 ± 1.0 Hz. We also tested a lower and a higher concentration (a half-logarithm) of both peptides and the data is summarized in Fig. 3A and B, respectively.

Despite the fact that we have previously shown that different Aβ peptides may affect hippocampal network activity with different potencies, reaching similar inhibitory effects with Aβ₁₋₄₂ 10 nM and Aβ₂₅₋₃₅ 1 μM [3,31], we tested different concentrations of the used Aβ peptides, and quantified their effects after 30 min of constant application [3,31]. The results show that Aβ₁₋₄₂ requires low nM concentrations to inhibit network activity induced either with kainate or with potassium (Fig. 3). However, we did not find clear concentration-dependent inhibition of induced-hippocampal network activity of the used peptides as we did before on spontaneous hippocampal network activity [3,31]. We also confirmed that Aβ₂₅₋₃₅ is less potent and requires high nM or even low μM concentrations to reach its effects (Fig. 3, [31]). Moreover, we found that Aβ₂₅₋₃₅ does not affect potassium-induced beta-like activity at any of the concentration tested (Fig. 3).

4. Discussion

Overall, our results show that different Aβ species differentially affect similar hippocampal oscillatory activity. Our data partially corroborate previous findings showing the amyloid beta peptide may interfere with oscillatory network properties [3,5,7,26,31] and goes further by suggesting that the effects of amyloid peptide might be specific for certain amyloid peptides and certain oscillations [8]. We found that whereas kainate-induced oscillations are affected by the two peptides tested, potassium-induced oscillations are resistant to Aβ₂₅₋₃₅. Despite the extensive literature showing that the effects produced by Aβ₂₅₋₃₅ are mostly reproduced by the full-length sequence [6,9,10,12,18,25,30,32,40–42,49,50], there are reports showing that this is not always the case. For instance, it has been shown that the reduction in long term potentiation (LTP) produced by oligomeric Aβ₁₋₄₀ is not reproduced by Aβ₂₅₋₃₅ [34]. In contrast, whereas freshly dissolved Aβ₂₅₋₃₅ induces intracellular actin aggregation and alters axonal transport, freshly dissolved Aβ₁₋₄₂ does not [17]. Same scenario occurs with the increase in intracellular calcium observed after application of Aβ₂₅₋₃₅, which is not reproduced by Aβ₁₋₄₂ [21]. These differences are not restricted to Aβ₂₅₋₃₅ and Aβ₁₋₄₂ but also include Aβ₁₋₄₀. For instance, it has been found that whereas both Aβ₂₅₋₃₅ and Aβ₁₋₄₂ reduce synchronous activity in hippocampal cultures, Aβ₁₋₄₀ does not [35]. All these evidences, along with ours, support the idea that different amyloid peptides may affect different molecular or cellular targets and therefore, those differences may explain their diverse effects on a particular physiological events [2,17,21,30,34–36,46]. Unfor-

unfortunately, at this point, we do not have evidence as to which the specific cellular processes are specifically affected by A β peptides used in this study. By looking at the cellular correlate of the effects of the A β peptide we have found that both A β _{25–35} and A β _{1–42} reduce synaptic transmission [3,31]. In contrast, just A β _{1–42} affect pyramidal neuron firing (unpublished data), whereas does not A β _{25–35} [31]. However, this is just one of several possible differential targets that need to be tested.

To make this picture more complicated, there is evidence that similar physiological processes, relying on slightly different cellular substrates, are differentially affected by amyloid peptides. For instance, it has been found that A β _{25–35} reduces LTP, in Wistar rats, when this plastic change is induced by weak but not by strong stimulation protocol [11]. In the same report it was shown that A β _{25–35} did not impair LTP, at any stimulation protocol, in a different rat strain [11]. A similar finding was obtained in LTP produced by different stimulation protocols (tetanus vs. theta burst, [39]) or by coapplication of stimulation plus nicotine [47]. Despite these contradictory findings, the study of the differential effects of different A β species acquires great relevance due to the fact that senile plaques contain different A β sequences, being A β _{1–40} and A β _{1–42} the most abundant but also including A β _{25–35} and other sequences [13,23,32]. It is known that AD patients can also accumulate both A β _{1–40} and A β _{25–35} [13,20]. As mentioned, A β _{25–35} produces similar effects to those produced by the full-length sequences (for instance A β _{1–42}) regarding cell death [32,50], neurite atrophy [12,42], synaptic loss [12,42], as well as disruption of synaptic plasticity [9,10,18], and memory [6,25,40,41,49]. Despite the fact that A β _{25–35} is less abundant in the brain of AD patients, compared to the full sequences, it is known that is more soluble, easier to inject *in vivo* and produce a faster effect than A β _{1–42} [46].

As mentioned, based on our data and the evidence from other laboratories [17,21,34,35], we propose that the differential effects produced by different amyloid peptides on similar evoked oscillations are based on putative different cellular mechanisms involved in the generation of those oscillations. As mentioned, it is well known that different cellular mechanisms are involved in the generation of similar oscillatory network activities (for review see Refs. [33,44,48]), which explains why those oscillations show different pharmacological sensitivities [4,27]. Despite the fact that kainate-induced and potassium-induced network oscillations seem to be produced by quite similar cellular mechanism [8,14,24,43], there must be some slight differences in the participation of some putative cellular mechanisms that are differentially affected by amyloid peptides. For instance, it is known that whereas kainate-induced oscillations require the activation of particularly fast-spiking interneurons [33,44,45,48], which is still unknown for potassium-induced oscillations. High-potassium application is an unspecific cell-activation procedure that may produce oscillations with different pharmacological sensitivity compared to those induced with more specific procedures (i.e. kainate). Recent reports [1,28] have shown that A β specifically affects different populations of interneurons in transgenic mice as well as in humans. It is still necessary to test whether or not acute application of different A β peptides affects different subpopulations of hippocampal neurons.

In conclusion, our findings support the idea that amyloid peptides produce specific cellular alterations, rather than global and unspecific alteration of network activity. This opens the possibility to explore which are the cellular and molecular mechanism involved in the effects of amyloid beta that are associated to the alteration of particular oscillations and particular cognitive processes. Our findings, along with others, also suggest that there might be amyloid-resistant oscillatory processes that must be promoted as a therapeutic approach once other oscillations are already affected during the course of Alzheimer disease.

Acknowledgments

We like to thank Juan Javier López-Guerrero, José Rodolfo Fernández and Arturo Franco for technical assistance. This work was sponsored by Conacyt-59187, México.

References

- [1] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada I, Sanchez-Mejias F, et al. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/ β APP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* in press.
- [2] Balleza-Tapia H, Peña F. Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:724–40.
- [3] Balleza-Tapia H, Arias N, Peña F. Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous activity in an age-dependent manner. *Curr Alzheimer Res* in press.
- [4] Brown JT, Teriakidis A, Randall AD. A pharmacological investigation of the role of GLUK5-containing receptors in kainate-driven hippocampal gamma band oscillations. *Neuropharmacology* 2006;50:47–56.
- [5] Colom LV, Castañeda MT, Bañuelos C, Puras G, García-Hernández A, Hernández S, et al. Medial septal beta-amyloid 1–40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function. *Neurobiol Aging* 2008;31:46–57.
- [6] Delobrette S, Privat A, Maurice T. *In vitro* aggregation facilitates beta-amyloid peptides- (25–35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 1997;319:1–4.
- [7] Driver JF, Racca C, Cunningham MO, Towers SK, Davies CH, Whittington MA, et al. Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations *in vitro* in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP). *Eur J Neurosci* 2007;26:1280–8.
- [8] Fisahn A, Contractor A, Traub RD, Buhl EH, Heinemann SF, McBain CJ. Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J Neurosci* 2004;24:9658–68.
- [9] Freir DB, Herron CE. Nicotine enhances the depressive actions of A beta 1–40 on long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region *in vivo*. *J Neurophysiol* 2003;89:2917–22.
- [10] Freir DB, Costello DA, Herron CE. A beta 25–35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 *in vivo* and *in vitro* is attenuated by verapamil. *J Neurophysiol* 2003;89:3061–9.
- [11] Gengler S, Gault VA, Harriott P, Holscher C. Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid (25–35) are dependent on stimulation-protocol and genetic background. *Exp Brain Res* 2007;179:621–30.
- [12] Grace EA, Rabiner CA, Busciglio J. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid β : implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2002;114:265–73.
- [13] Graden MA, Davidova TB, Malisauskas M, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Wilhelm K, et al. Differential neuroimmune markers in the onset of Alzheimer disease neurodegeneration and dementia: autoantibodies to A beta ((25–35)) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J Neuroimmunol* 2007;186:181–92.
- [14] Hajos N, Karona L, Máté SS, Mackie K, Ledent C, Mody I, et al. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 2000;12:3239–49.
- [15] Hermann D, Both M, Ebert U, Gross C, Schoemaker H, Draguhn A, et al. Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes. *Neuroscience* 2009;162:1081–90.
- [16] Herrmann CS, Munk MH, Engel AK. Cognitive functions of gamma-band activity: memory match and utilization. *Trends Cogn Sci* 2004;8:347–55.
- [17] Hiruma H, Katakura T, Takahashi S, Ichikawa T, Kawakami T. Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Neurosci* 2003;23:8967–77.
- [18] Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallot HA. Soluble beta-amyloid (25–35) reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur J Pharmacol* 2007;561:85–90.
- [19] Hughes JR, Shanmugham S, Wetzel LC, Bellur S, Hughes CA. The relationship between EEG changes and cognitive functions in dementia: a study in a VA population. *Clin Electroencephalogr* 1989;20:77–85.
- [20] Kaneko I, Morimoto K, Kubo T. Drastic neuronal loss *in vivo* by beta-amyloid racemized at Ser (26) residue: conversion of nontoxic [D-Ser (26)]beta-amyloid 1–40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience* 2001;104:1003–11.
- [21] Korotzer AR, Whittemore ER, Cotman CW. Differential regulation by beta-amyloid peptides of intracellular free Ca²⁺ concentration in cultured rat microglia. *Eur J Pharmacol* 1995;288:125–30.
- [22] Kowalski JW, Gaweł M, Pfeffer A, Barcikowska M. The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease: correlation with the severity of mental impairment. *J Clin Neurophysiol* 2001;18:570–5.
- [23] Kubo T, Nishimura S, Kumagai Y, Kaneko I. *In vivo* conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1–40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25–35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res* 2002;70:474–83.
- [24] LeBeau FE, Towers SK, Traub RD, Whittington MA, Buhl EH. Fast network oscillations induced by potassium transients in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 2002;542:167–79.

- [25] Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 1996;706:181–93.
- [26] Nerellus C, Sandegren A, Sangsyan H, Ramak R, Leijonmark H, Chatterjee U, et al. Alpha-helix targeting reduces amyloid-beta peptide toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9191–6.
- [27] Palitani J, Paulsen O, Freund TF, Hájos N. Distinct properties of carbacol- and DHPC-induced network oscillations in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 2004;47:381–9.
- [28] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Blech-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 2007;55:697–711.
- [29] Peña F, Alvarez-Pérez N. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of Me-cURRENT in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 2006;47:47–54.
- [30] Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:149–63.
- [31] Peña F, Ordaz B, Ballera-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio I, et al. Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: role of PVN-kinase. *Hippocampus* 2010;20(1):78–86.
- [32] Pike CJ, Walencewicz-Waserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CC, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 1995;64:253–65.
- [33] Ramirez JM, Tryba AK, Peña F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:565–74.
- [34] Rönkkö R, Idemm A, Meilhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Beyreuther K. Abeta mediated diminution of MTT reduction—an artefact of single cell culture? *PLoS One* 2008;3:e3236.
- [35] Rui Y, Li R, Liu Y, Zhu S, Yu X, Sheng Z, et al. Acute effect of beta amyloid on synchronized spontaneous Ca²⁺ oscillations in cultured hippocampal networks. *Cell Biol Int* 2006;30:733–40.
- [36] Schmid AW, Freir DB, Herron CE. Inhibition of LTP in vivo by beta-amyloid peptide in different conformational states. *Brain Res* 2008;1197:135–42.
- [37] Schreier-Gasser U, Gasser T, Ziegler P. Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease: correlations with severity clinical characteristics visual EEG, CCT. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994;90:267–72.
- [38] Seidenberg PB, Kahana MJ, Howard MW, Donner EJ, Madsen JR. Theta and gamma oscillations during encoding predict subsequent recall. *J Neurosci* 2003;23:10809–14.
- [39] Smith JP, Lal V, Bowser D, Cappel R, Masters CL, Cicotosto GD. Stimulus pattern dependence of the Alzheimer's disease amyloid-beta 42 peptide's inhibition of long term potentiation in mouse hippocampal slices. *Brain Res* 2009;1269:176–84.
- [40] Stepanichev MY, Zdobanova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Gaudier MY, et al. Amyloid-beta (25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 2004;80:647–55.
- [41] Sun MK, Allison DL. Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transmission and spatial memory by beta-amyloid (25–35). *J Neurophysiol* 2002;87:2441–9.
- [42] Toldá C, Matsumoto N, Zou K, Merelhy MR, Komatsu K, Abeta (25–35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:860–8.
- [43] Towers SK, LeBeau FE, Gloveli T, Traub RD, Whittington MA, Buhl EH. Fast network oscillations in the rat dentate gyrus in vitro. *J Neurophysiol* 2002;87:1165–8.
- [44] Traub RD, Spruston N, Soltesz I, Konnerth A, Whittington MA, Jefferys CG. Gamma-frequency oscillations: a neuronal population phenomenon, regulated by synaptic and intrinsic cellular processes, and inducing synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 1998;55:563–75.
- [45] Traub RD, Bibbig A, LeBeau FE, Buhl EH, Whittington MA. Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:247–78.
- [46] Varadarajan S, Kansli J, Akseanova M, Lauderback C, Buterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's Abeta (1–42) and A beta (25–35). *J Am Chem Soc* 2001;123:5625–31.
- [47] Weisby PJ, Rowan MJ, Anwyl R. Beta-amyloid blocks high frequency stimulation induced LTP but not nicotine enhanced LTP. *Neuropharmacology* 2007;53:188–95.
- [48] Whittington MA, Faulstich HJ, Doherty HC, Traub RD. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacol Ther* 2000;86:171–90.
- [49] Yanaguchi Y, Kawashima S. Effects of amyloid-beta-(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze-learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001;412:265–72.
- [50] Yankner BA, Duffy LR, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990;250:279–82.

Amyloid Beta 1-42 Inhibits Entorhinal Cortex Activity in the Beta-Gamma Range: Role of GSK-3

Fernando Peña-Ortega^{1,2,*}, Ángeles Solís-Cisneros¹, Benito Ordaz^{1,2}, Hugo Balleza-Tapia¹ and Juan Javier López-Guerrero²

¹Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla, México; ²Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-IPN, México

Abstract: Oscillatory activity in the entorhinal cortex has been associated with several cognitive functions. For example, Alzheimer Disease-associated cognitive decline has been related to amyloid beta-induced disturbances in several of these oscillatory patterns. We have previously shown that acute application of amyloid beta inhibits the generation of slow-frequency oscillations (7-20 Hz). In contrast, alterations in faster oscillations recorded in Alzheimer Disease-transgenic mice that over-express amyloid beta have been controversial. Since transgenic mice may produce complex responses due to compensatory mechanisms, we tested the effect of acute application of amyloid beta on fast oscillations (beta-gamma bursts) generated by entorhinal cortex slices *in vitro* in a Mg²⁺-free solution. We also explored the participation of the enzyme glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) in this effect. Our results show that bath application of a clinically relevant concentration of amyloid beta (10 nM) activates GSK-3 and reduces the power of beta-gamma bursts in the entorhinal cortex. The reduction of beta-gamma bursts by amyloid beta is blocked by inhibiting GSK-3 either with lithium or with SB 216763. Our results suggest that amyloid beta-induced inhibition of entorhinal cortex beta-gamma activity involves GSK-3 activation, which may provide a molecular mechanism for amyloid beta-induced neural network disruption and support the use of GSK-3 inhibitors to treat Alzheimer Disease.

Keywords: Alzheimer's disease, gamma oscillations, network activity, amyloid beta protein, GSK-3, lithium.

INTRODUCTION

Entorhinal cortex oscillations in the beta-gamma range (20-80 Hz) have been associated with several cognitive functions, such as binding, learning, memory, attention, etc. [1, 2] and alterations in this activity have been closely related to the cognitive decline observed in patients with Alzheimer Disease (AD) [3-9]. It is also known that the alteration in cortical function closely correlates with the increased levels of soluble amyloid beta protein [9-11]. Accordingly, recent reports have shown that slices from animals over-expressing the mutated human amyloid precursor protein (APP), and consequently producing high levels of amyloid beta, have a deficit in the induction of oscillations in the beta-gamma range (15-80 Hz) [12], but the animals have no deficit in generating sharp waves and ripples *in vivo* (150-300 Hz) [13]. It is known that similar oscillatory patterns, i.e., those that are in the same frequency band but rely on slightly different cellular mechanisms, exhibit differential sensitivity to several pharmacological manipulations [14, 15], including acute amyloid beta application [16]. We have previously shown that acute application of amyloid beta inhibits the generation of spontaneous network activity (7-12 Hz) [17, 18] as well as beta oscillations (15-20 Hz) [16]. However, in view of the evidence that different types of oscillations might

be differentially affected by amyloid beta, one aim of the present study was to test whether or not amyloid beta affects beta-gamma oscillations in the entorhinal cortex. The other aim was to explore the participation of the enzyme glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) in amyloid beta-induced disruption of entorhinal network activity.

The molecular mechanisms by which amyloid beta interferes with network activity remain largely unknown [18, 19]. GSK-3 has been widely implicated in Alzheimer's disease as well as in the effects of amyloid beta [20-31]. Numerous studies have demonstrated that amyloid beta activates GSK-3 [19, 32-34] and that this activation constitutes a major link between the two histopathological markers of AD (amyloid beta and Tau) [27, 28, 33, 34]. Moreover, amyloid beta-induced activation of GSK-3 not only promotes the phosphorylation of Tau, but also mediates several other pathological actions of amyloid beta, such as induction of cognitive impairment [25-30] and glial activation [27, 28] as well as inhibition of long-term potentiation [29] and potentiation of long-term depression [31]. So far, there is no evidence of GSK-3 involvement in amyloid beta-induced disruption of neural network activity [12, 16, 17, 35]. Thus, in the present study, we examined the role of GSK-3 in the actions of amyloid beta on gamma bursts recorded in the entorhinal cortex. First of all, we hypothesized that acute bath application of a clinically relevant concentration of amyloid beta (10 nM) would activate GSK-3 and consequently would lead to the reduction of the power of beta/gamma bursts, which would be prevented by blocking GSK-3 either with its non-specific inhibitor lithium [36] or its more specific inhibitor SB

*Address correspondence to this author at the Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, 76230, México; Tel: +52(442)2381057; Fax: +52(442)2381005; E-mail: jfpena@unam.mx

216763 [26]. If so, our results would suggest that amyloid beta-induced inhibition of entorhinal cortex beta-gamma activity involves GSK-3 activation and would support the use of lithium in AD treatment.

MATERIALS AND METHODS

We performed the experiments using hippocampus-entorhinal cortex slices obtained from 3- to 4-week-old Wistar rats. The experimental protocols were approved by the Local Committees on Ethics of Animal Experimentation (CICUAL-Cinvestav and INB-UNAM) and followed the regulations established in the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals ('Norma Oficial Mexicana' NOM-062-ZOO-1999). All animals were housed at 22°C and maintained on a 12-h:12-h light/dark cycle with free access to food and water.

Amyloid Beta Preparation

Amyloid beta₁₋₄₂ was obtained from Bachem (Heidelberg, Germany) and oligomerized through a standard protocol described earlier [18, 37]. Briefly, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) was added to solid amyloid beta₁₋₄₂ at a final peptide concentration of 1 mM and incubated for 60 min at room temperature. HFIP was allowed to evaporate overnight, and a 5 mM solution of amyloid beta was prepared by adding DMSO. This solution was diluted with F12 medium to reach a final concentration of 100 μM, and then incubated at 5°C for 24 h, followed by centrifugation at 14,000 × g for 10 min in the cold. The supernatant, containing the amyloid beta oligomers, was collected, characterized by electrophoresis, and showed the presence of both amyloid beta monomers and oligomers [3, 18, 37].

Slice Preparation

To obtain hippocampus-entorhinal cortex slices, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/kg, intraperitoneally), perfused transcardially with cold protective saline containing 238 mM sucrose, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Then, the animals were decapitated; their brains were removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 119 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 30 mM D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen. One cerebral hemisphere was mounted onto an agar block with a 30° inclination, and horizontal 400-μm thick slices, containing the entorhinal cortex, were cut with a vibratome (Vibratome, St. Louis, MO, U.S.A.). Control slices were left to recover in aCSF at room temperature for at least 60 min before any further experimental manipulation. Treated slices were left to recover in identical aCSF but with added lithium (2, 3, 5, or 10 mM) or SB 126763 (10 nM).

Population Recordings

For extracellular field recordings, the hippocampus-entorhinal cortex slices were transferred to a submerged recording chamber continuously perfused at 17–20 ml/min with oxygenated, magnesium-free aCSF [38, 39] at 30 ± 2°C (control slices). The oscillatory activity induced under these

conditions is highly reproducible, robust, and lasts for several hours [38, 39]. Such activity seems to rely on intrinsic bursting neurons as well as on the activation of NMDA receptors [38, 39]. Treated slices were perfused under the same conditions but in the presence of lithium (2, 3, 5, or 10 mM) or SB 126763 (10 nM). The field recordings were obtained with suction electrodes filled with magnesium-free aCSF and positioned on the superficial layers of the entorhinal cortex. The signal was amplified and filtered (highpass, 0.5 Hz; lowpass, 1.5 KHz) with a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A.). This raw signal was also rectified and integrated using an electronic filter (time constant of 30–50 ms built by JFI electronics at The University of Chicago) [40, 41]. Entorhinal cortex activity was recorded for 15–20 min to establish the baseline in each slice; 10 nM amyloid beta was then added to the bath, and its effect was followed for 60 min. Finally, 1 mM lidocaine was added to the bath to block any neural activity, as a control of the viability of the slice.

Western Blot

To evaluate GSK-3 phosphorylation, slices were placed in frozen tubes and homogenized in ice-cold lysis buffer containing: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 % Triton, 0.5 % SDS, 25 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 10 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche; Mannheim, Germany). Samples were pre-cleaned by centrifugation and stored at -80 °C. For electrophoresis, cell homogenates were boiled for 10 min and centrifuged for 5 min. After adding 2X Laemmli sample buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 15 μL per lane of the total homogenate was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel. After electrophoresis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and were incubated for 1 h in a blocking buffer consisting of TBS-T (20 mM Trizma base, 137 mM NaCl, and 0.05% Tween, pH 7.6) and 7.5% nonfat dry milk. phospho-GSK-3α/β (Ser21/9) rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) diluted in TBS-T buffer at 4°C. After this, the membranes were washed twice with TBS-T and twice with normal TBS (20 mM Trizma base and 137 mM NaCl, pH 7.6), then incubated with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-HRP Ab; SantaCruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at a 1:10,000 dilution in TBS-T for 1–2 hr. Proteins were visualized using Western Blot Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The membranes then were reanalyzed for total GSK3β using the GSK-3β (27C10) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc.). To do so, nitrocellulose membranes were stripped in a buffer solution (containing 0.070 mL 2-mercaptoethanol, 2 mL 10% SDS, 1.26 mL 0.5 M Tris, pH 6.8, and 6.67 mL deionized water) for 30 min at 50°C with occasional agitation. After this, the membranes were washed four times with deionized water, twice with normal TBS, and then processed as described above.

Data Analysis

All recordings were digitized at 3–9 KHz and stored on a personal computer with an acquisition system from National Instruments (Austin, TX, U.S.A.) by using custom-made

software designed in the LabView environment. The recordings obtained were analyzed off-line by performing classical power spectrum analysis [17, 41-43]. Segments of 60 sec were analyzed using a Rapid Fourier Transform Algorithm, with a Hamming window, in Clampfit (Molecular Devices). The power spectra, from 1 to 120 Hz, were integrated and normalized to the control, i.e., the control power spectrum was integrated, and this value was arbitrarily set as 100%.

Quantification of blots was carried out by scanning the photographs and calculating optical density (OD) with ImageJ 1.43u, and is presented in arbitrary units (a.u.). To obtain the GSK3 β phosphorylation ratio, the OD of phospho-GSK3 β was divided by the OD of total GSK3 β for control and amyloid beta conditions.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. To test for statistical differences, we used ANOVA and the Student's *t*-test for the non-normalized data. In the case of normalized data we have used the Wilcoxon rank sum test using the GraphPad Prism software package.

RESULTS

As previously reported [38, 39], incubation of entorhinal cortex slices in a Mg²⁺-free solution induces spontaneous bursts of population activity that occur with a frequency of 0.03 ± 0.01 Hz and have a duration of 18.8 ± 7.0 sec (N=10; Fig. 1A). The power spectra show that the activity is dominated by a broad range of frequency components that fall into the beta-gamma range [1, 2, 12]. Considering the wide range of frequencies present during the burst of population activity, we found that the peak frequency (frequency with maximal power) was 38.5 ± 3.6 Hz (N=10). This activity is highly reproducible and robust, and it persists unaltered for several hours, as previously reported [38, 39].

Application of 10 nM amyloid beta alters the generation of beta-gamma burst activity by the entorhinal cortex. After 60 min of continuous application of 10 nM amyloid beta, bursts occur at significantly lower frequency (0.11 ± 0.03 Hz; $p < 0.05$) and have significantly shorter duration (9.5 ± 5.5 sec; $p < 0.05$). However, the net effect of 10 nM amyloid beta on beta-gamma burst activity is a reduction in power to 55.5 ± 12.1 % of control (N=10; $p < 0.05$). As previously reported for other oscillatory activities [16, 17], 10 nM amyloid beta reduces the power of the population activity but has no preferential effect on a particular frequency domain (Fig. 1). The peak frequency of the beta-gamma burst in the presence of 10 nM amyloid beta (42.1 ± 6.3 Hz; N=10) is not different from that produced in control conditions. The effect of amyloid beta was specific for the normal sequence (1-42), since application of the inverse amyloid beta sequence (42-1; Fig. 2) did not affect beta-gamma burst frequency (126.6 ± 31.6 % of control; N=10; Fig. 2), duration (135.7 ± 18.5 % of control; N=10; Fig. 2), power (121.2 ± 15.7 % of control; N=10; Fig. 2), or peak frequency (40.3 ± 3.6 Hz; N=10; Fig. 2).

Treatment of slices treated with 10 nM amyloid beta as described in Fig. (1), significantly reduces phosphorylation of GSK-3 β at serine residue 9 (N=7; $p < 0.05$; Fig. 3). This result is consistent with previous observations in other systems [19, 32, 34]. On the other hand, the inhibition of GSK-

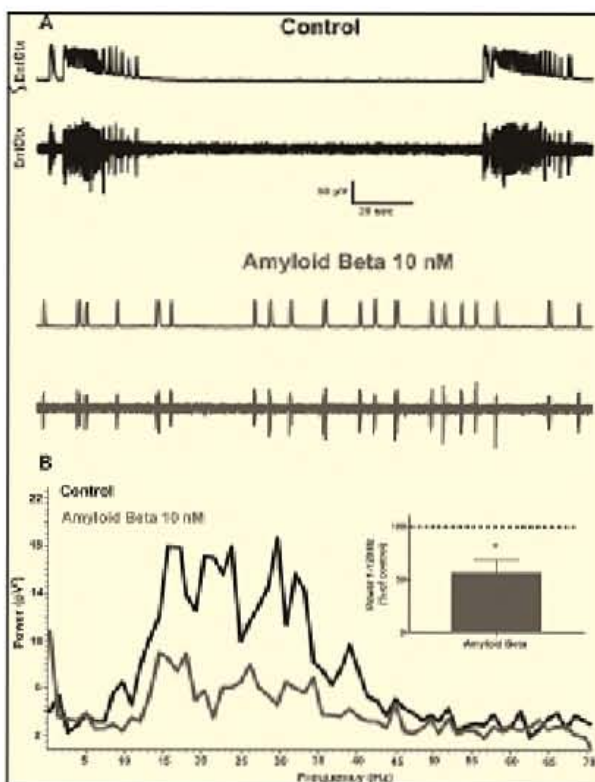


Fig. (1). Entorhinal cortex generates gamma bursts which are inhibited by amyloid beta. **A.** Population recordings obtained from the superficial layers of the entorhinal cortex (EntCtx) in control conditions (black traces) and after bath application of amyloid beta 10 nM (gray traces). In each case, the lower traces represent the raw signal, and the upper traces represent the rectified and integrated signal. Note that entorhinal cortex activity shows a variety of frequency components that can be included in the gamma band. **B.** The power spectra of the recordings presented in A shows that amyloid beta reduces the power (gray spectrum) of the entorhinal activity compared to control (black spectrum). The inset is the quantification of the normalized power (as % of control) after amyloid beta application (N=10). * indicates a significant difference compared to control ($p < 0.05$).

3, either with the non-specific inhibitor lithium or with the specific inhibitor SB 216763, partially prevents the amyloid beta-induced alterations in beta-gamma burst activity (Figs. 4, 5). As exemplified in Fig. (4), beta-gamma burst activity is not affected by 2 mM lithium (N=6); beta-gamma burst frequency (0.02 ± 0.02 Hz; N=6) and duration (15.1 ± 5.6 sec; N=6) are not different from those observed in control slices (compare with Fig. 1). However, 2 mM lithium partially prevents the effect of amyloid beta on beta-gamma bursts. Although amyloid beta still increases the frequency of beta-gamma bursts (to 244.4 ± 80.5 % of control; $p < 0.05$; N=6), it does not affect their duration (87.30 ± 20.63 % of control; N=6) and, furthermore, lithium abolishes the reduction in beta-gamma power due to amyloid beta (134.4 ± 32.3 % of control; N=6). We also tested two higher concentrations of lithium and found basically the same results. In the presence of 5 mM (N=7) and 10 mM (N=6) lithium, amyloid

beta does not affect beta-gamma power ($104.0 \pm 24.1\%$ and $113.2 \pm 15.6\%$ of control, respectively; Fig. 5).

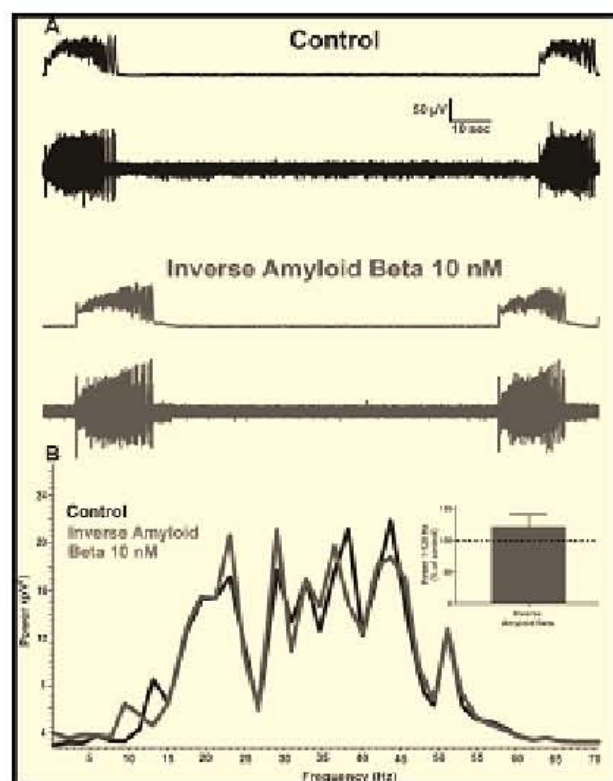


Fig. (2). The inverse amyloid beta sequence does not affect gamma burst generation in the entorhinal cortex. **A.** Population recordings obtained from the superficial layers of the entorhinal cortex in control conditions (black traces) and after bath application of the inverse amyloid beta sequence 10 nM (gray traces). In each case the lower traces represent the raw signal, and the upper traces represent the rectified and integrated signal. **B.** The power spectra of the recordings presented in A show that the inverse amyloid beta sequence does not affect the power (gray spectrum) of the entorhinal activity compared to control (black spectrum). The inset is the quantification of the normalized power (as % of control) after inverse amyloid beta sequence application (N=7).

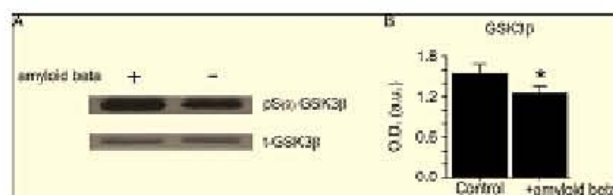


Fig. (3). Activation of GSK3 in entorhinal slices by acute application of amyloid beta. **A.** Western blot of total cell lysates from entorhinal slices analyzed for phosphorylation of pS(9)GSK3 β , as well as for total GSK3 β (t-GSK3 β). **B.** Quantification of GSK3 β serine phosphorylation in response to amyloid beta treatment (n=7). * indicates a significant difference compared to control ($p < 0.05$).

Finally, the specific inhibition of GSK-3 with SB 126763 prevented the alterations in beta-gamma burst activity in-

duced by 10 nM amyloid beta Fig. (5). Beta-gamma burst frequency (0.05 ± 0.02 Hz; N=8) and duration (11.3 ± 3.5 sec; N=8) in the presence of SB 126763 were not different from those observed in control slices (compare with Fig. 1). However, SB 126763 (10 nM) abolished the effect of amyloid beta on beta-gamma bursts. In the presence of SB 126763, amyloid beta does not affect either frequency ($116.3 \pm 24.3\%$ of control; N=8) or duration of beta-gamma bursts ($128.4 \pm 26.1\%$ of control; N=8). Likewise, amyloid beta had no effect on beta-gamma power in the presence of SB 126763 ($86.8 \pm 16.1\%$ of control; N=8; Fig. 5).

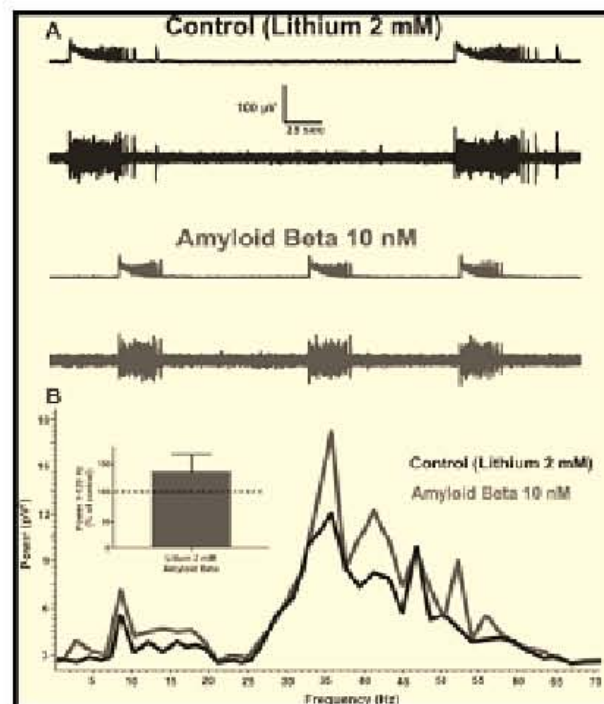


Fig. (4). Lithium prevents the gamma burst inhibition induced by amyloid beta in the entorhinal cortex. **A.** Population recordings obtained from the superficial layers of the entorhinal cortex in control conditions (slices pre-treated with lithium 2 mM; black traces) and after bath application of the amyloid beta 10 nM (gray traces). In each case, the lower traces represent the raw signal, and the upper traces represent the rectified and integrated signal. **B.** The power spectra of the recordings presented in A show that in the presence of lithium, amyloid beta does not reduce the power (gray spectrum) of the entorhinal activity compared to control (black spectrum) (N=6). The inset is the quantification of the normalized power (as % of control) after amyloid beta application in the presence of lithium.

DISCUSSION

The purpose of the present study was to test the hypothesis that amyloid beta will activate GSK-3 and consequently, reduce the power of beta-gamma bursts, and that this reduction will be prevented by blocking GSK-3 either with its non-specific inhibitor lithium [36] or its more specific inhibitor SB 216763 [26]. Our results show that acute application of amyloid beta reduces beta-gamma burst activity recorded in the entorhinal cortex and that such inhibition involves the

activation of GSK-3. These findings may help to explain the cellular mechanisms involved in amyloid beta-induced disruption of neural network activity, and possibly its early deleterious effects on cognition, as well as provide support for the use of GSK-3 inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease (AD).

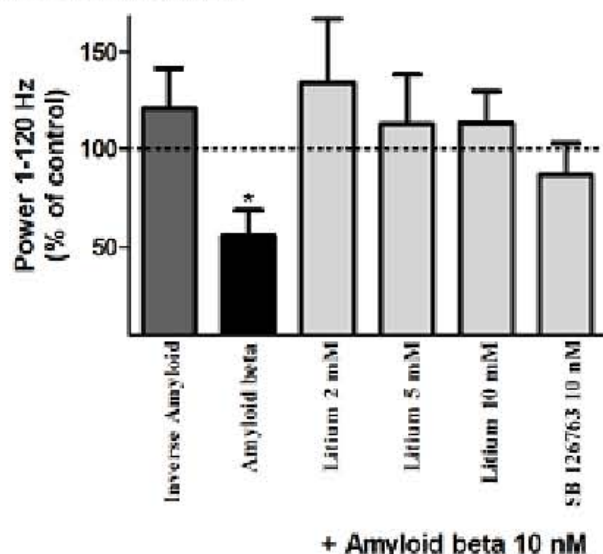


Fig. (5). GSK-3 is involved in the inhibition of gamma burst by amyloid beta in the entorhinal cortex. A summary of the quantification of the normalized power (as % of control) after amyloid beta application (N=10), inverse amyloid beta sequence application (N=7), and application of amyloid beta in the presence of different concentrations of the non-specific GSK-3 inhibitor lithium at 2 mM (N=6), 5 mM (N=7), and 10 mM (N=6) as well as the specific GSK-3 inhibitor SB 126273 10 nM (N=8). Note that either lithium or SB 126273 prevents the inhibition of entorhinal cortex activity by amyloid beta. * indicates a significant difference compared to control ($p < 0.05$).

The Cellular Mechanisms Involved in Amyloid Beta-Induced (GSK-3-Mediated) Inhibition of Beta-Gamma Activity

As mentioned in the introduction, GSK-3 activation has already been implicated in amyloid beta-induced disruption of neural function and AD [20-34]. Here, we present the first demonstration that amyloid beta-induced inhibition of network oscillations also involves the activation of GSK-3, which raises intriguing possibilities about the cellular mechanisms involved. We have previously shown that amyloid beta-induced inhibition of network oscillations correlates with a reduction in synaptic transmission and that this reduction is mediated by a presynaptic effect of amyloid beta [17, 18]. Coincidentally, it has been shown that both amyloid beta [44-46] and GSK-3 activation [47] alter presynaptic activity by inhibiting P/Q-type Ca^{2+} channels as well as by altering SNARE function. Thus, it is possible that amyloid beta and GSK-3 share common molecular targets; alternatively, as supported by our data, amyloid beta may alter the neuronal network by activating GSK-3, thereby modulating its molecular targets. This scenario might explain not only our data, but also the synaptic plasticity alterations induced

by amyloid beta, such as the increase in long-term depression [31] or the decrease in long-term potentiation [29]. These effects are not only mediated by GSK-3 [29-31], but they are also mimicked by the independent activation of GSK-3 [31, 48-51]. Specific experiments are needed to test if this is just coincidence or if it constitutes a mechanistic relationship between the actions of amyloid beta and GSK-3 on specific molecular targets that affect neural function and plasticity.

GSK-3 Involvement in Amyloid Beta-Induced Neural Network Dysfunction. Basic and Clinical Relevance

Our observation that amyloid beta reduces beta-gamma oscillations in the entorhinal cortex, along with our previous findings that amyloid beta reduces a variety of oscillatory patterns in the hippocampus [16-18] and the medial septum [35, 52], supports the notion that amyloid beta has an early inhibitory effect on the oscillatory properties of several circuits that might ultimately be reflected in the EEG slowing observed in AD patients, which closely correlates with the cognitive decline observed in these patients [3-8]. If this interpretation is correct, finding the molecular mechanisms involved in this disruption might reveal molecular targets to either prevent or revert the cognitive dysfunction in AD. Based on our findings and those of others, one such target might be protein kinase GSK-3.

Inhibition of GSK-3 was proposed for AD therapy long ago [53-57], but our data suggest a mechanistic explanation for the beneficial effects of lithium in the early phases of the disease. The use of GSK-3 inhibitors to treat AD and other neurodegenerative diseases was originally proposed based on the assumption that GSK-3 is involved in neurodegeneration [20, 54, 56, 57]. Without discarding this well-documented possibility [20, 54, 56, 57], our results and those of others support the notion that GSK-3 might also be involved in early "functional" alterations that are not necessarily related to neurodegeneration and that might account for the early symptoms of AD [29-31]. Here, we show that the inhibition of GSK-3 prevents the amyloid beta-induced inhibition of entorhinal cortex activity, suggesting that GSK-3 inhibition might have a beneficial effect on the EEG slowing and the associated cognitive dysfunction observed in AD patients [3-8]. It has already been shown that lithium treatment modifies EEG activity [58-61], and clinical data indicate that those patients who received lithium treatment early in life are less likely to suffer from AD [62, 63]. Moreover, three clinical trials have shown a beneficial effect of lithium on the cognitive performance of AD patients [54, 64, 65].

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dorothy Pless for reviewing the English version of this paper. We also thank José Rodolfo Fernandez and Arturo Franco for technical assistance. This work was sponsored by grants (to F P-O) from DGAPA IA201511; CONACyT 151261; and from the Alzheimer's Association NIRG-11-205443.

REFERENCES

- [1] Chrobak JJ, Buzsáki G. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat *J Neurosci* 18: 388-398 (1998).
- [2] Penley SC, Hinman JR, Sabolek HR, Escabi MA, Markus EJ, Chrobak JJ. Theta and gamma coherence across the septotemporal axis during distinct behavioral states *Hippocampus* (in press) (2011).
- [3] Cohen LA, Danziger WL, Berg L. Frequency analysis of the resting awake EEG in mild senile dementia of Alzheimer type *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 55: 372-380 (1983).
- [4] Cohen LA, Danziger W, Storandt M. A longitudinal EEG study of mild senile dementia of Alzheimer type, changes at 1 year and at 25 years *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 61: 101-112 (1985).
- [5] Schreiner-Gasser U, Gasser T, Ziegler P. Quantitative EEG analysis in early onset Alzheimer's disease, correlations with severity, clinical characteristics, visual EEG and CCT *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 90: 267-272 (1994).
- [6] Dierks T, Frölich L, Ihrl R, Maurer K. Correlation between cognitive brain function and electrical brain activity in dementia of Alzheimer type *J Neural Transm Gen Sect* 99: 55-62 (1995).
- [7] Claus JJ, Kwa VL, Teunisse S, Walstra GJ, van Gool WA, Koelman JH, et al. Slowing on quantitative spectral EEG is a marker for rate of subsequent cognitive and functional decline in early Alzheimer disease *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12: 167-174 (1998).
- [8] Yoshimura M, Iotani T, Yagyu T, Iriwawa S, Yoshida T, Sugiyama M, et al. Global approach to multichannel electroencephalogram analysis for diagnosis and clinical evaluation in mild Alzheimer's disease *Neuropsychobiology* 49: 163-166 (2004).
- [9] Kowalski JW, Gawel M, Pfeffer A, Burcikowska M. The diagnostic value of EEG in Alzheimer disease, correlation with the severity of mental impairment *J Clin Neurophysiol* 18: 570-575 (2001).
- [10] Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease *Am J Pathol* 155: 853-8562 (1999).
- [11] Näsund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greenberg P, Busbaum JD. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline *JAMA* 283: 1571-1577 (2000).
- [12] Driver JE, Racca C, Cunningham MO, Towers SK, Davies CH, Whittington MA, LeBeau FE. Impairment of hippocampal gamma-frequency oscillations *in vitro* in mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP) *Eur J Neurosci* 26: 1280-1288 (2007).
- [13] Hermann D, Both M, Ebert U, Gross G, Schoemaker H, Draguhn A, et al. Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes *Neuroscience* 162: 1081-1090 (2009).
- [14] Brown JT, Teriakidis A, Randall AD. A pharmacological investigation of the role of GLUK5-containing receptors in kainate-driven hippocampal gamma band oscillations *Neuropharmacology* 50: 47-56 (2006).
- [15] Pálhalmi J, Paulsen O, Freund TF, Hájos N. Distinct properties of carbachol- and DHPG-induced network oscillations in hippocampal slices *Neuropharmacology* 47: 381-9 (2004).
- [16] Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Márquez-Ramos A, Peña-Ortega F. Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides *Peptides* 31: 1761-6 (2010).
- [17] Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity, role of Fyn-kinase *Hippocampus* 20: 78-96 (2010).
- [18] Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F. Amyloid β oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner *Curr Alzheimer Res* 7: 453-462 (2010).
- [19] Balleza-Tapia H, Peña F. Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein *Mini Rev Med Chem* 9: 724-740 (2009).
- [20] Giese KP. GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory *JUBMB Life* 61:516-21 (2009).
- [21] Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 43-55 (2007).
- [22] Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution levels and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 70-78 (1997).
- [23] Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) *I* glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5: a component of TPK *II* *Acta Neuropathol* 92: 232-241 (1996).
- [24] Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J, Combarros O. Association between glycogen synthase kinase-3 β genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease *Dement Geriatr Cogn Disord* 21: 228-232 (2006).
- [25] Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Bar-on P, Rose JB, et al. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation *J Neurosci* 27: 1981-191 (1996).
- [26] Hu S, Begum AN, Jones MR, Oh MS, Beech WK, Beech BH, et al. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals *Neurobiol Dis* 33: 193-206 (2009).
- [27] Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, et al. A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss *in vivo* *Neurobiol Dis* 35: 359-367 (2009).
- [28] Fiorentini A, Rosi MC, Grossi C, Luccarini I, Casamenti F. Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice *PLoS One* 5: e14382 (2010).
- [29] Ma T, Hoeffler CA, Capetillo-Zarate E, Yu F, Wong H, Lin MT, et al. Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease *PLoS One* 5: e12845 (2010).
- [30] Jo J, Whitcomb DJ, Olsen KM, Kerrigan TL, Lo SC, Brummer, G, et al. A β (1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3: Akt1 and GSK-3 β *Nat Neurosci* 14: 545-547 (2011).
- [31] Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shanks GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake *Neuron* 62: 788-801 (2009).
- [32] Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N, Sato K. Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase *I* glycogen synthase kinase-3 β *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6370-6375 (2003).
- [33] De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers *Neurobiol Aging* 29: 1334-1347 (2008).
- [34] Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein *Exp Neurol* 223: 322-325 (2010).
- [35] Colom LV, Castañeda MT, Bañuelos C, Puras G, García-Hernández A, Hernández S, et al. Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function *Neurobiol Aging* 31: 46-57 (2010).
- [36] Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium *Mol Interv* 4: 259-272 (2004).
- [37] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusile, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6448-6453 (1998).
- [38] Flint AC, Maisch US, Kriegstein AR. Postnatal development of low [Mg²⁺] oscillations in neocortex *J Neurophysiol* 78: 1990-1996 (1997).
- [39] Flint AC, Connors BW. Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations *J Neurophysiol* 75: 951-957 (1996).
- [40] Peña F. PACAP modulates the respiratory rhythm generated in the brainstem slice preparation *Adv Exp Med Biol* 669: 119-122 (2010).

- [41] Peña F, Alvarez-Pérez N. Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus *in vitro* *Epilepsia* 47: 47-54 (2006).
- [42] Romcy-Pereira RN, de Araujo DB, Leite JP, Garcia-Cairasco N. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns, a wavelet-based timefrequency and coherence analysis *J Neurosci Methods* 167: 384-392 (2008).
- [43] Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms *IEEE Trans Syst Man Cyber* 9: 62-66 (1979).
- [44] Chauhan NB, Lichter T, Siegel GL. Aging potentiates Abeta-induced depletion of SNAP-25 in mouse hippocampus *Brain Res* 982: 219-227 (2003).
- [45] Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, *et al.* Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents *J Neurosci* 28: 788-797 (2008).
- [46] Suh EC, Jung YJ, Kim YA, Park EM, Lee KE. A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures *Neurotoxicology* 29(4): 691-699 (2008).
- [47] Zhu LQ, Liu D, Hu J, Cheng J, Wang SH, Wang Q, Wang F, *et al.* GSK-3 beta inhibits presynaptic vesicle exocytosis by phosphorylating P/Q-type calcium channel and interrupting SNARE complex formation *J Neurosci* 30: 3624-3633 (2010).
- [48] Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation *Eur J Neurosci* 25: 81-6 (2007).
- [49] Cai F, Wang F, Lin FK, Liu C, Ma LQ, Liu J, *et al.* Redox modulation of long-term potentiation in the hippocampus via regulation of the glycogen synthase kinase-3beta pathway *Free Radic Biol Med* 45: 964-970 (2008).
- [50] Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YV, Tian Q, Wang XC, *et al.* Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments *J Neurosci* 27:12211-12220 (2007).
- [51] Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. The role of GSK-3 in synaptic plasticity *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S428-37 (2008).
- [52] Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Rouillot E, Bellessort B, *et al.* Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat *J Neurosci* 30: 10991-11003 (2010).
- [53] Engel T, Godí-Oliver P, Gómez de Barreda E, Lucas JJ, Hernández F, Avila J. Lithium, a potential protective drug in Alzheimer's disease *Neurodegener Dis* 5: 247-249 (2008).
- [54] Leyhe T, Eschweiler GW, Stransky E, Gasser T, Annas P, Basun H, Laske, C. Increase of BDNF serum concentration in lithium treated patients with early Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis* 16: 649-656 (2009).
- [55] Pomara N. Lithium treatment in Alzheimer's disease does not promote cognitive enhancement, but may exert long-term neuroprotective effects *Psychopharmacology (Berl)* 205: 169-170 (2009).
- [56] Medina M, Avila J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease *Curr Pharm Des* 16: 2790-8 (2010).
- [57] Lauterbach EC, Victoroff J, Coburn KL, Shilcutt SD, Doonan SM, Mendez MF. Psychopharmacological neuroprotection in neurodegenerative disease, assessing the preclinical data *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 22: 8-18 (2010).
- [58] Struve FA. Lithium-specific pathological electroencephalographic changes, a successful replication of earlier investigative results *Clin Electroencephalogr* 18: 46-53 (1987).
- [59] Opgenoorth E, Wolf R, Presslich O, Anderer P. Contralateral eye movements and alpha reactivity of lithium patients in recognition tasks *Pharmacopsychiatry* 20: 208-212 (1987).
- [60] Harvey NS, Jarratt J, Ward NI. Trace elements and the electroencephalogram during long-term lithium treatment *Br J Psychiatry* 160: 654-658 (1992).
- [61] Schulz C, Mavroggiorgou P, Schröter A, Hegerl U, Juckel G. Lithium-induced EEG changes in patients with affective disorders *Neuropsychobiology* 42 Suppl 1: 33-7 (2000).
- [62] Tetrao T, Nakano, H, Inoue Y, Okamoto T, Nakamura J, Iwata N. Lithium and dementia, a preliminary study *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1125-1128 (2006).
- [63] Kessing LV, Søndergård L, Forman JL, Andersen PK. Lithium treatment and risk of dementia *Arch Gen Psychiatry* 65(11): 1331-1335 (2008).
- [64] Nunes PV, Fortenla OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder *Br J Psychiatry* 190: 359-360 (2007).
- [65] Fortenla OV, Diniz BS, Radanovic M, Santos FS, Talib LL, Gattaz WF. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment, randomised controlled trial *Br J Psychiatry* 198: 351-356 (2011).

