



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Facultad de Psicología

Papel de los canales de K^+ sensibles a ATP en los efectos de la proteína beta amiloide sobre la actividad del circuito hipocampal

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Psicología
Presenta:

Javier Alberto Rodríguez Colorado

Director de Tesis:

Dr. Fernando Peña Ortega

Revisor:

Dr. Eduardo Calixto González

México D.F 2013.



RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de CIRCUITOS NEURONALES del DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA del INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA de la UNAM Y EN EL LABORATORIO 9 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA DEL CINVESTAV DEL IPN, bajo la dirección del Dr. José Fernando Peña Ortega.

Recibió la invaluable revisión, comentarios, críticas y sugerencias del Dr. Eduardo Calixto González.

Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos de CONACyT (151261), de la Alzheimer's Association (NIRG-11-205443) y de DGAPA-UNAM (IACODI1201511) otorgados al Dr. José Fernando Peña Ortega. El tesista recibió una beca de licenciatura del proyecto CONACYT 151261.

Agradecimientos

A mi madre por su total entrega a sus hijos y mi padre por el invaluable apoyo para lograr este merito que es el reflejo del amor incondicional que siempre he recibido por su parte gracias, **LOS AMO**.

Al laboratorio del Dr. Fernando Peña que desde sus inicios en el CINVESTAV me dieron la oportunidad de pertenecer a tan selecto grupo de los cuales agradezco todo mi conocimiento y en especial al Técnico Juan Javier quien me diera la confianza plena en la preparación de mis experimentos.

A mi prima Erika y Toño por darme acobijo en mis estancias cortas en Querétaro de verdad muchas gracias por ofrecerme el espacio...

A las chuladas (José Luis Ortega y Arturo Islas), a Reynaldo, Penélope, Hugo por ofrecerme su sala para lograr instalarme en Querétaro y finalizar lo que ahora muestro con orgullo.

Al hermoso estado de Querétaro por mostrarme nuevos horizontes y alejarme de mi vida mundana en el Distrito Federal.

Al Dr. Fernando Peña por abrirme las puertas en este mundo tan extraordinario del conocimiento del cerebro por su atención y dedicación en la realización de este trabajo al Dr. Benito Ordaz por su dedicación y ayuda a disipar mis dudas, muchas gracias de verdad que son un ejemplo de vida.

A todo el laboratorio **C-01** por brindarme su apoyo y conocimientos para realizar los experimentos de esta tesis que sin ellos no lo hubiera logrado, por todos esos momentos de felicidad y silencio que me dieron las herramientas para sentar las bases en mi camino como investigador.

Un especial agradecimiento a la **FES Iztacala** quien fuera la que me recibió en mi entrada a la Licenciatura en Psicología durante dos semestres y me dieron las bases para continuar mis estudios en la Facultad de Psicología a todos esos amigos y profesores de verdad gracias.

A todos mis compañeros de la Facultad de Psicología y de todas las carreras que durante toda la mi estancia me brindaron su amistad y apoyo incondicional, todos esos momentos en las islas y en todos los espacios que la UNAM nos ofrece han formado parte de mi vida. Gracias Facultad de Ciencias por brindarme su espacio de conocimiento durante un semestre.

A todos los profesores que me ayudaron en mi formación inculcando en mí sus enseñanzas e interés, gracias Lic. Ena Niño Calixto, Dr. José de Jesús González, Dra. Andrómeda Valencia; Dr. Guillermo Oscoy, Dr. Felipe Cruz, Dr. Cesar Casasola, Dr. Fernando Peña, Dr. Alfonso Escobar, Dr. Víctor Manuel Valdez, Dr. Antonio Zainos, Dr. Eduardo Calixto, Lic. Karina Simón, Dr. David García, Lic. Blanca Reguero, Dra. Irma Zaldivar, Dr. Jairo Muñoz...a todos ustedes por seguir la tradición de la enseñanza poniendo en alto el nombre de tan afamada Institución la UNAM es nuestro patrimonio y sustento.

Y por último al cosmos que me dio la vida permitiendo que tomara las decisiones correctas para abrir mi propio camino, esto apenas comienza y mi compromiso es ser símbolo de servicio a la sociedad.

Esta tesis contó con el apoyo de recursos otorgados por CONACYT 151261.

MUCHAS GRACIAS!!!...

Dedicatorias

Esta tesis está dedicada a toda mi familia y en especial a mi madre **Emma Colorado Mena** por creer en todo lo que he decidido y apoyarme sin juzgarme de verdad que todo ese amor que me has brindado es lo mas grande que he recibido. A mi padre **Francisco Javier Rodríguez Labastida** que a pesar de lo fuerte que sople el viento te has mantenido al cuidado de todos nosotros con tu trabajo y dedicación estoy logrando tantas éxitos que van enfocados a que estés orgulloso de mi y que todo lo que has sacrificado tenga un valor enorme, muchas gracias que sin tu apoyo no sería nada. Mi trabajo esta dedicado a ustedes y que nuestra familia siga creciendo.

El significado de la **UNAM** en mi vida ha sido punto importante en mi formación desde mí llegada en la preparatoria 1 Gabino Barreda y la entrada a la Licenciatura agradezco que mi trabajo sea el reflejo de una mejor sociedad y continuare trabajando **“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**.

A todos mis amigos José Hernández Sandoval (por seguir sus sueños), Ernesto Saldivar (por sus consejos), Rodrigo Rivas (por su madurez), Abel Alejandro, Celta Zamorano (el amor de mi vida), Cyntia Canales, Brenda Rojo (por su apoyo), Mariela Encinas, Juan Metales, Abraham Márquez, Reynaldo Alvarado (te debo tu estampita), Arturo Islas, Areli, Hugo Baeza, Ana Julia, Ernesto, Andrés Nieto, Karlita, Degus, Steff, Penélope, José Luis Ortega, gracias INB, a toda la banda de las islas, a los Tlachiqueros y todos los que han influido en mis pensamientos y decisiones, de verdad TLAZOCAHMATI!!!

“Cada uno tiene el máximo de memoria para lo que le interesa y el mínimo para lo que no le interesa”.

Arthur Schopenhauer

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la alteración temprana de la memoria y el deterioro progresivo de las facultades cognoscitivas que están correlacionadas con los niveles elevados de la proteína beta amiloide (P β A) en su estado soluble. Por ello, se ha propuesto que la P β A afecta las funciones cognoscitivas al alterar la actividad de varios circuitos neuronales, entre los cuales uno de los afectados en las etapas tempranas de la EA es el hipocampo, donde se observa una alteración de la actividad espontánea en la región CA1, alterando funciones como la memoria y el aprendizaje. Actualmente se sabe que la P β A desencadena una cascada de transducción la cual se ve implicada en la alteración de la actividad oscilatoria y se propone a los canales de K⁺ sensibles a ATP como un posible blanco de dicha cascada transduccional. Se ha observado en distintos modelos experimentales que los canales de K⁺ sensibles a ATP correlacionan con el deterioro causado por la P β A tanto en humanos como en ratones transgénicos. Por lo anterior, se evaluó si los canales de K⁺ sensibles a ATP participan en los efectos producidos por la P β A en el circuito hipocampal. Para ello se registró la actividad espontánea de la región CA1 en rebanadas de hipocampo obtenidas de animales de 7 a 10 semanas posteriormente se aplicó los bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles a ATP (Tolbutamida y Glibenclamida) y el activador (Diazoxida) y se agregó la P β A para observar su inhibición. Nuestros resultados muestran que los bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles ATP aumentan la actividad espontánea de la región CA1 del hipocampo y evitan la inhibición que produce la P β A sobre la misma. El abrir de los canales de K⁺ sensibles a ATP disminuye la actividad del circuito hipocampal y ocluye el efecto de la P β A sobre la misma. Estos resultados indican que la inhibición de la actividad hipocampal producida por la P β A involucra la activación de los canales de K⁺ sensibles a ATP y podría estar relacionado con las alteraciones que se observan en la EA.

(Palabras clave: Proteína Beta Amiloide, Circuito Hipocampal, Canales de K⁺ sensibles a ATP, EA)

I. Índice.

Resumen.

II. Introducción

1. Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.1 Características.....	3
1.2 Sintomatología.....	5
2. Marcadores histopatológicos de la EA.....	7
2.1 Ovillos neurofibrilares.....	7
2.2 Placas Seniles.....	7
3. La Proteína β - Amiloide y su participación en la fisiopatología de la EA.....	8
3.1 Proteína β - Amiloide.....	8
3.2 Alteraciones en la actividad eléctrica poblacional producidos por la PBA.....	12
4. El Circuito hipocampal.....	13
4.1 Características del circuito hipocampal.....	13
4.2 Actividad sincrónica en el hipocampo.....	18
5. Cascada transduccional inducida por la Proteína β - Amiloide.....	22
5.1 La enzima Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) y su participación en los efectos de la Proteína β -Amiloide.....	24
6. Canales de K^+ sensibles a ATP.....	27
6.1 Estructura de los canales de K^+	27
6.2 Canales de K^+ sensibles a ATP.....	28
III. Justificación.....	34
IV. Objetivo.....	35
V. Hipótesis.....	36
VI. Métodos y materiales.....	36
VII. Resultados.....	41
VIII. Discusión.....	46
IX. Conclusiones.....	52
X. Referencias.....	53

II. Introducción

Leo una y otra vez el mismo libro y cada vez es para mí algo nuevo (Furtmayr-Schuh, 1995).

1. La Enfermedad de Alzheimer

En Noviembre de 1901, Alois Alzheimer (Fig.1) admitió como paciente a Auguste D., de 51 años de edad, debido a que ella presentaba pérdida progresiva de la memoria, la coordinación motora, así como delirios y alucinaciones. Alzheimer describió que dicha paciente estaba desorientada espacial y temporalmente, así como confundida y ansiosa. También noto, que la paciente hablaba claramente, pero detenía la conversación como si estuviera perdida o indecisa acerca de lo que estaba diciendo. Al leer, la paciente pronunciaba las palabras como si no tuviesen significado o deletreandolas. Al escribir, la paciente repetía sílabas constantemente y omitía letras o sílabas enteras. Al dirigirse a temas específicos, la paciente evadía las preguntas o respondía con conversaciones que no tenían relación alguna con lo que se le cuestionaba. Frecuentemente, hablaba de manera espontánea, parafraseando y usando de manera inapropiada las palabras (dándole un significado erróneo) o con secuencias de palabras sin coherencia. Cuando se le mostraban objetos, la paciente no los reconocía y no sabía cómo utilizarlos (Alzheimer, 1907)

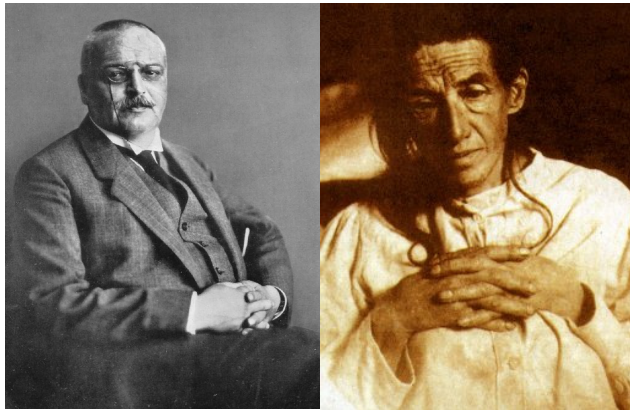


Figura 1. Foto de **Alois Alzheimer** y **Auguste D.**(tomada de http://alzheimer.medico-guia.com/wp-content/10688_9996316861.jpg, http://www.kleinlab.org/about_alzheimers.htm)

Después de la muerte de Auguste D., en abril de 1906, a los 55 años de edad, el estudio anatómo-patológico de su cerebro reveló atrofia cortical y subcortical asociada a marañas neurofibrilares y placas seniles en toda la corteza cerebral. Tales cambios histológicos fueron relacionados a la sintomatología antes descrita (Alzheimer, 1907). El 3 de noviembre de 1906, en la 37ª sesión de la Sociedad Alemana de psiquiatras del Suroeste en Tübingen, Alemania, Alois Alzheimer presentó las características clínicas y neuropatológicas de lo que Emil Kraepelin (1910), posteriormente, denominaría Enfermedad de Alzheimer (EA).

Actualmente se sabe que el curso clínico de la EA eventualmente lleva a la demencia, al daño de las funciones motoras y, finalmente, a la muerte (Palmer et al., 2002). La evolución de la EA puede prolongarse un poco más de una década, y la exacerbación progresiva de los síntomas refleja una expansión gradual de las alteraciones en la funcionalidad del cerebro (Palmer et al., 2002). En este sentido, durante la evolución de la enfermedad, las alteraciones histopatológicas se observan inicialmente en regiones límbicas, incluyendo la corteza entorrinal y el hipocampo. Después, las alteraciones se propagan a la neocorteza, para eventualmente afectar distintos núcleos subcorticales como el hipotálamo (Selkoe et al., 2003; Palmer et al., 2002).

Actualmente, la EA se define como una “patología neurodegenerativa, progresiva e irreversible, caracterizada por la alteración temprana de la memoria y el deterioro progresivo de las facultades cognoscitivas del paciente” (Terry et al., 1991; Selkoe et al., 2003). La EA es la primera causa de demencia y se estima que, como consecuencia del incremento de la población adulta mayor, en los próximos años habrá un incremento de la prevalencia de la misma (Wimo et al., 2003). De hecho, la Organización Mundial de la Salud pronostica que para el año 2050 habrá 114 millones de seres humanos con EA, en comparación con los 25,5 millones que padecían esta enfermedad en el año 2000 (Wimo , Winblad , Agüero-Torres., 2003).

La identificación de la Proteína Beta Amiloide (P β A) como el componente de las placas seniles y de la proteína tau como el componente principal de las marañas neurofibrilares marcó el inicio de la era moderna de la investigación

sobre la EA (Goedert, et al., 2006). Esta tesis está enfocada a los procesos patológicos que desencadena la P β A, pero antes describiremos las características clínicas y el diagnóstico de la EA con el fin de relacionar a esta proteína con la fisiopatología de la enfermedad.

1.1 Características y diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

Las demencias son padecimientos que se expresan más frecuentemente conforme se envejece. Un meta-análisis realizado por Lopes y Bottino (2002) revela que la prevalencia de demencia va en aumento, en todo el mundo, en relación al grupo etario. Se ha observado una prevalencia de demencia de cerca del 3% en los individuos entre los 70-75 años, de 16% entre los individuos de 80-84 años, de 38% entre los individuos de 90-94 años y del 55% para individuos mayores de 95 años. En todos los estudios analizados por estos investigadores, la EA es la causa mayor de demencia en adultos mayores, llegando incluso a encontrarse una proporción de 5 a 1 comparada con otros tipos de demencias (Lopes y Bottino, 2002).

El diagnóstico de la EA, de acuerdo con el DSM-IV, se realiza en el apartado de los trastornos de «Demencia». Ésta se caracteriza por el desarrollo de múltiple déficit cognoscitivo (que incluye el deterioro de la memoria), debidos a los efectos fisiológicos directos de una enfermedad médica, a los efectos persistentes de una sustancia o a múltiples etiologías (<biblio>). El inicio de la demencia tipo Alzheimer es gradual e implica un deterioro cognoscitivo continuo. Debido a la dificultad de obtener pruebas histopatológicas directas de la presencia de la EA (se obtienen regularmente *postmortem*) se han creado distintas herramientas para diagnosticarla como son pruebas cognoscitivas, que se utilizan rutinariamente para determinar el grado de Demencia Clínica (CDR, *Clinical Dementia Rating*; Davis & Chisholm, 1997; Haraoutunian et al., 1998). Sin embargo, dichas pruebas no son concluyentes y presentan un poder diagnóstico significativo sólo en los pacientes en etapas tardías de la EA (Davis & Chisholm, 1997; Haraoutunian et al., 1998). Recientemente esta batería de pruebas cognoscitivas ha sido asociada a la marca obtenida con “El componente-B Pittsburgh” (PiB, por sus siglas en

inglés; Klunk et al., 2004). El PiB es un compuesto capaz de unirse selectivamente a los depósitos de la P β A, en los cerebros de humanos, que puede ser detectado con tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés; Klunk et al., 2004). En el diagnóstico de la EA, también se utiliza la resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), como una técnica que permite obtener imágenes detalladas del volumen cortical, a través de la alineación magnética de los átomos de hidrógeno, sin necesidad de radiación iónica (Barber, 2010). Otro método diagnóstico para la EA, es la cuantificación de la P β A soluble y la proteína Tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Selkoe et al, 1993; Tolnay Probst, 2003; Barber, 2010). En las etapas tempranas de la EA, la concentración de la P β A en el LCR se encuentra elevada (Davis & Chisholm, 1997; Haroutunian et al., 1999) y a medida que progresa la EA, su concentración disminuye, debido a que aparecen los depósitos de la P β A insoluble en estructuras corticales (Näslund et al., Fjell et al., 2010; Barber, 2010). En combinación con la disminución en los niveles de la P β A, el aumento de la concentración de la proteína Tau en el LCR está correlacionada con el grado de avance de la EA en etapas tardías (Fjell et al., 2010; Mulder et al., 2010) La presencia de ambos marcadores en el LCR, permite diferenciar la demencia tipo EA, de otros tipos de demencias, como la demencia vascular o la demencia fronto-temporal (Fjell et al., 2010). Otra técnica ampliamente utilizada en el estudio y diagnóstico de la EA es el electroencefalograma (EEG) (Adler et al., 2003; Lee et al., 2010). En los pacientes con EA, se ha reportado un enlentecimiento del EEG que consiste en una disminución en las oscilaciones rápidas (alfa-gamma) acompañada de un incremento en las oscilaciones lentas (delta), principalmente en las regiones temporales de la corteza, así como un bajo índice de coherencia entre estructuras, lo que se asocia a una desincronización cortical (Adler et al., 2003; Lee et al., 2010). Desafortunadamente, el diagnóstico definitivo de la EA sólo se obtiene con el análisis histopatológico *postmortem* del cerebro del paciente donde se observan las marañas neurofibrilares y las placas seniles (Jalpert, 2008; Selkoe et al, 2003)

1.2 Sintomatología de la Enfermedad de Alzheimer.

Durante la evolución de la Enfermedad de Alzheimer se pueden observar tres etapas bien definidas, llamadas etapas temprana, media y tardía (Jalbert et al., 2008).

El inicio de las manifestaciones clínicas de la EA (etapa temprana) es casi imperceptible, y frecuentemente los familiares y amigos del individuo pueden considerarlo como manifestaciones comunes del proceso de envejecimiento (Salloway, 2009; Jalbert et al., 2008). Sin embargo, durante esta etapa el individuo presenta periodos de perseverancia (repite conversaciones una y otra vez), alteraciones de memoria reciente y confusión acerca de información adquirida recientemente (Salloway, 2009; Selkoe et al., 2003). De hecho, se observa un deterioro leve de las facultades cognoscitivas del paciente, con muy poco deterioro de otras capacidades (Jalbert et al., 2008; Selkoe, 2003). Por ejemplo, se pueden presentar alteraciones leves del lenguaje aun cuando las funciones motora y sensorial permanecen normales (Selkoe et al., 2003). Los individuos gradualmente desarrollan desorientación temporal (no saben la hora del día, o el día de la semana en que viven) y dificultad para realizar tareas complejas (Jalbert et al., 2008; Selkoe et al., 2003). Adicionalmente, durante esta etapa, se observan alteraciones en la conducta, tales como desinterés en actividades recreativas, apatía e inestabilidad emocional, así como desorientación espacial (perderse en lugares conocidos) y dificultad para realizar operaciones matemáticas (Selkoe et al., 2003).

En la etapa media de la EA, las manifestaciones antes descritas se hacen más evidentes y los pacientes empiezan a depender de familiares y amigos para su cuidado (Jalbert et al., 2008). En pocos años, los pacientes presentan deterioro en funciones motoras, incluyendo la capacidad para llevar a cabo tareas manuales estereotipadas (por ejemplo trabajos artesanales, escritura o dibujo), alteración del equilibrio y problemas para caminar (Jalbert et al., 2008; Selkoe et al., 2003). Además, los pacientes se ven incapacitados para vivir de manera independiente, ya que se les dificulta realizar actividades cotidianas como hacer las compras, tareas de aseo o preparación de alimentos (Jalbert et al., 2008; Selkoe et al.,

2003). Entre los síntomas neuropsiquiátricos que pueden manifestarse en esta etapa, se incluyen agresividad, reacciones emocionales exacerbadas, confusión, desórdenes de expresión emocional involuntaria, irritabilidad, alucinaciones, depresión, ansiedad, estrés, agnosia, pensamiento y lenguaje desorganizado así como deterioro de la atención (Jalbert et al., 2008; Selkoe et al., 2003; Salloway, 2009). En la etapa media, la alteración de la orientación espacial incrementa y algunos pacientes pueden incluso perderse dentro de su casa (Mayeux, 2003).

Así mismo, las alteraciones en la memoria son más evidentes, viéndose comprometida la formación de la memoria a corto plazo. En esta etapa, la memoria episódica, la memoria semántica y la memoria implícita se ven menos afectadas (Mayeux, 2003). La sintomatología de la etapa media puede mantenerse por una década o más (Jalbert et al., 2008). Durante este periodo la EA evoluciona gradualmente hasta que se presenta un grado severo de demencia en la cual la memoria a largo plazo también se ve afectada, con total desorientación y con deterioro prácticamente en todas las habilidades cognitivas (Jalbert et al., 2008).

Finalmente, en la etapa tardía, el individuo depende completamente de familiares para su cuidado. Debido a la apraxia, los pacientes tienen que permanecer en cama o moverse con ayuda de una silla de ruedas (Selkoe et al., 2003). Además, los pacientes presentan dificultad para ingerir alimentos, incontinencia intestinal y/o urinaria (Jalbert et al., 2008). Para estos pacientes es imposible realizar actividades sencillas como el aseo personal (Jalbert et al., 2008) y son incapaces de comunicarse (Jalbert et al., 2008). Sin embargo, a pesar de la pérdida de la capacidad lingüística, en periodos de lucidez breves, pueden comprender y demostrar expresiones afectivas. La severidad de la agnosia incrementa incluso hasta desconocer su propia imagen. En algunos pacientes hay desórdenes del sueño y se vuelven más susceptibles a presentar dificultades respiratorias (Jalbert et al., 2008; Selkoe et al., 2003), lo que eventualmente lleva a la muerte (Selkoe et al., 2003).

2. Marcadores histopatológicos de la EA

2.1 Ovillos neurofibrilares

Las marañas u *ovillos* neurofibrilares están constituidos de filamentos helicoidales apareados que se encuentran dentro del cuerpo de las neuronas y en sus dendritas proximales (Fig. 2). Los filamentos helicoidales apareados están formados por la isoforma no soluble de la proteína asociada a microtúbulos TAU (Iqbal, Wisniewski, Shelanski et al., 1974; Grundke-Iqbal, Iqbal, Quinlan et al., 1986). La proteína TAU deja su conformación soluble, durante la EA, al encontrarse hiperfosforilada (Grundke-Iqbal, Iqbal, Tung et al., 1986), lo que compromete su función estructural en el citoesqueleto (Grundke-Iqbal, Iqbal, Quinlan et al., 1986). La afectación de la proteína TAU compromete también el transporte axonal, lo que eventualmente mata a las neuronas que dejan tanto sus cadáveres como sus marañas neurofibrilares en el líquido intersticial, donde interactúan con agregados de la P β A para formar las placas seniles (Selkoe et al., 1996). Las marañas u *ovillos* neurofibrilares se pueden observar en un primer momento en la corteza entorrinal y el hipocampo, para luego extenderse al resto de la neocorteza (Braak, 1991).

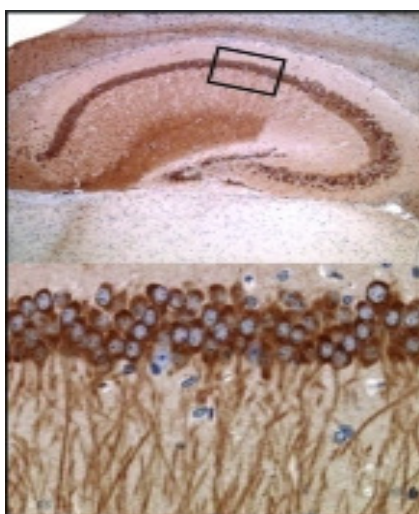


Figura 2 Marañas neurofibrilares. Se observa el hipocampo (y un acercamiento de la región CA1) con las marañas u *ovillos* neurofibrilares marcados con la técnica de inmunohistoquímica. El color café muestra agregados de la proteína TAU, en estado hiperfosforilado. (Modificado de Paulson B, Ramsden M, Forster C et al 2008).

2.2 Placas Seniles

Las placas seniles están formadas principalmente por la agregación extracelular de la P β A (Fig.3; Glenner, Wong, 1984). Se han observado dos tipos

principales de placas seniles en los cerebros de los enfermos de la EA: las placas neuríticas y las placas difusas (Wang et al., 2004; Selkoe et al., 1996). Las placas neuríticas contienen agregados densos de fibrillas de amiloide que están rodeadas por axones y dendritas (neuritas) distróficos, así como de astrocitos y microglía (Morris 1995 citado en Wang et al., 2004; Selkoe et al., 1996). Las placas difusas contienen amiloide no estructurado que no está rodeado por restos neuronales (Wang et al., 2004). Las placas amiloideas se encuentran en zonas cerebrales específicas: En la etapa temprana de la EA aparecen en las estructuras mediales del lóbulo temporal, la corteza entorrinal y el hipocampo. En la fase tardía de la enfermedad las placas aparecen en las áreas asociativas temporales y en la corteza parietal (Braak,1992).

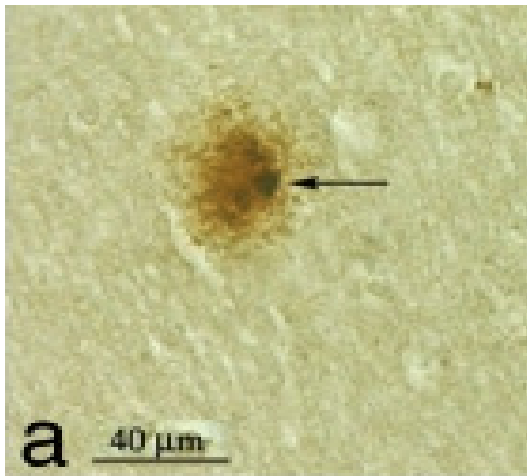


Figura 3 Placas seniles. Se observa una imagen de microscopia de luz con la tinción de inmunoperoxidasa se observa con una flecha agregados de P β A, uno de los marcadores característicos presentes en la EA (Modificado de Khan A, Xiao, Banwait S et al 2007)

3. La Proteína β - Amiloide y su participación en la fisiopatología de la EA

3.1 La Proteína β - Amiloide

Cuando Alois Alzheimer describió las características histológicas del cerebro de su paciente Auguste D. encontró las llamadas placas seniles que están formadas por agregados proteicos extracelulares de la P β A (Gleneer; Wong, 1984). La P β A es un péptido cuyas formas más comunes se constituyen de 40 a

42 aminoácidos (Selkoe et al., 2001). Estas proteínas se forman mediante la degradación proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés) (Selkoe et al., 2001). La APP es una proteína transmembranal que se codifica en un gen localizado en la región intermedia del brazo largo del cromosoma 21 (Coria, et al., 1994). La APP contiene un dominio extracelular, relativamente largo y un dominio intracelular pequeño (Turner et al., 2003). Existen varias isoformas de esta proteína, que constan de entre 751 y 770 aminoácidos, y que son expresadas en cualquier tipo celular (Turner et al., 2003). En el cerebro, la isoforma predominante de la APP tiene 695 aminoácidos y es casi exclusiva de las células neuronales (Turner et al., 2003; Peña et al., 2006; Selkoe et al., 2001; Annaert, 2002). Sin embargo, existe una variante, conocida como APPican, que se expresa exclusivamente en astrocitos (Annaert, 2002; Turner et al., 2003).

La APP tiene una vida media relativamente corta (de 45 a 60 minutos), durante la cual es procesada por distintas vías proteolíticas (Selkoe et al., 2001; Annaert, 2002). En general, existen dos vías de degradación de la APP, conocidas como vía *no* amiloidogénica y la vía amiloidogénica (Fig.4) (Selkoe et al., 2001; Annaert, 2002).

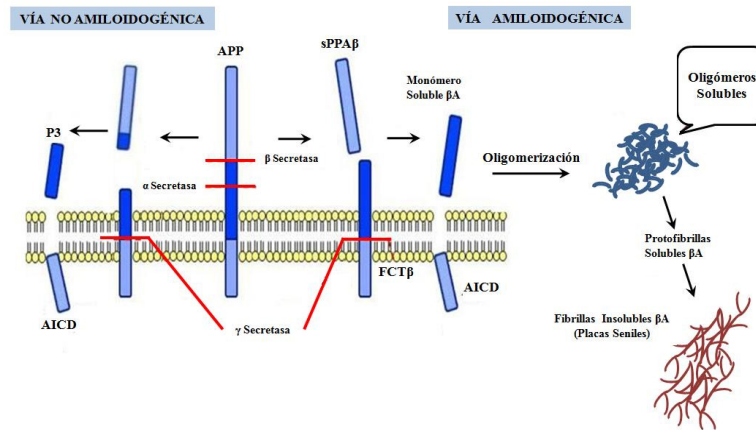


Figura 4. Vía metabólica de degradación de la APP. Vía no amiloidogénica: La proteólisis del dominio transmembranal por la α secretasa libera un fragmento soluble (sAPP α), derivado del segmento amino-terminal, al espacio extracelular. Por su parte la γ secretasa rompe el fragmento carboxilo terminal y libera el péptido intracelular AICD y el residuo p3. Vía amiloidogénica: La enzima β secretasa rompe a la APP en el dominio extracelular y libera un fragmento soluble (sAPP β). La γ secretasa rompe el fragmento carboxilo terminal (FCT), para liberar un dominio intracelular (AICD) y al péptido β A al espacio extracelular. Una vez producido el péptido β A, éste tiende a agregarse en el espacio extracelular formando inicialmente oligómeros solubles y, eventualmente, formas fibrilares (Modificado de Wilquet V. 2004; Iwata N. 2005.)

La vía amiloidogénica de degradación de la APP involucra la proteólisis producida por la β -secretasa (Annaert, 2002; Wilquet, 2004), que genera un fragmento amino terminal que permanece asociado a la membrana (Selkoe et al., 2001; Wilquet, 2004; Turner et al., 2003). Este último fragmento es hidrolizado por la γ -secretasa, lo que genera la P β A de 40 o 42 aminoácidos y un residuo que se libera al citoplasma conocido como AICD. Una vez formada la P β A, especialmente la isoforma de 42 aminoácidos, se produce su agregación en oligómeros solubles y, eventualmente, en protofibrillas que se depositan en el espacio extracelular formando las placas seniles o neuríticas (Figura 3; Wilquet, 2004; Turner et al., 2003).

Antes de revisar los efectos patológicos producidos por la P β A, es importante mencionar que esta proteína es producida constantemente y se encuentra en el líquido intersticial, el líquido cefalorraquídeo y en la sangre de individuos sanos (Selkoe et al., 2001). De hecho, diversos investigadores han demostrado que la P β A juega un papel fisiológico en condiciones normales. Se ha propuesto que la P β A podría actuar como un regulador de la función de canales iónicos y de receptores neuronales (Esteban, 2004). En un estudio realizado por Kamenetz et al. (2003), se demostró que la actividad neuronal modula la formación y secreción de P β A en rebanadas de hipocampo. Cuando hay un incremento en la actividad neuronal se promueve la formación de P β A y la formación de P β A deprime la función sináptica. Se ha planteado que la falla en esta función homeostática podría llevar a la alteración de la actividad neuronal y eventualmente a la EA (Kamenetz et al., 2003; Cirrito et al, 2005).

Una vez que la P β A se encuentra incrementada en solución, tiende a desarrollar un proceso de agregación que lleva a la formación secuencial de oligómeros solubles, fibrillas solubles y eventualmente fibrillas insolubles (Wilquet, 2004; Iwata et al., 2005). Diversos investigadores han reportado que los oligómeros solubles de la P β A, a concentraciones nanomolares, están involucrados en el deterioro de las funciones del sistema nervioso y en la generación de los síntomas iniciales de patologías como la EA (Lue et al, 1999; Näslund et al, 2000). De la misma forma, otros estudios muestran que la cantidad

de oligómeros solubles de bajo peso molecular de P β A está correlacionada con el grado de deterioro cognoscitivo en pacientes que presentan demencia temprana (Tabla I; Lue et al, 1999; Näslund, 2000; Peña et al., 2006). Recientemente, se han revelado varios de los mecanismos celulares que participan en las alteraciones cognoscitivas producidas por la P β A. Entre éstos podemos incluir alteraciones en la excitabilidad neuronal (Wilquet et al, 2004; Koffie, 2009), alteraciones en la transmisión sináptica y en su plasticidad (Walsh et al, 2002; Wilquet, 2004; Balleza-Tapia et al., 2010) y, eventualmente, la neurotoxicidad (Wilquet et al, 2004). Sin embargo, existen dos mecanismos celulares que han sido relacionados con las capacidades cognoscitivas y que podrían ser la base de los efectos nocivos de la P β A. El primero es el fenómeno plástico denominado Potenciación de Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y el segundo es la generación de Patrones de Oscilación Poblacional en diversos circuitos neuronales. En cuanto al primero, hay reportes que indican que la P β A disminuye la generación de la LTP, tanto *in vivo* como *in vitro*, en diversas estructuras como el hipocampo, la corteza y la amígdala (Walsh et al, 2002; Wang et al, 2004). Sin embargo, hay también muchos reportes que no han podido corroborar dichos hallazgos (Cullen et al., 1996; Hsia et al., 1999; Fitzjohn et al., 2001; Sun, 2002), e incluso existen evidencias de que la P β A aumenta la inducción de la LTP tanto *in vitro* (Wu 1995; Koudinov, 2004), como en ratones transgénicos *in vivo* (Parent 1999; Jolas 2002). En vista de que la P β A produce efectos contradictorios sobre la LTP y que estos efectos no se asocian necesariamente al deterioro cognoscitivo que ésta produce (Peña et al., 2006), últimamente se ha expandido el estudio de los efectos de la P β A a la generación de patrones oscilatorios por distintos circuitos neuronales. Por ejemplo, recientemente, Scott y colaboradores (2012), encontraron alteraciones en la generación de distintos patrones oscilatorios poblacionales en el hipocampo de roedores transgénicos que sobreproducen la P β A y presentan deterioro cognoscitivo. Este tipo de hallazgos, así como los de nuestro propio grupo de trabajo que demuestran que la aplicación directa de la P β A altera las oscilaciones poblacionales en el hipocampo y la corteza entorrinal, nos permiten sugerir que la P β A altera la actividad eléctrica poblacional y que esto

podiera estar asociado al deterioro cognoscitivo que la P β A produce (Peña et al., 2010; Colom et al., 2010; Villette et al., 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012).

Niveles de PBAx-42 en diferentes regiones corticales como funcion de severidad de demencia

CDR Score	Frontal	Temporal	Entorhinal	Parietal	Visual	P Value†
	A β x-42					
0.0	475 (162)	196 (64)	121 (43)	87.5 (29)	164 (34)	
0.5	754 (237)	225 (56)	768 (274)	412 (97)	432 (151)	.32
1.0	1088 (164)	267 (71)	1487 (289)	394 (79)	482 (117)	.009
2.0	2003 (465)	723 (253)	1136 (316)	544 (85)	627 (203)	<.001
5.0	2180 (276)	2329 (492)	2015 (324)	1926 (300)	1425 (286)	<.001

Tabla I. Relación entre los niveles de la P β A 1-42 en estado soluble y la severidad de la demencia en diferentes regiones corticales. La tabla muestra que a mayor *score* de demencia, mayor es la concentración de oligómeros de P β A solubles presentes en la corteza de pacientes previamente diagnosticados. La severidad de demencia fue asignada según los resultados del Clinical Dementia Rating (CDR), donde el score de 5.0 representa la demencia más severa. Las concentraciones de P β A están expresadas en picomoles/gramo de tejido (Modificado de Näslund et al. 2000).

3.2 Alteraciones en la actividad eléctrica poblacional producidas por la P β A

Como ya se mencionó, el deterioro cognoscitivo temprano de la EA correlaciona fuertemente con la cantidad de los oligómeros solubles de la P β A medida en los cerebros de pacientes con EA *postmortem* (Näslund et al., 2000). Estos hallazgos obtenidos en pacientes con EA, han sido corroborados en líneas de ratones transgénicos que expresan una patología tipo EA (Mucke et al., 2000; Koffiea, 2009). En dichos animales, se ha observado que el decremento en terminales presinápticas, asociado al deterioro cognoscitivo, es críticamente dependiente de los niveles de P β A soluble en la corteza y no de los niveles de APP o la formación de placas (Mucke et al., 2000). Dado que, adicionalmente, las placas amiloideas han sido observadas en individuos sanos y que parecen ser producidas tardíamente (Maccioni et al., 2010; Balleza-Tapia et al, 2010), se ha propuesto que los oligómeros solubles de la P β A son los responsables del

deterioro cognitivo temprano en la EA y que las placas seniles podrían tener incluso una función neuroprotectora (Maccioni et al., 2010). De acuerdo a lo planteado en las líneas anteriores, se ha observado que los oligómeros solubles de P β A son capaces de alterar el funcionamiento de los circuitos neuronales y provocar deterioros cognitivos antes de causar muerte neuronal (Peña et al, 2006).

La generación de patrones de actividad sincrónica poblacional, tales como los ritmos theta (4–7 Hz) y gamma (25–70 Hz), está involucrada con la cognición (Palva, 2005). La sincronización asociada a estos ritmos cerebrales constituye un mecanismo fundamental para la comunicación coordinada entre redes locales o redes distribuidas espacialmente en el cerebro, lo que permite la comunicación dentro y a través de diferentes circuitos neuronales así como mecanismos de integración de la información durante los procesos cognoscitivos (Schnitzler, 2005; Palva, 2005). En este sentido, los procesos anormales de sincronización podrían perjudicar las funciones cerebrales normales (Palva, 2005), lo que puede ser observado en muchos desordenes neuropsiquiátricos, incluyendo las demencias (Schnitzler, 2005). De hecho, los deterioros cognoscitivos en la EA están asociados a una disminución generalizada de la sincronización de oscilaciones alfa (7–14 Hz), beta (14–25 Hz) y gamma (25–70 Hz), concomitante con un incremento de sincronización de actividad delta 2-4 Hz (Schnitzler, 2005). Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento agudo de rebanadas de cerebro con P β A, así como su administración aguda intracerebral, afecta la actividad sincrónica poblacional en el hipocampo (Peña, et al 2010; Balleza-Tapia et al., 2010; Adaya-Villanueva et al., 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012).

4. El circuito hipocampal

4.1 Características del circuito hipocampal

El hipocampo se localiza en la parte medial e interna del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical (Amaral, 1989). La formación del hipocampo se compone de cuatro regiones de la arquicorteza relativamente simples (Fig. 5). Éstas incluyen la

circunvolución dentada y a las tres subdivisiones del hipocampo propiamente dicho: los subcampos llamados CA3, CA2 y CA1, además del complejo subicular que, a su vez, también está dividido en 3 partes (subículo, presubículo y parasubículo) (Amaral, 1989). El hipocampo está en íntima relación tanto anatómica como funcional con la corteza entorrinal (CE) que, especialmente en los roedores, se divide en subdivisiones medial y lateral (Amaral, 1989).

El hipocampo tiene una forma de C en un corte coronal. El contorno del mismo, asemeja un cuerno de carnero y por eso, en ocasiones, es llamado cuerno de Ammon, que es el nombre de una deidad Egipcia con cabeza de carnero (Lewis, 1923). La superficie ventricular del hipocampo está formada por una capa delgada de sustancia blanca llamada *alveus* (Douglas, 1967).

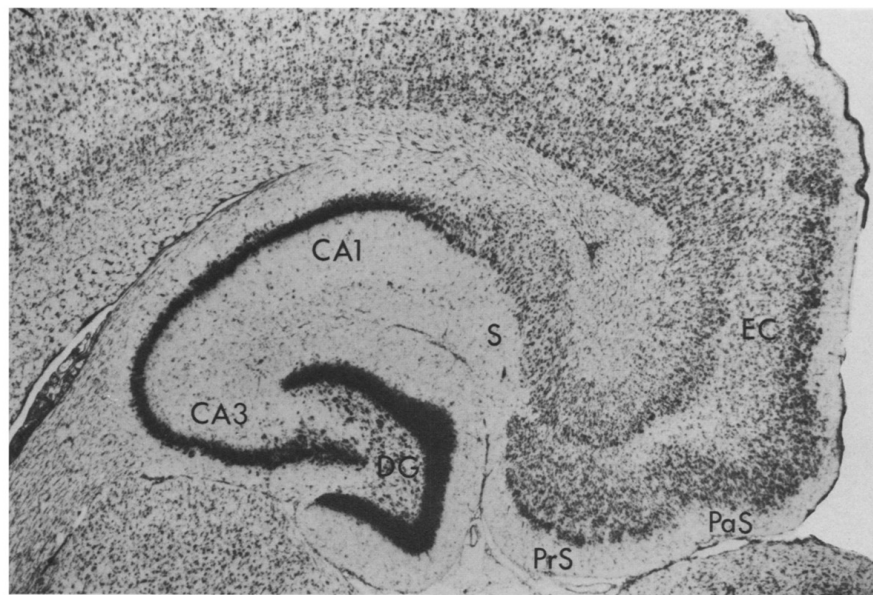


Figura 5. Microfotografía de una sección horizontal de la formación del hipocampo de rata. La formación del hipocampo se compone de cuatro regiones distintas en su citoarquitectura: la corteza entorrinal (EC), el giro dentado (DG), el hipocampo propiamente dicho (dividido en campos CA3 y CA1) y el complejo subicular que se subdivide en subículo (S), presubículo (PrS) y el parasubículo (PaS). (Modificado de Amaral et al, 1989)

A principios de los años 70s, Andersen y colaboradores propusieron que las vías principales de excitación de la formación del hipocampo se organizan de forma laminar. Esta propuesta, basada en gran medida en estudios fisiológicos

sugiere que “una fuente puntual de las proyecciones de la actividad de los impulsos en la corteza entorrinal se transmite a través de la vía de la formación del hipocampo a lo largo de sus divisiones o laminas” (Andersen et al, 1971). La “hipótesis laminar” de la organización anatómica del hipocampo ha tenido enorme influencia en la conceptualización del procesamiento de información del hipocampo y fue responsable, en gran medida, del establecimiento de las aproximaciones al estudio del hipocampo *in vitro*, que utilizan rebanadas de cerebro para poder estudiar al mismo (Andersen et al, 1971). Sin embargo, más recientemente, se ha mostrado que todas las fibras intrahipocampales son mucho más divergentes de lo planteado por la teoría laminar (Andersen et al, 1971).

La corteza entorrinal (CE), es la mayor fuente de entrada de información al hipocampo y es el blanco de salida de la información que surge del mismo. La CE tiene, a su vez, interconexión con muchas otras partes de la corteza cerebral. Por ello, se ha propuesto que la CE sirve como la principal interfase entre el hipocampo y otras partes del cerebro (Andersen et al, 1971; Amaral, 1989). De hecho, el hipocampo recibe sólo un pequeño número de conexiones directas desde las áreas neocorticales, siendo la CE una zona de convergencia de las proyecciones de la neocorteza, en donde la información se recibe y procesa, seleccionando las entradas más relevantes para ser enviadas, posteriormente, a todas las áreas del hipocampo (Andersen et al, 1971; Amaral, 1989).

Desde el estudio realizado por Raisman y colaboradores (1965) se demostró que la CE es el origen de la vía perforante que se dirige al giro dentado y a todo el hipocampo. El giro dentado se divide en tres capas: la capa molecular, en donde se originan las fibras musgosas, la capa de las células granulares que está poblada por el principal tipo celular del giro dentado y una capa profunda o polimórfica que está poblada por una variedad de tipos interneuronales (Amaral, 1989).

Las células granulares dan lugar a las fibras musgosas que proyectan colateralmente a la capa polimórfica antes de entrar en el campo CA3 donde hacen sinapsis en las dendritas proximales de las células piramidales dejando

botones musgosos (Amaral, 1989). Las células de la capa polimórfica dan lugar a por lo menos dos sistemas de conexiones asociativas que regresan a las neuronas granulares (Amaral, 1989).

Las células que proyectan del hipocampo son las neuronas piramidales que se agrupan en la capa que recibe su nombre (Amaral, 1989). En lo profundo de la capa de las células piramidales se encuentra el “stratum oriens” en donde las dendritas basales de las células piramidales descienden y coexisten con una serie de neuronas no piramidales (Amaral, 1989). La región en que se encuentran las dendritas apicales de las células piramidales se divide en un estrato más profundo el *radiatum* y un estrato superficial el *lacunosum-moleculare* (Swanson et al., 1980). En CA3, la región justo por encima de la capa de las células piramidales contiene las fibras musgosas del giro dentado y se llama estrato lúcido, (ver figura 6; Swanson et al., 1980). Las células piramidales de CA3 tienen axones de asociación colaterales que proyectan dentro de CA3 y dan lugar a la mayor entrada de CA1, las llamadas colaterales de Schaffer (Swanson et al., 1980)

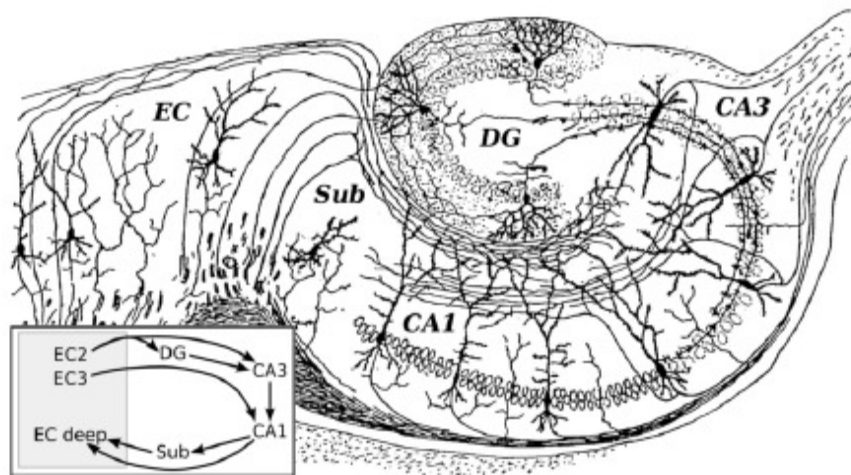


Figura 6. El circuito del hipocampo y la corteza entorrinal. Se observa en este esquema clásico de Ramón y Cajal como la Corteza entorrinal (EC) proyecta hacia el giro dentado (DG), éste hacia la capa CA3 y esta a su vez proyecta hacia la capa de CA1 y después hacia el Cubículo (Sub) para regresar hacia la EC. También se pueden observar otras proyecciones que pueden ir directas de la EC a CA3 sin pasar por el DG o de la EC al campo CA1 así como de CA1 a la EC. (Modificado de Ramón y Cajal, 1911).

En el hipocampo, el flujo de información es en gran medida unidireccional, con señales que se propagan a través de una serie de capas de células muy

empaquetadas, primero en el giro dentado, luego a la capa CA3, para continuar a la capa CA1 después al subículo y de ahí de regreso a la CE. La conectividad interna en el hipocampo se ha simplificado en lo que se conoce como el circuito trisináptico (Witter, 2004). Este circuito incluye la “vía perforante” que proyecta hacia el giro dentado, posteriormente las fibras musgosas que proyectan al campo CA3 y finalmente el objetivo de las colaterales de Schaffer en las neuronas piramidales del campo CA1 (Witter, 2004).

Las conexiones aferentes del hipocampo proceden de las cortezas entorrinal, de la parahipocámpica posterior y de la prepiriforme, así como del núcleo central de la amígdala (Snell, 2007). También hay información que llega de la corteza cingular, de los núcleos del *Septum* y el hipotálamo (Snell, 2007). El *Septum* y los núcleos de la banda diagonal de Broca proyectan por el fórnix al cuerno de Amón, el giro dentado y el subículo (Snell, 2007). El hipotálamo ventricular lateral y supramamilar y el núcleo talámico anterior, este último por intermedio del cíngulo, también proyectan al hipocampo (Snell, 2007). Otras aferencias al hipocampo provienen de la parte rostral del mesencéfalo, el núcleo interpenduncular y el *locus coeruleus*, así como el núcleo reticular superior central dorsal del rafe y el dorsal tegmental (Snell, 2007).

Las conexiones eferentes del hipocampo, además de su proyección de regreso a la CE, emergen para formar el *alveus* y la fimbria (Snell, 2007). La fimbria continúa como el pilar del fórnix (Snell, 2007). Los dos pilares convergen para formar el cuerpo del fórnix. El cuerpo del fórnix se divide en las dos columnas del fórnix, que se curvan hacia abajo y por delante de los forámenes interventriculares. Dentro del fórnix las fibras se distribuyen a las siguientes regiones:

1. Algunas fibras se dirigen hacia atrás hasta la comisura anterior para entrar en el tubérculo mamilar donde terminan en el núcleo medial.
2. Algunas fibras se dirigen hacia atrás hasta la comisura anterior para terminar en los núcleos anteriores del tálamo.

3. Algunas fibras se dirigen hacia atrás hasta la comisura anterior para entrar en el tegmentum del mesencéfalo.
4. Algunas fibras se dirigen hacia adelante hasta la comisura anterior para terminar en los núcleos septales, el área preóptica lateral y la parte anterior del hipotálamo.
5. Algunas fibras se unen con la estría medular del tálamo para alcanzar los núcleos habernulares (Snell, 2007).

4.3 Actividad sincrónica en el hipocampo

Se usa el término «oscilación» o «actividad oscilatoria» para referirse a las fluctuaciones rítmicas de los potenciales de campo de un grupo neuronal (potenciales de campo local) o de una región cortical (EEG, electroencefalograma), pero también al patrón de descarga rítmico de los potenciales de acción de una neurona o un grupo neuronal (Artieda et al., 2009). Existe un acuerdo general en que la actividad oscilatoria constituye un mecanismo básico del funcionamiento cerebral (Fig. 7). La actividad oscilatoria aparece a diferentes niveles cerebrales, participando en procesos perceptivos, cognitivos y motores (Artieda et al., 2009). La actividad oscilatoria y la sincronización son fenómenos distintos, aunque asociados. La actividad oscilatoria facilita la sincronización de la descarga de potenciales de acción de grupos neuronales o áreas corticales, cercanas o distantes (Artieda et al., 2009).

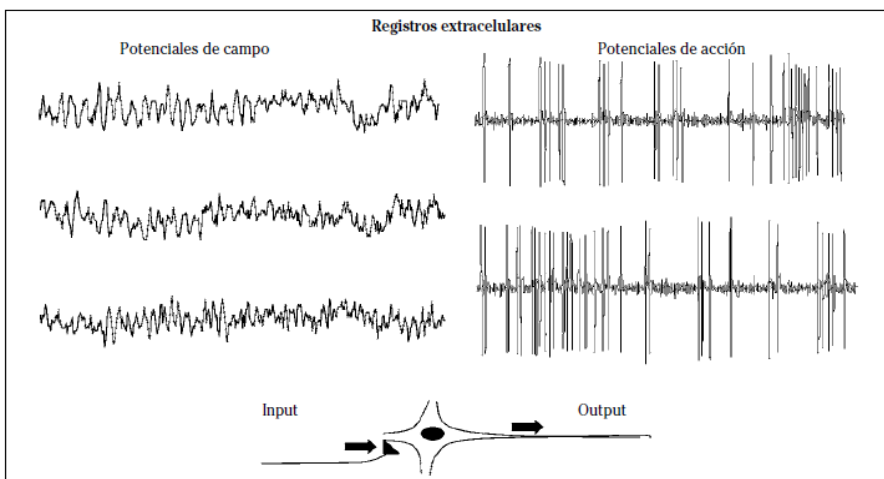


Figura 7. Diferencias entre el comportamiento oscilatorio de los potenciales de campo local (izquierda) y los potenciales de acción (derecha). En ambos casos se utiliza el término oscilación para

expresar fenómenos fisiológicamente diferentes. Las oscilaciones de los potenciales de campo expresan mayoritariamente la aferencia a un núcleo y son fruto de la suma de potenciales postsinápticos mientras que los potenciales de acción expresan la eferencia (Artieda et al., 2009)

Existen múltiples mecanismos capaces de generar actividad neuronal oscilatoria. El más simple consiste en la descarga rítmica espontánea de una o un conjunto de neuronas, como ocurre en las células del sistema de conducción cardiaco (Artieda et al., 2009). Sin embargo, la actividad oscilatoria puede ser generada más fácilmente mediante circuitos neuronales. En estas redes juegan un papel fundamental las interneuronas inhibitoras (Artieda et al., 2009). Se ha demostrado que en presencia de antagonistas a los receptores ionotrópicos a glutamato un grupo de interneuronas acopladas sinápticamente pueden disparar potenciales de acción a frecuencias beta y gamma gracias a la generación de potenciales postsinápticos inhibitorios que pueden sincronizarlas (Wang et al., 1996). De la misma forma, el bloqueo de los componentes de frecuencia beta y gamma de la actividad de campo con antagonistas a los receptores GABA_A, demuestra la participación de las interneuronas GABAérgicas en su generación, por lo que, en el hipocampo, las redes locales de interneuronas son indispensables para el inicio, la regulación y la sincronía de la actividad oscilatoria (Cobb et al, 1995., Fishan et al., 1998). Sin embargo, el mecanismo específico con el cual las interneuronas contribuyen a estos ritmos es más complejo, ya que diferentes subtipos de interneuronas en el hipocampo y en la corteza, participan con diferentes frecuencias de disparo a la dinámica del circuito y, además, modulan diferencialmente a las células piramidales excitadoras de acuerdo a las proyecciones diferenciales que establecen sobre las mismas (Somogy, 2005)

Hans Berger introdujo la costumbre de indicar la frecuencia de las oscilaciones cerebrales con diferentes letras griegas (citado en Restrepo et al., 2006). Por convención, el término ritmo alfa se refiere a las frecuencias entre 8- 13 Hz, el ritmo beta a las frecuencias entre 14-30 Hz, el ritmo delta a las frecuencias de 0.5-3.0 Hz, los ritmos theta a las frecuencias de 4-10 Hz y los ritmos gamma a las frecuencias de 30-100 hz, (Restrepo et al, 2006; Artieda et al., 2009). A

continuación, enfocaremos nuestra atención a los ritmos theta y gamma debido a su importancia en procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria.

Las oscilaciones theta (4-10 hz) representan el estado “en línea” del hipocampo (Buzsaki, 2002). Este ritmo es esencial para la codificación/decodificación temporal de los conjuntos activos de neuronas (ensambles neuronales) y las modificaciones sinápticas (Buzsaki, 2002; Bliss, 1973; Jutras, 2010). Las ondas theta son más regulares en frecuencia y mayores en amplitud en el stratum lacunosum de la región CA1 del hipocampo (Buzsaki, 2002). Por otra parte, en el hipocampo, las oscilaciones gamma (30-100 hz) dependen de las interacciones entre las redes inhibitorias y las conexiones locales colaterales de las células piramidales (Csicsvari et al., 2003; Hajos, Paulsen, 2009). Las oscilaciones gamma pueden afectar a la transmisión de señales por dos mecanismos distintos. En primer lugar las oscilaciones gamma pueden proporcionar ganancia en la modulación de las entradas a través de la influencia de la inhibición en la red de neuronas principales. Esto, debido a que las oscilaciones gamma se derivan de la fuerte inhibición de las redes perisomáticas de interneuronas locales (Csicsvari et al., 2003; Hajos, Paulsen, 2009). En consecuencia, las oscilaciones gamma pueden promover la interacción entre las neuronas que producen los cambios sinápticos que se creen necesarios para los procesos cognitivos (Csicsvari et al., 2003; Hajos, Paulsen, 2009).

Existe evidencia que sugiere que la sincronización de la actividad neuronal en los ritmos theta y gamma es funcionalmente relevante en muchas funciones cerebrales. Por ejemplo, Rodríguez y colaboradores (1999) demostraron que la sincronización precisa de descargas neuronales en el rango de las frecuencias theta y gamma están involucradas en las funciones cognitivas como la percepción. Además, estas oscilaciones son necesarias para la integración intermodal (Roelfsema et al., 1997), la atención selectiva, (Muller et al., 2000), la memoria a corto plazo (Tallon-Baudry et al., 1998) y el aprendizaje asociativo (Gruber et al., 2001). Estos datos sugieren que la sincronización en el rango de frecuencias theta y gamma juega un rol importante en el aprendizaje y la memoria.

Consecuentemente, las anomalías en la sincronización de las frecuencias beta y gamma están implicadas en muchos desórdenes incluida la EA (Uhlhaas y Singer 2006). Como ya se mencionó, en un estudio de Schnitzler A. (2005) se demostró que los deterioros cognitivos presentes en la EA están ampliamente asociados a una disminución generalizada de la sincronización de las oscilaciones rápidas (theta, gamma, alfa y beta) con un concomitante incremento de la sincronización de actividad delta. Se ha demostrado también que los efectos nocivos de la P β A en los procesos cognitivos están relacionados con alteraciones en las oscilaciones neuronales (Sun, 2002). Estos efectos podrían representar la base neuropatológica para el deterioro cognitivo observado durante las etapas iniciales de la EA (Cullen et al, 1997; Stephan et al, 2001; Walsh et al, 2002).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el tratamiento agudo de rebanadas de cerebro con P β A, así como su administración aguda intracerebroventricular, afecta las oscilaciones theta y gamma en el hipocampo (Peña et al., 2006; Balleza-Tapia et al., 2010; Peña et al., 2010; Adaya-Villanueva et al., 2010; Peña-Ortega y Bernal-Pedraza, 2012). En los últimos años, nuestro grupo de trabajo también ha estudiado los mecanismos bioquímicos que participan en esta inhibición de las oscilaciones de la actividad hipocampal producida por la P β A y ha descubierto una cascada transduccional que se describe a continuación (Balleza-Tapia et al., 2010).

5. Cascada transduccional involucrada en la inhibición de los ritmos hipocampales producida por la Proteína β - Amiloide.

Una gran cantidad de estudios bioquímicos muestran que la P β A se puede unir a varios tipos de receptores de membrana y puede activar diferentes vías de señalización a través de ellos (Verdier; Penke, 2004; Verdier; Zarandi, 2004; Balleza-Tapia, Peña, 2009). Tales receptores incluyen: a) receptores ionotrópicos como el receptor de glutamato tipo-NMDA y los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), b) receptores acoplados a proteínas G como el receptor de péptidos formil tipo-1 (FPRL1), c) receptores de adhesión, como las integrinas, d)

receptores para citocinas como el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) y el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNF-R1), e) los receptores con actividad de tirosina cinasa, como los receptores de la insulina (R1), y f) varios receptores involucrados en la respuesta neuroinmune (Verdier; Penke, 2004; Verdier.; Zarandi, 2004; Balleza-Tapia, Peña, 2009).

Para los propósitos de esta tesis se enfocara a las integrinas y a la cascada de transducción que desencadenan, pues resultados de nuestro laboratorio indican que la P β A afecta la actividad oscilatoria del hipocampo a través de la activación de esta vía transduccional (Fig.8; Balleza-Tapia y Peña, 2010). Las integrinas son miembros de una superfamilia de glicoproteínas de membrana que se expresan en todos los tipos celulares (Denda, 2007). Éstas proteínas forman heterodímeros compuestos de subunidades α y β que actúan como receptores de las proteínas de la matriz extracelular y receptores de las células adyacentes (Denda, 2007). Las interacciones célula a célula son necesarias para la supervivencia de las células y la alteración en estas interacciones pueden afectar la función celular e incluso desencadenar la apoptosis (Caltagarene, 2007).

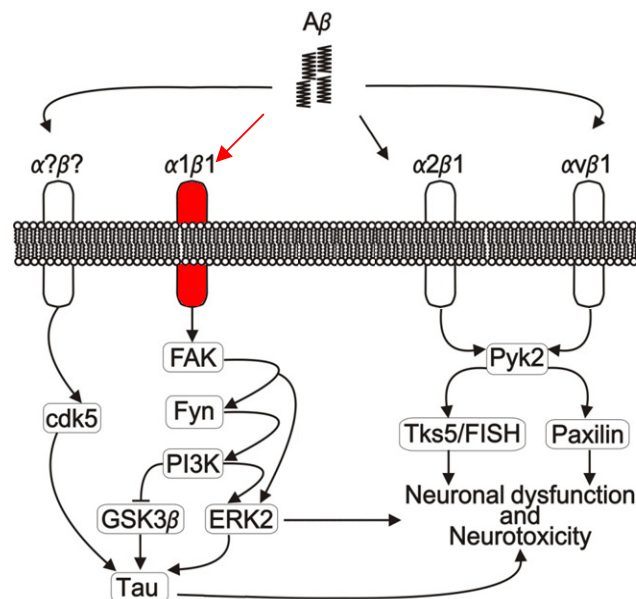


Figura 8. Interacción de la P β A con las integrinas y el mecanismo transduccional involucrado. Se puede observar en este esquema cuatro integrinas que interactúan con la P β A y las cascadas transduccionales que desencadenan. Resulta interesante para esta tesis que el receptor que

conforman las subunidades $\alpha 1\beta 1$ (rojo) induce una cascada transduccional que parece ser la involucrada en los efectos deletéreos que produce la P β A sobre la actividad hipocampal (modificado de Balleza-Tapia, Peña, 2009)

La P β A se une a las integrinas en un dominio compuesto por la secuencia de aminoácidos Arg-His-Asp-Ser (Guiso, 1992; Sabo, 1995). Además, las integrinas, y las vías intracelulares que desencadenan, se han relacionado con la fisiopatología de la EA. Por ejemplo, las integrinas se co-localizan con las placas seniles y las neuritas distróficas en los pacientes con EA, así como en modelos de animales transgénicos de ésta enfermedad (Akiyama, 1991; Eikelenboom, 1994; Van Gool, 1994). En lo que respecta a la interacción de la P β A con las integrinas, se ha reportado que la unión de la P β A a la integrina $\alpha\beta 1$ activa la vía MAPKK-ERK2 e induce la degeneración de las neuritas y la muerte celular en las neuronas del hipocampo (Anderson, 2004). Estos efectos fueron bloqueados por la equistatina, que es un inhibidor general de las integrinas así como por anticuerpos contra ambas integrinas (Anderson, 2004). En un estudio realizado por Bozzo (2004) se demostró que el tratamiento con proteínas de unión a integrinas, tales como la fibronectina, la laminina y el colágeno protegen contra la apoptosis inducida por la P β A. Asimismo, el tratamiento con anticuerpos contra las integrinas $\alpha 1\beta 1$ evitan la neurotoxicidad inducida por la P β A. Otro estudio, donde utilizaron la línea celular SH-SY5Y, mostró que la P β A se une a la integrina $\alpha 1$ y activa a la cinasa de adhesión focal (FAK), lo que induce la reactivación del ciclo celular y finalmente la muerte celular (Frasca et al., 2008). Es importante mencionar que la cinasa FAK es una cinasa de tirosinas (Caltagarone, 2007; Schlaepfer, 1996) que está estrechamente relacionada con la cinasa Fyn (Zhang et al, 1996). FAK y Fyn se encuentran sobreexpresadas en el cerebro de pacientes con EA (Ho et al., 2005; Shirazi, 1993). En este sentido, estudios de nuestro laboratorio ha demostrado que la alteración inducida en el circuito del hipocampo por la P β A se previene cuando se inhibe a las integrinas y a las cinasas FAK y Fyn (Balleza-Tapia et al., 2010).

Posteriormente, siguiendo con los estudios de la cascada transduccional inducida por la P β A, más allá de la cinasa Fyn, nuestro grupo de trabajo demostró que la inhibición de la GSK3, que es un blanco de la cinasa Fyn, también previene la inhibición de la actividad hipocampal producida por la PBA (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña-Ortega et al., 2012). Lo anterior, ha llevado a concluir que la vía transduccional involucrada en la inhibición de la actividad hipocampal producida por la P β A involucra a las integrinas que activan a la cinasa FAK, que a su vez activa a la cinasa Fyn y, ésta, a la enzima GSK3 (Balleza-Tapia et al., 2010). Evidencias tanto clínicas como experimentales indican que la GSK3 participa en los efectos deletéreos producidos por la P β A y en la fisiopatología de la EA (Imahori, 1997; Takashima et al, 1993; Blalock et al, 2004). A continuación, un resumen breve de esta evidencia.

5.1 La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) y su participación en los efectos de la Proteína β -Amiloide

La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) es una cinasa de serinas y treoninas identificada originalmente por su papel en la regulación del metabolismo del glucógeno (Embi et al.1980). Esta cinasa está altamente expresada en el cerebro y participa en la neurotoxicidad inducida por la P β A (Sun, 2002) y la hiperfosforilación de la proteína Tau, también inducida por la P β A (Lucas et al., 2001). La GSK3 también participa en la regulación de la transcripción genética (Troussard et al., 1999), la apoptosis (Turenn, Price, 2001) y la fosforilación de varias proteínas asociadas al citoesqueleto como las Proteínas Asociadas a Microtubulos (MAP, por sus siglas en inglés) (Anderton et al. 2001; Brion et al. 2001).

Existen dos isoformas de la GSK3 codificadas por genes diferentes: la GSK3 α y la GSK3 β (Mukai et al. 2002). La GSK3 β es especialmente abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC) donde fosforila varias proteínas neuronales (Anderton et al., 2001; Brion et al., 2001). Es importante destacar que la ausencia total de la GSK3 β es embrionariamente letal en ratones, lo que implica que GSK3 α no puede compensar la falta de su homólogo (Hoeflich et al, 2000). En contraste,

la GSK3 α puede eliminarse por completo sin efectos adversos obvios sobre la viabilidad o la salud, con la posible excepción de la esterilidad del macho (Kaidanovich-Beilin et al, 2010).

Como ya se mencionó, la GSK3 β es un regulador clave en varios procesos fisiológicos que van desde el metabolismo y el ciclo celular (Jope, Johnson, 2004), pero también participa en procesos patológicos como la oncogénesis (MacAulay et al., 2007) y la apoptosis (Turenne, Price 2001). En términos patológicos, la GSK3 β ha sido también implicada en la Diabetes Mellitus no dependiente de insulina, pues la GSK3 β regula la señalización desencadenada por la insulina para la regulación de la inhibición de la síntesis de glucógeno (Henriksen, Dokken, 2006). Relacionado a la EA, la GSK3 β participa en la generación de marañas neurofibrilares asociada con la EA, así como en varios de los procesos propios de esta enfermedad como son la neurodegeneración inducida por la P β A (Lucas et al., 2001). Este y otros resultados *in vivo* sugieren firmemente que la GSK3 β contribuye a la patogénesis de la EA a través de su participación en los efectos deletéreos inducidos por la P β A (ver revisión Kremer et al., 2011)

Como continuación de esta línea de investigación, nos proponemos determinar cuál es el blanco molecular de la GSK3 β que participa en los efectos inhibitorios producidos por la P β A sobre la actividad del hipocampo. Uno de estos blancos de la GSK3 β son los canales de K $^{+}$ sensibles a ATP (Gross et al., 2007; Ning et al., 2009). Estudios previos han demostrado que cambios en la actividad de la GSK3 β modulan la función de los canales de K $^{+}$ sensibles a ATP (Gross et al., 2007; Ning et al., 2009), aunque aún no se conoce una relación directa entre la GSK3 β y los canales de K $^{+}$ sensibles a ATP (Gross et al., 2007; Ning et al., 2009). Recientemente, se ha sugerido que la disfunción de los canales de K $^{+}$ sensibles a ATP podría participar en la etiopatología de la EA (Guozhao et al., 2008; Guozhao et al., 2009), pues el favorecimiento de su apertura puede mediar un posible papel neuroprotector en modelos transgénicos de la EA (Guozhao et al., 2008; Guozhao et al., 2009). En un estudio realizado por Dong et al., (2010) se demostró que la administración a largo plazo de Diazoxida (un abridor de los canales de K $^{+}$

sensibles a ATP) suprime los deterioros causados por la P β A y por la proteína TAU en el modelo del ratón 3XTgAD que presenta las características de la EA. En apoyo a nuestra hipótesis de trabajo, cabe mencionar que existe un reporte de que la expresión de los canales de K⁺ sensibles a ATP se encuentra alterada en el cerebro de pacientes con EA (Ikeda et al., 1993). Antes de proceder al planteamiento del problema, haremos una breve descripción de los canales de K⁺ sensibles a ATP.

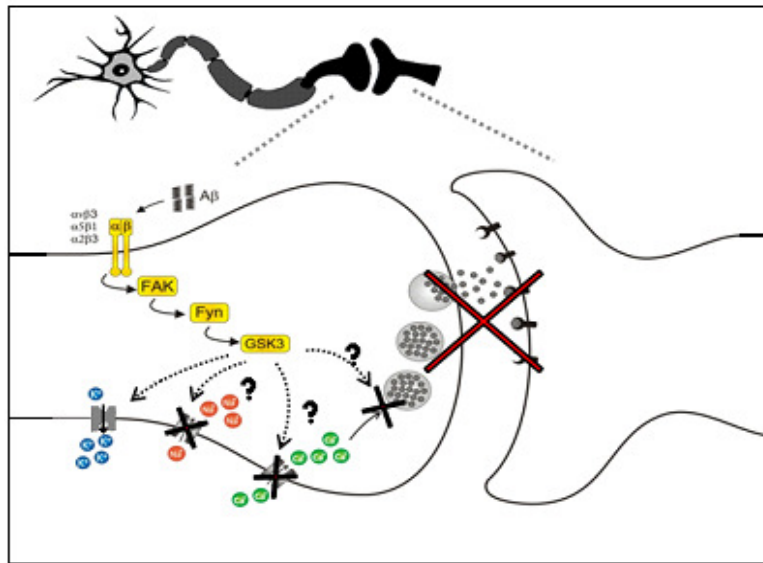


Figura 9. Posible cascada transduccional involucrada en la inhibición de la actividad hipocampal producida por la A β . Se propone que la P β A activa una vía transduccional que involucra a las subunidades $\alpha\beta$ de las integrinas, a las cinasas FAK y Fyn y que termina en la modulación de la actividad de la GSK3. Cuatro de los posibles blancos de la GSK3, entre los cuales se encuentran los K⁺ sensibles a ATP, se muestran en la ilustración. (Balleza-Tapia et al., 2010)

6. Los Canales de K⁺ sensibles a ATP

5.1 Estructura de los canales de K⁺

Julius Bernstein en 1902 postuló la existencia de una permeabilidad selectiva a potasio (K⁺) en las membranas de las células excitables, lo que eventualmente llevó al descubrimiento de los canales de K⁺ (Hille, 1992). Trabajos subsecuentes demostraron la existencia de diversos canales iónicos con permeabilidad para distintos iones como el sodio, el calcio y el cloro.

Interesantemente, ninguna de estas permeabilidades es tan diversa como aquella relacionada a los canales de K^+ (Hille, 1992).

La apertura de los canales de K^+ hiperpolariza el potencial de membrana al acercar éste al potencial de equilibrio del K^+ , lo que aleja a las células excitables del umbral de disparo (Hille, 1992). Además, los canales de K^+ restablecen el potencial de reposo al final del potencial de acción. Estos canales contribuyen también a regular la duración del mismo potencial de acción y a terminar periodos de intensa actividad de disparo. Adicionalmente, los canales de K^+ regulan el periodo refractario de las espigas y afectan la eficacia de las entradas sinápticas (Hille, 1992). Además de estas funciones en las células eléctricamente excitables, varios canales de K^+ tienen un papel de transporte en los epitelios (Hille, 1992) y en las células gliales (Hille, 1992).

Si bien los canales de K^+ son proteínas ubicuas que se presentan en prácticamente todos los organismos vivos, incluidas bacterias, levaduras, plantas y animales; éstos exhiben una gran heterogeneidad estructural y funcional (Hille, 1992). Los canales de K^+ pueden ser regulados por cambios en el potencial de membrana o por el estado metabólico de la célula, así como por hormonas y neurotransmisores (Hille, 1992). Últimamente, se clasifica a los canales de K^+ en base a “regiones” estructurales conservadas que pueden estar involucradas en la actividad del canal. Este tipo de clasificaciones se lleva a cabo considerando también las propiedades de selectividad de cada canal (Hille, 1992). Estructuralmente hablando, los canales pueden ser clasificados en los grupos que se describen a continuación: 1) Canales de potasio dependientes de voltaje que contienen seis regiones transmembranales y un solo poro; 2) Canales de potasio rectificadores que contiene sólo dos regiones transmembranales y un solo poro y 3) Canales de K^+ con dos poros y cuatro regiones transmembranales (para una revisión ver Char-chang et al., 2000; Fig.10). Como parte del segundo grupo de canales de K^+ , se encuentran los canales de K^+ sensibles a ATP, que se describen a continuación.

A. Seis segmentos transmembranales y un poro

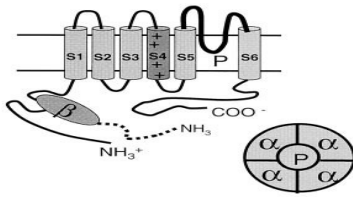
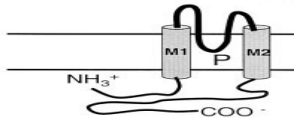
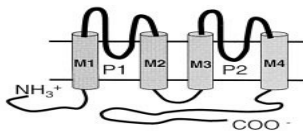


Figura 10. Diversidad estructural de los canales de K⁺. Se observan los 3 grandes grupos en los que se dividen los canales de K⁺, dependiendo de sus segmentos transmembranales y el número de poros que tienen (modificado de Char-chang et al., 2000)

B. Dos segmentos transmembranales y un poro



C. Cuatro segmentos transmembranales y dos poros



5.2 Los canales de K⁺ sensibles a ATP

Los canales de K⁺ sensibles a ATP pertenecen a la familia de canales de K⁺ con dos segmentos transmembranales y un poro (Char-chang et al., 2000), que exhiben rectificación entrante, que son inhibidos por el ATP y activados por ADP (Noma, 1983; Ashcroft et al., 2005). La modulación de estos canales por el ATP y el ADP permite el acople entre el metabolismo energético celular y la actividad eléctrica de la membrana (Noma, 1983; Ashcroft et al., 2005). Estos canales fueron originalmente descritos en miocitos cardiacos, pero se encuentran presentes en una gran variedad de tejidos y células excitables dentro de las que se incluyen a las células beta del páncreas, células del músculo liso y esquelético, así como neuronas (Ashcroft et al., 1990). En todas estas células los canales de K⁺ sensibles a ATP acoplan los cambios metabólicos intracelulares a la actividad eléctrica de la membrana plasmática, ya que la apertura de estos canales, en respuesta a una reducción en el ATP, puede cambiar el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio para el ion K⁺, hiperpolarizando la célula (Ashcroft, 2005). Estos canales, además de regular el potencial de membrana en reposo, también modulan la forma del potencial de acción y son importantes en varios procesos fisiológicos como; la liberación de insulina en el páncreas (Ashcroft et al, 1984; Koster et al, 2000; Miki et al, 1998), regulación del apetito en las neuronas

del núcleo arcuato del hipotálamo (Wang et al, 2004) la modulación a los cambios de glucosa en la sangre (Zingman et al, 2002; Yamada, et al 2001) y la regulación del tono muscular (Daut et al, 1994; Miki et al, 2002), por mencionar algunos.

Estudios moleculares han mostrado que los canales de K^+ sensibles a ATP son heteromultímeros formados por dos subtipos de subunidades totalmente distintas. Una de estas subunidades es una proteína que pertenece a la familia de los canales de K^+ con rectificación entrante tipo Kir 6.X (Inagaki et al., 1995). La segunda subunidad, es un receptor para las sulfonilureas (SUR) que fue purificado y clonado con base a su afinidad a la Glibenclamida (Aguilar-Bryan et al., 1995). Cabe mencionar que las subunidades tipo SUR son miembros de la familia de transportadores de ATP con múltiples dominios transmembranales y dos sitios de unión para nucleótidos, incluido el mismo ATP (Tusnádý et al., 1997). Ambas subunidades proteicas (los Kir 6.X y los SUR) son requeridas para formar un canal de K^+ sensible a ATP funcional (Bebenko et al., 1998; Glaser et al., 2000). Los dos tipos de subunidades se asocian de manera esteoquiométrica en una relación de 4:4 formando un canal octamérico (SUR/Kir6.X). Las subunidades Kir 6.X forman el poro del canal, mientras que el receptor SUR regula su actividad por nucleótidos (ver figura 11; Bebenko et al., 1998; Glaser et al., 2000).

Cabe mencionar que las subunidades que conforman al canal de K^+ sensible a ATP tienen diferentes combinaciones, dependiendo de los tejidos y el tipo celular que los presente (Hibino, 2009). La familia de proteínas Kir 6.x está constituida por alrededor de 15 diferentes subunidades, pero solo las subunidades rectificadoras Kir 6.1 y Kir 6.2 se unen a las subunidades SUR1 o SUR2 (SUR2A y SUR2B) para formar, en muy diversas combinaciones, canales de K^+ sensibles a ATP funcionales (ver revisión Hibino, 2009)

Una variedad de agentes farmacológicos puede estimular o inhibir los canales de K^+ sensibles a ATP mediante la unión a las subunidades SUR. Entre ellos se encuentran inhibidores de los canales como clorpropamida, Tolbutamida y Glibenclamida (Doyle et al., 1998; Edwards G, Weston A, 1993). Todos estos inhibidores son usados en el tratamiento terapéutico de la diabetes tipo II (Hibino, 2009). Los agentes estimuladores de los canales, también conocidos como

abridores de canales de potasio, incluyen al pinacidil, al nicorandil y a la Diazoxida (Hibino, 2009).

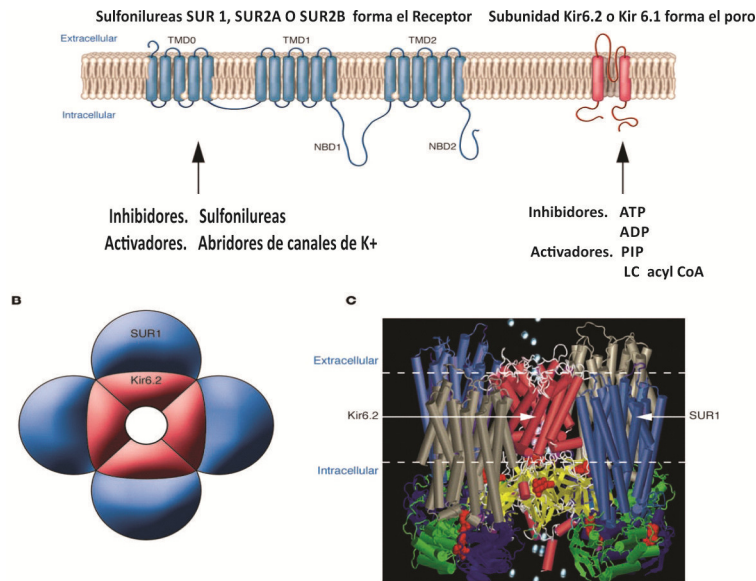


Figura 11. Estructura molecular del Canal de K⁺ sensible a ATP. (A) Representación esquemática de la topología de una subunidad SURx (izquierda) y el canal Kir.x (derecha). (B) Así mismo podemos observar la conformación molecular del canal por sus dos subunidades SUR 1 y Kir6.2 (C) y un modelo de como se encuentran ensambladas las subunidades Sur1 y Kir6.2 (c) (Modificado de M. Ashcroft 2005).

En las células beta del páncreas, en las que la función de los canales de K⁺ sensibles a ATP han sido más estudiada, normalmente los canales de K⁺ sensibles a ATP están abiertos (Behrman et al., 2004). Sin embargo, el aumento en la concentración de ATP produce un cierre del canal, lo que induce la acumulación de potasio y la despolarización de la membrana (Behrman et al., 2004). Esto, consecuentemente, activa a los canales de calcio dependientes de voltaje, que provoca la entrada de calcio hacia el citoplasma y la secreción de insulina por exocitosis-dependiente de calcio (Behrman et al., 2004).

En el SNC, los canales de K⁺ sensibles a ATP se expresan predominantemente en los ganglios basales, el tálamo, el hipocampo y la corteza cerebral (Mourre et al., 1989). La activación de estos canales resulta en la salida de K⁺ en las neuronas y la hiperpolarización de la membrana que, consecuentemente, produce la disminución de la excitabilidad neuronal, la atenuación de la liberación del transmisor y la protección contra la muerte celular

(Yamada et al., 2001). Además, la función de estos canales determina la supervivencia de las células durante estrés metabólico (Miki & Seino, 2005). También, se ha sugerido que los canales de K^+ sensibles a ATP regulan la liberación de glutamato inducida por una isquemia cerebral o hipoxia (Jiang et al., 1994). Además, se sugiere que estos canales podrían jugar un papel importante en el acople de la excitabilidad con el metabolismo celular en condiciones normales, así como durante las alteraciones que ocurren ante la falta de oxígeno y glucosa (Jiang et al., 1994; Mourre et al., 1989).

Existen estudios farmacológicos que apoyan la posible participación de los canales de K^+ sensibles a ATP en la protección contra daño oxidativo, ya que las sulfonilureas y los abridores de canales de K^+ sensibles a ATP parecen modular la despolarización inducida por glutamato durante la anoxia en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Ben-Ari et al., 1989). Además, los abridores de los canales de K^+ sensibles a ATP muestran una acción protectora en condiciones de excitotoxicidad inducida *in vitro* (Abele et al., 1990) e *in vivo* (Gandolfo et al., 1989). La excitotoxicidad, en este caso, se produce por la activación de los receptores tipo NMDA y tipo AMPA/Kainato, que conduce a un incremento en la entrada de Ca^{++} . El aumento en la concentración citoplasmática de Ca^{++} desencadena una serie de vías intracelulares citotóxicas (Gandolfo et al., 1989; Abele et al., 1990).

Diferentes estudios han descrito la distribución de los canales de K^+ sensibles a ATP en el cerebro (Stanford et al, 1995; Tromba et al 1992; Zawar et al., 1999). Por ejemplo, Karschin y cols (1997) estudiaron la expresión y distribución de los mRNAs de las subunidades Kir6.2 y Sur1 en rebanadas de cerebro de rata y ratón, encontrando que estas subunidades se encuentran distribuidas en casi todo el cerebro. De manera relevante para esta tesis está la evidencia de que el hipocampo expresa estas subunidades de manera moderada a fuerte (ver figura 14)

Distribución de los mRNAs en cerebro adulto de ratón y rata de las subunidades Kir6.2/SUR1		
Región del cerebro	Kir6.2	SUR1
Hipocampo		
Células Granulares del giro dentado	+++	+++
Células piramidales de CA1 y CA3	++	++
Células piramidales de CA2	++	++++

Fig. 14 Los niveles de expresión de las subunidades formadoras de los canales de K⁺ sensibles a ATP en diferentes regiones del hipocampo del ratón y la rata. Note que el nivel de expresión del mRNAs para las subunidades Kir 6.2/SUR1 representado con las cruces (+) es de moderado en CA1 y CA3 a muy fuerte en giro dentado y CA2 (modificado de Karschin 1997)

En otro estudio, se investigó la distribución de los canales de K⁺ sensibles a ATP en 4 diferentes tipos de neuronas del hipocampo en rebanadas de cerebro de rata (células piramidales de CA1, interneuronas del estrato radiado de CA1, células gliales de la misma área y células granulares del giro dentado). Se determinó la presencia de estos canales por la sensibilidad de estas células a la Tolbutamida y a la Diazoxida, utilizando la técnica “whole-cell patch clamp”, además de la expresión de su ARNm por PCR. De manera relevante, se encontró que la cantidad de canales de K⁺ sensibles a ATP es mayor en células granulares e interneuronas en comparación con las células piramidales (Zawar et al., 1999). Otros estudios han corroborado que los canales de K⁺ sensibles a ATP en el hipocampo son sensibles a bloqueadores como la Tolbutamida y la Glibenclamida y a activadores como la Diazoxida (Stanford et al, 1995; Tromba et al 1992).

A nivel sistémico se ha reportado que los canales de K⁺ sensibles a ATP modulan tareas como la memoria contextual. De hecho, se ha demostrado que animales carentes del gen Kir6.2 o en humanos que presentan mutaciones en este mismo gen, muestran deterioro cognoscitivo que se corrige con la administración de Tolbutamida o Glibenclamida (Betourne et al 2009; Slingerland et al 2008). De igual forma, otros estudios han comprobado que abridores de los

canales de K⁺ sensibles a ATP, como la Diazoxida, protegen contra el daño oxidativo inducido por la PβA y que bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles a ATP como la Tolbutamida y la Glibenclamida disminuyen el deterioro cognoscitivo que se observa en líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan la PβA (Yadong., 1996; X.Chia et al 2000; Dong et al 2010; Ikeda et al 1993; Bernd et al., 1999; Azza B., Elghotny 2010). Finalmente, de manera relevante para este proyecto, se ha demostrado que los canales de K⁺ sensibles a ATP están reducidos en densidad en la corteza temporal y occipital de pacientes con EA en comparación con sujetos normales *postmortem* (Ikeda et al., 1993).

Los datos anteriores claramente indican que los canales de K⁺ sensibles a ATP juegan un rol importante en el circuito hipocampal y que pueden ser modulador por la vía transduccional desencadenada por la PβA que, a su vez afecta procesos cognitivos dependientes del hipocampo. Por ello, nos proponemos estudiar si los bloqueadores y el abridor de los canales de K⁺ sensibles a ATP modifican la actividad hipocampal, así como la inhibición de la misma producida por la PβA.

III. Justificación.

Desde la descripción clínico-anatomo-patológica que Alois Alzheimer realizó a la paciente Auguste D. en 1901, se ha acumulado evidencia que sugiere que las formas solubles de la P β A son responsables de la generación de muchos de los síntomas tempranos de la EA, independientemente de la formación de las placas seniles y la concomitante neurodegeneración (Walsh et al., 2002; Peña et al., 2006). Se ha observado también, que los oligómeros solubles de la P β A son capaces de alterar el funcionamiento de los circuitos neuronales y provocar deterioros cognitivos antes de causar muerte neuronal (Peña et al., 2006). Nuestro grupo de trabajo ha descrito que estos efectos involucran la activación de una vía de señalización que involucra a las integrinas y a las cinasas FAK, Fyn y GSK3 (Peña, Ordaz, Balleza-Tapia et al., 2009; Balleza-Tapia et al., 2010).

Como continuación de esta línea de investigación, se propone determinar cuál es el blanco molecular de la GSK3 β que participa en los efectos inhibitorios producidos por la P β A sobre la actividad del hipocampo. Uno de estos blancos de la GSK3 β son los canales de K⁺ sensibles a ATP. Se ha demostrado que la densidad de los canales de K⁺ sensibles a ATP está reducida en la corteza cerebral de pacientes con EA (Ikeda et al., 1993) y que moduladores de estos canales podrían reducir los efectos deletéreos producidos por la P β A (Yadong G Mattson M 1996; X.Chia et al 2000; Dong et al 2010; Ikeda et al., 1993; Bernd B, Tjernberg L 1999; Azza B, Elghotny 2010). Por todo esto, se propone determinar si los canales de K⁺ sensibles a ATP participan en la inhibición de la actividad oscilatoria hipocampal producida por la P β A

*“Conocer algo, es haber logrado las respuestas al qué,
cuándo, cómo, y por qué de ese algo”*

Socrates

IV. Objetivo

- Determinar la participación de los canales de K⁺ sensibles a ATP en la inhibición de la actividad del circuito hipocampal producida por la PβA.

Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de los bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles a ATP (Tolbutamida y Glibenclamida) sobre la actividad del circuito hipocampal y sobre la inhibición de la misma producida por la PβA.
- Determinar el efecto del abridor de los canales de K⁺ sensibles a ATP (Diazoxida) sobre la actividad del circuito hipocampal y sobre la inhibición de la misma producida por la PβA.

Variables de trabajo.

Variables

Variable independiente: Transferir la rebanada a una cámara de perfusión sumergida continua con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) que contiene (en mM): NaCl: 119, Glucosa: 30, NaHCO₃: 25, KCl: 3, MgCl₂: 1 y CaCl₂, oxigenada de manera constante a una temperatura de 30±2°. Posicionar el electrodo de borosilicato en la región CA1 del hipocampo y esperar a que se establezca la actividad espontánea (control), para posteriormente aplicar los diferentes fármacos directamente en el LCRA de la cámara de perfusión. Los fármacos aplicados a las siguientes concentraciones:

PβA 10 nM (Balleza-Tapia et al., 2010)

Glibenclamida 1 μM

Tolbutamida 20 μM

Diazoxida 300 μM

(Zawar et al., 1999; Stanford et al., 1995; Tromba et al., 1992)

- Variable dependiente: Cambios en la potencia (el área bajo la curva de los espectros de potencia) y frecuencia de la actividad poblacional del circuito

hipocampal.

V. Hipótesis.

- El bloqueo de los canales de K^+ sensibles a ATP con Tolbutamida y Glibenclamida aumentará la actividad del circuito hipocampal y evitará la inhibición de la misma producida por la $P\beta A$.
- La apertura de los canales de K^+ sensibles a ATP con Diazoxida disminuirá la actividad del circuito hipocampal y ocluirá la inhibición de la misma producida por la $P\beta A$.

VI. Método y materiales.

Sujetos.

Se utilizaron 23 ratones machos de la cepa Swiss Webster de 7 a 10 semanas de edad, de los cuales se obtuvieron rebanadas de cerebro de 400 μm . Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Local de Ética de Experimentación Animal (INB-UNAM) y siguen las normas establecidas en la norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Norma Oficial mexicana NOM-062-ZOO 1999)

Aparatos y materiales.

Material: jeringas, instrumental quirúrgico, vasos de precipitado de 100 ml, papel filtro, cajas de petri, navajas, agares.

Aparatos.

Vibratomo: Vibratome, St. Louis, MO, U.S.A que se utilizó para los cortes de rebanadas de cerebro de ratón

Amplificador: Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A. que se utilizó para los registros de la actividad poblacional de neuronas del hipocampo.

Sustancias.

Alcohol etílico.

Pentobarbital sódico (anestésico Pfizer)

Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) que contiene (en mM): NaCl: 119, Glucosa: 30, NaHCO₃: 25, KCl: 3, MgCl₂: 1 y CaCl₂: 1.5.

Procedimiento.

Todos los ratones utilizados se mantuvieron en un cuarto con una temperatura de 22 °C y con periodos de luz /oscuridad de 12:12-h con libre acceso de comida y agua.

Obtención de la solución oligomerizada de PβA

El protocolo utilizado para la obtención de la solución oligomerizada de PβA fue realizado en base a lo descrito por Klein (Klein W. L., 2002) y Lambert (Lambert M. P., 1998). La PβA₁₋₄₂ fue inicialmente solubilizada en 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración de 1 μM. La solución fue incubada durante un periodo de 60 minutos, a temperatura ambiente, procurando que el vial permaneciera cerrado. Posteriormente, se permitió la evaporación del solvente durante toda la noche a temperatura ambiente. Después el péptido fue resolubilizado en DMSO al 100%, y fue diluido en medio F12 (sin rojo fenol) hasta alcanzar una concentración de PβA de 100 μM. Esta solución fue incubada por un periodo de 24 horas a 5°C. Finalmente, la solución fue centrifugada a 14,000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene los oligómeros y monómeros de PβA, fue almacenado casi inmediatamente a temperaturas no mayores a 20°C y usado en los experimentos.

Preparación de las rebanadas

Para obtener las rebanadas transversales de 400 μm de espesor los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (40 mg/kg). Posteriormente, fueron perfundidos transcárdialmente con fluido cerebroespinal modificado frío que contiene 238 mM sacarosa, 3 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM

NaHCO₃, y 30 mM D-glucosa, pH 7.4, burbujeado con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

Luego los animales fueron decapitados y los cerebros removidos y puestos en hielo con LCRA burbujeado con carbógeno. Un solo hemisferio fue montado en un bloque de agar a 30° de inclinación y las rebanadas obtenidas de la formación hipocampal fueron cortadas con un vibratomo. Antes de comenzar el experimento las rebanadas se dejaron reposar oxigenadas durante una hora.

Registros electrofisiológicos.

Para la obtención de los registros de la actividad poblacional espontánea las rebanadas fueron transferidas, de forma individual, a una cámara de perfusión sumergida continua con LCRA oxigenada de manera constante a una temperatura de 30±2°C. Los registros de campo se obtuvieron con electrodos de succión extracelulares, fabricados a partir de capilares de borosilicato llenados con LCRA y posicionados sobre la superficie del hipocampo, en la región CA1, con la ayuda de un micromanipulador. La señal fue amplificada, filtrada e, integrada electrónicamente para después ser almacenada con ayuda de un equipo de cómputo.

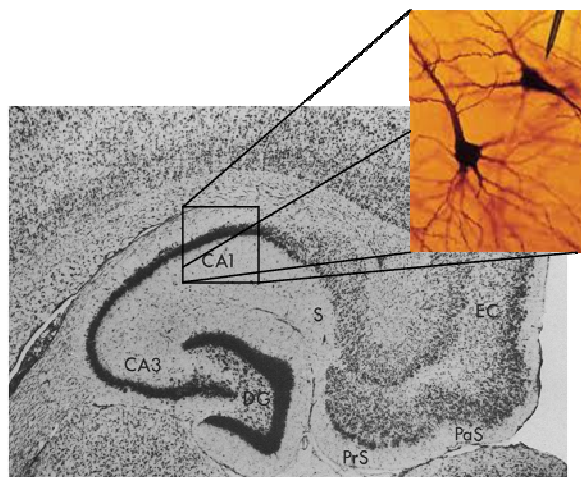


Fig. 15 Se resalta la posición del electrodo en la región CA1 del hipocampo para registrar la actividad de campo. (Modificado de Amaral et al, 1989)

Protocolo para el registro de la actividad eléctrica del circuito hipocampal CA1

Una vez que se colocó el electrodo sobre la región CA1, ahí se mantuvo el resto del experimento. Se registró la actividad durante 2 horas 11 min. Después de 10 min (tiempo aproximado requerido para que la actividad registrada se estabilice) se llevó a cabo el registro en la secuencia siguiente:

- 10 min de estabilización
- 20 min de registro de actividad espontánea (control)
- 30 min de registro de actividad en presencia de bloqueadores o abridor de los canales de K^+ sensibles a ATP
- 60 min de registro de actividad en presencia de la P β A
- 10 min de registro de actividad en presencia de lidocaína
- 1 min de registro de actividad ruido eléctrico (el electrodo en el baño sin tocar la rebanada)

Análisis de resultados

Los registros de actividad poblacional fueron cuantificados con el análisis clásico de espectro de potencia, en el cual se utilizaron fragmentos del final del registro de 5 min aplicando el algoritmo de la transformada rápida de Fourier con una ventana de Hamming en el programa Clampfit (Molecular Devices), integrando el espectro de potencia de 1 a 70 Hz. Cabe mencionar que en todos los experimentos se utilizó lidocaína como un control para ver la viabilidad de las rebanadas ya que al aplicar lidocaína todos los canales de Na^+ se bloquean impidiendo la despolarización de las neuronas lo cual disminuye la actividad eléctrica en comparación al control y gracias a eso se puede apreciar el ruido eléctrico. Esta actividad se resta a la sumatoria de la potencia del control y a las demás condiciones y después se normaliza al 100% así nos queda la cuantificación de la actividad biológica y se comparan las medias de las diferentes condiciones.

Análisis estadístico

- Se utilizaron pruebas no paramétricas debido a que los datos no se

distribuyeron dentro de la normalidad.

- Se utilizó la prueba Wilcoxon para comparar la media del Control vs PβA
- Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medias de los diferentes grupos: 1) Control vs Tolbutamida y PβA, 2) Control vs Glibenclamida y PβA, 3) Control vs Diazoxida y PβA con una comparación múltiple de ajuste de Dunn's para evaluar las diferencias entre los diferentes grupos usando el programa GraphPad Prisma con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

VII. Resultados

La región CA1 del hipocampo genera actividad poblacional que presenta componentes de frecuencia entre los 5 y los 50 Hz (Fig. 7.1). Sin ignorar que la actividad muestra un rango muy amplio de frecuencias, se encontró que la frecuencia promedio (aquella frecuencia con la potencia máxima) fue de 7.40 ± 1.32 Hz (N = 6). La actividad descrita es altamente reproducible, robusta y se mantiene inalterada durante varias horas (Balleza-Tapia et al., 2010). La aplicación de P β A 10 nM inhibe la generación de la actividad espontánea producida por la región CA1 del hipocampo. Después de 60 minutos de la aplicación continua de P β A 10 nM, ésta disminuye la potencia de la actividad poblacional a $56.04 \pm 10.4\%$ del control (N = 6, $p < 0,05$) mientras en la frecuencia no muestra cambios significativos 6.0 ± 1.30 Hz cabe destacar que esta inhibición es reversible (Balleza-Tapia et al; 2010; Fig. 7.1).

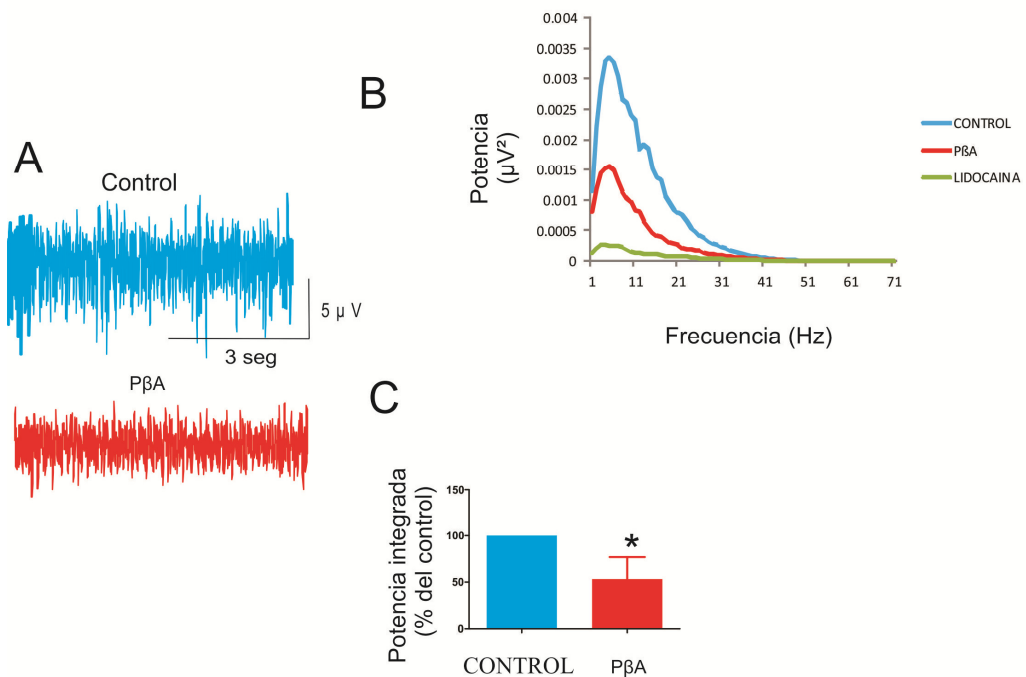


Fig.7.1 La P β A inhibe la actividad poblacional del circuito hipocampal. Los trazos representativos (A) muestran la actividad poblacional espontánea de la región CA1 del hipocampo antes (trazo azul) y después de 60 minutos de aplicación continua de P β A 10 nM (trazo rojo) se observa una disminución en la potencia. A la derecha (B) se muestran los respectivos espectros de potencia de un trazo representativo (con los mismos colores de los trazos). La actividad muestra componentes de frecuencia en un rango muy amplio (1-40 Hz). (C) Además, note que la potencia es disminuida en prácticamente todas las frecuencias una vez que se aplica la P β A 10 nM. La cuantificación de la potencia integrada (normalizada con respecto al control) muestra una disminución significativa en la potencia de la actividad hipocampal después de la aplicación de PBA 10 nM. * denota una diferencia significativa en comparación al control ($p < 0.05$).

Una vez reproducido el efecto inhibitor producido por la P β A, se evaluó el efecto de los bloqueadores de canales de K⁺ sensibles de ATP sobre la actividad hipocampal, así como sus efectos sobre la inhibición de la misma producida por la P β A. Para ello se aplicó el bloqueador de canales de K⁺ sensibles de ATP Tolbutamida (20 μ M; Zawar et al., 1999; Stanford et al., 1995; Tromba et al., 1992) a rebanadas que, en condiciones control mostraron una frecuencia pico de 6.00 ± 1.22 Hz. Después de 30 min de aplicación continua de Tolbutamida se puede observar un aumento significativo en la potencia de la actividad poblacional de CA1 a $369.0 \pm 98.49\%$ del control (N = 9, p <0,05) mientras en la frecuencia pico no mostró cambios significativos 7.66 ± 1.61 Hz. Posteriormente, se agregó la P β A (10 nM en presencia de la Tolbutamida) y se observó que la P β A no afecta significativamente la potencia de la actividad hipocampal con respecto a la actividad en presencia de Tolbutamida ($230.4 \pm 70.84\%$ del control; N = 9, p <0,05) y que dicha actividad sigue siendo de potencia mayor a la registrada en condiciones control. De nueva cuenta, no observamos cambios significativos en la frecuencia pico 6.77 ± 1.48 Hz (ver Fig 7.2)

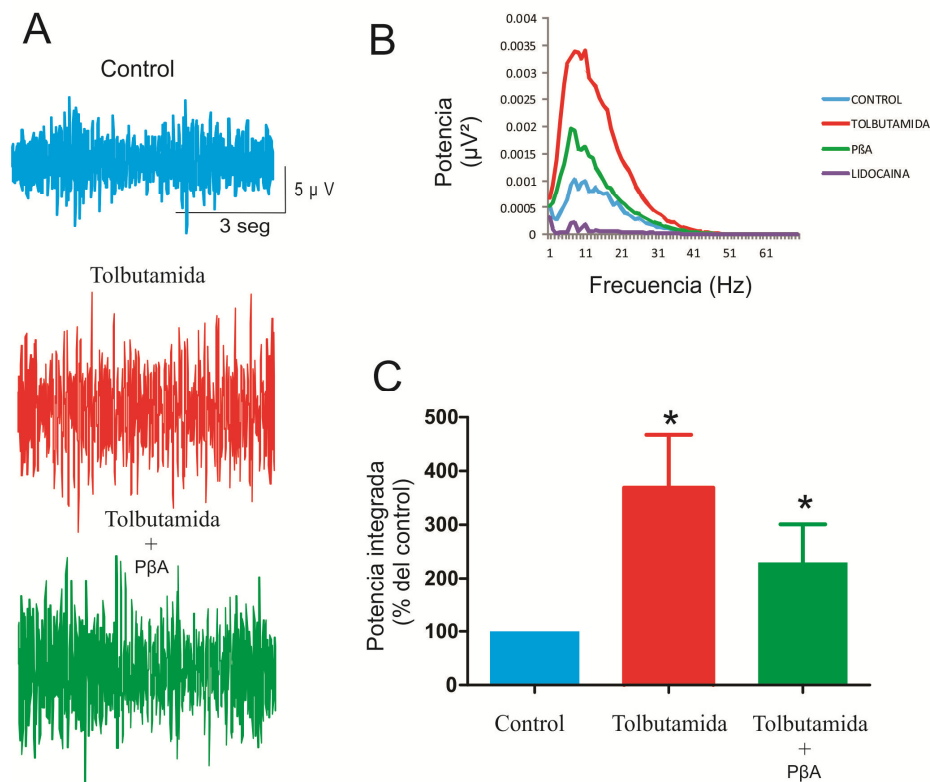


Fig.7.2 La Tolbutamida aumenta la actividad de la región CA1 del hipocampo y evita la inhibición de la misma producida por la PβA. Los trazos representativos (A) muestran la actividad poblacional de la región CA1 del hipocampo antes (trazo azul) y después de la aplicación continua de 30 minutos de Tolbutamida (20μM) (trazo rojo), así como después de la posterior aplicación de la PβA (10nM) por 60 minutos (trazo verde). A la derecha (B) se muestran los respectivos espectros de potencia de un trazo representativo (con los mismos colores de los trazos). Note que la actividad muestra componentes de frecuencia en un rango muy amplio (1-40 Hz). (C) La potencia es aumentada en prácticamente todas las frecuencias con la aplicación de Tolbutamida (20μM). La cuantificación de la potencia integrada (normalizada con respecto al control) muestra un aumento significativo en la actividad en presencia de Tolbutamida (20μM)* y una disminución no significativa al agregar PβA (10nM). La actividad hipocampal en presencia de Tolbutamida y PβA es mayor a la registrada en condiciones control. * denota una diferencia significativa en comparación al control (p<0.05).

En el siguiente experimento, se utilizó otro bloqueador de canales de K⁺ sensibles a ATP, la Glibenclamida (1μM; Zawar et al., 1999; Stanford et al., 1995; Tromba et al., 1992), para poder determinar su efecto en el circuito del hipocampo. Este bloqueador se aplicó a rebanadas que en condiciones control presentaron una frecuencia pico 11.80 ± 4.23 Hz. Después de 30 min de aplicación continua de Glibenclamida se puede observar un aumento significativo en la potencia de la actividad de la región CA1 del hipocampo a $231.9 \pm 33.12\%$ del control (N=5, p <0,05) y una frecuencia pico, sin cambios significativos, de 12.6 ± 5.07 Hz. Una vez que se aplicó la PβA no se observó cambios en la potencia de la actividad hipocampal con respecto de la Glibenclamida ($230.0 \pm 30.94\%$ del control; N=5, p <0,05) ni cambios significativos en la frecuencia pico (11.40 ± 4.15 Hz), pero si hubo diferencias significativas con respecto al control (ver fig 7.3). De lo anterior se desprende que la inhibición de los canales de K⁺ sensibles a ATP con Glibenclamida previene la inhibición de la actividad eléctrica hipocampal producida por la PβA.

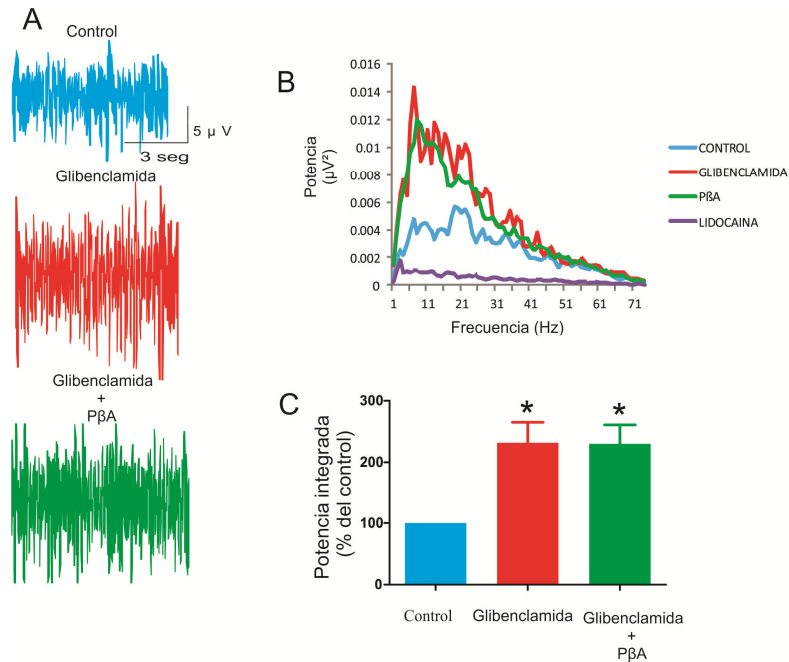


Fig.7.3 La Glibenclamida aumenta la actividad de la región CA1 del hipocampo y evita la inhibición de la misma producida por la PβA. Los trazos representativos (A) muestran la actividad poblacional de la región CA1 del hipocampo antes (trazo azul) y 30 minutos después de la aplicación continua de Glibenclamida (1μM) (trazo rojo), así como 60 minutos después de la posterior aplicación de la PβA (10nM) (trazo verde). A la derecha (B) se muestran los respectivos espectros de potencia de un trazo representativo (con los mismos colores de los trazos). Note que la actividad muestra componentes de frecuencia en un rango muy amplio (1-50 Hz). (C) La potencia es aumentada en prácticamente todas las frecuencias con la aplicación de Glibenclamida (1μM) y que esta actividad no es afectada por la aplicación de PβA. La cuantificación de la potencia integrada (normalizada con respecto al control) muestra un aumento significativo en la actividad en presencia de Glibenclamida (1μM), dicha actividad no cambia al agregar PβA (10nM), * denota diferencias significativas en comparación al control (p<0.05).

Una vez demostrado que el bloqueo de los canales de K⁺ sensibles a ATP aumenta la actividad hipocámpal y la protege del efecto inhibitorio de la PβA, se procedió a aplicar al abridor de dichos canales (la Diazoxida) y caracterizar su efecto sobre la actividad del hipocampo y sobre las alteraciones causadas por la PβA. Este abridor se aplicó a rebanadas que en condiciones control mostraron una frecuencia pico 9.33 ± 2.02 Hz. Después de la aplicación continua, durante 30 min de Diazoxida (300 μM; Zawar et al., 1999; Stanford et al., 1995; Tromba et al., 1992) se observó una disminución significativa en la potencia de la actividad poblacional de CA1 a $56.61 \pm 11.65\%$ del control (N = 6, p <0,05), sin cambios significativos en la frecuencia pico (11.33 ± 2.39 Hz). Posteriormente, se agregó PβA y se observó una disminución que no fue significativa en la potencia con

respecto a la Diazoxida a $40.98 \pm 10.39\%$ del control ($N = 6, p < 0,05$), sin cambios significativos en la frecuencia pico (7.83 ± 1.74 Hz), lo que indica que la Diazoxida ocluye los efectos de la P β A.

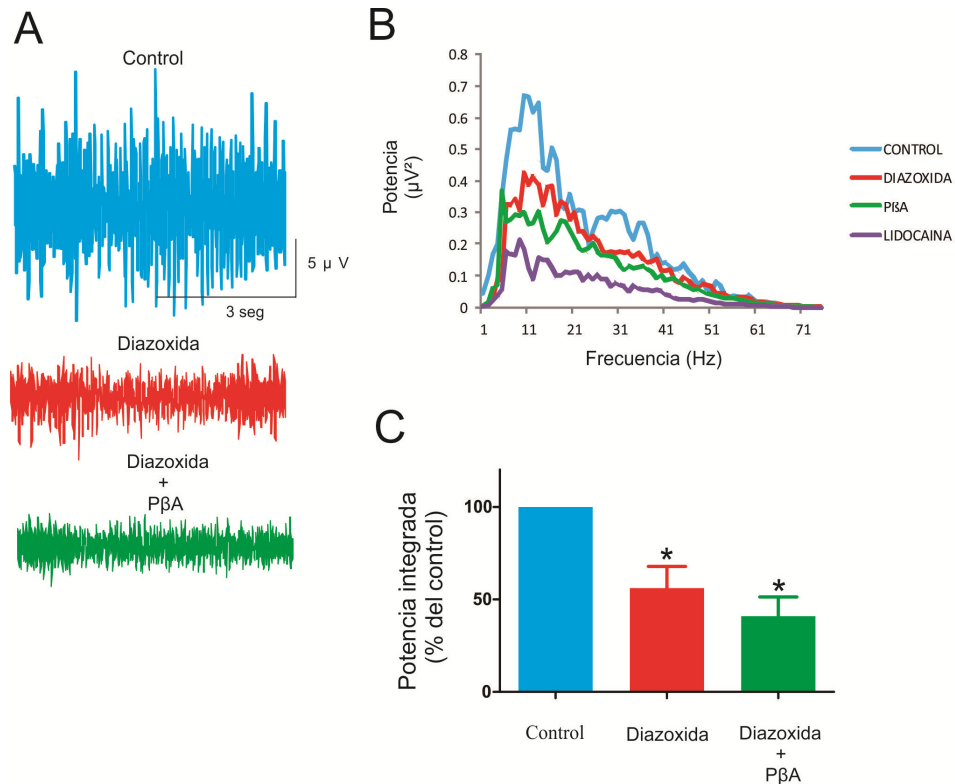


Fig.7.4 La Diazoxida inhibe la actividad de la región CA1 del hipocampo y ocluye el efecto de la P β A. Los trazos representativos (A) muestran la actividad poblacional de la región CA1 del hipocampo antes (trazo azul) y después de la aplicación continua, de 30 minutos, de Diazoxida ($300\mu\text{M}$; trazo rojo), así como la posterior aplicación de la P β A (10nM) por 60 minutos (trazo verde). A la derecha (B) se muestran los respectivos espectros de potencia de un trazo representativo (con los mismos colores de los trazos). Note que la actividad muestra componentes de frecuencia en un rango muy amplio (1-50 Hz). (C) Además, la potencia es disminuida en prácticamente todas las frecuencias con la aplicación de Diazoxida ($300\mu\text{M}$). La cuantificación de la potencia integrada (normalizada con respecto al control) muestra una disminución significativa en la actividad en presencia de Diazoxida ($300\mu\text{M}$). La posterior aplicación de la P β A (10nM) no disminuye más la actividad hipocámpal y la actividad no genera cambios significativos al agregar P β A * denota diferencias significativas en comparación al control ($p < 0.05$).

VIII. Discusión

Esta investigación forma parte de un esfuerzo que busca entender las bases celulares involucradas en los efectos deletéreos que la P β A produce sobre la funcionalidad de los circuitos neuronales. Además, se propone explorar alternativas que pudieran ser clínicamente relevantes para prevenir los efectos inhibitorios sobre la actividad del circuito hipocampal y sobre la memoria (Peña-Ortega et al., 2012). Los experimentos en nuestro laboratorio han demostrado que la aplicación de la P β A soluble es capaz de disminuir la actividad espontánea del hipocampo y la CE en rebanadas de cerebro de roedores (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña-Ortega et al., 2012). Esto mismo ocurre *in vivo* en el hipocampo de la rata (Peña et al., 2010; Peña-Ortega & Bernal Pedraza, 2012). Es importante señalar que estos hallazgos han sido validados por otros grupos de investigación, que han corroborado el efecto inhibitor que produce la P β A sobre la actividad espontánea del hipocampo y correlacionado estos efectos con un deterioro cognoscitivo (Colom et al., 2010; Villete et al., 2010). Los resultados obtenidos en el experimento control de esta tesis corroboran que la inhibición de la actividad del circuito hipocampal producida por la P β A es robusta y consistente (Fig. 7.1). El objetivo principal de este estudio fue determinar si la vía transduccional involucrada en la inhibición de la actividad hipocampal producida por la P β A involucra a los canales de K⁺ sensibles a ATP. El resultado final mostró, en efecto, que los canales de K⁺ sensibles a ATP participan en la inhibición del circuito hipocampal producida por la P β A. Esto, debido a que el bloqueo con Tolbutamida y Glibenclamida de los canales de K⁺ sensibles a ATP inhibe la alteración producida por la P β A sobre la actividad hipocampal. Así mismo, al abrir los canales de K⁺ sensibles a ATP con Diazoxida se observa una disminución de la actividad hipocampal similar a los efectos que la P β A causa en el circuito hipocampal. Más aún, la aplicación de la P β A, en presencia de Diazoxida no produce una inhibición mayor a la ya producida por el abridor de los canales de K⁺ sensibles a ATP. Esto indica que la Diazoxida ocluye los efectos de la P β A sobre la actividad hipocampal y sugiere fuertemente que los efectos producidos por la P β A involucran la activación de estos canales.

Cabe destacar que los fármacos utilizados en esta tesis son usados en el tratamiento terapéutico de la diabetes *mellitus* tipo II (Hibino, 2009) y que podrían ser utilizados en la terapéutica de la EA debido a que son de uso rutinario. La potencialidad de usar las Sulfonilureas en la EA sería de gran impacto debido a que se ha comprobado que atraviesan la barrera hematoencefálica y podrían actuar sobre el cerebro y mejorar procesos cognitivos (Slingerland et al, 2007). Otra de las ventajas es que estos fármacos son de fácil acceso, amplia distribución y se administran por vía oral, lo que los convierte en candidatos excelentes para el manejo de los deterioros cognitivos que se presentan en la EA. Sin embargo, falta mucha investigación para conocer los efectos que estos fármacos pueden tener en pacientes con EA.

8.1. Bloqueo de los Canales de K⁺ sensibles a ATP

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar el efecto de los bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles a ATP (Tolbutamida y Glibenclamida) sobre la actividad del circuito hipocampal. Cabe destacar que se utilizó un criterio de inclusión, donde solo se incluyeron los experimentos donde al aplicar los bloqueadores se observara como mínimo un aumento del 50% con respecto al control. Los resultados muestran que ambos bloqueadores producen un aumento significativo en la actividad de la región CA1. Nuestros resultados se comparan análogamente a los efectos que estos mismos fármacos tienen sobre la actividad eléctrica en el páncreas (Behrman et al., 2004). De igual forma, podemos sustentar la participación de los canales de K⁺ sensibles a ATP en la regulación de la actividad hipocampal, en la evidencia de su extensa distribución y expresión de las subunidades Kir6.2 y Sur1 en el circuito del hipocampo (Karschin et al 1997).

Después de determinar el efecto de los bloqueadores en el circuito hipocampal se continuó la caracterización del efecto de estos fármacos sobre la inhibición que produce la PβA en el circuito del hipocampo donde existen estudios farmacológicos que apoyan la posible participación de los canales de K⁺ sensibles a ATP en la protección contra daño oxidativo, ya que las sulfonilureas parecen modular la despolarización inducida por glutamato durante la anoxia en neuronas

piramidales de la región CA3 del hipocampo (Ben Ari et al., 1990). Asimismo, en esta tesis, la rebanadas de cerebro de hipocampo de ratón fueron tratadas con las sulfonilureas (Tolbutamida y Glibenclamida), posteriormente al aplicarse la P β A se observó una ligera disminución en las tratadas con Tolbutamida que no fue significativa en comparación con la actividad basal (ver figura 7.2) y en las que fueron tratadas con Glibenclamida prácticamente no hubo cambios (ver figura 7.3) por lo que se asume una neuroprotección contra los efectos de la P β A al bloquear dichos canales. Datos similares se han observado en los distintos protocolos experimentales donde se observa en líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan la P β A y en cultivos celulares expuestos a la P β A que lo bloqueadores de canales de K⁺ sensibles a ATP como la Tolbutamida y Glibenclamida tiene un efecto neuroprotector (Yadong G Mattson M 1996; X.Chia et al 2000; Dong et al 2010; Ikeda et al., 1993; Bernd B, Tjernberg L 1999; Azza B, Elghotny 2010). Una posible interpretación de estos resultados, es que la cascada transduccional que activa la P β A afecta a los canales de K⁺ sensibles a ATP activándolos, por lo cual las neuronas del hipocampo se hiperpolarizan y se observa una disminución de la actividad poblacional. Dicha inhibición no es observada al tratar las rebanadas con los bloqueadores de los canales de K⁺ sensibles a ATP.

Existen estudios que han demostrado la participación de los canales de K⁺ sensibles a ATP en procesos cognitivos de aprendizaje y memoria tanto en ratones transgénicos (Betourne et al. 2009) he interesantemente, en un humano que presentó una mutación en el gen Kir6.2 mostró alteraciones cognitivas muy parecidas a diferentes síntomas de la EA que fueron revertidas al ser tratado con Glibenclamida (Slingerland et al., 2008). Estos estudios nos indican que existe una relación de los canales de K⁺ sensibles a ATP con deterioros cognitivos observados tanto en roedores como en humano y nos permiten especular que estos canales podrían estar involucrados en los deterioros cognitivos causados por la P β A que se han observado en pacientes con EA y que han sido corroborados en ratones transgénicos (Mucke, 2000; Koffiea, 2009).

8.2. Apertura de los canales de K⁺ sensibles a ATP

Los agentes mejor conocidos como abridores de canales de K⁺ sensibles a ATP incluyen pinacidil, nicorandil y Diazoxida (Hibino, 2009). En este trabajo se utilizó la Diazoxida, que produjo una disminución significativa en la actividad del circuito hipocampal en CA1 con respecto a la actividad basal (esta disminución se utilizó como criterio de inclusión), muy probablemente debido a que este abridor produce una hiperpolarización de las neuronas del hipocampo (fig. 7.4; Ashcroft, 2005; Zawar et al., 1999; Stanford et al, 1995; Tromba et al 1992). Esto mismo ocurre en respuesta a una reducción en el ATP, lo que puede cambiar el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio para el ion K⁺, hiperpolarizando la célula (Ashcroft, 2005). Otros estudios donde se utilizó a la Diazoxida para activar los canales de K⁺ sensibles a ATP mostraron que algunas células hipocampales producen una corriente saliente que es bloqueada por Tolbutamida y Glibenclamida, demostrando así presencia de canales de K⁺ sensibles a ATP en distintas neuronas del circuito hipocampal (Zawar et al., 1999; Stanford et al, 1995; Tromba et al 1992). Con estos resultados podemos asumir que la actividad del circuito hipocampal es inhibida al ser tratada con Diazoxida por la presencia de los canales de K⁺ sensibles a ATP en las neuronas de este circuito.

Después de determinar el efecto de la Diazoxida en el circuito hipocampal en CA1 se evaluó la inhibición que produce la PβA en el circuito del hipocampo en estas condiciones. Interesantemente, los resultados observados nos muestran que la PβA no disminuye de manera significativa la actividad de las rebanadas que fueron tratadas previamente con Diazoxida. En base a lo anterior, dada la oclusión de los efectos de la PβA por la Diazoxida, sugerimos que la PβA está activando los canales de K⁺ sensibles a ATP en el hipocampo.

Nuestros resultados coinciden con los realizados por Dong et al., (2010) donde demostraron que la administración a largo plazo de Diazoxida suprime los deterioros causados por la PβA en un modelo de ratón 3XTgAD que presenta las características de la EA. Proponemos que el tratamiento crónico con Diazoxida, llevaría a una disminución de la expresión de los canales de K⁺ sensibles a ATP, como una regulación homeostática ante los deterioros causados por la PβA que

están actuando como un abridor de los mismos canales. En otro estudio realizado por Betourne et al (2009) se ha mostrado que la administración de Diazoxida produce un fuerte deterioro en la memoria contextual en la tarea del condicionamiento al miedo, mismo que es revertido por Tolbutamida. Podemos asumir, en base a lo anterior, la promoción de la actividad de los canales de K^+ sensibles a ATP, ya sea con un abridor (la Diazoxida) o por medios indirectos (la $P\beta A$), puede causar deterioros cognitivos que en los resultados de nuestra tesis se correlacionan con una disminución de la actividad hipocampal que es igualmente producida (e incluso ocluída) por la $P\beta A$ y la Diazoxida. De manera relevante, existe un estudio realizado en un humano con una mutación en el gen para proteína Kir6.2 causante de la diabetes neonatal donde también se observaban desordenes cognitivos que tuvieron mejoría al ser tratado el paciente con Glibenclamida (Slingerland et al., 2008). Estos estudios y nuestros resultados dan relevancia a los canales de K^+ sensibles a ATP en procesos cognitivos y a su posible participación en los efectos deletéreos causados por la $P\beta A$. Proponemos que estos canales participan en la cascada transduccional que desencadena la $P\beta A$ en el circuito hipocampal.

Los resultados de este estudio y la revisión de la literatura nos ayudaron a plantear una perspectiva experimental que describiremos a continuación. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la $P\beta A$ disminuye la frecuencia de disparo de diversas poblaciones de interneuronas GABAérgicas, así como la frecuencia de los potenciales posinápticos inhibitorios que éstas reciben o bien que generan sobre las neuronas piramidales (Huanosta-Gutierrez et al., 2010; Verret et al., 2012). Si a estos resultados le agregamos el estudio realizado por Zawar et al (1999) donde se encontró que la cantidad de canales de K^+ sensibles a ATP es mayor en células granulares e interneuronas en comparación con las células piramidales, podemos asumir que al abrir los canales de K^+ sensibles la $P\beta A$ afecta la actividad hipocampal debido a su efectos preferencial sobre interneuronas GABAérgica. Ésto nos dice que la cascada de transducción que genera la $P\beta A$ podría estar afectando preferencialmente a la interneuronas debido a su mayor expresión de canales de K^+ sensible a ATP (Zawar et al 1999).

Además, refuerza la hipótesis de que la inhibición producida por la P β A es causada por la activación los canales de K⁺ sensibles ATP.

Los resultados de esta tesis son importantes en el estudio de la EA y sus posibles blancos terapéuticos ya que los canales de K⁺ sensibles a ATP participan en el deterioro cognitivo tanto en roedores como humano y de igual forma existe relevancia de que estos canales se encuentran alterados en pacientes postmortem con diagnóstico de EA (Ikeda et al., 1993). Los estudios previos y los resultados de esta tesis nos permiten asumir que la P β A desencadena una cascada transduccional que activa a las integrinas, que activan a la cinasa FAK, que a su vez activa a la cinasa Fyn y, ésta a la enzima GSK3 y de alguna manera, que aún se desconoce, se activan los canales de K⁺ sensibles a ATP causando así una inhibición en la actividad del circuito del hipocampo que puede ser revertida con el uso de Tolbutamida y Glibenclamida. Estos resultados sugieren mayor investigación de la participación de estos canales en los efectos deletéreos producidos por la P β A en el hipocampo y en otros circuitos relevantes para la cognición.

IX. Conclusiones

- La P β A inhibe la actividad oscilatoria espontánea de la región CA1 del hipocampo del ratón Swiss Webster, lo que pudiera ser el sustrato del deterioro cognoscitivo producido por dicha proteína.
- El bloqueador de canales de K⁺ sensibles a ATP Tolbutamida aumenta la actividad la región CA1 del hipocampo y evita la inhibición que produce la P β A sobre la misma. Lo que indica que el bloqueo de los canales de K⁺ sensibles a ATP tiene un efecto neuroprotector contra la inhibición que produce la P β A sobre la actividad hipocampal. Este resultado sugiere el estudio de este fármaco, de uso clínico corriente, como posible tratamiento contra el deterioro cognoscitivo producido por la P β A y, quizás, contra los síntomas tempranos en la EA.
- El bloqueador de canales de K⁺ sensibles a ATP Glibenclamida aumenta la actividad la región CA1 del hipocampo y evita la inhibición que produce la P β A sobre la misma. Lo que indica que el bloqueo de los canales de K⁺ sensibles a ATP tiene un efecto neuroprotector contra la inhibición que produce la P β A sobre la actividad hipocampal. Este resultado sugiere el estudio de este fármaco, de uso clínico corriente, como posible tratamiento contra el deterioro cognoscitivo producido por la P β A y, quizás, contra los síntomas tempranos en la EA.
- El activador de los canales de K⁺ sensibles a ATP Diazoxida disminuye la actividad del circuito hipocampal y ocluye el efecto de la P β A sobre la misma. Lo que indica que la inhibición de la actividad hipocampal producida por la P β A involucra la activación de los canales de K⁺ sensibles a ATP.

X. Referencias bibliográficas:

- Adaya-Villanueva A, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Marquez-Ramos A, Peña-Ortega F. (2010). Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides*. (31): 1761-1766
- Abele April E., Kenneth P. Scholz, Wendy K. Scholz, Richard J. Miller. (1990). Excitotoxicity induced by enhanced excitatory neurotransmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Cell Press*. (4): 413-419
- Adler G, Brassens S, Jajcevic A. (2003). EEG coherence in Alzheimer's dementia. *J Neural Transm*. (110): 1051- 1058
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P. Boyd, A. E., Gonzalez, g., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, j. & Nelson, D. A. (1995). Cloning of the 8 cell highaffinity sulfonyleurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. (268): 423-426
- Akiyama, H.; Kawamata, T.; Dedhar, S.; McGeer, P.L. (1991). Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *J. Neuroimmunol*. (32): 19-28
- Alzheimer A. (1907). Über einen eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie and Psychisch-Gerichtliche Medizin*. (64): 146-148
- Amaral D. G, Witter M. P. (1989).The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. (3): 571-591
- Andersen P., Bliss V. P. and Skrede K. K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Expl Brain Res*. (13): 222-238.
- Anderson, K.L.; Ferreira, A. (2004). alpha1 Integrin activation: a link between beta-amyloid deposition and neuronal death in aging hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res*. (75): 688-97
- Anderton BH, Betts J, Blackstock WP, Brion JP, Chapman S, Connell J, Dayanandan R, Gallo JM, Gibb G, Hanger DP, Hutton M, Kardalidou E, Leroy K, Lovestone S, Mack T, Reynolds CH, Van Slegtenhorst M. (2001). Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochemical society symposium*. (67): 73-80
- Annaert W., De Strooper B. (2002). A Cell Biological Perspective On Alzheimer's Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. (18):25-51
- Artieda J, M. Alegre, M. Valencia, E. Urrestarazu, M. Pérez-Alcázar, M.J. Nicolás, J. López Azcárate, J. Iriarte (2009). Brain oscillations: pathophysiological and therapeutic role in some neurological and psychiatric diseases. *An. Sist. Sanit. Navar*. 32 (Supl. 3): 45-60
- Ashcroft Frances M (2005). ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion Published in Volume 115, Issue 8 *J Clin Invest*. 115(8):2047-2058

- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., and Ashcroft, S.J.H. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B-cells. *Nature*. (312):446–448
- Azza Baraka, Samar ElGhotny (2010) Study of the effect of inhibiting galanin in Alzheimer's disease induced in rats *European Journal of Pharmacology*. (641):123–127
- Balleza-Tapia H. and Peña F (2009). Pharmacology of the Intracellular Pathways Activated by Amyloid Beta Protein *Mini Rev Med Chem*. 9(6):724-40
- Balleza-Tapia H., Huanosta-Gutiérrez A., Márquez-Ramos A., Arias N., Peña F. (2010). Amyloid β Oligomers Decrease Hippocampal Spontaneous Network Activity in an Age-Dependent Manner. *Current Alzheimer Research*. 7(5):453-62
- Babenko A. P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. (1998). A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu. Rev. Physiol.* (60):667–687
- Barber RC (2010). Biomarkers for early detection of Alzheimer disease. *J Am Osteopath Assoc* (110): 10-15
- Behrman R. E, Kliegman M. R, Jenson H. B. (2004). *Nelson Tratado de Pediatría*. Ed. Elsevier. España. 510-518
- Ben-Ari Y (1990). Galanin and Glibenclamide Modulate the Anoxic Release of Glutamate in Rat CA3 Hippocampal Neurons. *European Journal of Neuroscience*. (2): 62 - 68
- Berberich, S., Punnakal, P., Jensen, V., Pawlak, V., Seeburg, P.H., Hvalby, O., Köhr, G., 2005. Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* (25): 6907-6910
- Bernd Bohrmann, Lars Tjernberg, Pascal Kuner, Sonia Poli, Bernard Levet-Trafit, Jan Na˚slund, Grayson Richards, Walter Huber, Heinz Do˚beli, and Christer Nordstedt (1999). Endogenous Proteins Controlling Amyloid β - Peptide Polymerization. (274): 15990–15995
- Betourne , Ambre M. Bertholet , Elodie Labroue , He lene Halley , Hong Shuo Sun, Anne Lorsignol , Zhong-Ping Feng , Robert J. French , Luc Penicaud , Jean-Michel Lassalle , Bernard Frances (2009). Involvement of hippocampal CA3 KATP channels in contextual memory. *Neuropharmacology*. (56): 615–625
- Blalock, E.M.; Geddes, J.W.; Chen, K.C.; Porter, N.M.; Markesbery, W.R.; Landfield, P.W (2004). Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (101) 2173-8
- Bliss TV, Lomo T(1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* (232):331-356

- Bozzo, C.; Lombardi, G.; Santoro, C.; Canonico, P.L (2004). Involvement of beta(1) integrin in beta AP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Neurosci*, (25). 1-8
- Braak H., Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4):239-59.
- Braak H, Braak E. (1992). The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci. Res.* 15(1-2):6-31
- Brion JP, Anderton BH, Authelet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tremp G. (2001). Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochemical society symposium.* (67): 81-88
- Buzsaki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron.* (33): 1–20
- Caltagarone, J.; Jing, Z.; Bowser, R (2007). Focal adhesions regulate Abeta signaling and cell death in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* (1772) 438-45
- Char-Chang Shiem, Michael Coghlan, James P. Sullivan, Murali Gopalakrishnan (2000). Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Rev.* (52):557–593
- Cirrito J., Yamada K., Finn M. (2005) Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- β Levels In Vivo. *Neuron.* (48): 913–922
- Cirrito R.J., Kang J., Lee J., Stewart F. R., Verges D. K., Silverio L. M., Bu G., Mennerick S., Holtzman D. M. (2008). Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid- β In Vivo *Journal of Neurology.* (58):42 51
- Cobb S.R, Buhl E.H, Halasy K, Paulsen O, Somogy P (2005). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature.* (378): 75-78
- Coria F, Rubio I, Bayón C. (1994) Alzheimer's disease, β -amyloidosis, and aging. *Rev Neuroci.* (5):275-292
- Colom LV, Castaneda MT, Banuelos C, Puras G, Garcia-Hernandez A, Hernandez S, Mounsey S, Benavidez J, Lehker C (2010). Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function. *Neurobiol Aging.* (31): 46-57
- Cullen W. K., Wu J., Anwyl R., Rowan M. J. (1996). Amyloid produces a delayed NMDA receptor- dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport.* (8): 87-92
- Cullen, W.K.; Suh, Y.H.; Anwyl, R.; Rowan, M.J (1997). Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport.* (8): 3213-7
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsaki G (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the

behaving rat. *Neuron*. (37):311-322

Daut, J., Klieber, H.G., Cyrus, S., and Noack, T. (1994). KATP channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc. Res.* (28):811–817

Davis JN, and Chisholm JC (1997). The amyloid cascade hypothesis of AD: decoy or real McCoy? *Trends Neurosci* (20): 558-559

Denda, S.; Reichardt, L.F (2007). Studies on integrins in the nervous system. *Meth. Enzymol.* (426): 203-21.

Dong Liu, Michael Pitta, Jong-Hwan Lee Balmiki Ray, Debomoy Lahiri, Katsutoshi Furukawa, Mohamed Mughal, Haiyang Jiang, Julissa Villarreal, Roy G. Cutler, Nigel H. Greig, and Mark P. Mattson (2010) The KATP Channel Activator Diazoxide Ameliorates A β and Tau Pathologies and Improves Memory in the 3xTgAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 22(2): 443 457

Douglas, R. J (1967). The hippocampus and behavior. *Psychol Bull.* (67): 416-442

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K₊ conduction and selectivity. *Science* (280): 69–77

(DSM-IV) American Psychiatric Association (1994). *Diagnótic and statistical manual of mental disorders* (4a. ed.): 139-158

Eikelenboom, P.; Zhan, S.S.; Kamphorst, W.; van der Valk, P.; Rozemuller, J.M (1994). Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Virchows Arch*, (424): 421-7

E. Kraepelin, *Psychiatrie* (1910). Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. II. Band (Barth Verlag, Leipzig)

Edwards G, Weston AH (1993). The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (33): 597–637

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European journal of the biochemistry.* (107): 519-527

Esteban Jose A. (2004). Living with the enemy: a physiological role for the b-amyloid peptide. *Neurosciences.* (27): 1-3

Fishan A. Pike F.G, Buhl E.H, Paulsen O (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 hz in the hippocampus in vitro. *Nature.* (394): 186-189

Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, Brewer JB, Dale AM (2010). CSF

biomarkers in prediction of cerebral and clinical change in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurosci* (30):2088-2101

Fitzjohn S. M., Morton R. A., Kuenzi F., Rosahl T. W., Shearman M., Lewis H., Smith D., Reynolds D. S., Davies C. H., Collingridge G. L., Seabrook G. R. (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. *The Journal of Neuroscience*. 21(13):4691–4698

Frasca, G.; Carbonaro, V.; Merlo, S.; Copani, A.; Sortino, M.A (2008). Integrins mediate beta-amyloid-induced cell-cycle activation and neuronal death. *J. Neurosci. Res.* (86): 350-5

Furtmayr-Schuh, Annelies. (1995) *La enfermedad de Alzheimer: saber, prevenir, tratar, vivir con la enfermedad.* Barcelona: Herder: 5-36

Gandolfo, S. Romettino, C. Gottesmann, G. van-Luijtelea, A. Coenen, J.N. Bidard, M. Lazdunski (1989). K⁺ channel openers decrease seizures in genetically epileptic rats *Eur. J. Pharmacol.* (167) 181–183

Glenner G. G. and Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (120): 885-890

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. GSK3 (2007). Inhibition and KATP channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol* (102): 341–349

Gruber, A. Keil, M.M. Muller (2001). Modulation of induced gamma band responses and phase synchrony in a paired associate learning task in the human EEG *Neurosci Lett*, (316): 29–32

Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski and L.I. Binder(1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (83): 4913–4917

Guozhao Ma, Qingxi Fu, Yong Zhang, Jianxin Gao, Jinjiao Jiang, Ailing Bi, Kejing Liu, Yifeng Du Chunfu Chen, Yuanxiao Cui, Lin lu (2008). Effects of Ab1–42 on the Subunits of KATP Expression in Cultured Primary Rat Basal Forebrain Neurons. *Neurochem Res* (33): 1419-1424

Guozhao Ma, Jianxin Gao, Qingxi Fu, Liangliang Jiang, Ruixia Wang, Yong Zhang, Kejing Liu (2009). Diazoxide Reverses the Enhanced Expression of KATP Subunits in Cholinergic Neurons Caused by Exposure to Ab1-42. *Neurochem Res.* (34): 2133-2140

Haroutunian V, Perl DP, Purohit DP, Purohit DP, Marin D, Khan K, Lantz M, Davis KL, Mohs RC (1998). Regional Distribution of neuritic plaques in the nondemented elderly and subjects with very mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* (55): 1185-1191

- Hajos N, Paulsen O: Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus (2009). *Neural Network*, (22):1113-1119
- Henriksen EJ, Dokken BB. (2006). Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Current drug targets*. (7):1435-1441
- Hibino H, Atsushi Inanobe, Kazuharu Furutani, Shingo Murakami, Ian Findlay and Yoshihisa Kurachi (2009). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev* (90): 291–366
- Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, 3a ed Universidad de Washington. 131-168
- Ho, G.J.; Hashimoto, M.; Adame, A.; Izu, M.; Alford, M.F.; Thal, L.J.; Hansen, L.A.; Masliah, E (2005). Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiol. Aging*. (26) 625-35
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O. and Woodgett, J. R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. (406):86 -90
- Hsia A., Masliah E., McConlogue L., Yui G., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Malenka R., Nicoll R., Mucke L. (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (96):3228–3233
- Ikeda M, Deborah D , James M, (1993). Differential alterations of ion channel binding sites in temporal and occipital regions of the cerebral cortex in Alzheimer's disease, *Brain Research*. (630): 50-56
- Iqbal K, H.M. Wisniewski, M.L. Shelanski, S. Brostoff, B.H. Liwnicz and R.D. Terry (1974). Protein changes in senile dementia, *Brain Research*. (77): 337–343
- Iwata N, Makoto Higuchi, Takaomi C. Saido (2005). Metabolism of amyloid-h peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics* (108): 129 – 148
- Imahori, K.; Uchida, T (1997). Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J. Biochem*. (121) 179-88
- Inagaki, N., Gonol, T., Clement, J. P. Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. & Bryan, J. (1995). Reconstitution of KATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* (270) : 1166-1170
- Jalbert J. J., Daiello L. A., Lapane1 K. L. (2008). Dementia of the Alzheimer Type. *Epidemiologic Reviews*. (30): 15-34

- Jan, L. Y, N Jan. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* (20) : 91-123
- Jiang C, Sigworth F, Haddad G (1994). Oxygen deprivation activates an ATP-inhibitable K_v channel in substantia nigra neurons. *J Neurosci* (14): 5590–5602
- Jolas T., Zhang X., Zhang Q., Wong G., Vecchio R., Gold L., Priestley T. (2002). Long-Term Potentiation Is Increased in the CA1 Area of the Hippocampus of APP_{swefind} CRND8 Mice. *Neurobiology of Disease.* (11): 394 – 409
- Jope RS, Johnson GV. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences.* (29): 95-102
- Jutras, M.J. and Buffalo, E.A. (2010). Synchronous neural activity and memory formation. *Current Opinion in Neurobiology.* 1-6
- Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S., (2003). APP processing and synaptic function *Neuron.* 27;37(6):925-37
- Kaidanovich-Beilin, Tatiana V Lipina, Keizo Takao, Matthijs van Eede, Satoko Hattori, Christine Laliberté, Mustafa Khan, Kenichi Okamoto, John W Chambers, Paul J Fletcher, Katrina MacAulay, Bradley W Doble, Mark Henkelman, Tsuyoshi Miyakawa, John Roder and James R Woodgett (2009). Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 α mutant mice. *Molecular Brain.* (35): 1-23
- Karschin, Claudia Ecke, Frances M. Ashcroft, Andreas Karschin (1997). Overlapping distribution of KATP channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Letters.* (401): 59-64
- Khan A, Xiao, Banwait S et al (2007). Neuroglobin attenuates β -amyloid neurotoxicity in vitro and transgenic Alzheimer phenotype in vivo. *PNAS.* (104): 19114–19119
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann Neurol.* 55: 306-319
- Koffie R. M., Meyer-Luehmanna M., Hashimotoa T., Adamsa K. W., Mielkea M. L., Garcia-Allozaa M., Michevac K. D., Smithc S. J., Kimd M. L., Leed V. M., Hymana B. T., Spires-Jonesa T. L. (2009) Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (106): 4012-4017
- Koster, J.C., Marshall, B.A., Ensor, N., Corbett, J.A., and Nichols, C.G. (2000). Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes. *Cell.* (100):645–654

- Koudinov A. R., Berezov T. (2004). Alzheimer's amyloid-beta ($A\beta$) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. (64): 71-79
- Kremer A, Justin V, Louis, Tomas Z, Jaworski and Fred Van Leuven (2011). GSK3 and Alzheimer's disease: fact and fiction. *Molecular Neuroscience*. (4): 1-10
- Lisman J, Buzsa'ki G (2008) A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr Bull*. (34):974–980
- Lee SH, Park YM, Kim DW, Im CH (2010). Global synchronization index as a biological correlate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurosci Res*. (66) : 333-339
- Lewis FT (1923). The significance of the term Hippocampus. *J Comp Neurol*. (35):213–230
- Lopes, M. A. and Bottino, C. M. C. (2002). Prevalencia de demencia em diversas regioes do mundo: analise dos estudos epidemiologicos de 1994 a 2000. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. (60): 61–69
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramon P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* (20) :27-39
- 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 predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* (155) : 853-862
- MacAulay K., Doble B. W., Patel S., Hansotia T., Sinclair E. M., Drucker D. J., Nagy A. and Woodgett J. R. (2007) Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab*. (6): 329–337
- Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L. (2010). The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. (5): 226-31
- Mayeux R. (2003). Epidemiology Of Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*. (26):81-104
- Miki, T., et al. (1998). Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. (95)10402–10406
- Miki, T. & Seino, S. (2005) Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol*. (38):917-25
- Miki, T., et al. (2002). Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat. Med*. (8):466–472

- Mourre, C., Ben Ari, Y., Bernardi, H., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1989) Antidiabetic sulfonylureas: localization of binding sites in the brain and effects on the hyperpolarization induced by anoxia in hippocampal slices. *Brain Res.* (486): 159-64
- Mucke L., Masliah E., Gui-Qiu Yu, Mallory M., Rockenstein E.M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K. and McConlogue L. (2000). High-Level Neuronal Expression of Ab1–42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *J Neurosci.* (11):4050-8
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of neurochemistry.* (81)1073-1083
- Mulder C, Verwey NA, van der Flier WM, Bouwman FH, Kok A, van Elk EJ, Scheltens P, Blankenstein MA (2010) Amyloid-beta (1-42), total tau, and phosphorylated tau as cerebrospinal fluid biomarkers for the diagnosis of Alzheimer disease. *Clin Chem* (56): 248-253
- Muller, T. Gruber, A. Keil (2000). Modulation of induced gamma band activity in the human EEG by attention and visual information processing *Int J Psychophysiol.* (38): 283–299
- Näslund J., Haroutunian V., Mohs R., Davis K., Davies P., Greengard P., Buxbaum J (2000). Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *Journal of American Medical Association.* JAMA. (283):1571-7
- Ning, Lisa C. Miller, Hilary A. Laidlaw, Kenneth R. Watterson, Jennifer Gallagher, Calum Sutherland, and Michael L. J. Ashford (2009). Leptin-dependent Phosphorylation of PTEN Mediates Actin Restructuring and Activation of ATP-sensitive K_v Channels. *The Journal of Biological Chemistry.* (284): 9331–9340
- Noma A (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* (305): 147–148
- Palmer A. M. (2002) Pharmacotherapy for Alzheimer’s disease: progress and prospects. *Pharmacological Sciences.* (9):426-433
- Palva JM, Palva S, Kaila K. (2005). Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *The journal neuroscience.* (25): 3962-3972
- Paulson B, Ramsden M, Forster C et al (2008). Amyloid Plaque and Neurofibrillary Tangle Pathology in a Regulatable Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *The American Journal of Pathology.* (17): 762-772
- Peña F., Gutiérrez-Lerma A., Quiroz-Báez R., Arias C. (2006). The Role of β -Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer’s disease Therapy. *Current Neuropharmacology.* (2):149-163
- Peña F, P.; Ordaz, B.; Balleza-Tapia, H.; Bernal-Pedraza, R.; Márquez- Ramos, A.; Carmona-Aparicio, L.; Girordano, M (2009). Beta amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of Fyn-kinase. *Hippocampus,*

(In-press)

Pena F, Bernal-Pedraza (2012). Amyloid Beta Peptide Slows Down Sensory-Induced Hippocampal Oscillations. *International Journal of Peptides* (2012): 1-8

Parent A., Linden D. J., Sisodia S. Borchelt D. R. (1999). Synaptic Transmission and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transgenic Mice Expressing FAD-Linked Presenilin 1. *Neurobiology of Disease*. (6): 56–62

Raisman, J., Cowan, W. M., and Powell, T.P. S. (1965). The extrinsic efferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain*. (88): 963-966

Ramon y Cajal S (1911) *Histologie du system nerveux de l'homme et vertebres*. Madrid: Instituto Ramon y Cajal

Restrepo, N Eduardo, Hermann Scholtz González (2006). *Neurocirugía para médicos generales*. Editorial Antioquia, Medellín Colombia. 168-175

Rodríguez, N. George, J.P. Lachaux, J. Martinerie, B. Renault, F.J. Varela Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity, *Nature*. (397) 430–433

Roelfsema, A.K. Engel, P. König, Singer W (1997). Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas *Nature*. (385): 157–161

Sabo, S.; Lambert, M.P.; Kessey, K.; Wade, W.; Krafft, G.; Klein, W.L (1995). Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci. Lett*, (184): 25-8

Salloway S., Correia S. (2009). Alzheimer disease: Time to improve its diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. (1): 49-58

Shirazi, S.K.; Wood, J.G (1993). The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport*. (4) 435-7

Schnitzler A, Gross J. (2005). Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. (6): 285-296

Schlaepfer, D.D.; Hunter, T (1996). Signal transduction from the extracellular matrix--a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell. Struct. Funct*. (21): 445-50

Scott L, Feng J, Kiss T, Needle E, Atchison K, Kawabe TT, Milici AJ, Hajós-Korcsok E, Riddell D, Hajós M (2012). Age-dependent disruption in hippocampal theta oscillation in amyloid- β overproducing transgenic mice. *Pfizer Global Research and Development, Groton, CT, USA* 67-80

Selkoe DJ (1993). Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease.

- Selkoe D. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*. (81):741-766
- Selkoe D. J., Schenk D. (2003). Alzheimer's Disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Neurochem Res. (11):1705-13
- Slingerland, W. Hurkx, K. Noordam§, S. E. Flanagan, J. W. Jukema, L. C. Meiners G. J. Bruining, A. T. Hattersley and M. Hadders-Algra (2007). Sulphonylurea therapy improves cognition in a patient with the V59M KCNJ11 mutation. *Diabetic Medicine* (25): 277-281
- Snell, Richard S. *Neuroanatomia clínica* (2007) -6a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 332-337
- Somogy P, Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneuron structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. (562): 9-26
- Stanford, I. and Lacey, M. (1995) Regulation of potassium conductance in rat midbrain dopamine neurons by intracellular adenosine triphosphate (ATP) and the sulphonylureas tolbutamide and glibenclamide. *J. Neurosci*. (15): 4651–4657
- 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) 5703-14
- Sun M., Alkon D. L. (2002). Impairment of Hippocampal CA1 Heterosynaptic Transformation and Spatial Memory by β -Amyloid₂₅₋₃₅. *The Journal of Neurophysiology*. (13):4691–4698
- Swanson L. W., Sawchenko P. E. and Cowan W. M. (1980) Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Res*. (197): 207-212
- Takashima, A.; Noguchi, K.; Sato, K.; Hoshino, T.; Imahori, K (1993). Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci*. (90): 7789-93
- Tallon-Baudry, O. Bertrand, F. Peronnet, J. Pernier Induced gamma-band activity during the delay of a visual short-term memory task in humans *J Neurosci*. (18): 4244–4254
- 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*. (4):572-80
- Tolnay M, Probst A (2003). The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life*. (55): 299-305

- Tromba, Antonino Salvaggi, Giorgio Racagn and Andrea Volterra (1992). Hypoglycemia-activated K⁺ channels in hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*. (143): 185-189
- Troussard A, Tan C, Nathan Y, Dedhar (1999). Cell-Extracellular Matrix Interactions Stimulate the AP-1 Transcription Factor in an Integrin-Linked Kinase- and Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology*. (11): 7420-7427
- Turenne, G. A., and B. D. Price. (2001). Glycogen synthase kinase 3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol*. (2):1471-2121
- Turner P., O'Connor K., Tate W., Abraham W. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*. (3):141-147
- Tusnády GE, Bakos E, Váradi A and Sarkadi B (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett*. (402): 1-3
- Uhlhaas, W. Singer (1996). Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology *Neuron*. (52): 155-168
- Van Gool, D.; Carmeliet, G.; Triau, E.; Cassiman, J.J.; Dom, R (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): 71-3
- Verdier, Y.; Penke, B (2004). Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr. Protein. Pept. Sci*, (5): 19-31
- Verdier, Y.; Zarandi, M.; Penke, B (2004). Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci*. (10), 229-48
- Verret, L, Edward O, Mann G, Hang, Albert M, Barth, Inma C, Kaitlyn H, Nino D, Eliezer M, Anatol C, Kretzer, Istvan M, Lennart Mucke, Jorge J. (2012). Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell* (149), 708-721
- Villette, F. Poindessous-Jazat, A. Simon et al (2010). Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory associated θ oscillations after hippocampal amyloid- β pathology in the rat. *Journal of Neuroscience*, 30: 10991-11003
- Walsh D., Selkoe D. (2007) A β Oligomers: a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*. (101): 1172-1184
- Walsh, D.M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J.V.; Cullen, W.K.; Anwyl, R.; Wolfe, M.S.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal longterm potentiation in vivo. *Nature*. (416): 535-9

- Wang Q., Walsh D. M., Rowan M. J., Selkoe D. J., Anwyl R. (2004). Block of Long-Term Potentiation by Naturally Secreted and Synthetic Amyloid β -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. *The Journal of Neuroscience*. (24) 3370–3378
- Wang, R., et al. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*. (53):1959–1965
- Wilquet V., De Strooper B. (2004). Amyloid-Beta Precursor Protein Processing in Neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology*. (14):582–588
- Wimo A, Winblad B, Agüero-Torres H, von Strauss. (2003) The magnitude of dementia Occurrence in the World. *Alz Diss Assoc Disord*; (17):63-7
- Witter, MP.; Amaral, DG (2004). Hippocampal Formation. In: Paxinos, G., editor. *The Rat Nervous System*. 3rd. Elsevier Academic Press. 1309
- Wu J., Anwyl R., Rowan M. J. (1995). β -amyloid-(1–40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro. *European Journal of Pharmacology*. (284): 1 - 3
- X. Chia, E.T. Suttona, G. Hellermannb, J.M. Pricea (2000) Potassium channel openers prevent β -amyloid toxicity in bovine vascular endothelial cells. *Neuroscience Letters*. (290): 9-12
- Yadong Goodman, Mark P. Mattson (1996) K^+ channel openers protect hippocampal neurons against oxidative injury and amyloid 13-peptide toxicity *Brain Research*. (706): 328-332
- Yamada, K., Ji, JJ., Yuan, H., Miki, T., Sato, S., Horimoto, N., Shimizu, T., Seino, S. & Inagaki, N. (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science*. (292):1543-6
- Zawar, T. D. Plant, C. Schirra, A. Konnerth and B. Neumcke (1999). Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*. (514): 327—341
- Zhang, C.; Qiu, H.E.; Krafft, G.A.; Klein, W.L (1996). 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): 185-8
- Zingman, L.V., et al. 2002. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*:13278–13283