

**EFECTOS DEL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE (25-35) SOBRE LA RESPUESTA
GLUTAMATÉRGICA EN CÉLULAS CULTIVADAS Y RODAJAS DE
HIPOCAMPO
Resultados Preliminares**

**Presentado por:
MAURICIO ORLANDO NAVA MESA**

TRABAJO DE FIN DE MASTER

**DIRECTOR:
JAVIER YAJEYA PÉREZ**

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEON
MASTER EN NEUROCIENCIAS
SALAMANCA
2009**

ÍNDICE GENERAL

	Pg
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Enfermedad de Alzheimer	3
1.1.1. Fisiopatología	3
1.1.2. Hipótesis Amiloidea de la E. de Alzheimer	5
1.1.3. Péptido B amiloide y disfunción sináptica	6
1.1.4. Efectos del B amiloide sobre la neurotransmisión glutamatérgica	6
1.2. Hipocampo	7
1.2.1. Circuito intrahipocampal	8
1.2.2. Conexión Aferente	9
1.2.3. Conexión Eferente	9
1.2.4. Neurotransmisión Glutamatérgica en la función del hipocampo	10
1.3. Efectos del B amiloide sobre la función hipocampal	11
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo General	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1. Cultivos primarios	14
4.2. Aplicación de Pulsos de Glutamato	14
4.3. Soluciones y Fármacos	14
4.4. Estudio Electrofisiológico	15
4.4.1. Instrumentos	15
4.4.2. Estudio en Rodajas de Hipocampo	16

4.4.3. Estudio en Cultivo de Hipocampo	18
4.5. Adquisición y Análisis de Datos	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	26
8. PERSPECTIVAS	26
9. BIBLIOGRAFÍA	27

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedad De Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo crónico de curso insidioso que afecta principalmente a sujetos adultos mayores. Es el tipo de demencia más frecuente, el cual según estadísticas de U.S.A, puede afectar entre un 5 a 10% de las personas mayores de 65 años (Purves *et al.*, 2001). Esta enfermedad se caracteriza desde el punto de vista clínico por una serie de alteraciones cognitivas, entre ellas trastornos del lenguaje, de la percepción, orientación y la memoria (McKhann *et al.*, 1984). El déficit en la memoria episódica se presenta de manera frecuente en los sujetos con E. de Alzheimer, muchas veces sin presentarse deterioro en la memoria semántica. Esta dificultad para la adquisición de conocimientos episódicos se han atribuido a desconexión del hipocampo y los sistemas de procesamiento sensorial (Aguado-Aguilar, 2001).

1.1.1. Fisiopatología

Dentro de los hallazgos patológicos descritos en estudios postmortem de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, se destacan: la acumulación del péptido B amiloide en forma de placas, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal selectiva en el cerebro (Selkoe, 2002; Goedert y Spillantini, 2006).

Mutaciones en el gen que codifica para la Proteína Precursora del Amiloide (APP) así como en la enzima que participa en su procesamiento (presenilina 1) han sido reportadas en pacientes que sufren una forma de Alzheimer de inicio temprano (Goate *et al.*, 1991; Sherrington *et al.*, 1995). Otra enzima encargada de la fragmentación de APP, denominada γ secretasa ha sido también implicada con la producción de b- amiloide (BA) en un modelo de estrés oxidativo “*in vitro*” (Shen *et al.*, 2008). Por lo tanto, una alteración en las vías de procesamiento de APP resulta en un incremento en la producción de BA y/o en su agregación en forma de placas. Los efectos tóxicos del BA sobre la función neuronal y el desarrollo de la E. de Alzheimer serán abordados en profundidad más adelante.

Como anteriormente se mencionó, uno de los hallazgos característicos de la E. Alzheimer es la presencia de ovillos neurofibrilares depositados al interior de las neuronas. En los años 80s, se descubrió que estos ovillos se encuentran formados por la proteína Tau asociada a los microtúbulos (Kosik *et al.*, 1986). Esta proteína se encuentra en forma hiperfosforilada,

formando una red de filamentos compactos. La proteína Tau es importante para el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, modulando finalmente la estabilidad del citoesqueleto y la morfología axonal. Aparentemente esta hiperfosforilación se encuentra asociada a un incremento en la actividad de diferentes kinasas (cdk5, GSK3B) inducida a su vez por las formas fibrilares de BA (Alvarez *et al.*, 1999). Los ovillos neurofibrilares se depositan principalmente en estructuras como hipocampo, corteza entorrinal y amígdala (Maccioni *et al.*, 2001), estructuras importantes para el procesamiento de la memoria.

La desregulación en la actividad de las kinasas y por lo tanto en el nivel de fosforilación de la proteína Tau, afecta la dinámica del citoesqueleto produciendo alteraciones en la función celular. Estos procesos a su vez se han visto relacionados con los procesos de neurodegeneración (Maccioni *et al.*, 2001; Mandelkow *et al.*, 1995). Por otro lado, la neurodegeneración se ha visto muy relacionada con el depósito de formas tóxicas de BA (Bezprozvanny y Mattson, 2008). Además de los anteriores factores, hay evidencia de un incremento en el estrés oxidativo en cerebros de sujetos con E. Alzheimer, resultado de un incremento en los radicales libres (Markesbery, 1997), así como una alteración en las enzimas antioxidantes. Esto trae como resultado un incremento en la oxidación de proteínas, lípidos y ADN, y por consiguiente degeneración neuronal (Varadarajan *et al.*, 2000).

El proceso de neurodegeneración en la E. de Alzheimer, no se da en todo el cerebro si no que es mas bien un proceso selectivo que afecta a ciertos circuitos, sistemas de neurotransmisión y estructuras cerebrales. Uno de los sistemas de neurotransmisión típicamente afectados en la enfermedad de Alzheimer es el sistema colinérgico. Múltiples estudios muestran una alteración en la actividad colinérgica a nivel cortical (Coyle *et al.*, 1983; Wevers *et al.*, 2000) y a nivel del hipocampo (Maki *et al.*, 2002; Jouvenceau *et al.*, 1998), así como en el sistema colinérgico septo hipocampal (Abe *et al.*, 1994). Los estudios de imágenes funcionales de sujetos con E. de Alzheimer muestran una menor actividad metabólica así como hipoperfusión en áreas como el lóbulo temporal medial (Wang *et al.*, 2009), giro cingulado posterior, corteza de asociación parietal y giro frontal medio y superior (Johnson *et al.*, 2005). En la mayoría de casos, independiente del estudio realizado se reporta además una atrofia cortical importante.

1.1.2. Hipótesis Amiloidea de la E. de Alzheimer

El depósito de Amiloide es uno de los procesos que disparan los eventos moleculares y celulares que llevan al desarrollo de la E. de Alzheimer. Esta afirmación se basa en el hecho de que los depósitos de BA en forma de placas seniles, se encuentra en proximidad con neuronas en degeneración (Katzman y Saitoh, 1991) y en la demostración de los efectos tóxicos del BA sobre neuronas en cultivo (Varadarajan *et al.*, 2000). Se han reportado otros eventos asociados con la E. de Alzheimer que son disparados por el péptido BA y que serán presentados a continuación:

BA induce Fosforilización de Tau: como anteriormente se mencionó, uno de los hallazgos característicos de la E. de Alzheimer es la presencia de los ovillos neurofibrilares. Hay evidencia de que la agregación de la proteína Tau puede ser inducida por el péptido BA, proceso que a su vez está mediado por la cdk5 (Maccioni *et al.*, 2001).

BA y Estrés Oxidativo: hay evidencia de un incremento del estrés oxidativo en cerebros de pacientes con E. Alzheimer. Según recientes hallazgos, la agregación del péptido BA junto con metales iónicos (Butterfield y Bush, 2004), puede aumentar los niveles de radicales libres y por lo tanto, inducir oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y formación de especies reactivas de oxígeno, los cuales afectan la función neuronal, aumentando los niveles de calcio intracelulares y finalmente produciendo muerte celular (Varadarajan *et al.*, 2000).

BA afecta la membrana plasmática: El péptido BA puede interactuar directamente sobre los lípidos (Matsuzaki, 2007) y proteínas (Sultana y Butterfield, 2008) de la membrana. Por otro lado el aumento de radicales libres inducidos a su vez por el péptido BA, afectan los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática, lo que explica en parte el aumento en la permeabilidad en las neuronas (Varadarajan *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha descrito que el BA puede formar directamente canales catiónicos en las membranas lipídicas (Pollard *et al.*, 1993) y de esta manera producir neurotoxicidad.

BA induce disfunción mitocondrial: Además de los efectos del BA sobre la membrana plasmática, se ha descrito recientemente que este péptido puede afectar la función mitocondrial. El péptido BA es capaz de producir poros de permeabilidad mitocondrial, el cual a su turno afecta el gradiente de protones entre la membrana interna y la matriz,

además induce la liberación del citocromo c al citoplasma. Esto trae como consecuencia la activación de la apoptosis y alteración en la producción de ATP (Kluck *et al.*, 1997)

1.1.3. Péptido B Amilode y Disfunción Sináptica

Además de los anteriores efectos sobre los procesos que inducen degeneración celular, se ha descrito que el péptido BA puede afectar la función sináptica y por lo tanto el procesamiento cognitivo antes del proceso de degeneración misma (Marcello *et al.*, 2008). En un reciente estudio, se evaluó los efectos rápidos de la forma soluble del BA en neuronas de hipocampo cultivadas. Según este estudio, el BA disminuye el pull de vesículas sinápticas en terminales nerviosas excitatorias y además disminuye el número de espinas dendríticas de estas células. Estos hallazgos fueron relacionados con una disminución en las *corrientes posinápticas excitatorias miniatura* (mEPSCs) y por lo tanto con una disminución en la eficacia sináptica (Calabrese *et al.*, 2007). Los efectos del BA sobre la función sináptica también parecen depender de la forma de ensamblaje de dicho péptido (fibrilar, no fibrilar, oligomérica) (Ye *et al.*, 2004; Marcello *et al.*, 2008), así como en los efectos mismos del BA sobre la excitabilidad neuronal (Yun *et al.*, 2006). Estos efectos parecerían explicar en parte los déficits en aprendizaje y memoria por el aumento agudo del BA, así como por su depósito. Estudios de nuestro laboratorio, indican que el BA 25-35 deprime la función sináptica aferente de la amígdala basolateral, un proceso mediado por los canales de calcio tipo L presinápticos (Ashenafi *et al.*, 2005). Además, este hallazgo indica que el efecto del BA sobre la función sináptica podría afectar múltiples circuitos involucrados con otros procesos cognitivos.

1.1.4. Efectos del B Amiloide sobre la Neurotransmisión Glutamatérgica

Un exceso en la liberación de glutamato sobre estimula a las neuronas y al mismo tiempo incrementa los niveles de calcio intracelular a niveles tóxicos. Este fenómeno conocido como excitotoxicidad estaría mediado por los receptores ionotrópicos de glutamato. La depleción de vesículas sinápticas observada en la E. de Alzheimer puede ser explicada por este fenómeno de excitotoxicidad (Butterfield *et al.*, 2007). Además, este hallazgo se relaciona con el hecho de que el BA disminuye las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas excitatorias en neuronas en cultivo (Calabrese *et al.*, 2007), sin embargo hay que

tener en cuenta los efectos postsinápticos del mismo péptido. En este sentido, hay evidencia de que el péptido BA puede afectar los receptores ionotrópicos para glutamato NMDA y AMPA de manera diferencial. En una serie de estudios electrofisiológicos, hay evidencia de que el BA puede incrementar la conductancia iónica para NMDA (Molnar *et al.*, 2004) y por otro lado disminuir la de AMPA (Parameshwaran *et al.*, 2007) en modelos *in vitro* así como modelos *in vivo*. Sin embargo, en estos modelos no se tiene en cuenta factores como concentración, tipo y tiempo de exposición del péptido BA, ni tampoco se puede excluir del todo los efectos presinápticos. La activación de los receptores NMDA por el BA y el subsecuente influjo de Calcio intracelular parecen ser importantes también para los procesos de neurodegeneración (Cowburn *et al.*, 1997). Por otro lado, hay evidencia de que el BA puede afectar el potencial de membrana de los astrositos, inhibiendo a su vez la recaptación extracelular de glutamato y aumentando su disponibilidad en la hendidura sináptica (Harkany *et al.*, 2000). El efecto del BA sobre la neurotransmisión ha sido evaluado en núcleos del cerebro anterior basal como la banda diagonal de Broca. En ese estudio el BA 1-42 afectó la neurotransmisión glutamatergica por vía de los receptores nicotínicos presinápticos de acetil colina y regulando la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato (Chin *et al.*, 2007).

1.2. Hipocampo

El hipocampo hace parte de lo que se conoce como la formación hipocampal, formada adicionalmente por el giro dentado y el subículo. El hipocampo es reconocido macroscópicamente como una pequeña protuberancia medial en el cuerno temporal del ventrículo lateral. Por otro lado, el giro dentado es una estrecha banda en la porción medial del hipocampo. El hipocampo hace parte del allocortex el cual es una estructura laminar similar al neocortex pero con menos capas y desde el punto de vista filogenético, más antigua (Greenstein, 2000). El hipocampo hace parte del sistema límbico y tiene un papel muy importante en los procesos de memoria declarativa o explícita, así como en la consolidación de la memoria de corto plazo a largo plazo. Este hallazgo se hizo evidente en sujetos a quienes se les extirpó el hipocampo quirúrgicamente (Milner *et al.*, 1998). A continuación se abordará en profundidad algunas características sobre su conectividad y función.

1.2.1. Circuito intrahipocampal

El hipocampo está formado por una capa de neuronas piramidales las cuales se comunican entre sí a través de neuronas GABAérgicas (basket cells). Las neuronas piramidales se agrupan en tres regiones denominadas CA3, CA2 y CA1. La denominación de CA hace referencia al *Cornu Ammonis* (asta de Ammon) dada la forma del hipocampo. Por otro lado, el giro dentado está formado por neuronas granulares, las cuales reciben la información proveniente de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y proyectan hacia la región CA3 del hipocampo por medio de las fibras musgosas. Estas fibras musgosas están formadas por los axones de las células granulares hacen sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan hacia la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer y luego desde la región CA1 las neuronas proyectan hacia el subículo (Greenstein, 2000; Leranth y Hajszan, 2007) y de allí nuevamente a la corteza entorrinal. Ver figura 1.

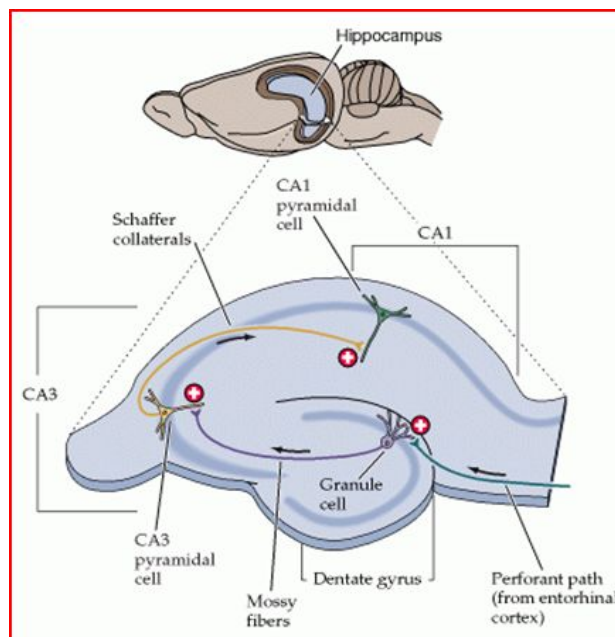


Fig. 1. Diagrama de una rodaja de hipocampo de roedor donde se muestran las regiones principales, vías excitatorias y conexiones sinápticas. (Tomado de Purves *et al.*, 2001)

1.2.2. Conexión Aferente

Existen tres vías aferentes principales en el hipocampo que fueron mencionadas anteriormente: la vía perforante que conecta con las células granulares del giro dentado; la fibra musgosa que proyecta a CA3 y finalmente, las colaterales de Schaffer que proyectan hacia la región CA1 (Kandel *et al.*, 1997). La corteza entorrinal, es la principal fuente de proyecciones hacia el hipocampo. La capa 2 de la corteza entorrinal no solo se proyecta al giro dentado, si no que algunos axones de la vía perforante también se conectan con neuronas de CA3 (Leranth y Hajszan, 2007). A su vez, la corteza entorrinal recibe información desde la corteza perirrinal y corteza parahipocampal, estructuras que reciben proyecciones de áreas de asociación unimodales y polimodales (lóbulos parietales, temporales y frontales) (Milner *et al.*, 1998). Además de la aferencia desde la corteza entorrinal, el hipocampo recibe algunas proyecciones del núcleo septal (Greenstein, 2000). En definitiva, la principal estructura del hipocampo que recibe proyecciones externas es el giro dentado, el cual recibe proyecciones colinérgicas y GABAérgicas desde el Septum medial, del área supramamilar, aferencias noradrenergicas de los núcleos póncticos y locus coeruleus, serotoninérgicas del rafe medial y dopaminérgicas del área tegmental ventral, además de un sistema comisural del hipocampo contralateral (Leranth y Hajszan, 2007).

1.2.3. Conexión Eferente

El hipocampo proyecta principalmente a diferentes áreas circunvecinas como la corteza entorrinal, subículo y núcleo septal. Por otro lado, el hipocampo también puede afectar otras estructuras cerebrales mucho más distantes a través de proyecciones indirectas y circuitos complejos. Entre estas estructuras se encuentran el hipotálamo, cuerpos mamilares (vía conexión recíproca del fornix), y el neocórtex (vía circuito de papez) (Greenstein, 2000; Kandel *et al.*, 1997). Con respecto a neocórtex, se ha descrito el efecto del hipocampo sobre estructuras como giro del cíngulo, a través de sus conexiones con corteza entorrinal y subículo (Greenstein, 2000). Las conexiones recíprocas del hipocampo con muchas de estas estructuras (incluida la amígdala, corteza prefrontal y de asociación) forma lo que se conoce como sistema límbico, un sistema importante para los procesos emocionales, entre otras funciones cognitivas (Kandel *et al.*, 1997).

1.2.4. Neurotransmisión Glutamatérgica en la función hipocampal

Las neuronas piramidales, las células granulares y sus conexiones intra hipocampales son el mayor componente de lo que se conoce como el circuito trisináptico del hipocampo. Este circuito se caracteriza por ser unidireccional y glutamatergico (Leranth y Hajszan, 2007).

La estimulación a alta frecuencia de cualquier punto del circuito aferente aumenta los potenciales posinápticos excitatorios (PEPS) en las neuronas hipocampales; este incremento en la eficacia sináptica puede permanecer por horas e incluso días. Este proceso es denominado potenciación a largo plazo (long term potentiation- LTP) e implica cambios en receptores postsinápticos, cambios presinápticos (es decir en la liberación del neurotransmisor), cambios estructurales en la sinapsis y en la citoarquitectura de la neurona misma (Martin et al., 2000; Kandel et al., 1997; Tsien, 2000). La LTP es el modelo básico que nos permite entender parte de los procesos funcionales en los circuitos cerebrales que participan en la formación de la memoria. De hecho, muchos tratamientos que alteran la memoria en animales de experimentación, también afectan la generación de LTP. De esta manera la LTP, es la evidencia de una forma de plasticidad sináptica que permite almacenar información de manera dependiente de la actividad, fenómeno descrito en estructuras que participan en el procesamiento de la memoria (Bliss y Collingridge, 1993). La LTP es un proceso que depende de la actividad de los receptores NMDA, AMPA y metabotrópicos para glutamato. Durante la generación de LTP, el incremento en la liberación de glutamato, y la activación de los receptores AMPA, despolariza a la neurona postsináptica. Una vez despolarizada, los receptores NMDA se activan (proceso dependiente de la liberación de Mg^{++} del canal mismo), permitiendo la entrada de calcio. A su vez, la entrada de calcio produce la activación de diferentes enzimas (por ejm. la kinasa PKC) las cuales activan diferentes factores de transcripción (por ejm. CREB) que inducen la activación de cierto genes que modifican la estructura de la neurona postsináptica, aumentando la expresión de receptores e incluso podría generar señales que de manera retrograda aumenta la probabilidad de neurotransmisor de la neurona presináptica. Todo esto en conjunto aumenta la eficacia de transmisión sináptica durante largos periodos de tiempo (Kandel *et al.*, 1997; Milner *et al.*, 1998). De esta manera, la función de los receptores de glutamato en los diferentes puntos de circuito del hipocampo, es indispensable para su función sináptica y por lo tanto para procesos cognitivos más complejos.

1.3. Efectos del B amiloide sobre la función hipocampal

Como anteriormente se mencionó, la LTP hace referencia a una forma de plasticidad, en la cual la eficiencia de la transmisión sináptica permanece incrementada a lo largo del tiempo. La LTP fue descrita inicialmente en el hipocampo, una estructura de máxima relevancia para el procesamiento de la memoria. Hay evidencia de que diferentes formas solubles del péptido BA, entre ellos el BA1-42 y sus fragmentos BA 25-35 y 31-35, pueden inhibir la inducción de LTP en el hipocampo de roedores (Chen *et al.*, 2000; Freir *et al.*, 2001). Este efecto puede ser dependiente de los receptores de glutamato tipo NMDA, así como de otros mecanismos (Chen *et al.*, 2002). En otros estudios, ratones transgénicos que sobre expresan la proteína APP y por lo tanto tienen incrementados los niveles de BA, presentan deterioro en el aprendizaje y memoria (Mucke *et al.*, 2000), así como en la inducción de LTP en giro dentado y en la región CA1 del hipocampo (Chapman *et al.*, 1999). Animales transgénicos que producen altos niveles de péptido BA (Kotilinek *et al.*, 2002), así como aquellos a los que se les administra BA de manera exógena, presentan deterioro en diferentes tipos de memoria dependientes de la función del hipocampo. Los efectos de la administración exógena de BA sobre la memoria, puede ser prevenido parcialmente por el uso de estatinas. Este efecto benéfico podría ser explicado por una disminución de la acumulación de BA y del estrés oxidativo (Kurinami *et al.*, 2008). Estudios de neuroimagen en humanos y roedores muestran que el hipocampo es una estructura muy sensible a los efectos tóxicos del BA. En un reciente estudio se muestra que dentro de la formación hipocampal, la corteza entorrinal presenta disminución en el flujo sanguíneo regional. Estos hallazgos fueron co-relacionados con deterioro en las pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Moreno *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios de neuronas de hipocampo cultivadas expuestas a BA, muestran los diferentes mecanismos encargados de la neurodegeneración y la neurotoxicidad. Entre los mecanismos descritos se destacan: el estrés oxidativo, la formación de los ovillos neurofibrilares, la disfunción mitocondrial, la inactivación de la bomba Na/K ATPasa y la activación de moléculas pro apoptóticas (Varadarajan *et al.*, 2000; Maccioni *et al.*, 2001; Kluck *et al.*, 1997). Sin embargo, otro de los factores que afectan la función del hipocampo antes de los procesos de muerte celular es la disfunción sináptica. El BA afecta considerablemente la actividad colinérgica (Maki *et*

al., 2002) así como la glutamatergica del hipocampo (Chen *et al.*, 2002; Maccioni *et al.*, 2001; Gasparini y Dityatev, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

A medida que la población general aumenta su expectativa de vida se incrementa la población mayor en la sociedad actual. Esto trae como consecuencia, el desarrollo de una serie de patologías que se presentan con mayor incidencia en este grupo de edad. Dentro de estas patologías se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, y entre ellas la de mayor relevancia e impacto es la enfermedad de Alzheimer.

Los modelos animales, son la primera aproximación experimental que permite entender parte de los mecanismos moleculares y funcionales que se producen en estos trastornos neurodegenerativos. Actualmente, existen muchos modelos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer entre los que se destacan los estudios *in vitro*. Se conoce hoy en día que uno de los factores que puede disparar los mecanismos moleculares y celulares que producen el trastorno cognitivo en la E. de Alzheimer es la presencia de niveles incrementados del péptido Beta Amiloide, así como su depósito en forma de placas. Llama la atención que en muchos de los modelos animales, así como en pacientes con diferentes grados de E. de Alzheimer, los trastornos cognitivos y concretamente el deterioro en la memoria aparece antes del proceso de muerte neuronal y neurodegeneración. Esto está en relación con el hecho que el péptido Beta Amiloide puede afectar la actividad sináptica en diferentes estructuras cerebrales.

Por otro lado, hay evidencia de los efectos del Beta Amiloide sobre la función del hipocampo. El hipocampo es una estructura muy importante para el procesamiento de la memoria, y es una estructura cerebral afectada típicamente en la enfermedad de Alzheimer. El BA afecta la neurotransmisión del hipocampo mediada por glutamato. A pesar de la evidencia molecular, morfológica y conductual de los efectos del BA sobre la actividad del hipocampo, existen pocos trabajos en relación a los efectos de éste péptido sobre la neurotransmisión glutamatérgica y más específicamente sobre la actividad funcional de los receptores AMPA y NMDA. Estos receptores son de vital importancia para la actividad funcional del hipocampo y por lo tanto para el procesamiento cognitivo. El propósito inicial de este trabajo consiste en evaluar los efectos de un tipo de BA sobre la neurotransmisión glutamatérgica en neuronas del hipocampo mediante un abordaje funcional desde la

electrofisiología. Esto nos permitirá comprender parte de los mecanismos por los cuales el BA puede producir la disfunción sináptica y la alteración en el procesamiento de la memoria en estos individuos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar, mediante estudio electrofisiológico, si el péptido Beta Amiloide 25-35 modifica la respuesta al ácido glutámico en neuronas cultivadas y en rodajas de hipocampo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las respuestas electrofisiológicas inducidas por glutamato en neuronas de hipocampo cultivadas.
- Caracterizar la respuesta sináptica en el complejo fimbria-CA3 del hipocampo
- Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide 25-35 sobre la corriente inducida por glutamato en neuronas cultivadas de hipocampo.
- Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide 25-35 sobre la actividad sináptica de las neuronas de la región CA3 del hipocampo

4. METODOLOGÍA

4.1. Cultivos Primarios de Hipocampo

Se tomaron células de hipocampo de rata de 2 días postnatal (n=6-7 animales por cada cultivo). Tras extraer los cerebros y luego los hipocampos, se realizó un procedimiento de disgregación mecánica y enzimática con 0,01% Papaina, 0,1 % Dispasa II y 0,01% DNAasa I. Estas células fueron colocadas en cubreobjetos con fondo de Poli-L-lisina estéril (5mg/ml) para que las células permanezcan fijas durante su posterior registro electrofisiológico. Las células de hipocampo fueron incubadas con medio de cultivo Neurobasal A: B27, Penicilina/estreptomicina, ciprofloxacina y Fungizona. Cada 4 días, este medio de cultivo fue cambiado y a partir de la segunda semana no se puso ciprofloxacina. Las neuronas que son registradas deben mostrar signos morfológicos de integridad de su membrana, así como vitalidad tras 15 a 20 días de cultivo. Se escogieron células con núcleos no visibles al microscopio, con adecuado volumen de membrana en el soma y sin agregados ni granulaciones en su citoplasma.

4.2. Aplicación de Pulsos de Glutamato

La aplicación de glutamato se realizó mediante un sistema de presión controlada (Microinyector de Presión a 0,5 Kpa), la cual estaba conectada a una micro pipeta de aproximadamente 50 μ m de diámetro de punta. Estas pipetas estaban hechas de vidrio de borosilicato rellenos con glutamato a una concentración de 100 μ M (Furukawa y Mattson, 1998). Durante el registro electrofisiológico se controló el momento de aplicación del Glutamato, así como su respuesta. La distancia entre la punta de esta micropipeta y la célula fue aproximadamente más de 100 μ m, para evitar artefactos de flujo (Colquhoun *et al.*, 1992). El pulso de glutamato fue hecho con una duración de 200ms. (Figura 4 B)

4.3. Soluciones y Fármacos

Tanto las neuronas en cultivo como las rodajas de hipocampo, fueron bañadas extracelularmente en solución de Krebs durante los registros electrofisiológicos. La solución de Krebs tiene una composición similar al líquido extracelular: NaCl 117 mM, KCL 4.7 mM, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.20, NaH₂PO₄ 1.25, Glucosa 11, NaHCO₃ 25. Durante los

registros la solución fue burbujeada con gas carbónico con el fin de mantener el aporte de O₂ y PH en las células.

Para el bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes se utilizó TTX (1 μM), TEA (5μM) o Aminopiridina (100 μM) para bloquear los canales de K⁺ voltaje dependientes, APV (50μM) para bloquear los canales NMDA y CNQX (10μM) para bloquear los canales AMPA. La concentración de BA 25-35 fue de 1μM. Todos los fármacos, así como el BA fueron diluidos en 50 ml de solución extracelular del baño de registro.

4.4. Estudio Electrofisiológico

4.4.1. Instrumentos

Electrodos de registro

Registro intracelular: Se emplearon micro-electrodos de vidrio de borosilicato rellenos con una solución electrolítica de acetato potásico 3M y con resistencias de 140 -180 MΩ . Estos electrodos fueron fabricados a partir de tubos capilares mediante un estirador de Pipetas modelo P87 (*Puller*)

Registro en la configuración de *cell attach Y Whole Cell*. Se utilizaron electrodos con resistencias entre 5 a 10 MΩ rellenos con la solución K-gluconate 100; EGTA, 0.6; MgCl₂, 5.0; Na-ATP, 2.0; Na-GTP, 0.3 y HEPES 40. Previo al procedimiento de “*cell attach*” se aplicó una ligera presión positiva para limpiar la punta del electrodo.

Electrodo externo de estimulación

Para la estimulación antidrómica del complejo fimbria-CA3, se utilizó un electrodo monopolar de acero inoxidable conectado a un generador de pulsos programable (MASTER 8). El electrodo fue posicionado en la fimbria ipsilateral al registro.

Microscopio y Micromanipuladores

Para la visualización de las preparaciones se empleó un microscopio de contraste de fases (LEICA DM LFSA). Mediante este tipo de microscopía es posible distinguir la membrana celular, así como las características de viabilidad celular para el registro.

Mediante micromanipuladores de precisión (*Axon Instruments*) se posicionó los electrodos de registro sobre las células y los estimuladores (electrodo monopolar y micro pipeta de inyección) sobre la fimbria y membrana celular respectivamente, dependiendo de la preparación (cultivos o rodajas).

Sistema de Perfusión

Durante el registro de la actividad eléctrica tanto de los cultivos como de las rodajas (slices) de hipocampo, se utilizó un sistema de perfusión para mantener la vitalidad celular. Este sistema de perfusión permite la movilización constante de solución Krebs oxigenada en la cámara de registro de forma laminar. Consiste en una línea de tubos de perfusión y succión a un rango de 3,5 ml/m. conectada a un reservorio de líquido de 60 ml.

Adquisición y Condicionamiento de la Señal

En primer lugar, las señales registradas fueron preamplificadas y leídas en tiempo real a través de un osciloscopio. Luego de que la señal pasa por un conversor análogo-digital (mediante una tarjeta de interfase convertidora), es adquirida a un ordenador con procesador Pentium III. Luego los datos son procesados por el programa Spike 2 para Windows. La amplificación fue modificada dependiendo de las características de la señal. El ruido externo fue reducido mediante la cobertura de los cables con aluminio y cubriendo el sistema de registro con una caja de Faraday. El ruido interno fue reducido mediante filtros pasa-bajos y Notch filter (filtro para señales de 30 a 40 Hz). (Figura 2)

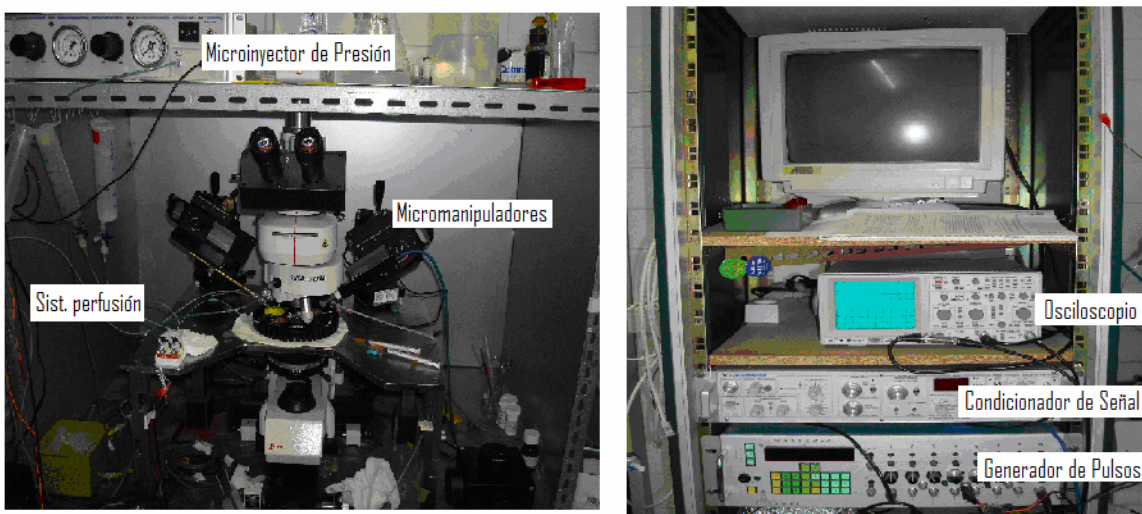


Fig. 2. Equipo de registro, microscopio, amplificación y condicionamiento de la señal

4.4.2. Estudio en Rodajas de Hipocampo

Para este tipo de registro se utilizaron ratas macho cepa Wistar, adultos jóvenes, con pesos entre 80 y 90 gramos. Posterior a un procedimiento de anestesia, los animales fueron decapitados y luego el tejido nervioso fue removido y mantenido en un ambiente frío y

húmedo (Solución de krebs isotónica). El cerebro fue cortado en rodajas de 350 μ m mediante un vibrátomo. Posteriormente, dicho tejido fue mantenido vivo en solución de krebs con sacarosa y un aporte constante de oxígeno mediante un difusor de gas. Tras un periodo de incubación de 2 a 3 horas, estas rodajas fueron ubicadas en una cámara de registro, que a su vez fue acoplada a un microscopio óptico para observar las estructuras. Fue identificado el complejo hipocampal y mediante una serie de coordenadas estereotáxicas fue identificada la región CA3 y la fimbria ipsilateral. Fueron introducidos electrodos de registro intracelular en CA3 y un electrodo monopolar de estimulación en la fimbria (Figura 3 A). Este tejido es bañado constantemente con solución isotónica de Krebs a la cual se administró una alícuota de péptido b amiloide (1 μ M) durante un tiempo controlado. Mediante un protocolo de pulsos pareados y pulso hiperpolarizante, se midió los PEPS (potenciales excitatorios postsinápticos) y PIPS (potenciales inhibitorios postsinápticos), así como la resistencia de entrada de la neurona respectivamente. Luego de finalizada la caracterización, así como el registro durante la perfusión con BA, se procedió a la inyección de Neurobiotina iontoforéticamente. El tejido fue fijado con Paraformaldehido al 3%, posteriormente cortado en rodajas de 40 μ m en frío, y luego mediante la técnica de ABC (inmunohistoquímica indirecta) y revelado con DAB, se marcó la neurona registrada en la región CA3 (Figura 7B).

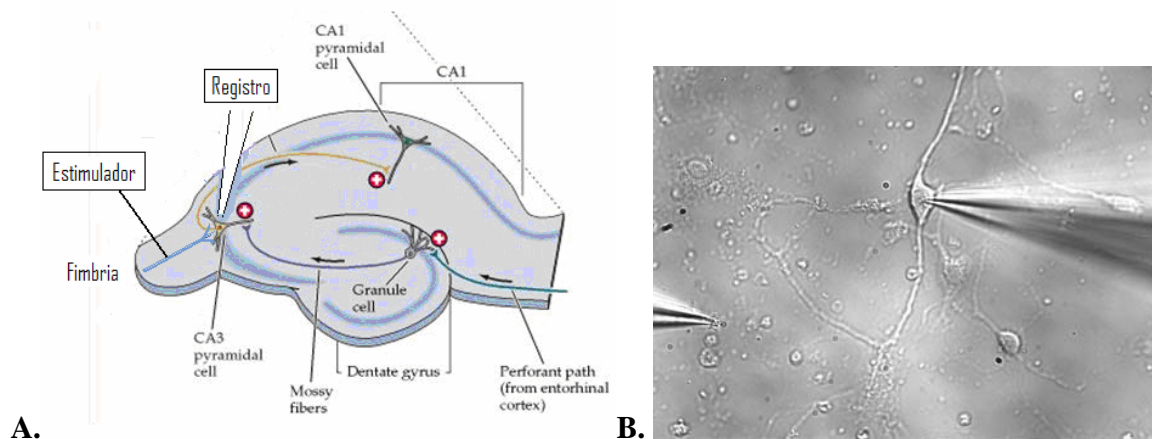


Fig. 3. A. Diagrama esquemático de una rodaja de hipocampo. Se representa la posición del electrodo estimulador y el de registro. **B.** Fotografía de células de hipocampo cultivadas observada en microscopio de contraste de fases. Se muestra la posición de la micropipeta rellena con glutamato (izq) y del electrodo de registro (der).

4.4.3. Estudio en Cultivo de Hipocampo

En este trabajo se utilizaron las técnicas de *patch clamp cell attached* y *whole cell*. En primera instancia, para evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide sobre la respuesta eléctrica de las neuronas en función del tiempo se empleó la configuración de *cell attached* Current Clamp (fig 3 esquema de configuración *cell attached* y *whole cell*) y se midió los cambios de voltaje (depolarizaciones) frente a los pulsos de glutamato. Con la técnica de *voltage clamp* en la configuración *cell attached* se evaluó los cambios en la corriente frente a los pulsos de glutamato luego de fijar el potencial en -60 y -70 mV. Los parámetros de registro fueron los siguientes: filtro pasa-bajos: 2 -5 KHz, amplificación $\times 1 - \times 5$ (ajustado según la amplitud de la respuesta). Voltaje de punta ajustado según voltaje generado por el líquido de la pipeta frente a la solución de Krebs. El tiempo de registro fue de 15 a 30 minutos dependiendo de la viabilidad celular (Figura 3B).

Para los estudios en *whole cell*, en primer lugar se aproximó la pipeta a la membrana del soma neuronal hasta realizar un parche de alta resistencia (giga sello) (Figura 4 B). Posteriormente se incrementa la presión negativa de la pipeta mediante succión con jeringas de 1 y 10 ml o se aplican pulsos de corriente $0,5\text{nA}$ hasta producir la ruptura de la membrana. En ese momento, el líquido que llena la pipeta entra en continuidad con el citoplasma y se procede a ajustar la capacitancia de la membrana, así como la resistencia en serie. Se registran los cambios de corriente frente a los pulsos de glutamato a diferentes voltajes (Figura 4).

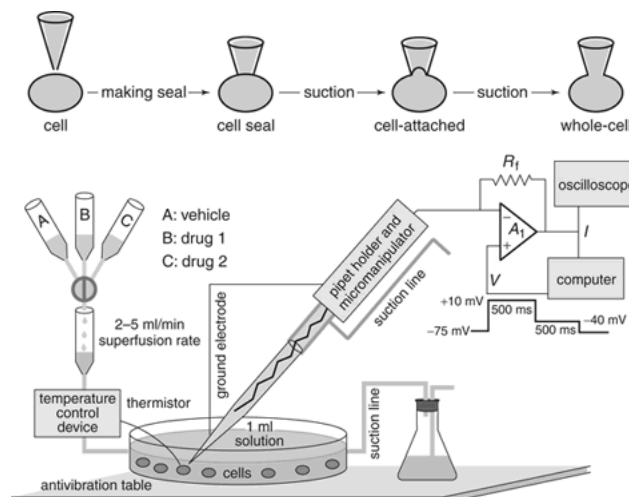


Fig. 4. Dibujo esquemático del sistema de registro en cultivo, perfusión y técnica de Patch Clamp en configuraciones *Cell-attached* y *Whole cell*.

4.3. Adquisición y Análisis de datos

Los datos fueron adquiridos utilizando el programa *Signal 3.0*. Para la determinación de eventos prolongados en el tiempo (potenciales de campo, eventos sinápticos y corrientes prolongadas) se hizo el muestreo a una frecuencia de 500 Hz, con longitud de cada ventana de 360 s. y 18000 puntos. Para determinación de eventos rápidos (potenciales de acción, corrientes miniatura espontáneas) fue utilizada una frecuencia de muestreo de 12500 Hz con ventanas de 1 s.

Para el análisis de datos se utilizó el programa Mini Analysis versión 6.0.7 de Sinaptosoft Inc. Estos datos fueron convertidos a formato ABF mediante un conversor binario incluido en el mismo programa. Se midieron parámetros como amplitud, tiempo de subida, tiempo de recuperación y T a partir de una línea base de 250000 ms previo a la pendiente del pico inicial. Estos valores fueron analizados mediante el programa estadístico SigmaStat 3.1 y para su representación gráfica se empleó Microsoft Excel Office 2003.

5. RESULTADOS

Estudio en rodajas de Hipocampo en la Región CA3

Tras estimular la fimbria ipsilateral se encontró un patrón bifásico de respuesta en el potencial de membrana de la neurona de la región CA3 registrada. Dicha respuesta consiste en un PEPS inicial de 5,95mV de amplitud y PIPS más tardío de 5,9 mV. Ambas amplitudes son el promedio de 118 registros durante el tiempo total de registro. (Figura 5)

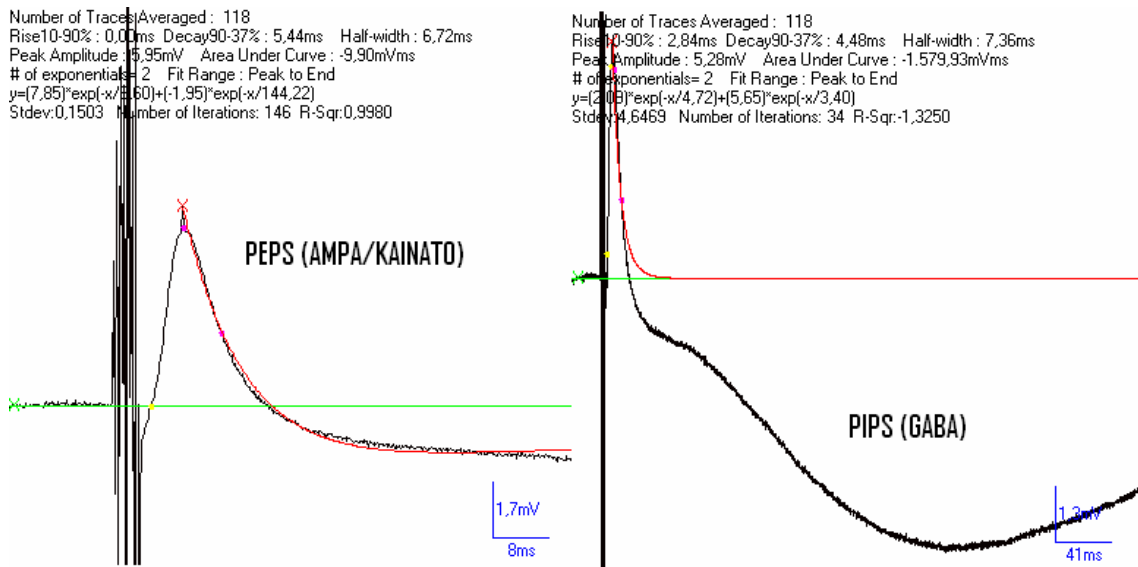


Fig. 5. Se presenta un promedio de 118 registros de potenciales excitatorios (Izq) e inhibitorios (Der) postsinápticos, en una neurona de la región CA3 del hipocampo, tras la estimulación de su fimbria ipsilateral.

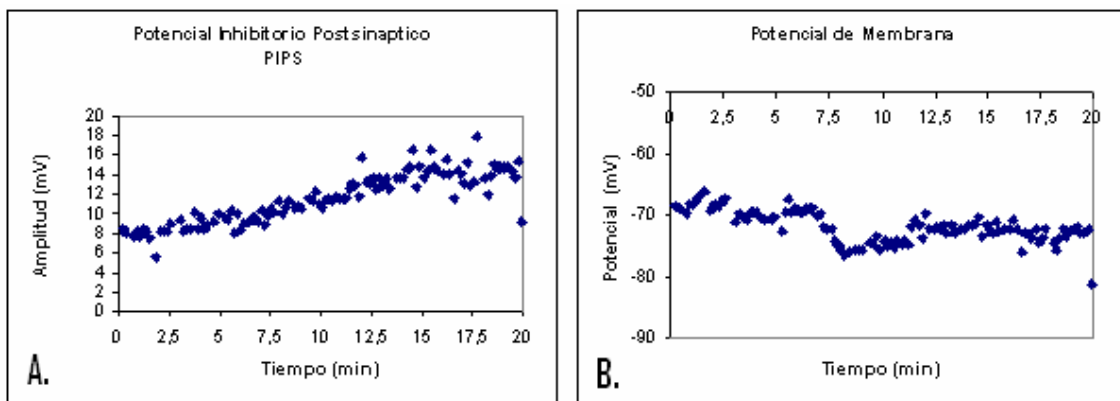


Fig. 6. Diagrama de puntos de una neurona de CA3 durante la perfusión con BA 25-35. A. Se evidencia un incremento significativo en los Potenciales Inhibitorios Postsinápticos durante dicha perfusión. B. Se observa una disminución en el potencial de membrana en reposo de la célula.

Efectos del Péptido BA 25-35 sobre la Actividad Inhibitoria y Resistencia de Entrada en CA3.

El análisis de los PIPS durante el tiempo de exposición al BA 25-35, muestra un Coeficiente de Correlación de Pearson $r=0,8828$, por lo tanto una correlación lineal positiva fuerte (0,71-0,90). Esto indica que a medida que la neurona de CA3 se expone al BA, los potenciales inhibitorios postsinápticos incrementan su amplitud. De la misma manera, el potencial de membrana disminuye su valor, con un Coeficiente de Correlación lineal negativa moderada $r=-0,5922$ (0,51-0,70). (Figura 6)

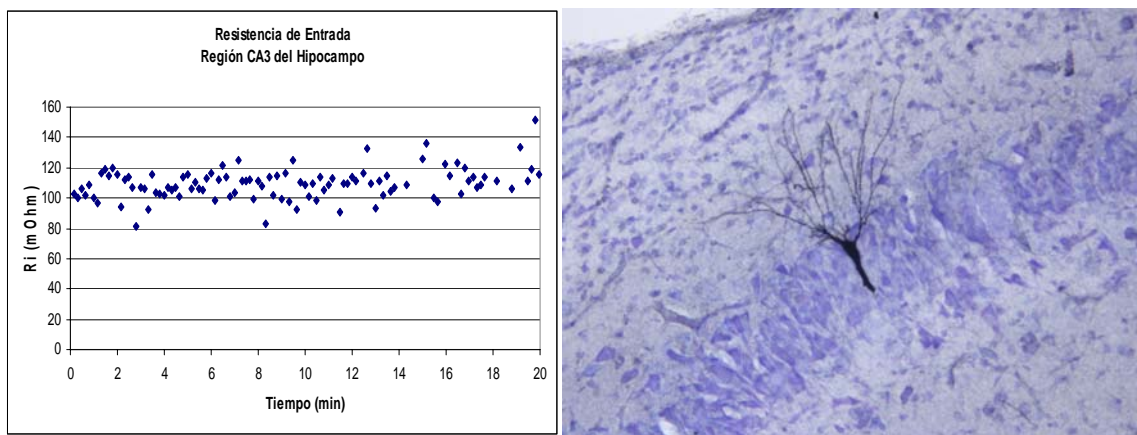


Fig. 7. A. Representación gráfica (diagrama de puntos) de la resistencia de entrada, en una neurona de la región CA3 del hipocampo durante la exposición a 20 minutos de BA 25-35. Se evidencia un incremento en dicha resistencia a medida que la célula se expone al BA. B. Fotografía en Microscopía Óptica de una neurona de la región CA3 del hipocampo. Tras su registro eléctrico, dicha neurona fue inyectada con Neurobiotina y posteriormente revelada mediante inmunohistoquímica.

La resistencia de entrada es un parámetro calculado a partir de la ley de Ohm. Posterior a un pulso hiperpolarizante de 5 mv a través del electrodo interno, se registro el cambio en la corriente de entrada. A partir de la Ley de Ohm, donde el voltaje será el producto de la corriente por la resistencia $V=IR$, se despeja la formula $R_i=V/I$. Donde R_i es la resistencia de entrada en MOhm. Dicha R_i se incrementa a medida que la neurona de CA3 se expone al BA 25-35. Al comparar las R_i de los primeros 4 minutos (tiempo 0 a 4) frente a los últimos 4 minutos (tiempo 16 a 20) de exposición a BA, se encuentra un incremento estadísticamente significativo de dicha resistencia ($t_{(43)} = -3,094 ; P = 0,003$). (Figura 7)

Efecto del Beta Amiloide 25-35 sobre la corriente glutamatergica total en neuronas de cultivo de hipocampo.

Mediante la técnica de *Patch Clamp* en células de cultivo de hipocampo (IV 15-21), se midió la amplitud de la corriente inducida por la administración de un puff de Glutamato (100uM; 200ms). Mediante ANOVA de medidas repetidas se evidencia que durante la administración del péptido BA en la configuración *cell attached*, se reduce la corriente glutamatérgica con respecto al control ($F(6,12)=170,262$; $P<0,001$), fenómeno que se observa en todos los registros a partir del minuto 6. Por otro lado en la configuración *Whole Cell*, la reducción en la corriente glutamatérgica se observa a partir del minuto 24 ($t = 6,953$; $P = 0,020$) y se mantiene dicha reducción en los minutos 30 ($t = 5,084$; $P = 0,037$), 36 ($t = 7,471$; $P = 0,017$) y 40 ($t = 5,729$; $P = 0,029$). En los minutos 6, 12 y 18, no se encontraron diferencias con respecto al control ($F(3,8)=1,25513$; $P=0,3528$). Figura 8

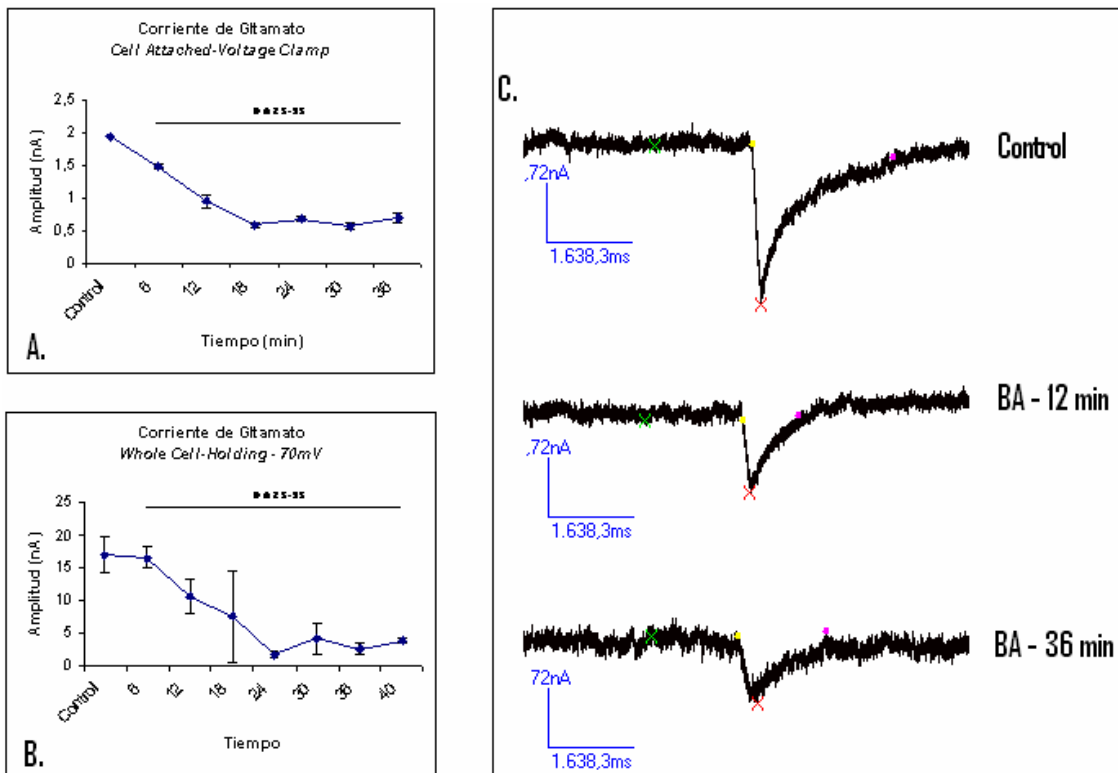


Fig.8. A. Representación gráfica de la corriente glutamatergica en configuración *Cell Attached*, durante 36 minutos de exposición al BA. Se observa una disminución significativa de dicha respuesta. **B.** Reducción significativa de la corriente de glutamato en configuración *Whole Cell* frente al BA. **C.** Se presentan algunos registros representativos de la corriente mediada por glutamato en configuración *Cell Attached*.

6. DISCUSIÓN

Los registros obtenidos en rodaja hipocampales (complejo fimbria-CA3) se observan componentes tanto positivos como negativos en los potenciales sinápticos registrados en CA3 inducidos por la estimulación antidrómica de la fimbria. Según estudios de Schneiderman y colaboradores, el componente positivo (P1) corresponde a PEPS dependientes de la actividad glutamatergica no NMDA, ya que son bloqueados por la presencia de CNQX; mientras que el componente negativo depende de la actividad GABA, ya que es bloqueada por Bicuculina (Schneiderman *et al.*, 1992). En el presente trabajo se registra dicho componente bifásico, indicando que las características fisiológicas de la sinapsis fimbria –CA3 puede ser glutamatérgica superpuesto con la activación de interneuronas GABAérgicas adyacentes. Durante la exposición del tejido al BA, se observa una reducción en el potencial de membrana, así como incremento en los PIPS mediados por GABA, proceso dependiente del tiempo de exposición. Estudios previos han encontrado efectos de la forma soluble del BA sobre la excitabilidad neuronal, reduciendo el número de potenciales de acción e incrementando la post hiperpolarización. Se ha sugerido que esta reducción en la excitabilidad podría estar mediado por incremento en la corriente de potasio (Yun *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la reducción en el potencial de membrana conforme se expone el tejido al BA, podría indicar efectivamente este incremento en la conductancia para el potasio, ya que el potencial de membrana en reposo depende en gran medida de la conductancia para este ión (Kandel *et al.*, 1997). Con respecto al incremento en la actividad inhibitoria visto en el presente trabajo, un reciente estudio encontró incremento en la inervación GABAérgica, así como en la inhibición sináptica en giro dentado en ratones transgénicos que presentaban niveles incrementados de BA (Palop *et al.*, 2007). Sin embargo, no hay muchos estudios que describan dicho comportamiento en los modelos de administración aguda del BA.

Como anteriormente se mencionó, la resistencia de entrada se calculó a partir de la Ley de Ohm. Por lo tanto, frente a un pulso hiperpolarizante, se genera una fuerza electroquímica que facilita la entrada de cargas positivas. Estudios realizados en otros laboratorios, no han encontrado cambios en la resistencia de entrada frente a la exposición a BA 1-42 (Yun *et al.*, 2006). Sin embargo, en dichos estudios el tiempo de exposición fue menor que en el presente trabajo y además el tipo de péptido utilizado era diferente. Se observa por lo tanto,

que la resistencia de entrada se incrementa en la medida que la neurona es expuesta al BA por más de 15 minutos. Dicho resultado se interpreta como un cierre de canales catiónicos y posiblemente de receptores ionotrópicos; este hecho en el contexto de una sinapsis glutamatérgica, podría indicar el cierre de receptores AMPA/Kainato. Sin embargo, dado que durante este estudio no se aisló la respuesta glutamatérgica, frente a otros canales o receptores catiónicos, no es posible asegurar que el cambio en la R_i sea únicamente atribuida al cierre de receptores glutamatérgicos. De la misma manera, dada la superposición del PIPS sobre el PEPS, y dado el cambio en el potencial de membrana en reposo, no fue posible atribuir los cambios en la amplitud del PEPS únicamente a la exposición al BA.

Para evaluar los efectos del BA sobre la actividad glutamatérgica postsináptica, se estudió la corriente glutamatérgica en células de cultivo de hipocampo, mediante la técnica de *patch clamp*. La exposición de las neuronas de cultivos primarios al péptido BA 25-35, reduce la corriente glutamatérgica en dichas células. Esto indica por lo tanto un bloqueo de los receptores ionotrópicos mediada por el BA. Estos hallazgos concuerdan con los estudios previos realizados en nuestro laboratorio, donde la respuesta glutamatérgica en amígdala (Ashenafi *et al.*, 2005) y en Septum Medial (Santos-Torres *et al.*, 2007) fue reducida en la medida que estas estructuras eran expuestas al BA. En estos estudios se determinó además que dicho efecto estaría mediado por los canales de calcio tipo L y por los receptores muscarínicos M1. Estos estudios se relacionan con el hecho que la disfunción sináptica glutamatérgica en el hipocampo generada por las formas solubles de BA, pueden producir diferentes tipos de déficits cognitivos, previo al proceso de neurodegeneración misma (Selkoe, 2002).

Los mecanismos a partir de los cuales el BA afecta la función y el número de los receptores de glutamato ha sido ampliamente estudiado. Los efectos del BA sobre la actividad glutamatérgica pueden darse mediante una interacción directa del BA sobre el receptor o afectando el ambiente lipídico circundante. En asociación con esta idea, el BA como molécula hidrofóbica se puede unir con diferentes tipos de proteínas de membrana en neuronas y glia (Gasparini y Dityatev, 2008) y además puede interactuar con los lípidos de la membrana (Matsuzaki, 2007). Por otro lado, el BA puede afectar el tráfico y expresión de los receptores de glutamato en la superficie celular. Estos efectos dependerán del tipo de

BA, conformación, tiempo y concentración del mismo. Los efectos del BA sobre la función glutamatérgica, dependerán además del tipo de receptor con el cual interactúe. Los dos tipos de receptores glutamatérgicos más estudiados en la actualidad son los ionotrópicos AMPA y NMDA. En cuanto a los receptores AMPA, el BA puede modular directamente su cinética y función. Adicionalmente, promueve su *cleavage* y afecta la actividad de algunas kinasas (CamKII y cdk 5) que modulan su actividad (Parameshwaran *et al.*, 2008). Por otro lado, el efecto del BA sobre los receptores NMDA es un poco más complejo, ya que intervienen diferentes mecanismos entre los que se destacan: incremento en la permeabilidad al Ca^{++} , facilitación de la endocitosis del receptor y disminución de su actividad. El BA, inhibe la proteína Kinasa C (PKC) que a su vez es una enzima importante para la actividad de los receptores NMDA y GABA (Parameshwaran *et al.*, 2008), con lo cual una posible explicación al desbalance entre actividad inhibitoria y excitatoria vista en el presente experimento puede involucrar un mecanismo común.

La mayoría de autores coinciden en afirmar que el BA reduce la actividad funcional del receptor AMPA (Parameshwaran *et al.*, 2007), aunque otros estudios no han descrito dicho efecto (Wu *et al.*, 1995). Por otro lado, existe controversia en cuanto al efecto que puede tener sobre la función de los receptores NMDA. Algunos autores no encuentran efectos sobre la corriente NMDA (Ting *et al.*, 2007), otros encuentran incremento de su actividad (Wu *et al.*, 1995; Molnar *et al.*, 2004) y otros reportan disminución (Johansson *et al.*, 2006). Estas diferencias parecerían depender de la concentración, tiempo de exposición y tipo de BA, así como configuración y organización de dicho péptido. Dichos factores deberán ser tenidos en cuenta para el diseño de futuras condiciones experimentales, así como para la interpretación de los resultados.

El estudio de los mecanismos y de los efectos del BA sobre la neurotransmisión glutamatérgica, permitirá producir futuras estrategias terapéuticas que atenúen de manera efectiva los déficits cognitivos vistos en pacientes con E. de Alzheimer.

7. CONCLUSIONES

1. El péptido BA 25-35 disminuye la excitabilidad neuronal en CA3, aumentando el potencial de membrana en reposo. La afectación de las células GABAérgicas explicaría el aumento de la actividad inhibitoria.
2. Los cambios en la resistencia de entrada vista en células de CA3 expuestas a BA, podría indicar el cierre de canales pasivos, así como de receptores catiónicos de superficie.
3. El BA 25-35 reduce la corriente glutamatérgica total en neuronas del hipocampo, indicando un efecto postsináptico de dicho péptido sobre los receptores ionotrópicos de glutamato.
4. Se evidencia un desbalance entre la actividad excitatoria así como la inhibitoria en las neuronas del hipocampo conforme el tiempo de exposición al BA se incrementa.

8. PERSPECTIVAS

Para futuros proyectos de investigación, y también como base de una posible Tesis Doctoral se proponen las siguientes propuestas de estudio:

1. Caracterizar las corrientes NMDA y AMPA, así como la conductancia de dichos canales en neuronas de hipocampo cultivadas.
2. Caracterizar las corrientes miniaturas espontáneas NMDA y AMPA mediante estudios de Patch Clamp en rodajas de hipocampo.
3. Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide 25-35 sobre las corrientes NMDA y AMPA en neuronas de hipocampo cultivadas así como en rodajas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abe E, Casamenti F, Giovannelli L, Scali C, Pepeu G. Administration of amyloid beta-peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo. *Brain Res.* 1994 Feb 4;636(1):162-4
- Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 1999;459:421.
- Ashenafi S, Fuente A, Criado JM, Riobobos AS, Heredia M, Yajeya J . Beta-amyloid peptides25–35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala “in vitro.” *Neurobiol Aging* .2005: 26:419–428.
- Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2008 Sep;31(9):454-63
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31–39.
- Butterfield DA, Bush AI. Alzheimer's amyloid β -peptide (1–42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiology of Aging* 25 (2004) 563–568
- Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, Braga J, Koo EH, and Halpain S. Rapid, Concurrent Alterations in Pre- and Postsynaptic Structure Induced by Soluble Natural Amyloid- β Protein. *Mol Cell Neurosci.* 2007 June ; 35(2): 183–193
- Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y and Xie CW. J Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *Neurosci Res* 2000; 60: 65–72.
- Chen QS, Wei WZ, Shimahara T and Xie CW. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus *Neurobiol Learn Mem* 2002; 77:354–371.
- Chin JH, Ma L, MacTavish D, Jhamandas JH. Amyloid B Protein Modulates Glutamate-Mediated Neurotransmission in the Rat Basal Forebrain: Involvement of Presynaptic Neuronal Nicotinic Acetylcholine and Metabotropic Glutamate Receptors. *The Journal of Neuroscience*, August 29, 2007 • 27(35):9262–9269
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neurosci* 1999; 2:271–276.
- Colquhoun D, Jonas P And Sakmann B. Action Of Brief Pulses Of Glutamate On Ampa/Kainate Receptors In Patches From Different Neurones Of Rat Hippocampal Slices. *Journal Of Physiology* (1992), 458, Pp. 261-287
- Cowburn RF, Wiehager B, Trief E, Li-Li M and Sundstrom E. Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res* 1997; 22:1437–1442.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 1983;219:1184–1190.
- Freir DB, Holscher C and Herron CE. J. Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *Neurophysiol* 2001; 85:708–713.

Furukawa K And Mattson MP. Secreted Amyloid Precursor Protein A Selectively Suppresses N-Methyl-D-Aspartate Currents In Hippocampal Neurons: Involvement Of Cyclic Gmp. *Neuroscience* Vol. 83, No.2, Pp. 429-438, 1998

Gasparini L, Dityatev A. B-Amyloid and glutamate receptors. *Experimental Neurology*. 212 (2008) 1–4

Goate A, Chartierharlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericakvance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's- disease. *Nature* 349:704–706

Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314 (5800):777-781.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDSADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34:939 –944..

Greenstein B, Greenstein A. *Color Atlas of Neuroscience. Neuroanatomy and Neurophysiology*. Thieme Stuttgart · New York. 2000

Harkany T, Abrahám I, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvári M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarándi M, Soós K, Penke B, Luiten PG. beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* 2000; 12:2735–2745.

Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, Gorno-Tempini ML, Schuff N. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2005 Mar;234(3):851-9.

Johansson, S., Radesater, A.C., Cowburn, R.F., Thyberg, J., Luthman, J., 2006. Modelling of amyloid beta-peptide induced lesions using roller-drum incubation of hippocampal slice cultures from neonatal rats. *Exp. Brain Res*. 168, 11–24.

Jouveneau A, Dutar P, Billard JM. Alteration of NMDA receptor-mediated synaptic responses in CA1 area of the aged rat hippocampus: contribution of GABAergic and cholinergic deficits. *Hippocampus* 1998;8:627–637

Kandel ER, Jessell TM, Schwartz JH. *Neurociencia y conducta*. Prentice Hall. Impreso en España, 1997.

Katzman, R., and Saitoh, T. (1991) *Advances in Alzheimer's disease*, *FASEB J*. 4, 278–286.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132.

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4044.

Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, Ashe KH. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002 Aug 1;22(15):6331-5

Kurinami H, Sato N, Shinohara M, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Ogihara T, Morishita R.. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int J Mol Med*. 2008 May;21(5):531-7

Leranth C, Hajszan T. Extrinsic Afferent Systems To The Dentate Gyrus. *Prog Brain Res*. 2007 ; 163: 63–799

- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research* 32 (2001) 367–381.
- Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:176–185.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging* 1995;16:355.
- Marcello E, Epis R, Di Luca M. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 6;585(1):109-18
- Markesbery, W. R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease, *Free Rad. Biol. Med.* 23, 134–147.
- Matsuzaki K. Physicochemical interactions of amyloid β -peptide with lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007) 1935–1942
- Milner, B. Squire, LR and Kandel, E. Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. Review. *Neuron*, Vol. 20, 445–468, March, 1998.
- Molnar Z, Soos K, Lengyel I, Penke B, Szegedi V, Budai D. Enhancement of NMDA responses by b-amyloid peptides in the hippocampus in vivo. *Neuroreport* Vol 15 No 10 19 July 2004
- Moreno H, Wu WE, Lee T, Brickman A, Mayeux R, Brown TR, Small SA. Imaging the AB-Related Neurotoxicity of Alzheimer Disease. *Arch Neurol/Vol 64* (No. 10), Oct 2007
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of a₁₋₄₂ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 2000;20(11):4050-4058
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2007 Sep 6;55(5):697-711
- Parameshwaran K, Sims C, Kanju P, Vaithianathan T, Shonesy Bc, Dhanasekaran M, Bahr B, Suppiramaniam V. Amyloid b-Peptide Ab₁₋₄₂ But Not Ab₁₋₄₀ Attenuates Synaptic AMPA Receptor Function. *SYNAPSE* 61:367–374 (2007)
- Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Experimental Neurology* 210 (2008) 7–13
- Pollard HB, Rojas E, Arispe N. A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Sep 24;695:165-8
- Purves D; Augustine GJ.; Fitzpatrick D; Katz LC.; LaMantia AS; McNamara JO.; Williams SM. *Neuroscience* 2th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2001.
Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=neurosci.TOC&depth=2>
- Santos-Torres J, Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Yajeya J. Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta-peptide in the medial septum. *J Neurosci Res.* 2007 Feb 15;85(3):634-48.

Schneiderman J.H., Cairns A. and Sterling C.A. Evoked CA3 field potentials corresponding to both EPSPs and IPSPs in hippocampal slice. *Brain Research*, 569 (1992) 287-294

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Dasilva HAR, Haines JL, Pericakvance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, Stgeorgehyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760.

Sultana R, Butterfield DA. Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide. *Mol Biosyst.* 2008 Jan;4(1):36-41

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002;298(5594):789- 791.

Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A and Jing A. Hydrogen Peroxide Promotes AB Production through JNK-dependent Activation of γ -Secretase The Journal Of Biological Chemistry Vol. 283, NO. 25, pp. 17721–17730, June 20, 2008

Ting JT, Kelley BG, Lambert TJ, Cook DG, Sullivan JM. Amyloid precursor protein overexpression epresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *PNAS* _ January 2, 2007 _ vol. 104 _ no. 1 _ 353–358

Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield A. Review: Alzheimer's Amyloid b-Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Journal of Structural Biology* 130, 184–208 (2000).

Wang H, Golob E, Bert A, Nie K, Chu Y, Dick MB, Mandelkern M, Su MY. Alterations in regional brain volume and individual MRI-guided perfusion in normal control, stable mild cognitive impairment, and MCI-AD converter. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2009 Mar;22(1):35-45

Wevers A, Witter B, Moser N, Burghaus L, Banerjee C, Steinlein OK, Schutz U, de Vos RA, Steur EN, Lindstrom J, Schroder H. Classical Alzheimer features and cholinergic dysfunction: towards a unifying hypothesis? *Acta Neurol Scand Suppl* 2000;176:42–48

Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport.* 1995 Nov 27;6(17):2409-13

Ye C, Walsh DM, Selkoe DJ, Hartley DM. Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neurosci Lett.* 2004 Aug 19;366(3):320-5.

Yun SH, Gamkrelidze G, Stine WB, Sullivan PM, Pasternak JF, Ladu MJ, Trommer BL. Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 2006 Jul 31;403(1-2):162-5