



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

La albúmina sérica protege a las
neuronas, pero no a los astrocitos, de
los efectos deletéreos del beta-
amiloide

Tesis Doctoral
Marta Domínguez Prieto
2016



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

La albúmina sérica protege a las neuronas pero, no a los astrocitos, de los efectos deletéreos del beta-amiloide

Marta Domínguez Prieto
Tesis Doctoral
2016

Parte de los resultados presentados en esta memoria han dado lugar a la siguiente publicación:

Domínguez-Prieto, M., Velasco, A., Vega, L., Tabernero, A., Medina, J.M. (2016). Aberrant co-localization of synapsis proteins promoted by Alzheimer amyloid- β peptides. Protective effect of human serum albumin. *Journal of Alzheimer Disease. (en revisión)*

*« Salamanca
que enhechiza la voluntad de volver a ella
a todos los que de la apacibilidad
de su vivienda han gustado. »*

El Licenciado Vidriera, Miguel de Cervantes.

AGRADECIMIENTOS.

Los que me conocen saben que soy una persona con una “ligera” tendencia hacia lo sentimental, por eso me resulta tan difícil escribir los agradecimientos de esta tesis, ya que no voy a ser capaz de expresar ni una pequeña parte de lo que me gustaría. Aun así, hay que intentarlo.

Al Prof. José María Medina, por brindarme la oportunidad de entrar en su laboratorio y sentir la pasión por la ciencia, pero más importante aún, por confiar en mí antes que yo misma. Te admiro profundamente, como científico y como persona. Nuestras constantes discusiones científicas son algunos de los mejores momentos que me ha dado esta tesis, esos y los ratos de café disfrutando y siempre aprendiendo algo nuevo, son recuerdos que atesoraré siempre.

A la Dra. Ana Velasco, por acompañarme paso a paso en el largo camino que ha supuesto esta tesis. Por ser una magnífica jefa, profesora, compañera, y apoyo en momentos fundamentales. Y también por tus ideas locas, confía en ellas tanto como yo lo he hecho, son extremadamente valiosas. Gran parte de este trabajo es también tuyo, y estoy orgullosa de que así sea.

A la Dra. Josefa M. Barrientos, y no por los ratos del café y los del cobro, más bien por todos los demás. Gracias por estar siempre ahí, en los buenos y los no tan buenos momentos. Por animarme, por cuidarme, o simplemente por estar. Mil gracias, y la cuenta.

A la Dra. Arantxa Tabernero, porque siempre me ha transmitido un apoyo incondicional y un positivismo que me han ayudado a seguir adelante día a día. Gracias por los ánimos constantes y los buenos consejos, procuraré seguirlos.

No demasiada gente puede presumir de un equipo como puedo yo hacerlo del que me ha rodeado estos años. El laboratorio 15 siempre será una referencia para mí, ya no sólo por su buena ciencia y su buen hacer, si no por sus buenas gentes, que hacen que todo cobre más valor aún. Basta decir que me he sentido como en casa, gracias.

Gracias a todos mis compañeros del lab. 15. A Álex, por su paciencia con mis primeros acercamientos a los cultivos primarios y su buena disposición ante mis interminables dudas. A Ángel, por compartir su sabiduría laboratorial y ayudarme en mis primeros pasos investigadores. A Ester, la otra zamorana del 15, por los ratos e intrigas compartidas. No te desanimes nunca, y no dejes de sonreír. A Maru, qué decirte amigo, más que compañero de trabajo has sido compañero de fatigas, y de los de verdad. Grandes cosas están aún por venir, y las celebraremos juntos. A Ana G, tras compartir cuatro años de tesis sólo me queda desearte mucha suerte en el futuro y que encuentres tu camino.

Y a las que quedan, Myriam, he tenido la suerte de compartir contigo poyata, pero eso ha sido casi lo de menos. Me llevo una grandísima amiga. Gracias por las discusiones científicas, por las aventuras, por las charlas interminables... y sobre todo gracias por cuidarme, apoyarme y valorarme. Vales un valer, que diría Josefa. Y eso no se lo digo a cualquiera. Sara, tu vuelta al laboratorio ha traído un soplo de frescura, eres una excelente

científica, pero además tienes una actitud admirable ante la vida. No cambies, llegarás lejos. A Tomy, no por su inestimable labor técnica, si no por su apoyo, preocupación y comprensión constantes. Gracias por tener siempre una palabra amable y de ánimo para mí.

A todos los “pollitos” que han pasado durante este tiempo por el laboratorio, de todos y cada uno he aprendido algo. En especial me gustaría acordarme de Miles, al que le deseo mucha suerte en su nueva aventura como médico, de Joshua y su sentido de humor que tanto alegró el laboratorio, de Rodrigo, que espero encuentre su lugar, y de Elvira, que seguro tendrá un futuro brillante.

A mis incylianos, compañeros de ciencia, cervezas y sidras. Muchos, más que compañeros, sois buenos amigos. Compartir con vosotros tantos y tan buenos momentos me ha permitido llegar hoy hasta aquí, así que gracias. A Dani, desde aquel mítico congreso ovetense nos hicimos inseparables, y hasta hoy nos hemos seguido apoyado y riendo el uno del otro. A Rodri, nuestro más reciente Doctor, siempre he sabido que llegarás a ser un grande. A Fer, la fuerza es poderosa en ti, y no se puede ser más bueno. Guárdate un poquito de todo ese cariño y comprensión que nos das a los demás, también te lo mereces. Seguiremos conspirando. Seila, gracias por compartir a Fernando con los demás, y por aguantarnos en nuestras jornadas de arreglar el mundo. Sois una pareja excepcional, os deseo lo mejor. A Adrián –y no Ad, lo siento-, por las conversaciones profundas, y las que no lo son, por nuestro aprecio mutuo. A Rafa, por poner siempre esa nota de humor que alegra incluso días grises. Gracias.

Al resto de miembros de Incyl, por apoyarme en toda ocasión. Al equipo directivo, ahora en funciones, por su colaboración durante todo este tiempo. Al futuro equipo directivo, mucha suerte en su labor. A la Dr. Conchi Lillo, por los consejos científicos y por el esfuerzo por hacerme olvidar la ciencia de vez en cuando, si alguna vez llego a mariposa, serás responsable de ello. También a Ana “técnico”, por su inestimable ayuda y apoyo constante.

A las pisíticas, a las originales y a las siguientes generaciones. Un maravilloso piso de la calle Volta (con apéndice en la calle Arapiles) fue el enclave para forjar grandes amistades, de las que duran. A Virginia, por infundirme fuerzas y valor, sobre todo al principio, para que confiara un poco en mí, porque ella ya lo hacía. Gracias por acompañarme en aventuras mil y por aguantarme, sé que no es fácil. A Víctor, que no Vítor, porque te considero un pisítico adoptado y tenías que estar aquí también. A Alba, por estar siempre para un ratito de conversación al final del día, y al principio, y en medio. Aún nos queda mucho mundo que arreglar y un coche nuevo que estrenar. A Ada, primero fueron las conversaciones desde la resi y las compras compartidas, y después el engaño para compartir piso. Creo que después de todo, no fue tan malo... Gracias por estar ahí cuando lo he necesitado, y sabes que yo también estoy ahí de ser necesario, no lo olvides.

A Violeta, nuestra amistad comenzó lenta, pausada, pero no ha dejado de crecer en todo este tiempo, ni dejará de hacerlo. Gracias por todo, has sido un apoyo en momentos duros y una buena compañía en todos los demás. Te admiro y no tengo dudas de que llegarás lejos, no lo dudes tú tampoco.

A María M., porque eres la mejor coautora de un estudio científico a gran escala que se puede tener. Gracias por las interminables charlas, los consejos y los ánimos. Qué afortunados son tus niños del cole por tenerte como maestra.

A mi familia de locas, Irene, Marta, M^aLuisa y Raquel, por aquello de “locas, sí, pero familia”. Son muchos años ya, bastantes más que los de esta tesis, y de los que voy a recordar aquí y ahora. Gracias por acompañarme en el trayecto, por todos los momentos vividos juntas (y los que quedan), y por los empujones –de ánimo- para lograr alcanzar el último peldaño.

Por último, a mi familia, porque soy lo que soy gracias a ellos, mil gracias no son suficientes. A Manuel, mi hermanito, porque sé que tú presumes de hermana pequeña, pero yo no puedo estar más orgullosa de mi hermano mayor. Gracias por cuidarme siempre. A Nuria, mi cuñi, gracias por ser una más de la family, por creer en mi trabajo y confiar en mi consejo. A Chon y Jorge, porque también sois ya de la familia, y porque confío en que todo va a salir bien. A Adriana, la niña de mis ojos, por ser como eres. Con sólo tres añitos eres la alegría y la luz de la casa, y lo que te rondaré morena, bueno, mejor dicho rubia. A lo que está por venir, por llenarnos de ilusión de futuro. A mis abuelas, Tomasa e Isidra, por ser mis abuelas y creer que lo que hago es importante, poco más se puede pedir. Y sobre todo, a mis padres, Marcos y Conchi, por quererme tanto, y por aguantarme tanto también, gracias. Si estoy aquí, es por vosotros. Os quiero.

Como he dicho al principio, ni una pequeña parte de lo que me gustaría expresar, gracias a todos.

Abreviaturas.

β -amiloide: beta-amiloide

A β : beta-amiloide

A β 25-35: beta-amiloide 25-35

A β 40: beta-amiloide 40

A β 42: beta-amiloide 42

ABAD: "A β -binding alcohol dehydrogenase"

ADAM: "a disintegrin and metalloprotease"

AICD: "APP intracellular domain"

APH: "anterior pharynx defective"

ANOVA: análisis de la varianza

APP: proteína precursora de beta-amiloide

BACE1: " β -site APP-cleaving enzyme-1"

Cav1: caveolina 1

Cdk5: "cyclin-dependent protein kinase 5"

Clt: clatrina

DCF: diclorofluoresceína

DIV: días *in vitro*

DLP1: "dynamin-like protein 1"

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetil sulfóxido

EAAT1: "excitatory amino acid transporter 1"

EAAT2: "excitatory amino acid transporter 2"

FBS: suero fetal bovino

Fis1: "mitochondrial fission 1 protein"

GFAP: proteína fibrilar ácida glial

GLAST: "glutamate aspartate transporter"

GSK-3 β : "glycogen synthase kinase-3 β "

HSA: albúmina sérica humana

LDLR: "low-density lipoprotein receptor"

LRP1: "Low density lipoprotein receptor-related protein 1"

LTD: depresión a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

Mfn1: "Mitofusin 1"

Mfn2: "Mitofusin 2"

mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

NCT: nicastrina

NT: "non-target"

OPA1: "optic atrophy protein 1"

PAO: óxido de fenilarsina

PBS: tampón fosfato salino

PEN-2: "presenilin enhancer"

PP2A: "protein phosphatase-2A"

Prep: proteasa presecuencia

PS1: presenilina 1

PS2: presenilina 2

PSD-95: "post-synaptic density 95"

ROS: radicales libres de oxígeno

SEM: error estándar de la media

siRNA: RNA pequeño de interferencia

Syp: sinatofisina

Syt: sinaptotagmina

TIM23: "translocase of the inner mitochondrial membrane 23"

TOM40: "translocase of the outer mitochondrial membrane 40"

TBS: tampón tris salino

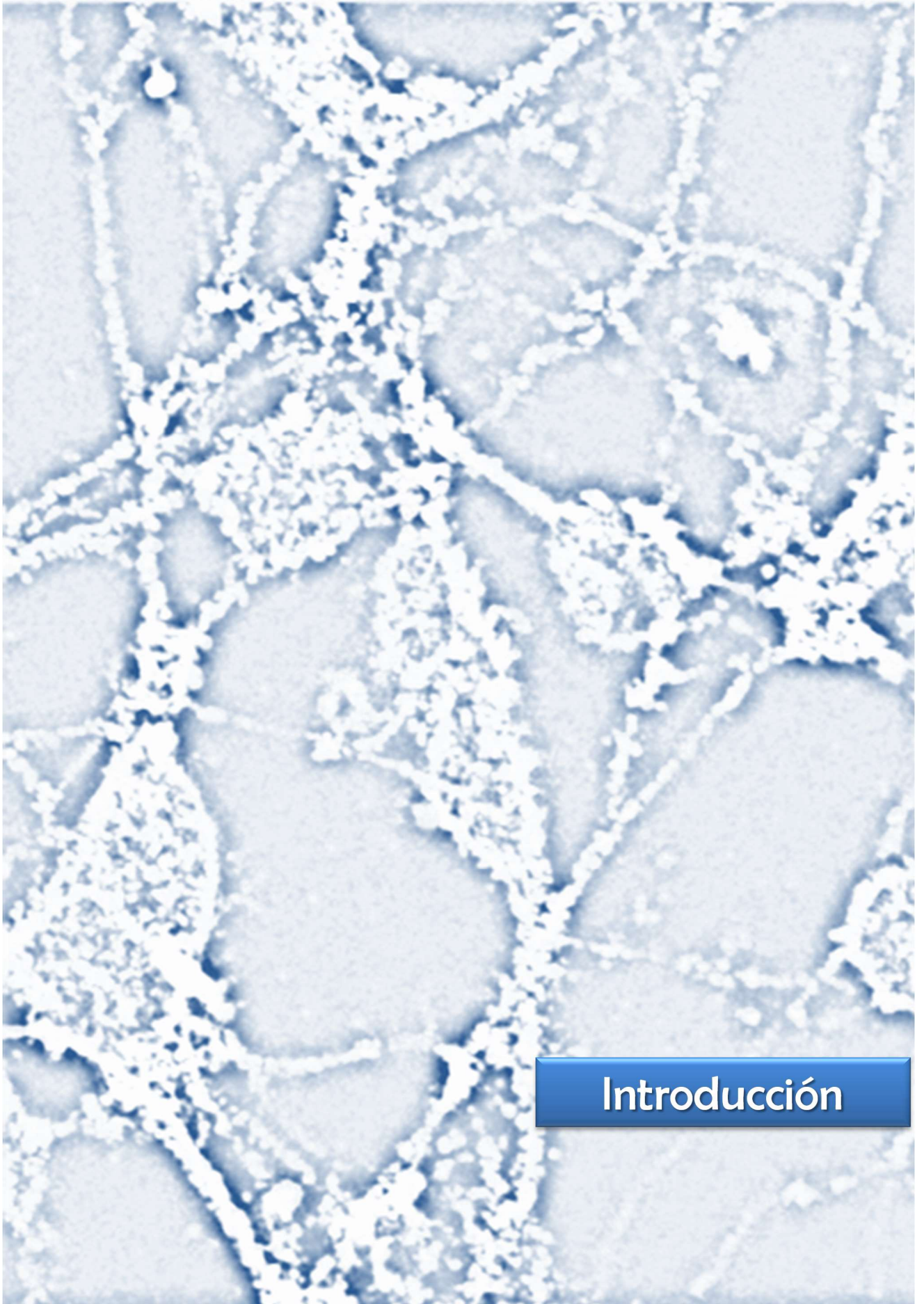
TTBS: tampón tris salino con Tween-20

Índice

1. Introducción.....	3
1.1. Enfermedad de Alzheimer.	3
1.2. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer.	6
1.2.1. Beta-amiloide.	6
1.2.2. Tau.....	11
1.2.3. Aclaramiento de β -amiloide y tau.....	13
1.3. Mecanismos de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer.....	16
1.3.1. Beta-amiloide y mitocondria.....	16
1.3.2. Beta-amiloide y sinapsis.....	19
1.3.3. Beta-amiloide y astrocitos.....	20
1.4. Albúmina sérica en la enfermedad de Alzheimer.	22
1.4.1. La albúmina sérica.....	22
1.4.2. Interacción albúmina- β -amiloide.....	25
1.4.3. La albúmina en la enfermedad de Alzheimer.	25
2. Plan de trabajo.	31
3. Material y métodos.....	35
3.1. Material.....	35
3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.	35
3.1.2. Medios instrumentales.	35
3.1.3. Productos.	38
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares.	44
3.2.2. Tratamientos celulares.....	52
3.2.3. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT. 53	
3.2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno mediante el ensayo fluorimétrico con DCF.	55
3.2.5. Análisis de proteínas mediante inmunocitoquímica.....	56
3.2.6. Análisis de proteínas mediante Western blot.....	57

3.2.7.	Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA.	61
3.2.8.	Análisis estadístico.	63
4.	Resultados.	67
4.1.	Efecto de los diferentes β -amiloides en neuronas en cultivo primario.	67
4.1.1.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad neuronal.	67
4.1.2.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de ROS.	69
4.1.3.	Inmunocolocalización de los diferentes β -amiloides en neuronas en cultivo primario.	70
4.1.4.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la expresión de la sinaptofisina.	74
4.1.5.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la localización celular de la sinaptotagmina (proteína presináptica) y la PSD-95 (Postsynaptic Density-95; postsináptica).	75
4.2.	Efecto protector de la albúmina sérica sobre el efecto deletéreo de los diferentes β -amiloides.	79
4.2.1.	Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 25-35.	79
4.2.2.	Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 40.	87
4.2.3.	Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 42.	94
4.3.	Efecto de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	102
4.3.1.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad de astrocitos en cultivo primario.	102
4.3.2.	Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de ROS en astrocitos en cultivo primario.	106
4.3.3.	Evolución de la viabilidad de los astrocitos con respecto al tiempo de exposición a los diferentes β -amiloides.	107
4.3.4.	Inmunolocalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	110
4.4.	Internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	113
4.4.1.	Efecto de la temperatura sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	113
4.4.2.	Efecto de la clorpromazina sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	115
4.4.3.	Efecto de la ciclodextrina sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	117

4.4.4. Efecto del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.....	118
4.4.5. Efecto de la genisteína sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	120
4.4.6. Efecto del silenciamiento de clatrina sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.....	121
4.4.7. Efecto del silenciamiento de caveolina 1 sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.....	122
4.4.8. Efecto del silenciamiento de LRP1 (“Low density lipoprotein receptor-related protein 1”) sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.....	125
4.5. Efecto de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	126
4.5.1. Efecto de la albúmina sérica sobre la muerte celular provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.....	127
4.5.2. Efecto de la albúmina sérica sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	128
4.5.3. Efecto de la albúmina sérica sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.	129
4.6. Transcitosis de los β -amiloides en cultivos proximales de astrocitos.....	137
4.7. Resistencia de los astrocitos a la muerte celular provocada por los diferentes β -amiloides.	140
5. Discusión.....	147
5.1. Efecto de los β -amiloides en neuronas.....	147
5.2. Efecto de los β -amiloides en astrocitos.	154
6. Conclusiones.....	161
7. Bibliografía.....	165



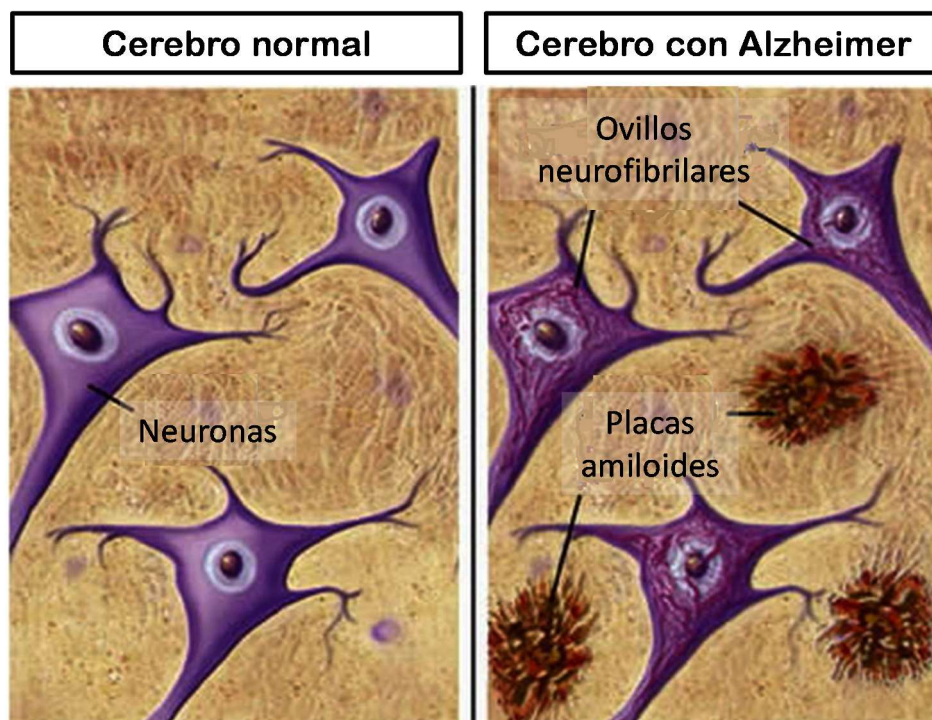
Introducción

1. Introducción.

1.1. Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa, caracterizada por un deterioro cognitivo progresivo asociado con la reducción de las actividades diarias y cambios conductuales. Es la forma más común de demencia, existiendo en la actualidad más de 46 millones de personas afectadas en el mundo. Se calcula que en el año 2050, si no se encuentra una cura efectiva, el número de casos se habrá triplicado.

La enfermedad fue descrita por Alois Alzheimer en 1906, a partir del caso de Auguste Deter, una mujer de 51 años, cuyos síntomas –pérdida de memoria, desorientación, trastornos de la personalidad- no se podían clasificar dentro de ninguna de las demencias conocidas hasta ese momento. Tras el fallecimiento de esta paciente, Alzheimer analiza su cerebro y describe las lesiones histopatológicas características que definen la enfermedad: los ovillos neurofibrilares, las placas amiloides y la consiguiente muerte neuronal (Alzheimer *et al.* 1995).



Esquema 1. Lesiones histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer.

Desde esta descripción inicial de la presencia de placas seniles en el cerebro de los enfermos de Alzheimer, pasaron ocho décadas hasta obtener las primeras pistas sobre su composición. En 1984, Glenner y Wong aislaron un péptido nuevo a partir de material obtenido de vasos meníngeos procedentes de patología cerebrovascular relacionada con Alzheimer (Glenner & Wong 1984). Un año después, Masters y colaboradores descubrieron que este péptido, denominado péptido beta-amiloide (β -amiloide), es el principal componente de las placas amiloides aisladas de cerebros de pacientes con Alzheimer (Masters *et al.* 1985). En cuanto a los ovillos neurofibrilares, en 1991 Lee y colaboradores encontraron que estaban constituidos por la proteína tau, una proteína asociada a los microtúbulos, que se encontraba en un estado de hiperfosforilación (Lee *et al.* 1991).

Por otra parte, la existencia de dos variantes en la enfermedad de Alzheimer, la forma familiar y la esporádica, ha proporcionado información relevante en cuanto al origen de la enfermedad. La forma familiar o de aparición temprana supone menos de un 5% de los casos totales y se trata de una patología hereditaria, cuyas mutaciones se han asociado a la síntesis y procesamiento del β -amiloide a partir de la proteína precursora de amiloide o APP, tales como los genes de la APP, la presenilina-1 y la presenilina-2. En estos enfermos existe un aumento en los niveles cerebrales de β -amiloide provocado por un incremento en la síntesis de dicho péptido (Wu *et al.* 2012).

Por el contrario, la forma esporádica o de aparición tardía de la enfermedad, que supone la gran mayoría de los casos de la misma, tiene un origen desconocido, aunque todo parece indicar que está más relacionada con defectos en el aclaramiento del β -amiloide que, del mismo modo, acaba dando lugar a un incremento en los niveles cerebrales del péptido (Mawuenyega *et al.* 2010).

Por tanto, está bastante bien establecido que en la enfermedad de Alzheimer se acumula β -amiloide en el cerebro, lo que inicia una cascada de eventos que acaba dando lugar al daño neuronal y la formación de las placas amiloides características de la enfermedad. Entre los eventos que ocurren, están bien descritos la disfunción mitocondrial, la formación de ovillos neurofibrilares, el fallo sináptico y la astrogliosis, de los cuales hablaremos más adelante. El depósito de las placas seniles se inicia en el

hipocampo y la corteza, regiones que, al verse afectadas, dan lugar a los primeros síntomas apreciables de la enfermedad (Serrano-Pozo *et al.* 2011).

En base a todo lo anterior se propuso, en la década de los 90, la “hipótesis amiloide” como modelo de patogenia de la enfermedad (Hardy & Allsop 1991, Hardy 1992, Beyreuther *et al.* 1991). Esta hipótesis, aunque controvertida, se mantiene aún vigente con algunas matizaciones (Hardy & Selkoe 2002, Selkoe & Hardy 2016). Así, en el modelo original, se establecía una linealidad entre un exceso de β -amiloide, acúmulo en placas seniles, hiperfosforilación de la proteína tau, formación de ovillos neurofibrilares, fallo sináptico, neurodegeneración y deterioro cognitivo. Sin embargo, hoy sabemos que no existe una correlación directa entre el depósito del exceso de β -amiloide en forma de placas y la pérdida neuronal (Masliah *et al.* 1990) y, de hecho, los daños a nivel sináptico ocurren de forma previa a la formación de las placas seniles (Selkoe 2002, Ferreira *et al.* 2015).

En consecuencia, se han ido realizando modificaciones al modelo inicial. Entre ellas cabe destacar que no serían las propias placas, sino los oligómeros de β -amiloide (agregados solubles de pocas subunidades de β -amiloide), las formas más tóxicas del péptido. En este sentido, se ha comprobado que la concentración de oligómeros en el parénquima cerebral se correlaciona de manera clara con el deterioro cognitivo (Naslund *et al.* 2000, McLean *et al.* 1999). De acuerdo con ello, el β -amiloide empezaría a ejercer sus diferentes efectos tóxicos con anterioridad a la formación de agregados visibles en forma de placas seniles.

Además, se ha añadido al modelo la participación de otros tipos celulares en el desarrollo de la enfermedad ya que, astrocitos, microglía y células endoteliales, cumplen importantes funciones en el aclaramiento cerebral del β -amiloide, de forma que también pueden favorecer el acúmulo del péptido en el cerebro (Tarasoff-Conway *et al.* 2015).

A continuación consideraremos, en más detalle, los diferentes factores implicados en la enfermedad de Alzheimer a nivel molecular, así como las rutas afectadas en el desarrollo de la patología.

1.2. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer.

Como ya hemos comentado, las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer fueron descritas en 1906. A pesar de que aún quedan cuestiones por resolver, en estos más de 100 años se ha avanzado en el conocimiento de la enfermedad de forma significativa.

1.2.1. Beta-amiloide.

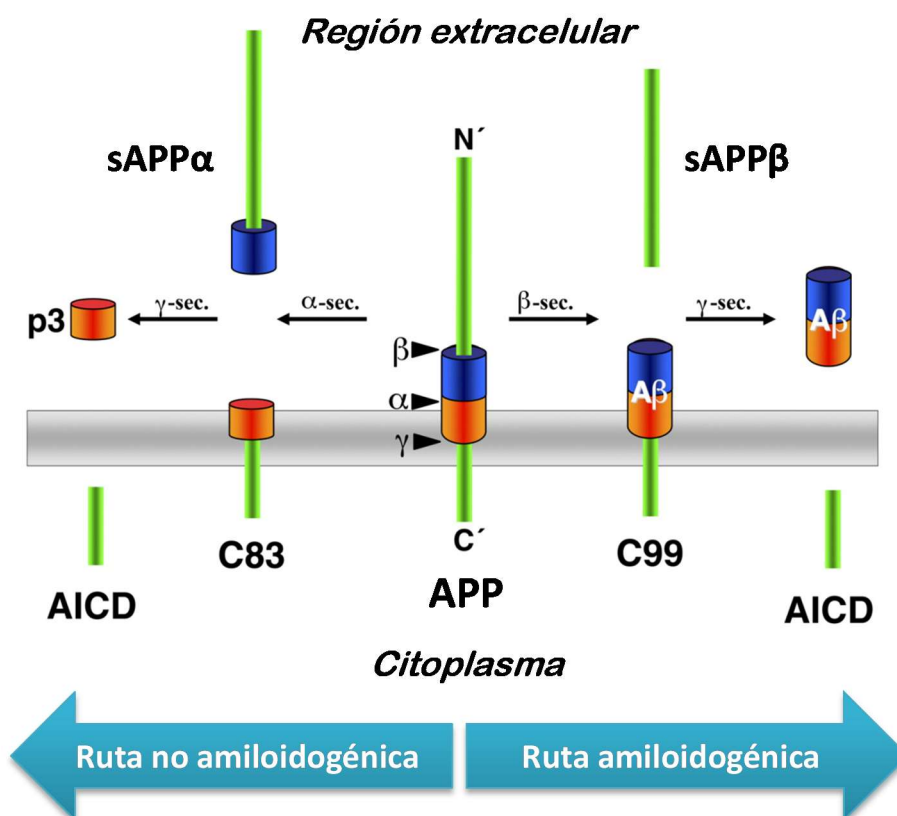
El β -amiloide es un péptido de unos 4 kDa que se produce a partir del procesamiento proteolítico de su proteína precursora, denominada APP o proteína precursora de amiloide. A esta proteína precursora se le han atribuido diversas funciones, como la de modular la interacción con sistemas de señalización celular implicados en el crecimiento de axones y dendritas o participar en procesos de mantenimiento sináptico. Además, durante el desarrollo parece tener un importante papel en la migración neuronal. Sin embargo, no sabemos si estas actividades las realizaría la proteína completa o los fragmentos proteolíticos derivados de la misma, tal y como veremos a continuación (van der Kant & Goldstein 2015).

La APP es una proteína transmembrana, con un pequeño dominio C-terminal intracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana y una amplia región N-terminal extracelular. Esta proteína sufre un procesamiento proteolítico postranscripcional, altamente compartimentalizado, que puede seguir dos rutas: la no amiloidogénica o la amiloidogénica (esquema 2).

La ruta no amiloidogénica implica la participación secuencial de α - y γ -secretasas, mientras que en la ruta amiloidogénica o de generación de β -amiloide intervienen β - y γ -secretasas (Haass *et al.* 2012). Ambas rutas de procesamiento de la APP compiten entre sí, ya que cuando una de ellas se favorece, la otra disminuye su actividad. Por ello, estas secretasas se han empleado como dianas terapéuticas en muchos estudios.

Las α -secretasas son varios miembros de la familia de proteasas ADAM (“a disintegrin and metalloprotease”), que actúan sobre numerosos sustratos celulares. A

nivel cerebral, la actividad de la α -secretasa constitutiva es llevada a cabo por la enzima ADAM10, mientras ADAM9, TACE/ADAM17 y ADAM19 llevarían a cabo la actividad α -secretasa regulada (Kuhn *et al.* 2010). La acción de la α -secretasa sobre la APP tiene lugar en medio de la región del β -amiloide (aminoácido 17 de la secuencia del β -amiloide), de forma que previene la formación de este péptido. Los productos de esta proteólisis son un fragmento soluble denominado sAPP α y otro fragmento de menor tamaño anclado a la membrana (Sisodia 1992).



Esquema 2. Rutas de procesamiento de la APP (modificado de (Kaether & Haass 2004)).

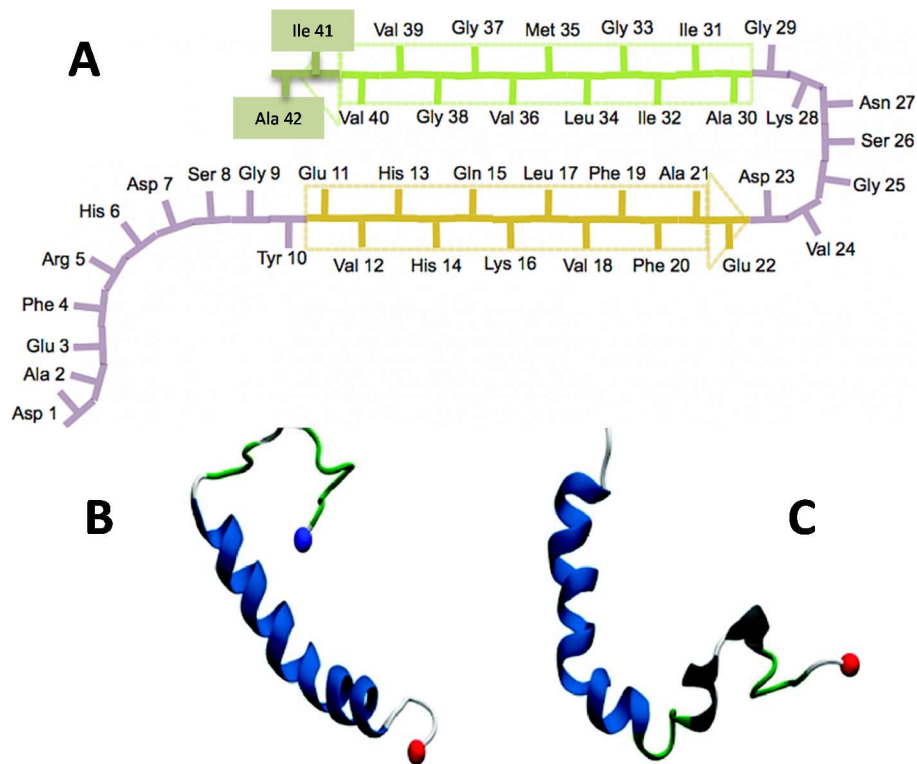
La β -secretasa es la enzima inicial y limitante en la generación de β -amiloide (Vassar 2004) y se ha identificado una forma principal de la misma, denominada BACE1 (“ β -site APP-cleaving enzyme-1”). Esta enzima escinde la APP en un fragmento soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal que permanece anclado en la membrana. BACE1 constituye una diana terapéutica clara, ya que su inhibición reduce los niveles de β -amiloide (Citron 2004). Sin embargo, al inhibir esta actividad enzimática también se

está afectando al resto de funciones de la proteína que, por ejemplo, se ha relacionado con procesos de mielinización (Hu *et al.* 2006).

La γ -secretasa es un complejo proteico formado por cuatro subunidades: presenilina 1 o 2 (PS1 o PS2), nicastrina (NCT), APH-1a o APH-1b (“anterior pharynx defective”) y PEN-2 (“presenilin enhancer”) (Kaether *et al.* 2006). La actividad catalítica reside en la subunidad de presenilina y actúa sobre los fragmentos anclados a la membrana, originados tras el procesamiento por α - y β -secretasas. La proteólisis del fragmento producido en la ruta no amiloidogénica da lugar a un pequeño péptido denominado P3, mientras que el procesamiento tras la intervención de la BACE1 libera un péptido β -amiloide de longitud variable (37-43 aminoácidos) (Kummer & Heneka 2014). En ambos casos se genera, además, el fragmento AICD (“APP intracelular domain”), que se libera hacia el citosol y podría traslocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción (Konietzko 2012, Pardossi-Piquard & Checler 2012).

Las funciones de los diferentes fragmentos de la APP generados en su procesamiento son centro de muchas investigaciones. Por el momento sabemos que sAPP α y sAPP β son liberados hacia el medio extracelular, donde estarían implicados en procesos de crecimiento celular, formación de sinapsis y crecimiento de neuritas (van der Kant & Goldstein 2015).

En cuanto a los β -amiloides generados, la gran mayoría corresponden a β -amiloide 40 (A β 40) y, en menor proporción –en torno a un 10% del total- a β -amiloide 42 (A β 42) (esquema 3). Además, existen otras formas de longitud intermedia formadas por la propia actividad de la γ -secretasa o por otras actividades enzimáticas (Kummer & Heneka 2014).



Esquema 3. Secuencia y estructura teórica de los beta-amiloideos 40 y 42. A. Secuencia aminoacídica. B. Estructura del A β 40. C. Estructura del A β 42. La esfera azul representa el extremo N-terminal y la esfera roja el C-terminal. (Modificado de (Olubiyi & Strodel 2012))

Como estamos viendo, el β -amiloide se produce de forma normal en el organismo mediante el procesamiento amiloidogénico de la APP. Así, en humanos las concentraciones de A β 40 y A β 42 en el líquido cefalorraquídeo se sitúan en torno a 1500 pM y 200 pM, y 60 pM y 20 pM en el plasma, respectivamente (Giedraitis *et al.* 2007). Este hecho, hace pensar en una posible función fisiológica para este péptido. Actualmente, sabemos que el β -amiloide posee un papel dual, actuando a bajas concentraciones como factor neurotrófico sobre neuronas en diferenciación, mientras que en altas concentraciones provoca la degeneración celular de neuronas maduras (Yankner *et al.* 1990, Puzzo & Arancio 2013). También se le ha asignado un papel neuroprotector, ya que favorecería el crecimiento y la supervivencia neuronales (Giuffrida *et al.* 2010). Y de forma reciente, se ha propuesto al β -amiloide como una molécula del sistema inmune innato, ya que posee actividad antimicrobiana frente a microorganismos habituales (Soscia *et al.* 2010). Por último, el β -amiloide modularía positivamente la plasticidad sináptica y favorecería la potenciación a largo plazo

(Morley *et al.* 2010). En este sentido, el péptido se liberaría desde neuronas sanas como respuesta a la actividad sináptica, lo que a su vez provocaría una regulación negativa de la transmisión sináptica. Existe, así, un mecanismo de retroalimentación negativa que mantiene los niveles normales de actividad neuronal (Puzzo *et al.* 2008).

En todas estas funciones no sólo sería importante la concentración de β -amiloide, sino también su estado de agregación, puesto que las formas agregadas, aun a bajas concentraciones, desplazan el efecto neuroprotector hacia la neurotoxicidad.

Una vez que las concentraciones de β -amiloide comienzan a aumentar, éste empieza a polimerizar y formar agregados de orden cada vez mayor, llegando a formar fibrillas insolubles, que se unen para acabar dando lugar a las denominadas placas seniles o amiloides (Masters & Selkoe 2012). Durante estos procesos se forman los oligómeros de β -amiloide, que afectan a las células cerebrales desencadenando procesos que veremos más adelante. Además, se ha descrito recientemente que, a partir de las placas seniles pueden desprenderse, de forma espontánea y mediante procesos no enzimáticos, diferentes péptidos, destacando entre ellos –como es lógico– los A β 40 y A β 42 (Lyons *et al.* 2016). Existe, por tanto, un equilibrio dinámico entre la producción y la secreción celular de los β -amiloides, la formación de las placas y la liberación de los péptidos desde éstas, lo que sugiere que en el entorno celular podríamos encontrar los diferentes estados de agregación de los β -amiloides, desde las formas monoméricas simples hasta los agregados más complejos.

Entre las diferentes especies de β -amiloide, el A β 42 constituye la forma más hidrofóbica y con más tendencia a la agregación, siendo la forma prioritaria en las placas seniles. En cambio, el A β 40, más soluble, parece tender a acumularse en el entorno de los vasos sanguíneos, dando lugar a la amiloidosis vascular característica de un porcentaje muy elevado de los casos de enfermedad de Alzheimer. Además, estas dos formas principales de β -amiloide pueden sufrir diferentes modificaciones y dar lugar a otras. Así, se ha descrito que los procesos normales de envejecimiento suponen la racemización de la serina 26 del A β 40 (Ser²⁶), que pasa de la conformación L (L-Ser²⁶) a la D (D-Ser²⁶). En esta forma, el péptido puede ser atacado por ciertas proteasas cerebrales, dando lugar a formas truncadas, destacando entre ellas el A β 25-

35 (Kubo *et al.* 2002). La forma corta A β 25-35 se ha detectado en el cerebro de enfermos de Alzheimer (Kaneko *et al.* 2001) y es el péptido de menor tamaño (11 aminoácidos) capaz de provocar los efectos tóxicos observados en los β -amiloides de longitud completa, de forma que se considera la región biológicamente nociva del β -amiloide (Kaminsky *et al.* 2010, Millucci *et al.* 2010). Por tanto, el A β 25-35 no sólo constituye una importante herramienta experimental para el estudio de los mecanismos patogénicos de la enfermedad de Alzheimer, sino que posee un claro significado biológico.

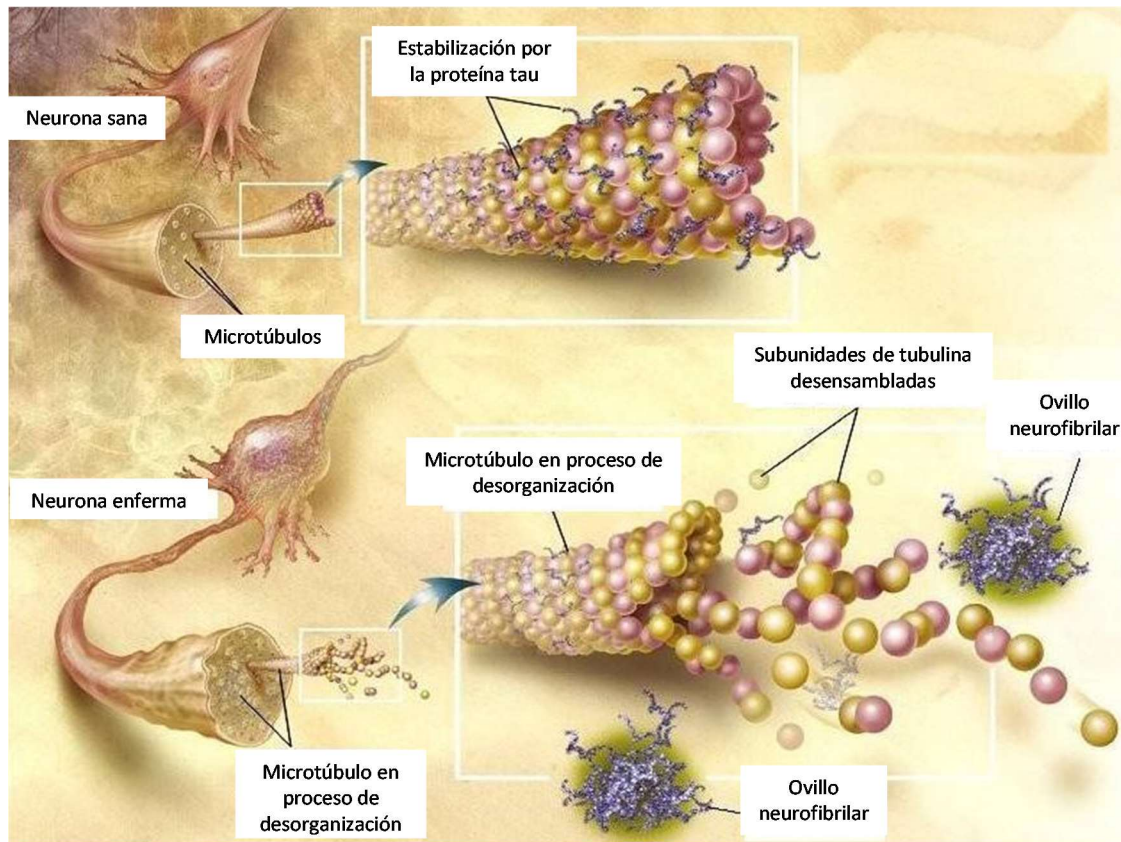
1.2.2. Tau.

La proteína tau (“tubulin-associated unit”) es una proteína de bajo peso molecular, altamente soluble, termoestable, que es imprescindible para la formación de los microtúbulos (Weingarten *et al.* 1975). A través de sus dominios de unión a tubulina, tau promueve la polimerización y ensamblaje de ésta, dando lugar a los microtúbulos. Estos últimos son los componentes principales del citoesqueleto neuronal, que define la morfología de las neuronas y proporciona soporte estructural a las mismas. Por tanto, tau cumple importantes funciones celulares, puesto que determina en última instancia la morfología, crecimiento y polaridad axonales y tiene un papel relevante en el control del transporte axonal.

Se han descrito seis isoformas de tau, que se generan por “splicing” alternativo. (Himmler *et al.* 1989). Como ya hemos mencionado, se trata de una proteína mayoritariamente neuronal, localizada en los axones de manera prioritaria (Binder *et al.* 1985).

En condiciones patológicas, como la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías, tau puede formar inclusiones intracelulares que denominamos ovillos neurofibrilares (esquema 4). Estas inclusiones están constituidas, en todos los casos, por proteína tau en estado hiperfosforilado. Es llamativo que el análisis de los agregados de tau en cada una de estas enfermedades dé lugar a un patrón electroforético diferente y característico. Así, en la enfermedad de Alzheimer se ha

observado la participación de las seis isoformas de tau de las que se expresan en adultos (Avila *et al.* 2004).



Esquema 4. Papel de tau en la organización y desorganización de los microtúbulos.

El grado de fosforilación de tau está determinado por la acción coordinada de kinasas y fosfatasa y tiene una implicación importante en su actividad biológica, puesto que regula la interacción con la tubulina de los microtúbulos (Mandelkow *et al.* 1995). El nivel de fosforilación de tau también regula su compartimentalización, por lo que en condiciones patológicas es posible que pase del compartimento axonal al somatodendrítico (Zempel *et al.* 2010).

Para la isoforma de mayor longitud de tau se han definido 79 sitios posibles de fosforilación, de los cuales se han podido demostrar al menos 39 en muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer (Hanger *et al.* 2007). La mayoría de estos sitios de fosforilación se encuentran en regiones próximas a los dominios de unión a

microtúbulos; de ahí la pérdida de función de tau. Además, su hiperfosforilación favorece su autoensamblaje y el inicio de la polimerización (Alonso *et al.* 2001).

En la enfermedad de Alzheimer la proteína tau se encuentra al menos tres veces más fosforilada que los controles correspondientes (Kopke *et al.* 1993). Esta hiperfosforilación estaría provocada por un desequilibrio entre las kinasas y fosfatasa que actúan sobre ella. Así, se ha descrito que la principal fosfatasa que actúa sobre tau, la PP2A (“protein phosphatase-2A”) se encuentra disminuida en enfermos de Alzheimer, mientras que algunas kinasas podrían estar aumentadas (GSK-3 β , “glycogen synthase kinase-3 β ”; cdk5, “cyclin-dependent protein kinase 5”) (Wang *et al.* 2007). También existen formas truncadas de tau, cuya proteólisis se ha establecido que tiene lugar posteriormente a la agregación (Kolarova *et al.* 2012).

Por último, en cuanto a la controversia β -amiloide/tau como origen de la patología de Alzheimer, existen numerosos datos que apuntan a que la hiperfosforilación y subsiguiente agregación en ovillos neurofibrilares de tau es un suceso que ocurre después de que empiece a acumularse el β -amiloide. Una de las evidencias más claras consiste en que mutaciones en el gen de tau provocan una demencia frontotemporal con un componente parkinsoniano. Esta patología neurodegenerativa se caracteriza por el acúmulo de ovillos neurofibrilares, pero sin presencia de placas amiloides (Spillantini *et al.* 1998). Por el contrario, en ratones transgénicos que sobreexpresan la APP, se desarrollan no sólo placas amiloides sino también ovillos neurofibrilares (Lewis *et al.* 2001). Por consiguiente, la alteración del metabolismo de la APP/ β -amiloide parece ser anterior a la hiperfosforilación de tau, dentro de la cascada de eventos que ocurren en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer.

1.2.3. Aclaramiento de β -amiloide y tau.

Como hemos visto, la enfermedad de Alzheimer está caracterizada por el depósito de proteínas cuyo plegamiento ha sido defectuoso y acaban dando lugar a agregados insolubles: ovillos neurofibrilares de tau hiperfosforilada y placas seniles de

β -amiloide. Pero, para llegar a este punto avanzado, han ocurrido una serie de eventos que han dado lugar al aumento de la concentración de dichas proteínas.

Aunque poco sabemos en lo que respecta a tau, sí está bastante bien establecido que el acúmulo de formas tóxicas de β -amiloide se produciría por un desequilibrio entre su formación y su aclaramiento (aclaramiento en sentido amplio, entendido como eliminación). En este sentido, estudios recientes sugieren la existencia de déficits en el aclaramiento del β -amiloide, tanto en las formas familiares como esporádicas de la enfermedad de Alzheimer (Mawuenyega et al. 2010).

En cuanto a los mecanismos concretos de aclaramiento o eliminación del β -amiloide, el más básico consiste en su degradación proteolítica. Así, el β -amiloide intracelular neuronal puede ser degradado a través del sistema ubiquitina-proteosoma, mediante enzimas lisosómicas y por otras proteasas celulares. Si es liberado al espacio extracelular, el β -amiloide también puede ser atacado por enzimas proteolíticas como la IDE (“insulin degrading enzyme”) (Qiu *et al.*) y la neprilisina (Iwata *et al.* 2000, Miners *et al.* 2008). Las células gliales –astrocitos y microglía– también pueden internalizar el β -amiloide y participar en su eliminación (Wyss-Coray *et al.* 2003, Wyss-Coray *et al.* 2001).

Sin embargo, el principal mecanismo de aclaramiento cerebral de β -amiloide tiene lugar mediante transcitosis a través de la barrera hematoencefálica hacia el sistema vascular. En este proceso participaría la apoE que, cargada con A β , interaccionaría con receptores de membrana tales como LRP1 (“Low density lipoprotein receptor-related protein 1”) (Deane *et al.* 2004), de forma que el β -amiloide se internalizaría por endocitosis mediada por clatrina, con implicación de las proteínas BIN1 y PICALM. Ciertas variantes en los genes APOE, BIN1, y PICALM constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, lo que se entiende fácilmente al suponer que esas variantes disminuyen la tasa de aclaramiento del β -amiloide hacia el torrente sanguíneo (Bohm *et al.* 2015).

Otro mecanismo de aclaramiento de β -amiloide desde el sistema nervioso central hacia el torrente sanguíneo es su paso al líquido cefalorraquídeo, paso que está controlado por los diferentes transportadores presentes en el plexo coroideo. En este

caso, el principal receptor del A β es la megalina o LRP2, en un proceso mediado por la apoJ (Alvira-Botero & Carro 2010, Hammad *et al.* 1997).

Una vez en la sangre, el β -amiloide puede viajar en forma soluble, pero principalmente lo hace unido a proteínas transportadoras como la albúmina y diferentes lipoproteínas (Biere *et al.* 1996). El β -amiloide sanguíneo se elimina en diferentes órganos periféricos (hígado, riñón, tracto gastrointestinal), por procesos en los que también participan receptores de la familia LDL (Xiang *et al.* 2015, Tamaki *et al.* 2006).

Aunque existen otras rutas de aclaramiento, aún disponemos de poca información sobre ellas, pero pueden adquirir relevancia conforme avanza la investigación, por ejemplo, a través del sistema linfático cerebral, recientemente descubierto (véase (Tarasoff-Conway *et al.* 2015)).

En relación con estos sistemas de aclaramiento, se han descrito algunos eventos que afectan a la eliminación del β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Así, se ha detectado que la expresión de algunas de las enzimas que degradan el β -amiloide está disminuida, como es el caso de la neprilisina (Yasojima *et al.* 2001). Por otro lado, el papel de los astrocitos en el aclarado también se ve comprometido conforme avanza la patología, puesto que, cuando las concentraciones de β -amiloide son muy altas los sistemas de degradación de los astrocitos se saturan, lo que supone que acumulen el péptido en su interior, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Nagele *et al.* 2003). En cuanto a la barrera hematoencefálica, su estructura se encuentra comprometida en la enfermedad de Alzheimer, alterándose el control sobre el intercambio de β -amiloide entre el compartimento intersticial y la sangre (Silverberg *et al.* 2010, Zlokovic 2011).

Cabe señalar que la presencia de β -amiloide en sangre y la correlación de su concentración con los niveles cerebrales del mismo, ha permitido desarrollar la “hipótesis del sumidero periférico” o “peripheral sink hypothesis” (DeMattos *et al.* 2002), en la que la sangre estaría actuando cual “sumidero” del exceso de β -amiloide cerebral. Por ello, facilitar la eliminación o aclarado de ese β -amiloide plasmático y

disminuir así los niveles cerebrales del péptido y el subsiguiente avance de la enfermedad, se postula como una interesante estrategia terapéutica.

1.3. Mecanismos de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer.

Los tres mecanismos principales para el desencadenamiento de la muerte celular observada en la enfermedad de Alzheimer son: la interacción del β -amiloide con las mitocondrias, la actuación del mismo sobre las sinapsis y la astrogliosis asociada a ambas. Consideremos cada una de ellas por separado.

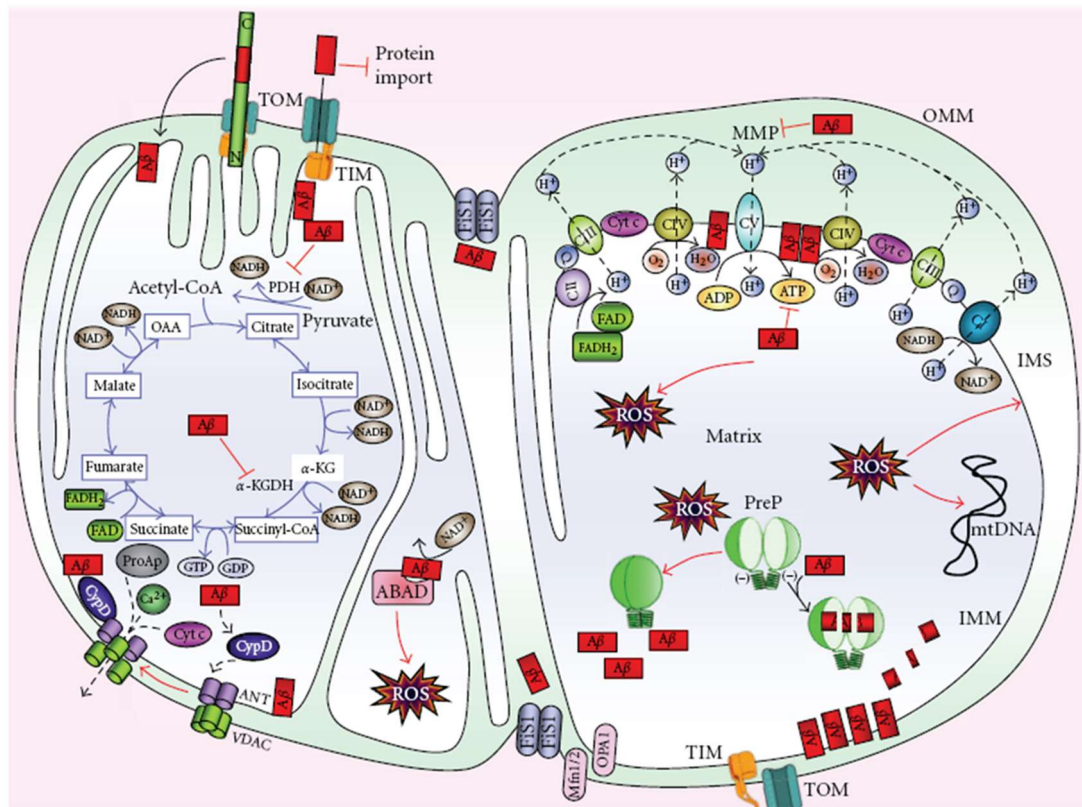
1.3.1. Beta-amiloide y mitocondria.

La disfunción mitocondrial es un evento temprano en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Hauptmann *et al.* 2009). Está ampliamente demostrada la presencia de β -amiloide en mitocondrias, tanto en muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer como en ratones transgénicos para la APP (Caspersen *et al.* 2005, Manczak *et al.* 2006). Además, estos depósitos intracelulares del péptido ocurrirían de forma previa a la formación de agregados de proteína tau y de depósitos extracelulares de β -amiloide (Fernandez-Vizarra *et al.* 2004).

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para las células, pues suministran la mayor parte de la energía celular, participan en la regulación del calcio intracelular, del potencial redox y en la eliminación de radicales libres, entre otras funciones, por lo que de su correcto funcionamiento e integridad depende la supervivencia celular.

Son numerosos los niveles de interacción mitocondria- β -amiloide que se han descrito hasta el momento y que tienen como consecuencia la disfunción mitocondrial (esquema 5). El primer lugar de interacción sería la propia membrana mitocondrial, donde se ha descrito que, directamente la APP, o formas truncadas de la misma β -amiloides- interaccionarían con la maquinaria de importe proteico mitocondrial, inhibiendo, así, la importación de proteínas al interior de la mitocondria. Las principales translocasas afectadas son TOM40 (“translocase of the outer mitochondrial

membrane 40”) y TIM23 (“translocase of the inner mitochondrial membrane 23”), con las que APP/A β formarían complejos estables, lo que impediría la llegada a la mitocondria de proteínas codificadas por el núcleo, tales como algunos de los componentes de la cadena transportadora de electrones, provocando un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Devi *et al.* 2006).



Esquema 5. Niveles de interacción del beta-amiloide y la mitocondria (Pagani & Eckert 2011).

La dinámica de fusión/fisión mitocondrial también se encuentra alterada en la enfermedad de Alzheimer. Las mitocondrias son orgánulos dinámicos sometidos a constantes procesos de fisión, mediada por las proteínas Fis1 (“mitochondrial fission 1 protein”) y DLP1 (“dynamin-like protein 1”), y de fusión, controlados por OPA1 (“optic atrophy protein 1”), Mfn1 (“Mitofusin 1”) y Mfn2 (“Mitofusin 2”) (Okamoto & Shaw 2005). Un desequilibrio en la fusión conduce a la elongación mitocondrial, mientras que una fisión descompensada supone una fragmentación mitocondrial excesiva. Ambos fenómenos llevan consigo la alteración de la función mitocondrial (Santos *et al.* 2010).

Varios hallazgos indican que la interacción del β -amiloide con la mitocondria altera la dinámica mitocondrial. En diferentes modelos experimentales de Alzheimer, se ha demostrado que existe un alto porcentaje de mitocondrias fragmentadas, y que las enteras son de menor tamaño que en los controles. En concreto, las concentraciones de las proteínas que intervienen en la dinámica mitocondrial se encuentran alteradas con respecto a la situación control, hallándose el balance fusión/fisión desplazado hacia la fisión. Así, los niveles de las proteínas de fisión tales como la Fis1, están aumentados, mientras que los niveles de las proteínas de fusión, tales como OPA1 y Mfn1, aparecen reducidos (Manczak *et al.* 2011). También se ha observado una distribución anormal de las mitocondrias dentro de las neuronas, que pasan a localizarse principalmente en la región perinuclear, siendo escasas en las prolongaciones neuronales. Todo ello puede tener como consecuencia el deterioro sináptico, como resultado de un insuficiente aporte de energía a ambos lados de la sinapsis, contribuyendo al declive cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.* 2009).

El β -amiloide mitocondrial también afecta a la cadena transportadora de electrones, provocando una disminución en la velocidad de síntesis de ATP y una elevada producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Este hecho es el resultado del escape de electrones a nivel de los complejos I y III, como consecuencia de la inhibición del complejo IV (citocromo *c* oxidasa) (Casley *et al.* 2002).

Por otro lado, se ha descrito la interacción del β -amiloide con la ciclofilina D, una parte integral del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). El mPTP es, como su nombre indica, un poro en la membrana mitocondrial que permite el paso no selectivo de sustancias a través de ella. La unión del β -amiloide a la ciclofilina D favorece la apertura del poro, lo que tiene como consecuencia la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la disminución de la producción de ATP y un incremento en la generación de ROS. Además, a través del mPTP se liberan factores apoptóticos, tales como el citocromo *c*, que inician la muerte celular por apoptosis (Du & Yan 2010).

Son muchas las enzimas mitocondriales cuyos niveles y actividades se encuentran afectados por el β -amiloide. Así, diferentes enzimas del ciclo de Krebs, tales como la piruvato deshidrogenasa o la α -cetoglutarato deshidrogenasa, aparecen disminuidas en tejido cerebral de enfermos de Alzheimer (Perry *et al.* 1980, Mastrogiacoma *et al.* 1996). También existe una interacción directa del péptido con ciertas enzimas mitocondriales. Así, la unión del β -amiloide con la ABAD (“ $A\beta$ -binding alcohol dehydrogenase”) causa una producción elevada de ROS y la consiguiente muerte celular, ambos fenómenos directamente relacionados con déficits de aprendizaje y de memoria en ratones transgénicos (Yan & Stern 2005).

Tal y como hemos descrito, la presencia de β -amiloide en la mitocondria produce un incremento muy significativo de la producción de ROS. Estas especies inhiben a la proteasa presecuencia (Prep), enzima encargada de la degradación del β -amiloide mitocondrial. En efecto, los ROS favorecen la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas de la enzima, pasando ésta a una forma inactiva. De este modo, el β -amiloide está provocando un mecanismo de retroalimentación positiva del proceso de disfunción mitocondrial al impedir su propia degradación (Alikhani *et al.* 2009).

1.3.2. Beta-amiloide y sinapsis.

En paralelo a la disfunción mitocondrial, se ha descrito que el fallo sináptico es otro de los eventos tempranos en la enfermedad de Alzheimer, que aparece de forma previa a la formación de las placas amiloides (Selkoe 2002, Ferreira *et al.* 2015). Así, las sinapsis se consideran lugares preferentes de acúmulo de β -amiloide (Lacor *et al.* 2004, Koffie *et al.* 2009), y la pérdida de las conexiones sinápticas constituye el mejor correlato patológico con el deterioro cognitivo en los enfermos de Alzheimer (DeKosky & Scheff 1990, Masliah *et al.* 1990, Scheff *et al.* 2006). Esto es fácilmente comprensible, puesto que las sinapsis son el medio por el que el cerebro transmite, procesa y almacena información, todo lo cual está afectado en la enfermedad.

Está ampliamente descrito que el β -amiloide puede inducir alteraciones morfológicas y funcionales en las sinapsis, así como afectar a la plasticidad sináptica

(Sheng *et al.* 2012). Localizados en las sinapsis, los oligómeros de β -amiloide reducen la densidad de espinas dendríticas en cultivos organotípicos de hipocampo (Wei *et al.* 2010, Shankar *et al.* 2008, Shrestha *et al.* 2006), en cultivos de neuronas (Calabrese *et al.* 2007, Evans *et al.* 2008, Lacor *et al.* 2007), así como en modelos transgénicos de ratón (Lanz *et al.* 2003, Spires *et al.* 2005). En general, se observa una reducción en el número de espinas dendríticas, así como una alteración de su morfología, pasando a estar anormalmente elongadas y con protuberancias, un aspecto propio de espinas inmaduras o no funcionales.

En consonancia con estos defectos estructurales, las neuronas tratadas con β -amiloide o que sobreexpresan APP muestran una transmisión glutamatérgica reducida (Hsieh *et al.* 2006, Almeida *et al.* 2005, Snyder *et al.* 2005, Ting *et al.* 2007). El β -amiloide también está afectando a mecanismos de plasticidad neuronal, tales como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), procesos estrechamente ligados a la memoria y el aprendizaje. En este sentido, se ha observado que el β -amiloide en forma oligomérica facilita la LTD (Li *et al.* 2009), y limita la LTP (Jacobsen *et al.* 2006, Walsh *et al.* 2002), afectando con ello a la memoria (Chapman *et al.* 1999, Cleary *et al.* 2005). Este efecto puede ser revertido –al menos en parte– con el tratamiento con anticuerpos contra el β -amiloide o pequeñas moléculas que inhiben su agregación (Klyubin *et al.* 2005, Hartman *et al.* 2005, Walsh *et al.* 2005, Morgan *et al.* 2000).

En resumen, el β -amiloide provoca la disfunción sináptica a través de la actuación directa o indirecta sobre multitud de vías, lo que acaba, en última instancia, conduciendo a la pérdida de memoria característica de la enfermedad de Alzheimer.

1.3.3. Beta-amiloide y astrocitos.

La última de las características descritas por Alois Alzheimer en el cerebro del primer caso de la enfermedad que lleva su nombre, es la presencia de astrogliosis. La astrogliosis o gliosis reactiva es un conjunto de cambios potenciales en los astrocitos a nivel molecular, celular y funcional, que ocurre en un contexto específico y como resultado de algún tipo de daño en el sistema nervioso central. Estos cambios tienen

funciones beneficiosas pero, si se prolongan demasiado, pueden tener efectos dañinos y contribuir al desarrollo de diversas patologías (Sofroniew 2009).

Esta astrogliosis provoca que el papel de los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer resulte aún controvertido, ya que es muy probable que la gliosis comience como un mecanismo defensivo frente a la enfermedad, pero conforme avanza y se mantiene en el tiempo, favorece el progreso de la patología. En este sentido, se han encontrado astrocitos rodeando las placas amiloides (Kamphuis *et al.* 2014), los cuales podrían actuar como barreras protectoras para las neuronas. Posiblemente, estos astrocitos reactivos actúen limitando la extensión del daño, reparando la barrera hematoencefálica y proveyendo de sustratos energéticos cuando el suministro de ellos está limitado. Sin embargo, si se mantienen la reactividad y la inflamación asociada a la misma, los astrocitos acaban causando la pérdida de funcionalidad que hasta entonces contribuían a mantener.

Los astrocitos son capaces de degradar el β -amiloide (Wyss-Coray *et al.* 2003). Para degradarlo podrían internalizarlo a través de diversos receptores, principalmente de la familia de los receptores “scavengers” o de la familia de los receptores de lipoproteínas. Dentro de los receptores “scavengers” se ha destacado el receptor SR-A (“scavenger receptor A”) cuya activación supone una alteración del metabolismo celular con consecuencias negativas para las neuronas vecinas (Allaman *et al.* 2010).

En cuanto a los receptores de lipoproteínas, se ha descrito que el LDLR (“low-density lipoprotein receptor”) puede unir directamente el β -amiloide y participar en su internalización en astrocitos (Basak *et al.* 2012). Sin embargo, el LRP1 (“low-density lipoprotein receptor-related protein 1”) es el más estudiado entre los candidatos posibles a receptor del β -amiloide. LRP1 mediaría la internalización de este péptido en neuronas (Kanekiyo *et al.* 2011), astrocitos (Koistinaho *et al.*), microglía (Laporte *et al.* 2004), células de la musculatura lisa vascular (Bell *et al.* 2009, Kanekiyo *et al.* 2012) y células endoteliales (Deane *et al.* 2004, Yamada *et al.* 2008). Existen numerosos estudios que apoyan al LRP1 como receptor principal del β -amiloide (Shibata *et al.* 2000, Kanekiyo & Bu 2014), a través de su unión directa o indirecta –mediante

interacciones de sus ligandos, apoE, α 2-macroglobulina- al mismo. Sin embargo, lo más probable es que varios receptores participen de la internalización.

Una vez endocitado, el β -amiloide sería degradado en los astrocitos. Si las concentraciones de β -amiloide son muy elevadas, el astrocito puede acumular más β -amiloide del que es capaz de degradar, lo que le causaría la muerte y posterior lisis, pasando a formar parte de los depósitos extracelulares y conformando las placas amiloides GFAP positivas descritas en la literatura (Nagele et al. 2003).

Además de su importante participación en el aclaramiento del β -amiloide cerebral, los astrocitos llevan a cabo numerosísimas funciones que se ven afectadas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Entre las más destacadas está la recaptación de glutamato en sinapsis glutamatérgicas, a través de los transportadores EAAT1 y EAAT2 (“excitatory amino acid transporter 1 y 2”) y sus ortólogos GLAST (“glutamate aspartate transporter”) y GLT-1 (“glutamate transporter 1”) del ratón, que son esenciales para el correcto funcionamiento de las sinapsis. Varios estudios han mostrado una reducción en la expresión de EAAT2 en el hipocampo y en la corteza frontal de enfermos de Alzheimer (Jacob *et al.* 2007, Li *et al.* 1997, Tian *et al.* 2010). Asimismo, la exposición al β -amiloide reduce los niveles de GLT-1 en la superficie de los astrocitos (Scimemi *et al.* 2013). Como ya expusimos en apartados anteriores, la reducción de la recaptación de glutamato por parte del β -amiloide altera los procesos de reciclaje del neurotransmisor y favorece, así, la LTD (Almeida et al. 2005).

1.4. Albúmina sérica en la enfermedad de Alzheimer.

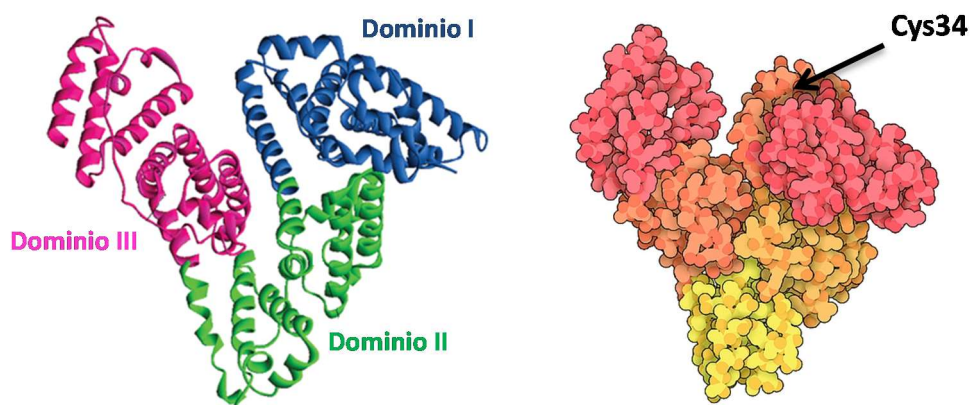
1.4.1. La albúmina sérica.

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma, constituyendo cerca del 60% de las proteínas plasmáticas. Su vida media en circulación es de 20 días y su concentración se sitúa en torno a 0,6 mmol/L. Tiene una masa molecular de 65-67 kDa. Está formada por 585 aminoácidos y tiene carga negativa neta en el plasma sanguíneo (pH 7,4) (Bruschi *et al.* 2013).

La albúmina se sintetiza en el hígado como pre-albúmina, sufriendo dos cortes proteolíticos consecutivos en el retículo endoplasmático y en el Golgi, y se secreta directamente a la circulación. La síntesis de albúmina está regulada por su propia concentración plasmática, así como por la ingesta de alimentos (Gekle 2005).

Las funciones fisiológicas que lleva a cabo la albúmina son muy numerosas. Entre ellas destacan el mantenimiento de la presión oncótica plasmática, la regulación del potencial redox del plasma y el transporte de ligandos, tanto endógenos como exógenos. Entre estos ligandos destacan los ácidos grasos libres, tiroxina, grupo hemo, bilirrubina no conjugada y muchos medicamentos (Wang *et al.* 2015).

La secuencia primaria de la albúmina fue identificada en 1975 (Meloun *et al.* 1975) y contiene 585 aminoácidos. Su estructura tridimensional fue determinada en 1992 (He & Carter 1992). A partir de estos estudios se estableció que la albúmina posee un 67% de α -hélices en su estructura secundaria. La molécula se pliega dando lugar a una forma de corazón (esquema 6). La estructura completa de la proteína contiene tres dominios, denominados dominio I (residuos 1-195), dominio II (196-383) y dominio III (384-585). Cada dominio consiste en diez α -hélices paralelas y se encuentra dividido en dos subdominios A y B. Además, la albúmina contiene 35 residuos de cisteína formando 17 puentes disulfuro que estabilizan la molécula, quedando un residuo de cisteína libre (Cys34), lo que resulta poco frecuente en proteínas expuestas al espacio extracelular oxidante.



Esquema 6. Estructura de la albúmina sérica.

Esta estructura favorece la función transportadora de ligandos de la albúmina, ya que le confiere cierta flexibilidad. Además, la presencia en la molécula de regiones totalmente inaccesibles al agua permite el transporte de ligandos hidrofóbicos a través del torrente sanguíneo (Grdadolnik & Marechal 2005).

Otra característica importante de la albúmina es su capacidad antioxidante y captadora de radicales libres, que posee gracias a la presencia de un residuo libre de cisteína (Cys34) y a seis residuos de metionina, susceptibles de ser oxidados (Roche *et al.* 2008).

A pesar de su alta concentración en plasma, los niveles cerebrales de albúmina son muy bajos, en torno a 3 μ M (Stevens *et al.* 1979), probablemente porque requiere un sistema de transporte activo para atravesar la barrera hematoencefálica. No obstante, se ha visto que células de la microglía son capaces de sintetizar albúmina en el cerebro (Ahn *et al.* 2008).

En el cerebro, la albúmina también desempeña importantes funciones, principalmente durante el desarrollo, momento en el que se detectan altas cantidades cerebrales de esta proteína. Tanto las neuronas (Fishman *et al.* 1990, Granda *et al.* 2003) como los astrocitos (Juurink & Devon 1990, Taberner *et al.* 1999) son capaces de captar albúmina de forma activa. En estudios previos de nuestro laboratorio se observó que la albúmina era internalizada por los astrocitos, en un proceso altamente regulado, por endocitosis mediada por caveolas, con participación del receptor megalina (LRP2) (Bento-Abreu *et al.* 2008, Bento-Abreu *et al.* 2009).

La albúmina tiene un papel regulador de la proliferación en astrocitos y controla los niveles intracelulares de calcio (Nadal *et al.* 1995). Así mismo, de su internalización depende la síntesis y liberación del factor neurotrófico ácido oleico por parte de los astrocitos (Taberner *et al.* 2002b, Bento-Abreu *et al.* 2009). Además, en ausencia de factores neurotróficos exógenos, la albúmina es capaz de inhibir *in vitro* la muerte por apoptosis, en un proceso mediado por el glutamato, permitiendo a las neuronas en cultivo mantener su programa de diferenciación (Taberner *et al.* 2002a). También parece regular el metabolismo de las células cerebrales (Vicario & Medina 1992, Tildon *et al.* 1993).

En determinadas condiciones patológicas la barrera hematoencefálica se ve alterada, favoreciéndose el paso inespecífico de componentes de la sangre, tales como la albúmina, hacia el cerebro (Weiss *et al.* 2009, Erickson & Banks 2013). Así, se ha observado que en enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson, la esclerosis múltiple o el Alzheimer, los niveles cerebrales de albúmina se encuentran aumentados con respecto a individuos sanos (Bowman *et al.* 2007).

1.4.2. Interacción albúmina- β -amiloide.

Se ha descrito que aproximadamente el 90% del β -amiloide circulante en el plasma se encuentra asociado a la albúmina (Biere *et al.* 1996), por lo que la naturaleza de la interacción albúmina- β -amiloide se ha estudiado en profundidad.

Estudios de Milojevic y colaboradores han establecido que, aunque la albúmina presenta varios sitios de unión a β -amiloide, la estequiometría de la interacción es 1:1 (Milojevic & Melacini 2011). Además, la albúmina no sólo se une al β -amiloide, sino que con ello impide su agregación en estructuras de mayor orden (Milojevic *et al.* 2009). Es importante señalar que estos procesos ocurren no sólo en el plasma, sino también a nivel cerebral, aunque la concentración de albúmina en el líquido cefalorraquídeo sea mucho menor que en el plasma (Stanyon & Viles 2012). Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio (Vega *et al.* 2009) han demostrado que la albúmina sérica es capaz de unirse al A β 25-35 y disminuir así de manera altamente significativa la mortalidad neuronal provocada por la presencia del mismo.

1.4.3. La albúmina en la enfermedad de Alzheimer.

Como ya hemos comentado, en la enfermedad de Alzheimer los niveles cerebrales de albúmina se encuentran incrementados, ya sea debido a defectos en la barrera hematoencefálica (Erickson & Banks 2013), ya a la estimulación de su producción en las células gliales ejercida por el β -amiloide (Ahn *et al.* 2008).

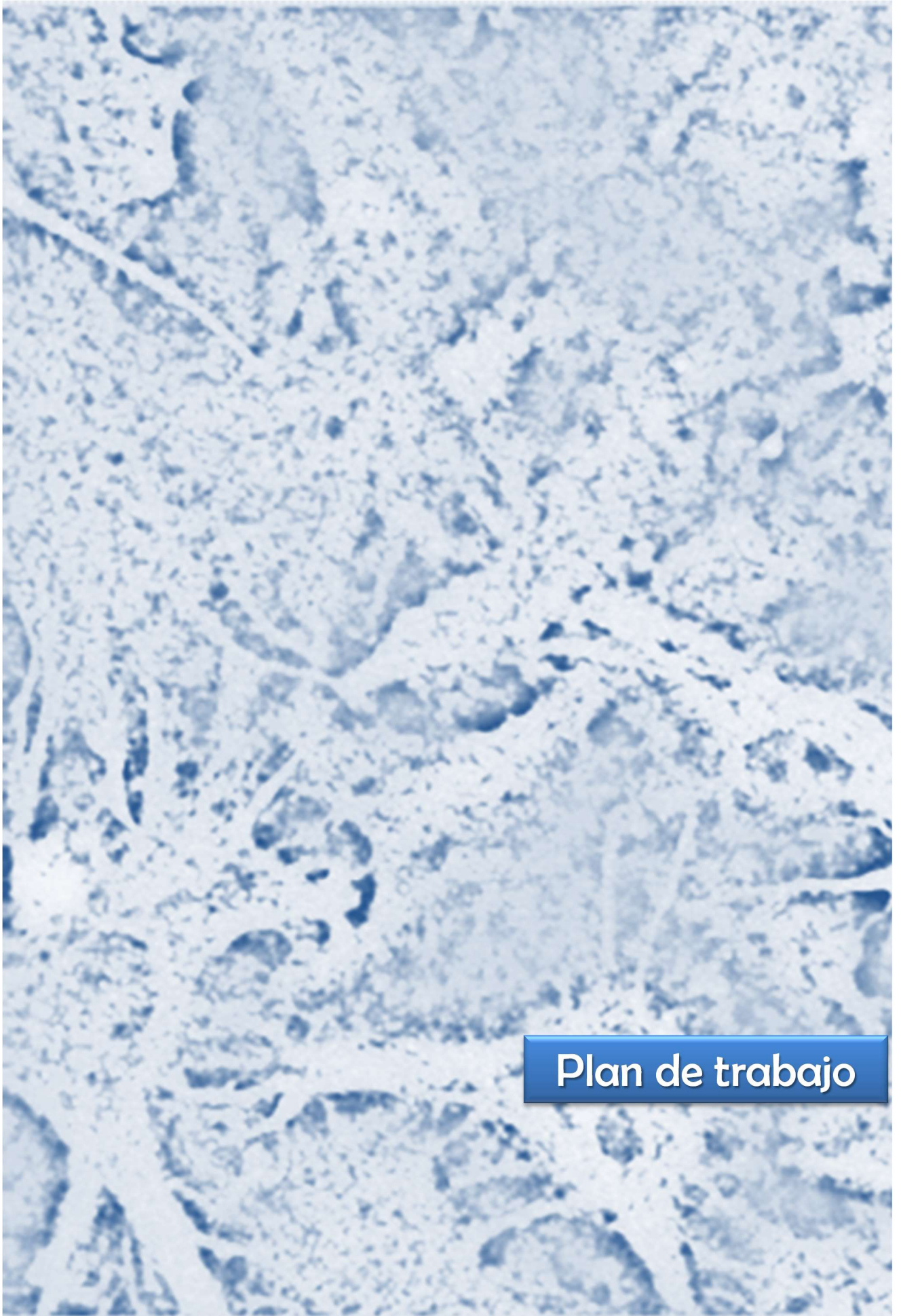
Además, existen estudios que demuestran una relación directa entre deterioro cognitivo y bajas concentraciones de albúmina plasmática (Llewellyn *et al.* 2010) y se han detectado niveles inferiores de albúmina sérica en enfermos de Alzheimer con respecto a individuos sanos (Kim *et al.* 2006).

En base a todos estos datos, y teniendo en cuenta la “hipótesis del sumidero periférico” tratada con anterioridad (véase apartado 1.2.3. Aclaramiento de tau y β -amiloide), se ha propuesto emplear la albúmina como agente atenuador de la enfermedad de Alzheimer. De hecho, está en marcha un ensayo clínico en el que el plasma de enfermos de Alzheimer es reemplazado por albúmina terapéutica (Albutein®), para alterar así el equilibrio dinámico entre el β -amiloide en plasma y el β -amiloide en el líquido cefalorraquídeo. Al reducir el contenido plasmático de β -amiloide, se favorece una mayor liberación de β -amiloide desde el líquido cefalorraquídeo, lo que tiene como consecuencia la disminución del contenido cerebral del péptido y, con ello, la reducción de sus efectos tóxicos (Boada *et al.* 2009). Esta estrategia se basa, por tanto, en facilitar y favorecer el aclaramiento del β -amiloide cerebral.

En un primer estudio piloto se obtuvieron resultados esperanzadores. Así, los primeros resultados mostraron una movilización del β -amiloide cerebral y una mejora en la puntuación de diferentes test cognitivos (MMSE: “Mini-Mental Status Examination”, ADAS-cog examination: “Alzheimer’s Disease Assessment Scale, cognitive subscale examination”). La estrategia empleada fue la plasmaféresis con recambio plasmático. Es decir, de la sangre extraída de los pacientes se separaron los elementos formes, que fueron devueltos al paciente, mientras que el plasma, cargado de β -amiloide, fue repuesto con albúmina terapéutica libre de péptido (Costa *et al.* 2012).

Estos primeros resultados tan prometedores han permitido ampliar el estudio y poner en marcha el proyecto AMBAR, que se ha diseñado como multicéntrico, aleatorizado y controlado con grupos paralelos para evaluar los cambios cognitivos, funcionales y conductuales en pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadios leve-moderados. En este proyecto participan casi 400 pacientes procedentes de

centros de España y Estados Unidos. Además, se estudiarán los cambios de concentración de β -amiloide, niveles de A β 40 y A β 42 en plasma y en líquido cefalorraquídeo y niveles de tau. Asimismo, se evaluarán los cambios estructurales en volumen de diferentes regiones cerebrales importantes en el progreso de la enfermedad, así como los cambios funcionales en las mismas (Boada *et al.* 2014). Los resultados conocidos hasta la fecha son muy prometedores y parecen indicar que esta aproximación terapéutica es capaz de ralentizar de forma significativa el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer, aunque las conclusiones finales del mismo no se obtendrán hasta 2017.

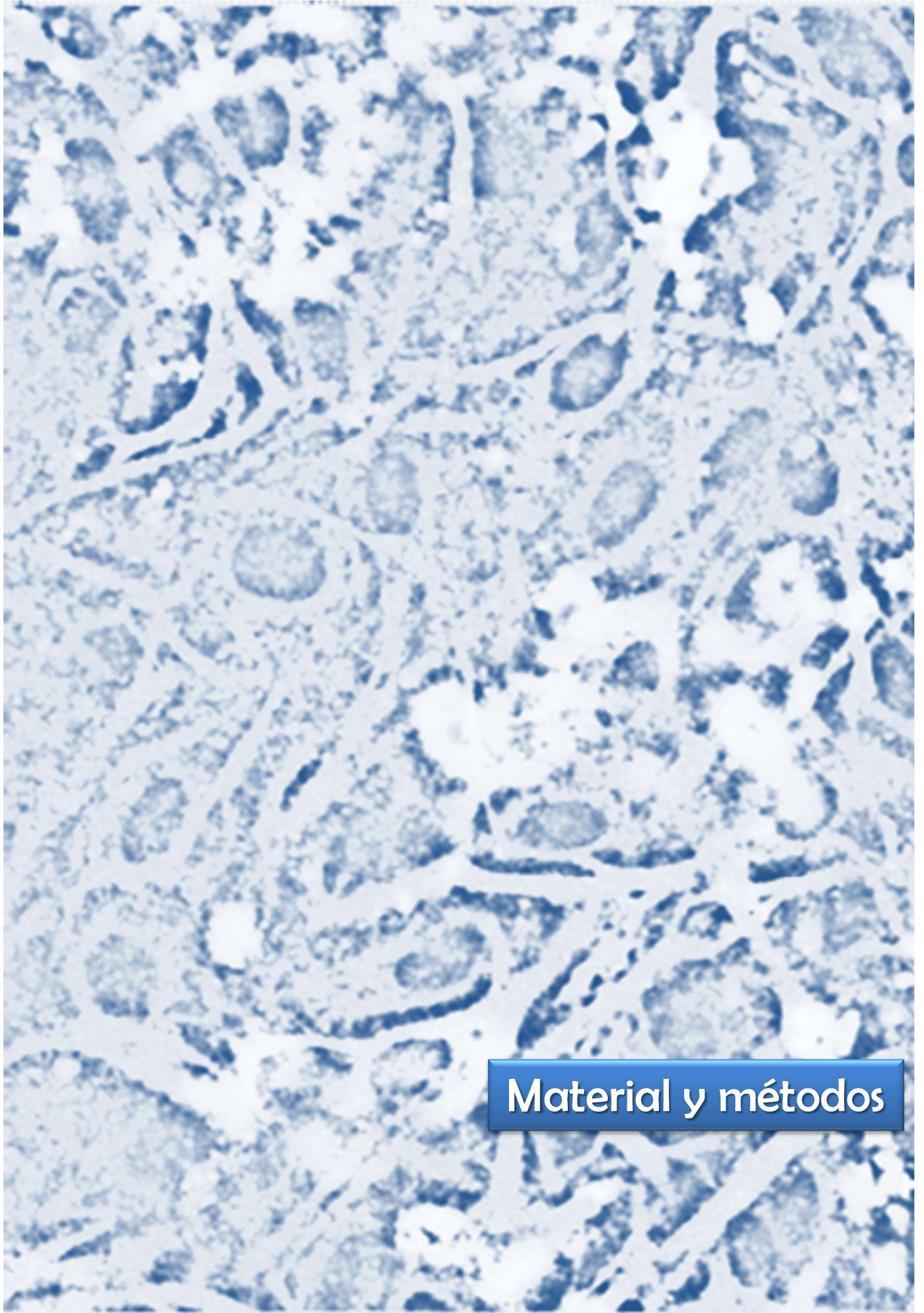


Plan de trabajo

2. Plan de trabajo.

De acuerdo con lo expresado en la introducción, nuestro plan de trabajo quedó establecido como sigue:

1. Efecto de los β -amiloides en neuronas en cultivo primario.
2. Efecto de los β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.
3. Estudio del posible papel protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos de los β -amiloides en neuronas y astrocitos.



Material y métodos

3. Material y métodos.

3.1. Material.

3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se emplearon ratas albinas Wistar, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA).

Los animales se criaron en jaulas manteniendo el número de ejemplares adecuado a las dimensiones de las mismas. Se emplearon ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La humedad osciló entre el 45 y el 65% y la temperatura se mantuvo entre los 20 y los 25°C. Los animales se alimentaron con una dieta sólida estándar (17% proteínas; 3% lípidos; 58,7% glúcidos; 4,3% celulosa; 5% sales minerales y 12% humedad). En todo momento los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y a la comida.

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas se emplearon fetos de 17,5 días de gestación (E17,5), mientras que para la obtención de los cultivos de astrocitos se utilizaron neonatos de un día de vida (P1). Los fetos E17,5 fueron obtenidos tras dislocación cervical de la madre. En todos los casos, los sacrificios de los animales fueron realizados siguiendo las normativas vigentes para la experimentación y el sacrificio de animales, según las directrices europeas (Convenio 123, Decisión 1999/575/CE , Directiva 2003/65/CE y Directiva 2010/63/UE), la legislación española (Ley 32/2007, Ley 6/2013, Real Decreto 1201/2005 y Real Decreto 53/2013) y de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Decreto 266/1998); así como los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

3.1.2. Medios instrumentales.

El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo *Milli-Q^R Integral 3 System* (Millipore Ibérica, Madrid, España), con dispensadores y filtros de agua *Ellix* (agua purificada tipo II) y agua *Milli-Q* (agua ultrapura tipo I).

Las pesadas se realizaron en balanzas analíticas Acculab, modelo *Atilon ATL-224-I* y Sartorius, modelo *1207 MP* (Göttingen, Alemania).

El pH se determinó con un medidor de protones HACH, modelo *HQ440d multi* (HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, Alemania).

Las centrifugaciones se realizaron centrífugas Eppendorf, modelos *miniSpin, 5414R, 5702* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Las cabinas de flujo laminar utilizadas fueron una modelo *TC 48* (Gelaire Flow Laboratories, McLean, U.S.A) y una modelo *CULTair BC100* (Cultek, S.L.U., Madrid, España).

Los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 μm de tamaño de poro, modelo *595-4520*, de la casa Nalgene (adquiridos a VWR, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España). Para volúmenes pequeños de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 μm de diámetro de poro (Acrodisc, Pall Gelman Laboratory, Michigan, EE.UU).

Los medios de cultivo y soluciones de cultivo fueron calentados en baños termostatzados a 37°C; modelos *Precistern* y *Precisdig* (Selecta). Para otras aplicaciones a diversas temperaturas, se ha utilizado un baño modelo *Haake Fisons GH* con termostato acoplado, un baño modelo *Haake Fisons D8* (Haake, Berlín, Alemania) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).

El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa marca Selecta (modelo *S-20*), termostatzada a 170°C.

El agua y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterilizaron por medio de calor húmedo en autoclaves Selecta modelos *437* o *Autester ST*.

Los cultivos primarios se realizaron empleando material estéril y fabricado específicamente a tal fin. Las neuronas fueron sembradas en placas Petri de 35 mm de diámetro, de la casa comercial BD Falcon, modelo *353001* (Becton & Dickinson Labware Europe, Le Pont D'Claix, Francia) o placas multipocillo *Nunc Δ Surface* (Thermo Scientific). Los astrocitos se sembraron siempre en placas Nunc, de diferentes

tipos, y en insertos suministrados por Merck Millipore en el caso de los cultivos proximales (Darmstadt, Alemania).

El conteo de las células previo a la siembra en placas se realizó mediante el dispositivo automático *Countess* (Invitrogen, Life Technologies), en el que han adaptado distintos protocolos para el diámetro y forma celular tanto de las neuronas como de los astrocitos.

Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y con flujo constante de CO₂ al 5%, en los incubadores automáticos de CO₂ modelos *Galaxy S* y *Galaxy 170* (RS Biotech, Northants, Reino Unido).

Se utilizaron botellas de dióxido de carbono suministradas por Air Liquide (Valladolid, España).

Para la realización de las agitaciones mecánicas, se emplearon dispositivos tipo vórtex, modelos *MS-1 minishaker* (IKA-Works Inc., EE.UU) y *Fine Vortex* (FINEPCR, Corea del Sur).

La observación periódica de las células se realizó mediante un microscopio de contraste de fases modelo *Nikon TS100* (Nikon, China). Además, se empleó un microscopio de fluorescencia invertido modelo *Nikon Eclipse TS2000*, captándose las imágenes con un programa informático *TCS-SP* (Leica Microscopy Systems) y una cámara de vídeo digital modelo *Leica DC 350F* (Leica Microsystems).

Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio láser confocal modelo *Leica DM-IRE2* (Leica Microscopy Systems), propiedad del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL/Universidad de Salamanca). Las imágenes se analizaron empleando el programa informático de análisis *LCS Lite Leica*.

Se utilizó un espectrofluorímetro, modelo *Appliskan 2001* (Thermo Scientific), en el que se utilizaron placas multipocillo de 12 o 96 pocillos, de la casa comercial Nunc (Nuclon, Roskilde, Dinamarca).

Se empleó un espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific) para la cuantificación de pequeños volúmenes. También se utilizó un fluorímetro modelo

Qubit Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) para la cuantificación de proteínas. En este caso, se usaron tubos de 0,5 mL, específicos para este dispositivo (*Qubit assay tubes*) proporcionados por la misma casa comercial.

Para sonicar las muestras de proteínas se empleó un baño de sonicación modelo *Bandelin Sonorex* (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, Alemania).

Para los ensayos de *Western-blot*, se utilizó un sistema de electroforesis vertical modelo *X-Cell4 Surelock Midi-Cell* de Invitrogen, conectado a una fuente de alimentación modelo *EPS 301* de Amersham Biosciences (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

La transferencia de los geles fue realizada en el dispositivo *iBlot* (Invitrogen, Life Technologies), utilizando *iBlot gel Transfer Stacks* con membranas de nitrocelulosa, procedentes de la misma casa comercial.

Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un agitador rotatorio modelo *Navigator 129* (BioComp, Fredericton, Canadá).

El análisis de imágenes se llevó a cabo mediante el programa *ImageJ* (NIH Image), desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación del *National Institute of Health* (Bethesda, EE.UU.).

3.1.3. Productos.

Los productos utilizados en la preparación de disoluciones y tampones que no se detallan a continuación, fueron adquiridos en las casas comerciales Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España), Panreac Química (Barcelona, España) o Merck (Darmstadt, Alemania).

3.1.3.1. Productos utilizados para en la preparación y mantenimiento de los cultivos celulares primarios.

El medio de cultivo para el crecimiento de las neuronas y los astrocitos es del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), y es de la casa Sigma (D5523). El suero fetal bovino (FBS) y la tripsina-EDTA proceden de la casa comercial Gibco (Life Technologies).

La DNasa I y la albúmina bovina (Fracción V), que se utilizaron en la realización de los cultivos celulares fueron suministrados por Roche Diagnostics SL (Barcelona, España), mientras que la tripsina procedía de Sigma (T4799).

La poli-L-lisina (P1524), utilizada para recubrir el fondo de las placas de cultivo, con objeto de facilitar la fijación de las células, así como la citosina- β -arabinofuranósido (C6645), y los antibióticos penicilina G (P3032), estreptomicina (S9137) y anfotericina (A9528), provienen de la casa Sigma.

3.1.3.2. Productos utilizados en los tratamientos celulares.

Los β -amiloides empleados provenían de la casa comercial BACHEM (Bubendorf, Suiza), y fueron suministrados por Cymit Química S.L. (Barcelona, España); y sus referencias son: A β 25-35, H-1192.0005; A β 40, H-1194.0005; A β 42, H-1368.5000.

Se utilizó Albúmina Humana Grifols® al 20% (670612), proporcionada por Grifols (Barcelona, España).

En los estudios de la endocitosis de los β -amiloides en astrocitos se emplearon clorpromazina (C8138), metil- β -ciclodextrina (C4555), PAO (P3075) y genisteína (G6649), todos de la casa comercial Sigma.

Productos utilizados para la preparación de la albúmina sérica.

La membrana utilizada para dializar la albúmina fue adquirida en Sigma. De igual forma, el sulfuro sódico y el ácido sulfúrico 96% (v/v), empleados para el tratamiento previo y activación de dicha membrana, corresponden a las casas comerciales Sigma y Merck, respectivamente.

Las sales usadas para la preparación del medio Elliot + calcio, empleado en la diálisis, fueron adquiridas a Sigma o Merck. Los filtros (0,22 µm) utilizados para la purificación de la albúmina dializada son de la marca Serum Acrodisc (Pall Gelman Laboratory).

3.1.3.3. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad celular y producción de especies reactivas de oxígeno.

En la determinación de la viabilidad celular mediante el método de MTT, se empleó el reactivo de MTT, es decir, la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de la casa comercial Sigma (M-2128) y dimetilsulfóxido (DMSO), de la casa comercial Fluka (Fluka-Sigma).

El reactivo que se utilizó para la detección de especies reactivas de oxígeno fue la 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (D399), de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies).

3.1.3.4. Productos utilizados para el análisis de proteínas.

La inhibición de proteasas durante la recogida de las proteínas se consiguió con una mezcla de inhibidores sin EDTA (*Protease Inhibitor Cocktail Set III*), de la casa Calbiochem (Calbiochem-Merck, EE.UU.), a la que se añadió PMSF y ortovanadato, procedentes de la casa Sigma. El fluoruro sódico provino de la casa Panreac.

La cuantificación de proteínas se realizó con el fluorímetro *Qubit* y se emplearon los kits comerciales suministrados por la casa comercial Invitrogen (Life Technologies).

Para los ensayos de *Western blot*, se utilizaron geles comerciales preparados "precast", *NuPage® Novex 8% y 10% Bis-Tris Midi-Gel*, de Invitrogen; empleándose la solución de electroforesis MOPS-SDS y las membranas de nitrocelulosa suministradas por dicha casa comercial. El marcador de peso molecular procedía de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

En el bloqueo de los anticuerpos primarios se empleó leche en polvo desnatada *Sveltesse* (Nestlé, Barcelona, España) o desnatada Asturiana (Central Lechera Asturiana, Siero, España).

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla 1. Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón y conejo conjugados con peroxidasa de rábano (tabla 2) y el sustrato quimioluminiscente luminol, procedieron de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Texas, EE.UU.).

El revelado de las películas de autorradiografía (Fujifilm) se llevó a cabo manualmente, con líquidos de la marca Fijufilm, *X-Fix-Fixer & Replenisher* y *Anatomix Developer Replenisher* (FujiHunt-Fujifilm, Europe WV, Bélgica).

El paraformaldehído y el metanol utilizado para fijar las células procedía de la casa Merck. El Triton X-100 para la permeabilización de las células fue suministrado por la casa Sigma. Los anticuerpos primarios empleados en los estudios de inmunocitoquímica se recogen en la tabla 3, y los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos en la tabla 4. El marcador fluorescente de DNA 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), el marcador de ácidos nucleicos *TO-PRO[®]-3* y el marcador mitocondrial fluorescente *MitoTracker[®] Red*, procedían de la casa comercial Invitrogen. El medio de montaje y conservador de la fluorescencia para las observaciones al microscopio fue *SlowFade Gold Antifade Reagent* (Invitrogen). Los portaobjetos y cubreobjetos utilizados para el montaje de las inmunocitoquímicas fueron adquiridos en Thermo Scientific.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los análisis de proteínas mediante *Western blot*.

Antígeno	Especie de procedencia	Dilución	Tipo	Casa comercial	Referencia
Sinaptofisina	Ratón	1:2500	Monoclonal	Santa Cruz	SC-17750
α-tubulina	Ratón	1:2500	Monoclonal	Sigma	T9026
Clatrina	Ratón	1:1000	Monoclonal	BD Biosciences	610500

Caveolina 1	Conejo	1:1000	Policlonal	Abcam	ab2910
LRP1	Conejo	1:1000	Policlonal	Sigma	L2170
GADPH	Ratón	1:5000	Monoclonal	Ambion	AM4300

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunocitoquímica.

Antígeno	Especie de procedencia	Dilución	Tipo	Casa comercial	Referencia
Aβ 25-35	Conejo	1:200	Policlonal	LSBio	LS-C51552
Aβ 40	Conejo	1:200	Policlonal	Novus Biologicals	NBP1-44047
Aβ 42	Conejo	1:200	Policlonal	LSBio	LS-C42699
PSD-95	Ratón	1:200	Monoclonal	ThermoScientific	MA1-045
Sinaptotagmina	Conejo	1:200	Policlonal	Synaptic Systems	105002
Albúmina	Ratón	1:200	Monoclonal	Sigma	B2901
Glut3	Conejo	1:200	Policlonal	Novus Biologicals	NB100-91224
APP	Ratón	1:500	Monoclonal	Sigma	A8354
GFAP	Ratón	1:200	Monoclonal	Sigma	G3893

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en los análisis de proteínas mediante *Western blot*.

Especie que reconoce	Especie de procedencia	Dilución	Casa comercial	Referencia
Ratón	Cabra	1:5000	Santa Cruz	SC-2005
Conejo	Cabra	1:10000	Santa Cruz	SC-2030

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunocitoquímica.

Especie que reconoce	Especie de procedencia	Dilución	Fluoróforo	Casa comercial	Referencia
Conejo	Cabra	1:1000	Alexa Fluor® 594	Invitrogen	A11012
Ratón	Cabra	1:1000	Alexa Fluor® 594	Invitrogen	55381A
Conejo	Cabra	1:1000	AlexaFluor® 488	Invitrogen	A11034
Ratón	Cabra	1:1000	AlexaFluor® 488	Invitrogen	A11029
Conejo	Cabra	1:1000	AlexaFluor® 647	Invitrogen	A21244
Ratón	Cabra	1:1000	AlexaFluor® 647	Invitrogen	A21235

3.1.3.5. Productos empleados para el silenciamiento génico.

El reactivo de transfección *Lipofectamina 2000*® y el medio de transfección *Opti-MEM*®, fueron suministrados por Invitrogen y empleados según sus indicaciones.

Los RNAs de interferencia de cadena corta (*small interfering RNA* o siRNA) fueron adquiridos en Bionova (Bionova Científica S.L., Madrid, España), y sus secuencias se resumen en la tabla 5. El siRNA sin diana (non target-siRNA o NT-siRNA), utilizado como control negativo de la transfección se obtuvo de la casa comercial Ambion (Life Technologies).

Tabla 5. Secuencia de nucleótidos de los siRNA.

Gen diana	Cadena sentido (5'→3')	Cadena antisentido (5'→3')
Clatrina	GCAAAGUGAUUGCACUGAAtt	UUCAGUGCAAUCACUUUGCtg
Caveolina-1	GGGACACACAGUUUCGACGtt	CGUCGAAACUGUGUGUCCctt
LRP1	UGAUCUUGAUGAUGACUGUtt	ACAGUCAUCAUCAAGAUCAtt

3.2. Métodos.

3.2.1. Preparación de los cultivos celulares.

3.2.1.1. Composición de las disoluciones.

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con H₂O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2, excepto en los casos en que se indique otro pH, y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

Medio de cultivo

DMEM + FBS 10% (v/v)

Penicilina G 50 U/mL

Estreptomicina 37,5 U/mL

Anfotericina B 0,23 µg/mL

Solución de Earle (EBSS)

NaCl	116 mM
KCl	5,4 mM
NaH ₂ PO ₄	1,0 mM
MgSO ₄	1,5 mM
NaHCO ₃	26 mM
Rojo fenol	10 mg/L
D-glucosa	15 mM

Solución de disgregación (solución A)

Albúmina (Fracción V)	3 µg/mL
DNAsa tipo I	20 µg/mL
EBSS	50 mL

Solución de tripsinización (solución B)

Tripsina	0,25 µg/mL
DNAsa tipo I	60 µg/mL
Albúmina (Fracción V)	3 µg/mL
EBSS	20 mL

Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	7,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM
Penicilina G	50 U/mL

Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL

Tampón Elliot, en tampón fosfato sódico 10,8 mM, pH 7,6

NaCl	122 mM
KCl	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,3 mM

Medio Hanks, pH 7,4

NaCl	134,2 mM
KCl	5,26 mM
KH ₂ PO ₄	0,43 mM
NaHCO ₃	4,09 mM
Na ₂ HPO ₄	0,33 mM
Glucosa	10,0 mM
Hepes	10,0 mM
CaCl ₂	2,0 mM

3.2.1.2. Preparación del cultivo primario de neuronas.

Los cultivos de neuronas se realizaron según el método previamente descrito por Taberero y col. (Taberero *et al.* 1993). Se emplearon fetos de rata Wistar, de 17,5 días de edad gestacional (E17,5). Los animales se obtuvieron por rápida histerectomía tras la dislocación cervical de la madre. Se limpiaron rápidamente y se les cortó el cordón umbilical, colocándose en una placa Petri con solución salina a 4°C.

El resto del proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización que se llevó a cabo a 37°C.

Tras limpiar los fetos con etanol al 70%, se decapitaron y se les extrajo el cerebro, del que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles, depositando únicamente los hemisferios cerebrales en una placa Petri que contenía solución A. Este tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 4 minutos a 500 x *g*. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C en solución de tripsinización (solución B). Posteriormente, se detuvo la tripsinización añadiendo al tejido disgregado DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v). Finalizada la tripsinización, el tejido fue centrifugado durante 5 minutos a 500 x *g*. Tras retirar el sobrenadante, el tejido fue resuspendido en la solución A y, tras hacerlo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada, se dejó decantar durante 4 minutos. Se recogió el sobrenadante, y el tejido fue sometido dos veces más al tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x *g* durante 5 minutos. Las neuronas obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM + FBS 10%).

Una pequeña alícuota de la suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,4% (p/v) para la determinación tanto de la viabilidad celular como del número de células en la suspensión, mediante el contador automático *Countess*, en el que se adaptó un protocolo con el diámetro y forma celular de las neuronas.

A continuación, las células se sembraron en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina (1 µg/cm²) en medio de cultivo (DMEM + FBS 10%), a una densidad de 1,0 x 10⁵ células/cm² o ligeramente menor 0,7 x 10⁵ células/cm², para experimentos de inmunocitoquímica. Las neuronas se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂. En estas condiciones se obtienen cultivos de neuronas de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico contra el neurofilamento (Vicario *et al.* 1993).

3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de astrocitos.

Los cultivos de astrocitos se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero *et al.* 1993). Se emplearon neonatos de rata de 1 día

de vida postnatal. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización, que se llevó a cabo a 37°C.

Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y se extrajeron los cerebros, de los que se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Los cerebros se colocaron en una placa Petri que contenía solución A. El tejido se disgregó utilizando un bisturí y se centrifugó durante 2 minutos a 500 x *g*. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C, en solución B. Posteriormente, se detuvo la tripsinización añadiendo al tejido disgregado medio de cultivo (DMEM + FBS 10%). Finalizada la tripsinización, se centrifugó el tejido durante 5 minutos a 500 x *g*, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el tejido en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se recogió el sobrenadante y se repitió dos veces más el tratamiento anterior. Se reunieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 500 x *g* durante 5 minutos. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo.

Una pequeña alícuota de esta suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,4% (v/v), para la determinación de la viabilidad celular y del número de células en el *Countess*, mediante un protocolo específico. A continuación, se sembraron las células en medio de cultivo (DMEM + FBS 10%), en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina (1 µg/cm²), a una densidad de 1,0 x 10⁵ células/cm² y se colocaron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂. Al tercer día se añadió citosina β-arabinofuranósido 10 µM, que se mantuvo durante 48 horas con el fin de evitar la proliferación de la microglía y de las células del linaje O-2A (Taberner *et al.* 1996). Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana con medio de cultivo. En estas condiciones, se obtienen cultivos de astrocitos de tipo-1 de una pureza del 95%, a juzgar por su reacción con el anticuerpo específico anti-GFAP (Taberner *et al.* 1996). En todos los experimentos se utilizaron astrocitos cultivados entre 18-21 días *in vitro* (DIV).

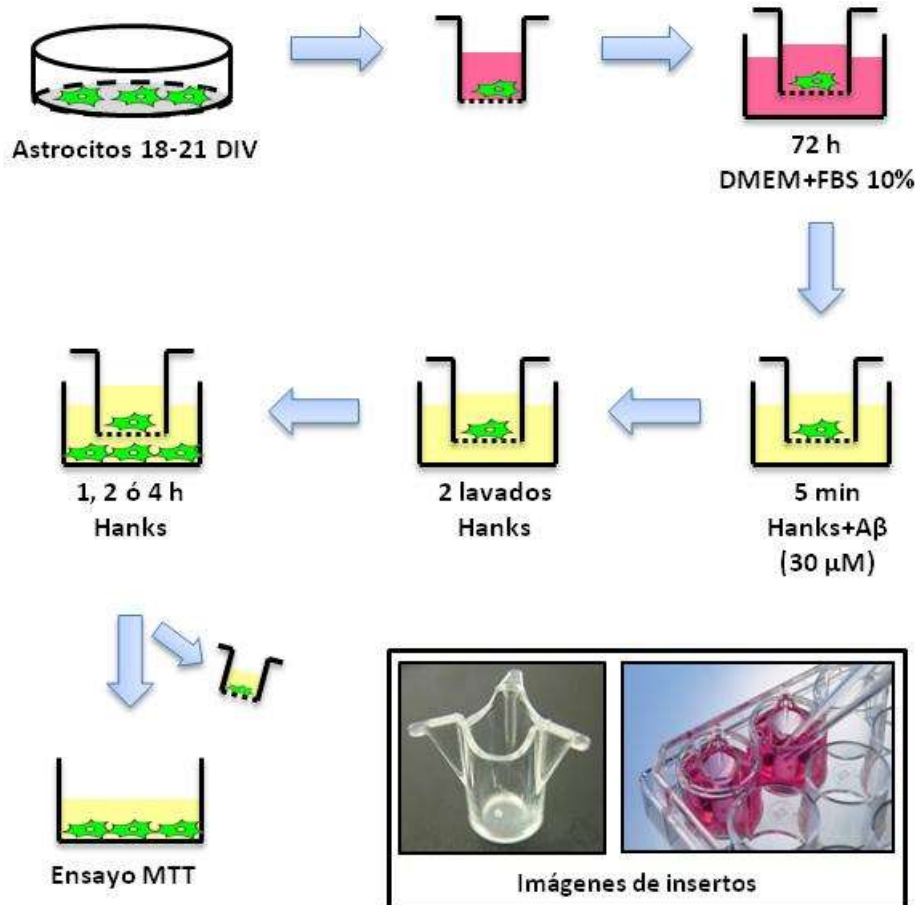
3.2.1.4. Preparación de los cultivos proximales de astrocitos.

Para el estudio de la transcitosis de los β-amiloides en astrocitos se utilizaron cultivos proximales tal y como se refleja en el esquema 7. Para su preparación, se

emplearon astrocitos de 18-21 DIV, que fueron resembrados en insertos para el cultivo celular. Para ello, las células se lavaron dos veces con PBS, y se trataron con tripsina durante 5 minutos a 37°C. Tras parar la tripsinización con medio de cultivo, se centrifugaron las células durante 5 minutos a 500 x *g*, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los astrocitos en medio de cultivo. Se determinó la densidad celular utilizando el contador automático *Countess* y, a continuación, se sembraron 75.000 células/200 µl de medio en cada inserto, añadiéndose otros 400 µl de DMEM + FBS 10% en el pocillo de la placa. Los astrocitos se mantuvieron en estas condiciones durante 72 horas en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂.

Los insertos escogidos para estos experimentos fueron suministrados por Merck Millipore (PIRP12R48), y poseen una membrana de PET, de 1,0 µm de tamaño de poro, que permite el intercambio de sustancias entre los dos compartimentos pero no el paso de las células.

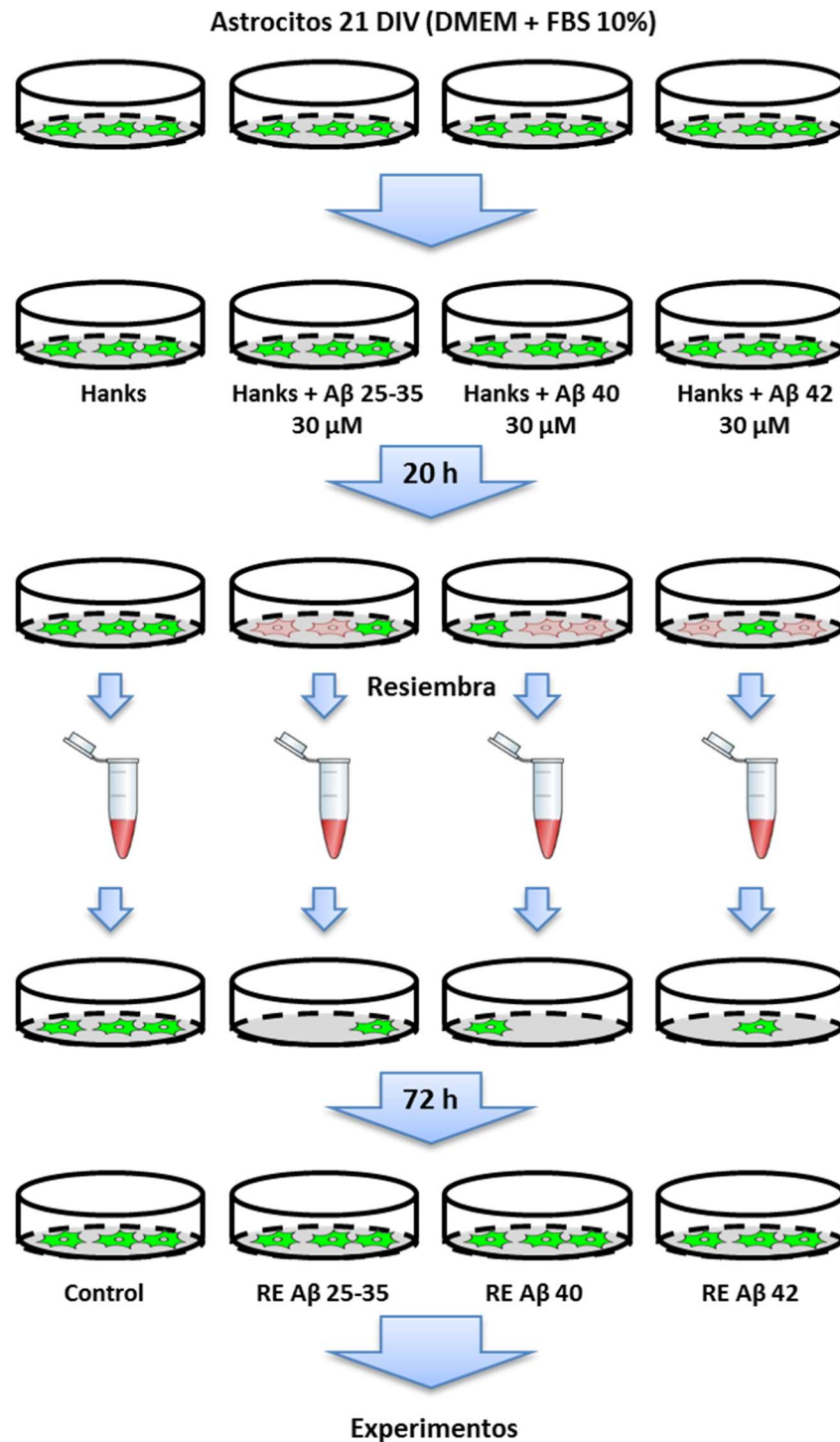
Transcurridas las 72 horas, los astrocitos en los insertos fueron incubados durante 5 minutos en medio Hanks en presencia de los diferentes β-amiloides (30 µM). Tras esta exposición a los péptidos, se lavaron dos veces con medio fresco y se pusieron en contacto con astrocitos procedentes del mismo cultivo primario sembrados en placas, y que no habían entrado en contacto con los β-amiloides. Se mantuvieron estos cultivos proximales durante 1, 2 ó 4 horas, tras las cuales se procedió a valorar la viabilidad celular de los astrocitos sembrados en las placas.



Esquema 7. Preparación de los cultivos proximales de astrocitos.

3.2.1.5. Preparación de los cultivos de astrocitos resistentes.

Para el estudio de la resistencia de los astrocitos a los β -amiloides, se empleó el protocolo reflejado en el esquema 8. Astrocitos de 21 DIV, cultivados en DMEM + FBS 10%, fueron incubados durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia de los tres péptidos β -amiloides (30 μ M). Transcurrido este tiempo, las células supervivientes fueron resembradas, manteniendo cada condición por separado.



Esquema 8. Preparación de los cultivos de astrocitos resistentes.

Para ello, se lavaron los astrocitos dos veces con PBS, y se trataron con tripsina durante 5 minutos a 37°C. Tras parar la tripsinización con medio de cultivo, se centrifugaron las células durante 5 minutos a 500 x *g*. Se retiró el sobrenadante y se

resuspendieron las células en un volumen apropiado de medio de cultivo. Así, obtuvimos cuatro poblaciones diferentes de astrocitos: los astrocitos control, que habiendo sido sometidos a todos los procesos no habían entrado en contacto con los péptidos; astrocitos resistentes a A β 25-35 (RE A β 25-35); astrocitos resistentes a A β 40 (RE A β 40) y astrocitos resistentes a A β 42 (RE A β 42).

Una vez sembradas las células, se permitió que proliferaran y cubrieran la placa durante 72 horas en DMEM + FBS 10% en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂. A las 72 horas se procedió a realizar los diferentes estudios de conteo de células, resistencia cruzada y producción de radicales libres de oxígeno.

3.2.2. Tratamientos celulares.

3.2.2.1. Preparación de los β -amiloides.

Los β -amiloides empleados fueron suministrados liofilizados, por lo que para su uso fueron en primer lugar disueltos en agua ultrapura estéril, para alcanzar una concentración de stock de 1 mM. Para conseguir una disolución completa del A β 42, fue necesario añadir 2-3 gotas de NaOH 20% durante el proceso, lo cual se comprobó que no interfería en tratamientos posteriores en las células. Un vez disueltos, se alicuotaron y almacenaron a -20°C.

3.2.2.2. Preparación de la albúmina sérica humana.

La albúmina empleada en los experimentos descritos a lo largo de esta tesis doctoral fue albúmina sérica humana Grifols, previamente dializada en tampón Elliot.

Para el tratamiento de la membrana de diálisis se siguieron las instrucciones del fabricante, tratando con bases y ácidos, y terminando con un aclarado de la membrana con agua ultrapura durante 15 minutos.

Se preparó una disolución de HSA 1 mM en la solución de Elliot con calcio, a partir del stock al 20% (p/v), y se dializó durante 24 horas con tres cambios de la solución. Después de la diálisis, se filtró la HSA y se almacenó a 4°C.

3.2.2.3. Preparación de los complejos HSA-A β .

Para la obtención de los complejos albúmina- β -amiloide, los péptidos liofilizados fueron directamente disueltos en HSA dializada 1 mM, para alcanzar una concentración stock 1 mM. Del mismo modo que al disolver en agua ultrapura, para la completa disolución del A β 42 fue necesaria la adición de 2-3 gotas de NaOH al 20%. Una vez formados los complejos, se almacenaron a 4°C.

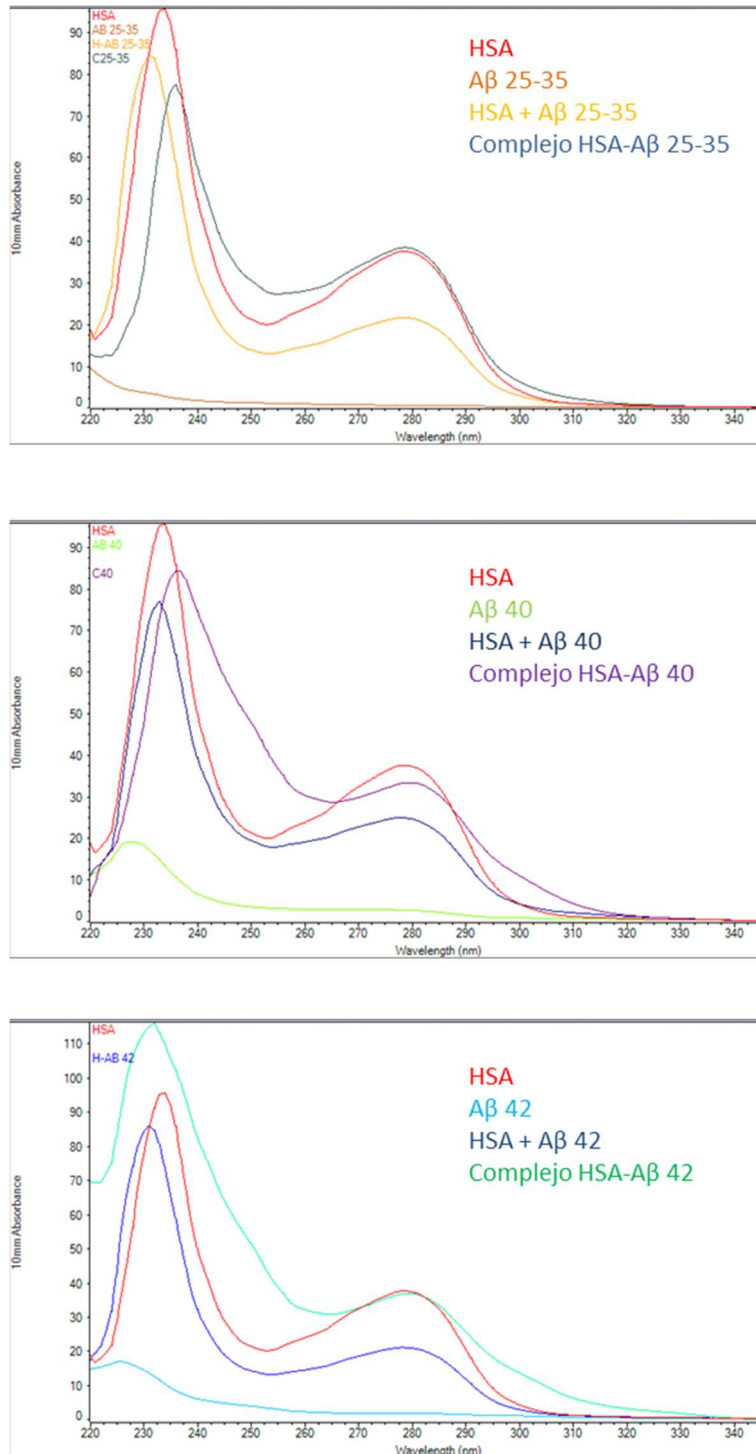
Quisimos comprobar si la formación de los complejos daba efectivamente lugar a estructuras diferentes a la suma de sus componentes. Para ello evaluamos los espectros de absorbancia de nuestros diferentes tratamientos: HSA, A β , HSA+A β y complejos HSA-A β . Los resultados obtenidos se muestran en el esquema 9.

3.2.2.4. Otros tratamientos.

En los estudios de endocitosis, se emplearon astrocitos incubados entre 18-21 DIV en DMEM + FBS 10%; que fueron preincubados durante 1 hora a 37°C en el caso de los tratamientos con clorpromazina (10 μ g/ml) y metil- β -ciclodextrina (25 mM), y durante 30 minutos en los tratamientos con PAO (1 μ M) y genisteína (45 μ M). Estos diferentes agentes se mantuvieron en la misma concentración durante el resto del experimento.

3.2.3. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT.

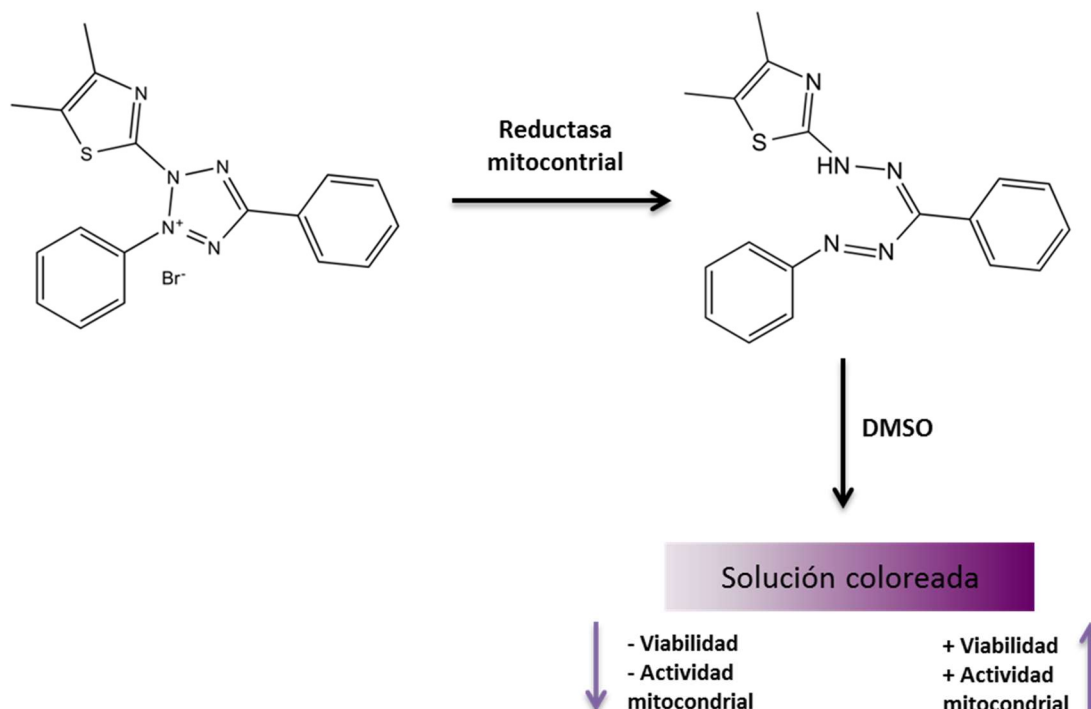
El ensayo colorimétrico con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) fue propuesto por Mosmann (Mosmann 1983) para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia, así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán, de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de dichos cristales en DMSO, se obtiene un medio de color violeta, cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo. El fundamento bioquímico se recoge en el esquema 10.



Esquema 9. Espectros de absorbancia de los diferentes tratamientos empleados.

Para determinar la viabilidad celular mediante este ensayo, las células se incubaron en 0,5 mg/ml de MTT disuelto en medio de cultivo, durante 75 minutos, en oscuridad, a 37°C y en un incubador de CO₂. Posteriormente se aspiró el medio, se añadieron 500 µl de DMSO y se dejaron las células en agitación leve y oscuridad

durante 10 minutos hasta la disolución homogénea de los cristales. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofluorímetro de placas Appliskan.

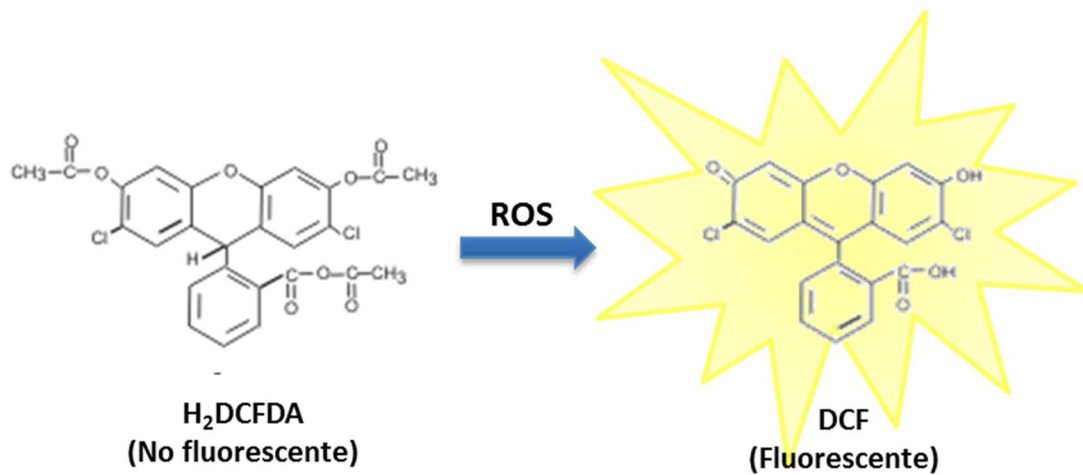


Esquema 10. Fundamento bioquímico del método de determinación de la viabilidad celular con MTT.

3.2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno mediante el ensayo fluorimétrico con DCF.

El reactivo que se utilizó para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), siguiendo el protocolo propuesto por Rosenkranz y col. (Rosenkranz *et al.* 1992). La H_2DCFDA es un compuesto reducido y no fluorescente que, por medio de esterasas intracelulares y la reacción con los radicales libres de oxígeno, pierde sus grupos acetato y se oxida a diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente cuya longitud de onda de excitación es de 492-495 nm y cuyo máximo pico de emisión es de 517-527 nm. Esta oxidación puede ser detectada siguiendo el incremento de fluorescencia con un fluorímetro, utilizando una fuente de excitación y el filtro apropiado para isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ver esquema 11).

Para tal fin, las células se incubaron en medio Hanks + H₂DCFDA (10 μM), y con los diferentes tratamientos, durante el tiempo de estudio deseado (generalmente, 20 horas). La medición de fluorescencia se realizó a 535 nm, utilizando un lector de placas acoplado a un fluorímetro Appliskan, en el momento de añadir la H₂DCFDA y tras la incubación. Para realizar los cálculos, ambas medidas de fluorescencia se restaron y se normalizaron respecto al porcentaje de viabilidad celular en cada condición. La viabilidad se determinó mediante ensayos colorimétricos con MTT, que se realizaron después del ensayo fluorimétrico.



Esquema 11. Fundamento del método de determinación de la producción de ROS mediante DCF.

3.2.5. Análisis de proteínas mediante inmunocitoquímica.

Para el análisis de proteínas mediante inmunocitoquímica, tras la incubación con los tratamientos correspondientes, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

En aquellos experimentos en los que se estudiaron las mitocondrias celulares, las neuronas fueron incubadas, de manera previa a la fijación, con el colorante fluorescente MitotrackerRed® 100 nM durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Una vez fijadas, las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron; bien con PBS + Triton X-100 al 0,25 % durante 1 hora (en la gran mayoría de los casos), bien con metanol a -20°C durante 10 minutos (en los análisis de proteínas sinápticas). A

continuación, se incubaron con el anticuerpo primario o los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados, así como sus especificaciones y las concentraciones usadas, se muestran en la tabla 3.

Tras retirar los anticuerpos primarios, se lavaron las células tres veces con PBS. Posteriormente, se incubaron con el o los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con un fluorocromo (tabla 4) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se incubaron las células durante 2 minutos con DAPI (1:5000) o durante 10 minutos con TOPRO3® (1:1000), con objeto de visualizar los núcleos. Transcurrido este tiempo y, tras varios lavados con PBS, las preparaciones se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia (*SlowFade Antifade Reagent*).

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal, obteniéndose imágenes con confocalidad en el plano. Para el análisis de las mismas, se empleó el programa Image J, que nos permitió cuantificar la fluorescencia, así como obtener los puntos de colocación de dos canales (mediante el *plug-in Colocalization*).

3.2.6. Análisis de proteínas mediante Western blot.

El análisis de la expresión de proteínas por transferencia tipo Western-blot se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

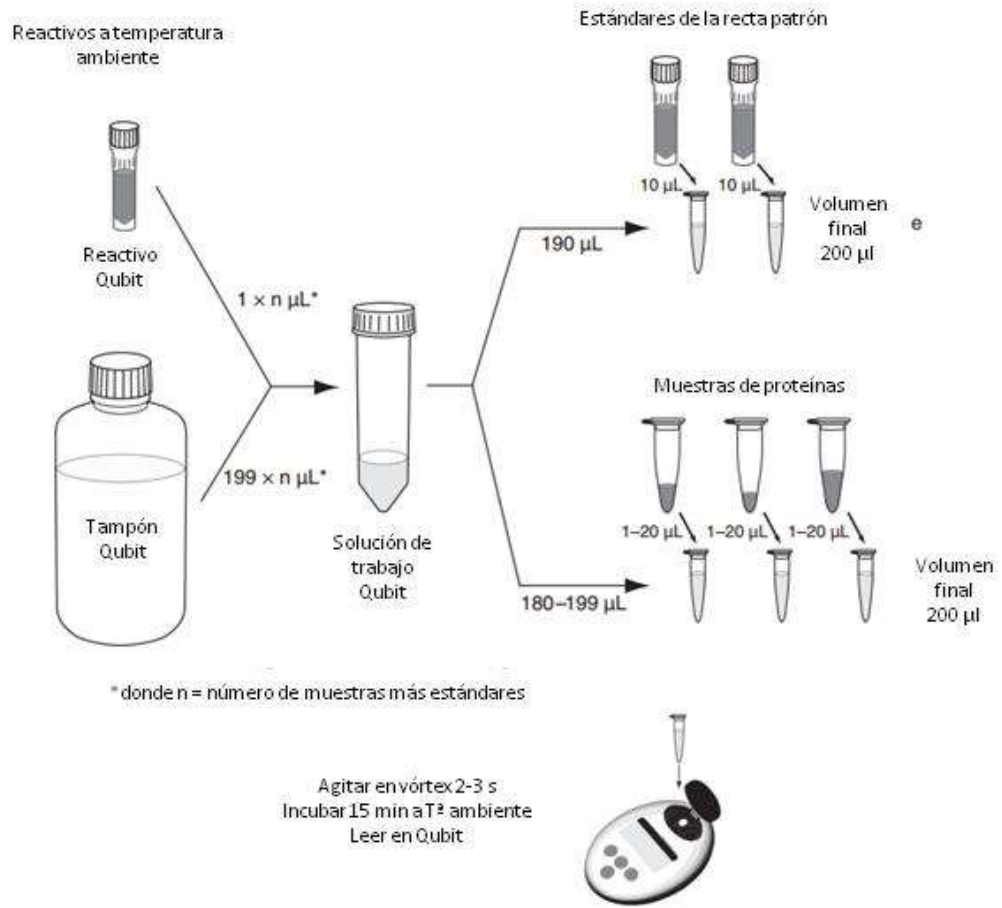
3.2.6.1. Extracción de proteínas.

Las células se lavaron dos veces, durante 5 minutos, con PBS, y se lisaron con una solución de extracción de proteínas compuesta por: Tris-HCl 5 mM (pH 6,8), SDS 2% (p/v), EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, una mezcla comercial de inhibidores de proteasas 1:100 (v/v), NaF y ortovanadato 0,1 mM. Los lisados se resuspendieron en tampón Laemmli 4X (Tris-HCl 0,18 M y pH 6,8; glicerol 5 M; SDS 3,7% (p/v); β-mercaptoetanol 0,6 M o DTT 9 mM y azul de bromofenol 0,04% (v/v)). Los lisados se calentaron durante 5 minutos a 100°C, se sonicaron 5 minutos, se centrifugaron a 14000 x g durante 15 minutos a 4°C y, por último, se almacenaron a -20°C.

3.2.6.2. Cuantificación de proteínas con el fluorímetro Qubit.

Este método se basa en la unión selectiva de proteínas a un reactivo fluorescente, incluido en el kit de determinación, sin que interfieran en la medición ácidos nucleicos o sustancias tales como el DTT o el β -mercaptoetanol. La cuantificación se realiza en un fluorímetro *Qubit* (Invitrogen), el cual ya está adaptado para el reactivo correspondiente a proteínas.

El protocolo consiste en la dilución 1:200 del reactivo fluorescente en el tampón de medida proporcionado por la casa comercial, para preparar la mezcla de trabajo. A continuación, se realiza una curva patrón con estándares de BSA, también proporcionados por la casa comercial. Por otro lado, se diluyen las muestras en la misma solución de trabajo (ver esquema 12). Antes de las mediciones, las muestras diluidas se agitan en un vórtex durante unos segundos, posteriormente, se dejan incubando en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y, por último, se mide en el fluorímetro, seleccionando la opción de análisis para proteínas. La cuantificación se realiza por extrapolación de los resultados de las muestras con la curva patrón de los estándares.



Esquema 12. Protocolo de preparación de muestras con el método Qubit.

3.2.6.3. Preparación de las muestras.

Para cada muestra se utilizaron 15-30 μg de proteínas resuspendidas en tampón Laemmli 4X. Se calentó la mezcla durante 5 minutos a 100°C para su desnaturalización y, tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo.

3.2.6.4. Electroforesis de las muestras.

Las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel comercial “precast”, incluyendo un marcador de pesos moleculares (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 KDa). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a voltaje constante (entre 80 y 120 V, dependiendo de las proteínas a separar) y durante el tiempo considerado conveniente para separar adecuadamente las proteínas de interés.

El tampón utilizado para la electroforesis fue un tampón *NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer (20X)*. Además, se añadió a la cubeta un antioxidante (2,5 µl/ml de tampón MOPS), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.6.5. Electrotransferencia.

Una vez terminada la electroforesis, el gel con las proteínas se incubó durante 20 minutos en un tampón de equilibrado, para optimizar la transferencia de proteínas de medio y alto peso molecular. El tampón de equilibrado está compuesto por la solución de transferencia *NuPAGE[®]*, a la que se ha añadido un antioxidante 1:1000 *NuPAGE[®]* y metanol 10% (v/v). Las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana está incluida en los *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose*, empleados en el *iBlot*. Se aplicó un voltaje fijo de 20 V durante 13 minutos, de manera que las proteínas van pasando a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmovilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

3.2.6.6. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana.

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo *Ponceau* 10% (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo 5% (p/v) en TTBS (Tween Tris-base 20 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5).

3.2.6.7. Inmunodetección.

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés, durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios utilizados se recogen en la tabla 1 y se prepararon en solución de anticuerpos, compuesta por FBS 10% (v/v); azida sódica 0,02% (p/v) y lisina 0,1 M en PBS 1X.

A continuación, se incubó con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón o conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de ratón se utilizó a una concentración de 1:5000 y el anticuerpo secundario contra la

inmunoglobulina de conejo se utilizó a una concentración de 1:10000, preparados en TTBS (tabla 2). En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada en una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. El revelado de las bandas detectadas por la película se realizó manualmente, con líquidos de revelado fotográfico.

Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía, mediante un escáner de doble haz y el programa informático de análisis de imagen *ImageJ*.

3.2.7. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA.

El mecanismo del RNA de interferencia (iRNA) consiste en el bloqueo de la expresión de un gen específico. Se ha observado en todos los tipos de células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Se cree que este mecanismo está implicado en la protección del genoma frente a las infecciones víricas y, además, juega un papel en la regulación de la proliferación, muerte y diferenciación.

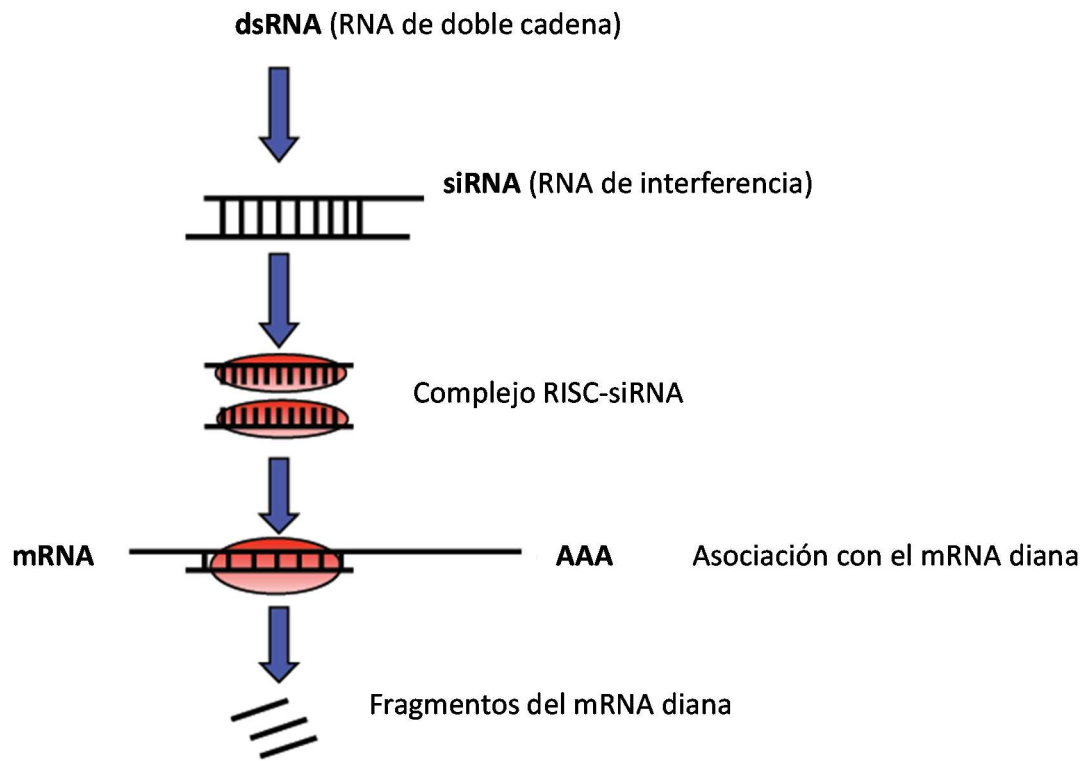
Actualmente, el iRNA es una herramienta útil para llevar a cabo el silenciamiento de un gen específico. El mecanismo de actuación del iRNA en la célula se representa en el esquema 13. En primer lugar, el RNA de doble cadena (dsRNA) es digerido por una enzima denominada *Dicer*, similar a la RNAsa III. Así se obtienen pequeños fragmentos de doble cadena de RNA, de 20-25 nucleótidos, denominados siRNA ("small interfering RNA"). Estos se ensamblan en un complejo denominado RISC ("RNA-induced silencing complex"), que contiene una endorribonucleasa, la cual separa la doble cadena de siRNA. Finalmente, la monocadena de siRNA se une a su

cadena complementaria en el mRNA de la célula y el complejo RISC digiere el mRNA diana.

Los silenciamientos de los mRNAs de clatrina, caveolina 1 y LRP1, se realizaron en astrocitos de 18-21 DIV, en medio de cultivo sin antibiótico; empleando siRNAs específicos cuya secuencia se recoge en la tabla 5.

Los siRNAs se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración inicial de 30 μ M y se diluyeron en medio comercial *Opti-MEM*[®] para una concentración final de 60 nM (Cav1 y LRP1) o 120 nM (Clt) y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Como control de las transfecciones de siRNA se utilizó una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana, designado como NT-siRNA (“non target-siRNA”). Por otro lado, se preparó 2,5 μ l/ml de *Lipofectamina 2000* disuelto en *Opti-MEM*[®], siguiendo las indicaciones del fabricante y se incubó durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron los medios que contenían el siRNA y la *Lipofectamina 2000* (1:1) y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla se añadió al cultivo celular (200 μ l/ml de volumen final).

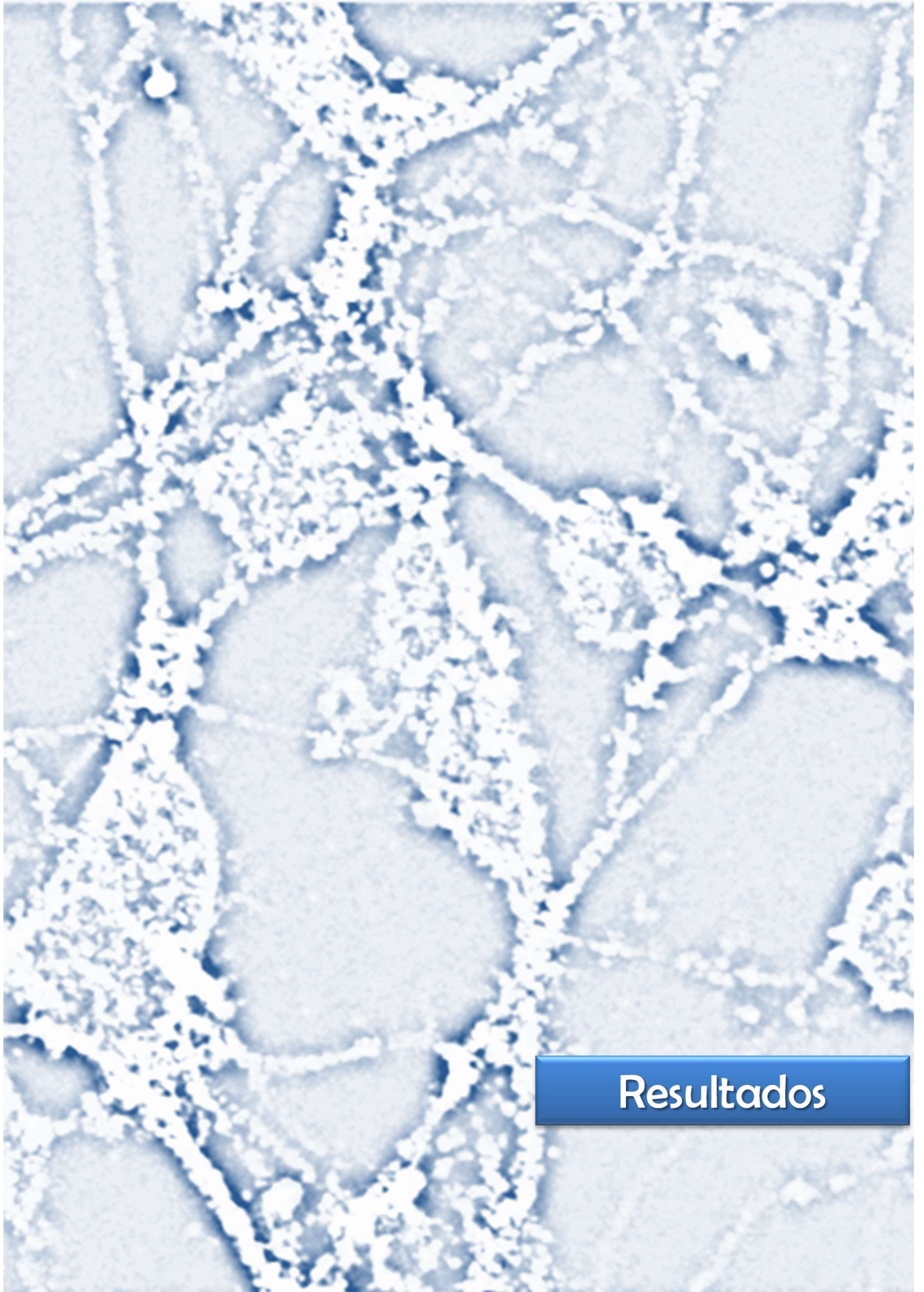
Al cabo de 12 horas de transfección, se sustituyó el medio de cultivo por medio con la mezcla de antibióticos. Las células se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂, el tiempo necesario para ser procesadas para los siguientes experimentos (24 horas en el caso del silenciamiento de clatrina, y 72 en los silenciamientos de caveolina 1 y LRP1).



Esquema 13. Fundamento del método de silenciamiento con siRNA.

3.2.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos utilizamos *Microsoft Office Excel 2010* y el programa *GraphPad Prism 5*. Todos los datos representados son medias \pm error estándar de la media (SEM) de, como mínimo, tres experimentos independientes ($n \geq 3$). Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student cuando el número de grupos o categorías fue igual a 2, o se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía cuando el número de categorías a comparar fue mayor de 2. Para determinar el nivel de significación, tras realizar un análisis de varianza, se realizó un ensayo *post-hoc*, el test Dunnett para comparar los tratamientos con respecto al control, o el test Tukey, para comparar todas las condiciones entre sí. Para todas las comparaciones consideramos las diferencias significativas cuando $p < 0,05$ (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).



Resultados

4. Resultados.

4.1. Efecto de los diferentes β -amiloides en neuronas en cultivo primario.

El primer objetivo que nos planteamos en el desarrollo del presente trabajo fue estudiar el efecto que tenían diferentes péptidos beta-amiloides sobre neuronas de rata en cultivo primario. Para ello empleamos tres péptidos distintos: beta-amiloide 25-35 (A β 25-35), beta-amiloide 40 (A β 40) y beta-amiloide 42 (A β 42); y realizamos diversos ensayos cuyos resultados se exponen a continuación.

4.1.1. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad neuronal.

Para valorar el efecto de los β -amiloides sobre las neuronas, lo primero que quisimos comprobar fue si provocaban muerte celular y, para ello, analizamos la viabilidad celular frente a diferentes concentraciones para cada uno de los tres β -amiloides. Neuronas en cultivo primario incubadas durante 3 DIV en medio DMEM + FBS 10%, fueron expuestas durante 20 horas a distintas concentraciones de β -amiloide en medio Hanks, tras lo cual se analizó su viabilidad celular mediante la técnica colorimétrica del MTT (figura 1).

Lo que observamos en estas curvas dosis-respuesta es que, mientras en presencia de A β 40 y A β 42 se alcanzan valores meseta de viabilidad en torno al 80% (por tanto, 20% de mortalidad celular), a concentraciones de aproximadamente 4 μ M, en el caso del A β 25-35 la viabilidad sigue cayendo conforme aumentamos la concentración del péptido.

Además, quisimos estudiar de forma más detallada la relación viabilidad neuronal-concentración de β -amiloide, para los primeros pares de valores. Así, realizamos una regresión lineal de los 6 primeros pares de valores representados en escala bilogarítmica (figura 1, inserto), que nos permitió obtener la pendiente (b). Este valor es una medida de la dependencia de la viabilidad con respecto a la concentración de péptido. En este sentido podemos concluir que esa dependencia es mayor en el caso del A β 42, es decir, que pequeñas variaciones en la concentración del péptido,

provocan mayores variaciones en la viabilidad que en el caso del A β 25-35 y del A β 40. Además, el hecho de que el valor b sea negativo nos confirma que la relación entre ambas variables es inversa, es decir, a mayor concentración menor viabilidad celular.

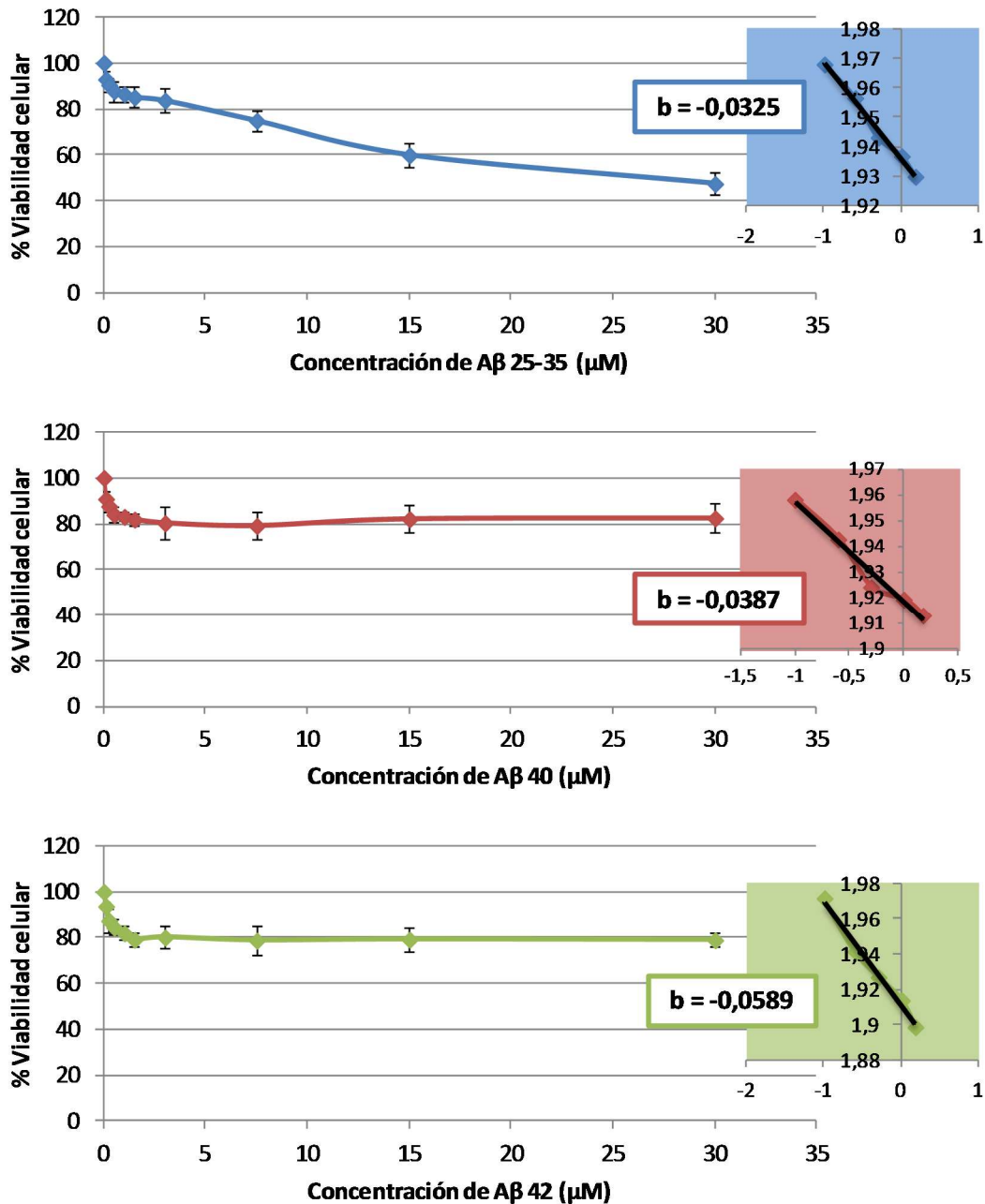


Figura 1. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular frente a los diferentes β -amiloides en neuronas en cultivo primario. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en presencia de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42 a concentraciones crecientes. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto a la viabilidad en ausencia de los péptidos y son medias \pm SEM ($n \geq 5$). El término b es la pendiente de la regresión lineal para cada péptido de los 6 primeros pares de valores representados en escala bilogarítmica.

Dado que en el caso del A β 25-35 la viabilidad sigue disminuyendo hasta la concentración de 30 μ M, decidimos tomar esta concentración como referencia y ampliar el número de datos. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 2, donde podemos comprobar que para esta concentración, la reducción en la viabilidad neuronal provocada por los tres péptidos es altamente significativa con respecto al control. Como ya mencionamos anteriormente, para 30 μ M de péptido la viabilidad de las neuronas tratadas con el A β 25-35 se encuentra en torno al 50%, mientras que en las expuestas a A β 40 o A β 42 se sitúa alrededor del 80%.

Por otra parte, en las imágenes de contraste de fases (figura 2) se aprecia tanto la presencia de células muertas como la modificación de la morfología neuronal, siendo más evidente en las células expuestas a A β 25-35.

4.1.2. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de ROS.

Una vez comprobado que los distintos β -amiloides provocan muerte neuronal, quisimos profundizar en los mecanismos que pudieran estar implicados en esa muerte. Existen numerosas evidencias de la implicación de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Hauptmann et al. 2009). Por ello, analizamos la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), utilizando la técnica fluorimétrica de la diclorofluoresceína diacetato. Para ello, neuronas procedentes de un cultivo primario, incubadas durante 3 DIV en medio DMEM + FBS 10%, se cambiaron a medio Hanks y se incubaron durante 20 horas en ausencia o presencia de los tres β -amiloides (30 μ M). Transcurrido ese tiempo se sometieron al ensayo de producción de ROS y analizamos la viabilidad celular para poder normalizar los datos.

Como podemos observar en la figura 3, donde se resumen los datos obtenidos, el tratamiento con el A β 25-35 provoca un incremento altamente significativo – aproximadamente del 80%– en la producción de ROS con respecto al control. En el caso del A β 42, el aumento en dicha producción se sitúa en torno al 30%, mientras que cuando exponemos las células a A β 40 no se observan cambios con respecto al control.

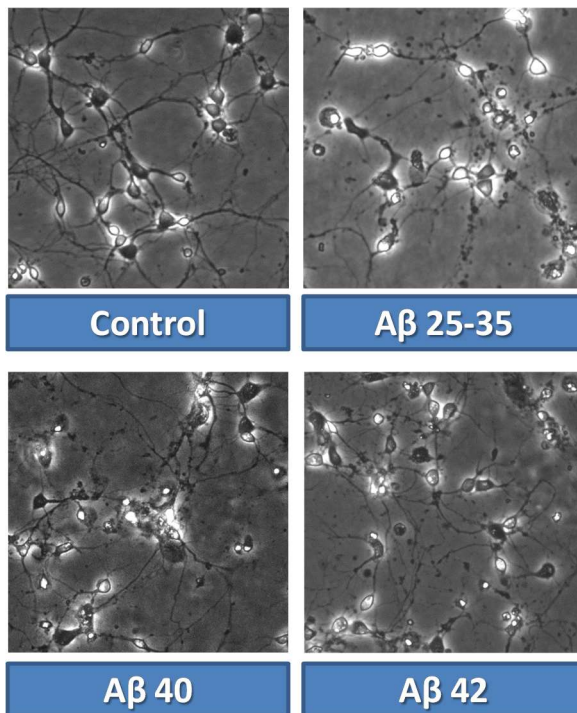
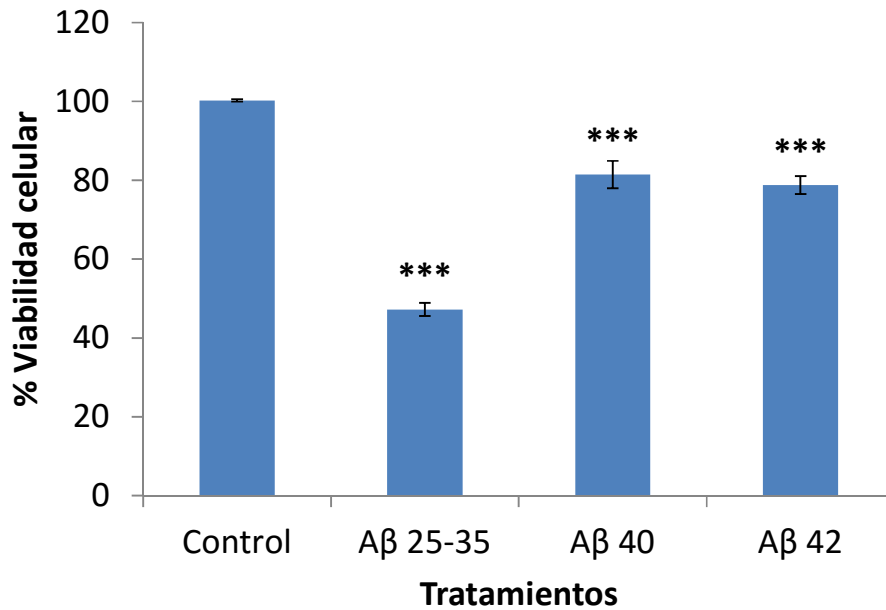


Figura 2. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad y morfología neuronal.

Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 9$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$.

4.1.3. Inmunocolocalización de los diferentes β -amiloides en neuronas en cultivo primario.

Puesto que la gran mayoría de los radicales libres celulares se generan en las mitocondrias y, dado que éstas –como ya hemos mencionado– se han situado durante mucho tiempo en el punto de mira de la enfermedad de Alzheimer, decidimos estudiar

su posible relación con el β -amiloide. Para ello, incubamos neuronas de 3 DIV en medio Hanks durante 5 horas en ausencia o presencia de los tres péptidos (30 μ M). Transcurrido ese tiempo, las células se tiñeron con MitotrackerRed –un marcador mitocondrial, en rojo- y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%. A continuación se sometieron a inmunocitoquímica contra β -amiloide (visible en verde) y se tiñeron los núcleos (en azul). Las imágenes que se muestran en la figura 4 se captaron mediante microscopía confocal.

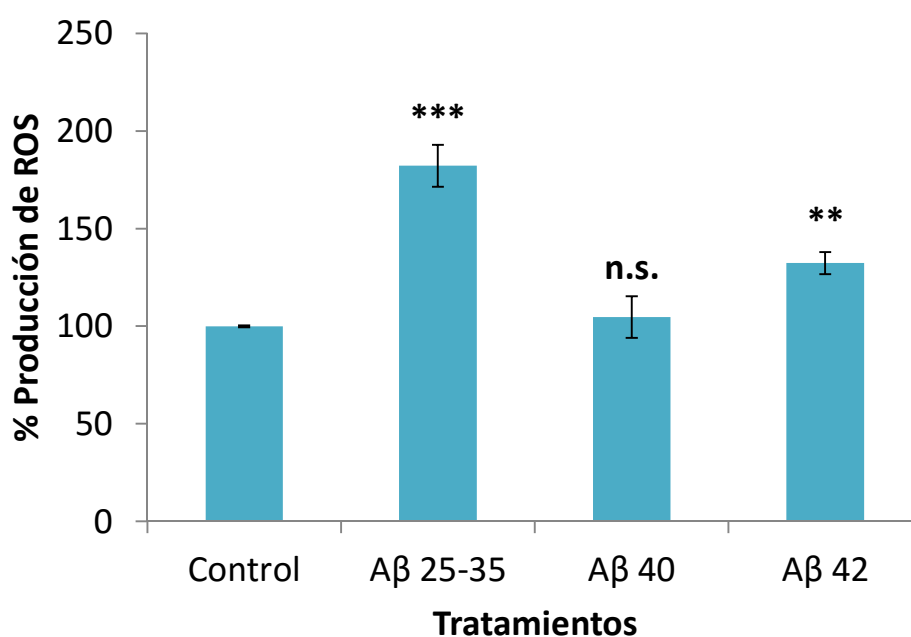


Figura 3. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se normalizaron utilizando los datos de viabilidad celular y se expresan como porcentajes con respecto al control siendo medias \pm SEM ($n \geq 7$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; n.s.: no significativo.

La tinción mitocondrial nos ofrece una visión de la morfología celular general gracias a la amplia distribución de las mitocondrias en las neuronas. Así, podemos observar que, mientras las células sin tratar aparecen con una morfología normal, es decir, con un acúmulo de mitocondrias en la región perinuclear y largas y prominentes neuritas, las células que han sido expuestas a β -amiloide pierden su morfología característica, viéndose afectadas sobre todo las prolongaciones.

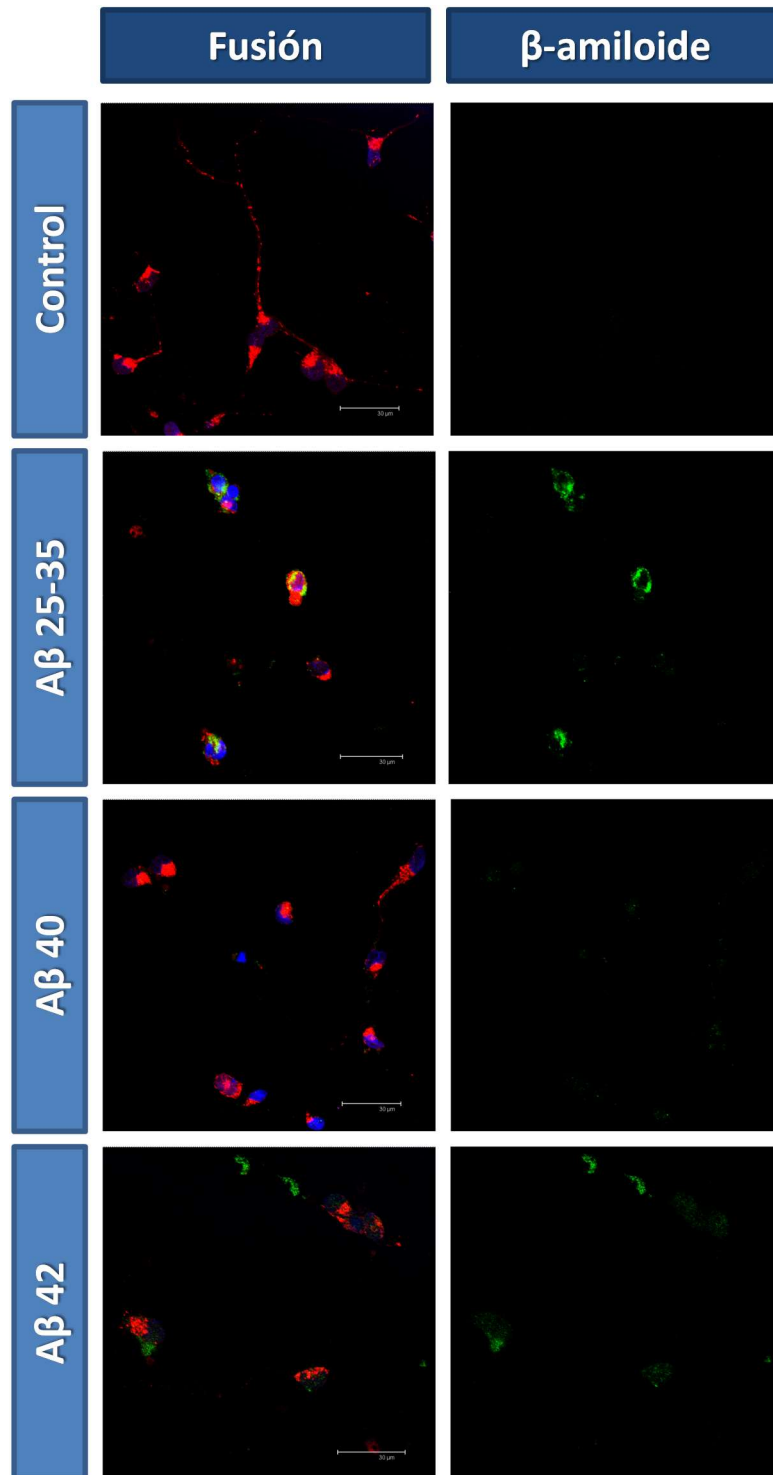


Figura 4. Localización celular de los diferentes β -amiloides. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 5 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Posteriormente, las células se sometieron a una tinción con un marcador mitocondrial (rojo) y se fijaron con paraformaldehído. A continuación se sometieron a inmunocitoquímica contra β -amiloide (verde) y se tiñeron los núcleos (azul). Las imágenes se captaron mediante microscopía confocal. Escala: 30 μ m.

En cuanto a la localización celular de los péptidos (figura 4), llama la atención que cada uno de ellos tiene un patrón de localización particular. El A β 25-35 se observa de forma muy clara dentro de las células, existiendo bastantes puntos de colocalización con el marcador mitocondrial (puntos amarillos en la imagen). Es decir, podemos situar este péptido dentro de las mitocondrias neuronales, lo que podría explicar el incremento tan importante en la producción de ROS que observamos con este tratamiento. Para apreciarlo con más detalle podemos observar la figura 5, donde aparecen separados los diferentes canales, viéndose de forma muy evidente cómo el β -amiloide se localiza en el interior celular y cómo colocaliza con las mitocondrias.

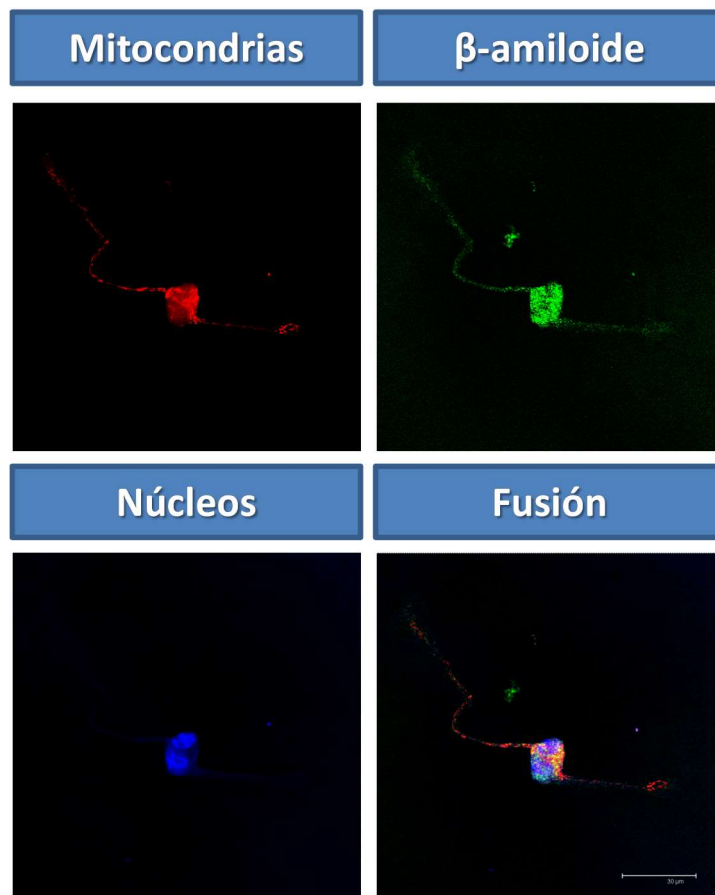


Figura 5. Localización subcelular del β -amiloide 25-35. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 24 horas en medio Hanks en presencia de β -amiloide 25-35 (30 μ M). Posteriormente, las células se sometieron a una tinción con un marcador mitocondrial (rojo) y se fijaron con paraformaldehído. A continuación se realizó inmunocitoquímica contra β -amiloide (verde) y se tiñeron los núcleos (azul). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal. Escala: 30 μ m.

En cuanto al A β 40, apenas es visible dentro de las células, y en ningún caso existe colocalización. Por su parte, el A β 42 representa una situación intermedia; se aprecia dentro de las células, o asociado a la membrana de las mismas, pero apenas se observan algunos puntos de colocalización con el marcador mitocondrial. Todas estas observaciones parecen corresponderse con los resultados obtenidos para la producción de radicales libres (figura 3). Así, la muerte celular provocada por los A β 25-35 y A β 42 podría ser explicada –al menos en parte, y sobre todo en el caso del A β 25-35– a través de una disfunción mitocondrial que da lugar a una producción exacerbada de ROS. Del mismo modo, el A β 40 no entraría en las neuronas ni, por tanto, en las mitocondrias de las mismas, de forma que no produce modificación en los niveles de ROS normales. Puede suponerse que el A β 40 ejercería sus efectos tóxicos desde el exterior de la célula, y desencadenaría la muerte neuronal a través de otras vías.

4.1.4. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la expresión de la sinaptofisina.

Otra de las principales vías propuestas en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer es el fallo sináptico (Selkoe 2002). Dado que, como hemos visto anteriormente, no se explica completamente la muerte provocada por los β -amiloides a través del estrés oxidativo, decidimos estudiar los efectos de los β -amiloides a nivel de sinapsis. Para ello, neuronas de 3 DIV se incubaron durante 20 horas en medio DMEM en ausencia o presencia de los tres péptidos (30 μ M), transcurridas las cuales se extrajeron las proteínas y se analizaron por western-blot los niveles de sinaptofisina, una proteína presináptica. La densitometría se normalizó con respecto a los niveles de α -tubulina.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, donde podemos observar que los tres péptidos ensayados reducen de forma significativa los niveles de sinaptofisina con respecto al control. Cabe destacar que el mayor descenso se registra en el tratamiento con el A β 40 (aproximadamente del 30%).

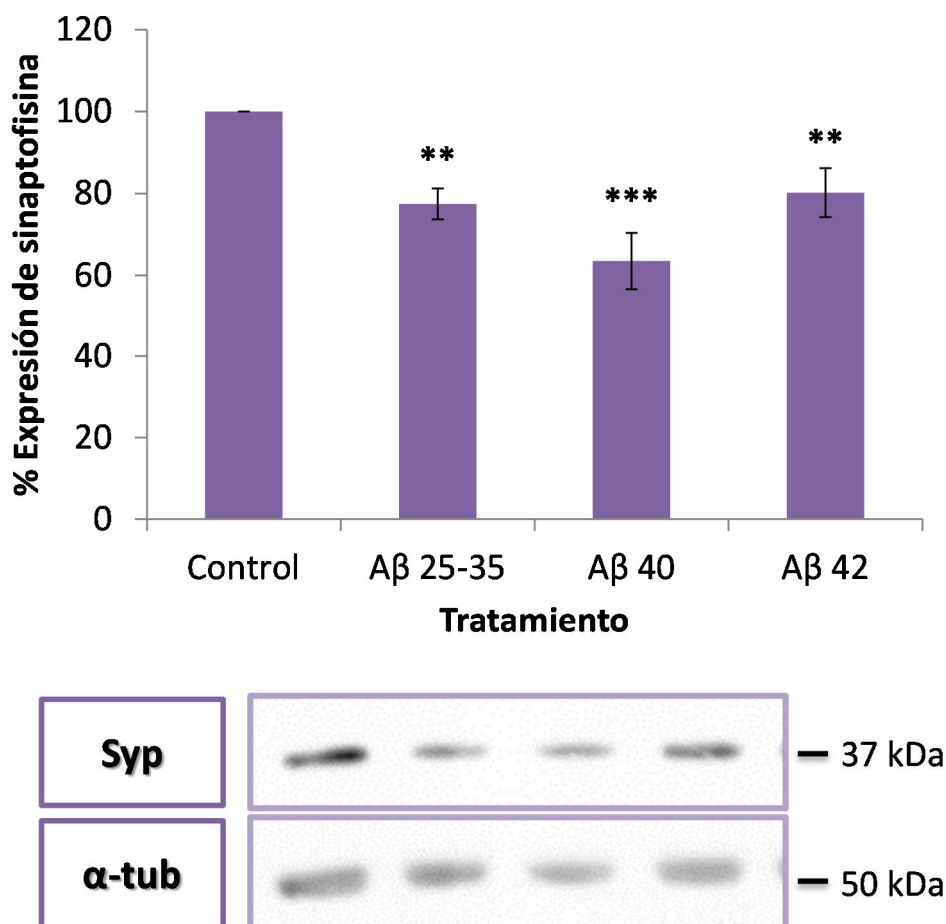


Figura 6. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la expresión de sinaptofisina (Syp). Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio DMEM en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Posteriormente se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante western-blot. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 9$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$.

4.1.5. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la localización celular de la sinaptotagmina (proteína presináptica) y la PSD-95 (Postsynaptic Density-95; postsináptica).

Una vez comprobado que a largo plazo (20 horas) los β -amiloides son capaces de modificar los niveles de ciertas proteínas sinápticas, quisimos estudiar si en tiempos más cortos podría verse afectada la localización de este tipo de proteínas. El estudio mediante microscopía confocal de la colocalización de una proteína presináptica (por ejemplo, sinaptotagmina) y una proteína postsináptica (PSD-95) permite situar

posibles puntos de sinapsis entre dos células adyacentes, al identificar en un mismo plano a las dos proteínas marcadores pre y postsinápticos, respectivamente.

Para valorar el efecto de los diferentes β -amiloides sobre la localización de marcadores sinápticos, incubamos neuronas de 4 DIV durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia de los tres péptidos. A continuación se fijaron y se realizó una doble inmunocitoquímica contra la proteína presináptica sinaptotagmina (en rojo) y contra la proteína postsináptica PSD-95 (en verde). Por último, se tomaron imágenes mediante microscopía confocal, que posteriormente fueron analizadas empleando la aplicación ImageJ. De esta forma se obtuvieron los puntos de colocalización de los dos canales en una imagen separada para su mejor valoración, y se cuantificó la fluorescencia tanto del canal rojo, como del verde, así como de la colocalización.

En la figura 7 se muestran las imágenes de la fusión de los dos canales y de los puntos de colocalización de las dos fluorescencias. Llama la atención de forma muy evidente que la situación de esos puntos de coincidencia de las dos proteínas se modifica con los tratamientos con los diferentes β -amiloides. Mientras en el control la mayoría de estos puntos se concentran en los lugares de contacto entre neuronas, donde cabría encontrar sinapsis entre las mismas, la presencia de los péptidos deslocaliza ambas proteínas. Además, en presencia de A β 25-35 la fluorescencia de ambos canales se ve disminuida, observándose menos puntos de colocalización, los cuales se disponen además de forma ligeramente aleatoria. En el tratamiento con el A β 40 se observa mucha colocalización entre ambas proteínas, pero ésta es completamente aberrante y muy marcada en los somas neuronales (figura 7b). Estos resultados indican que las proteínas no se localizan donde deberían, es decir, en los puntos de contacto de las neuronas y, por tanto, no pueden estar llevando a cabo de forma correcta su función sináptica. El A β 42 también induce una deslocalización, aunque más similar a la provocada por el A β 25-35.

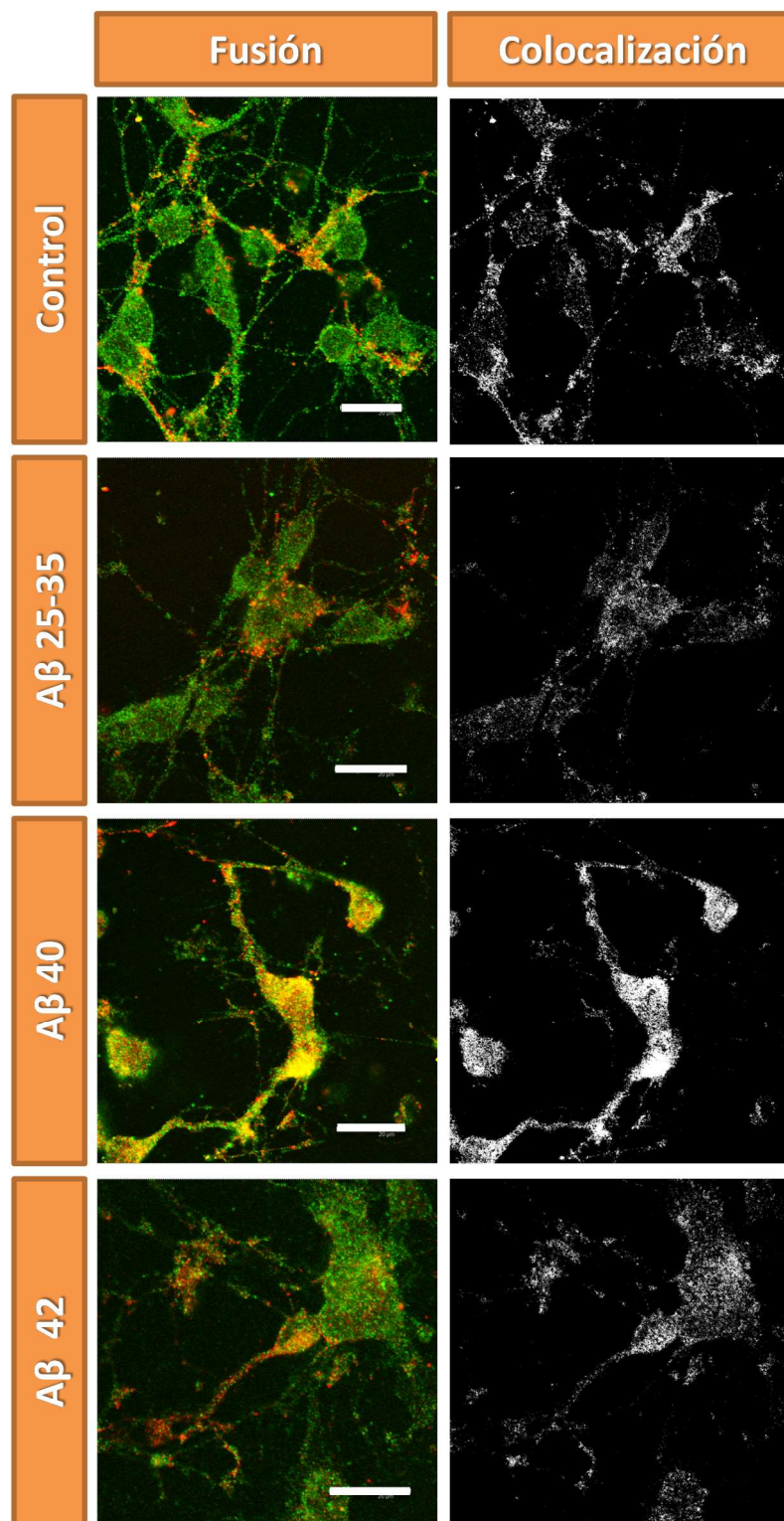


Figura 7. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la localización de PSD-95 y sinaptotagmina (Syt). Neuronas procedentes de un cultivo primario (4 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia ($30 \mu\text{M}$) de los péptidos β -amiloides: $\text{A}\beta$ 25-35, $\text{A}\beta$ 40 y $\text{A}\beta$ 42. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra PSD-95 (verde) y Syt (rojo). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Mediante el software ImageJ se obtuvieron los puntos de colocalización de ambas proteínas. Escala: $20 \mu\text{m}$.

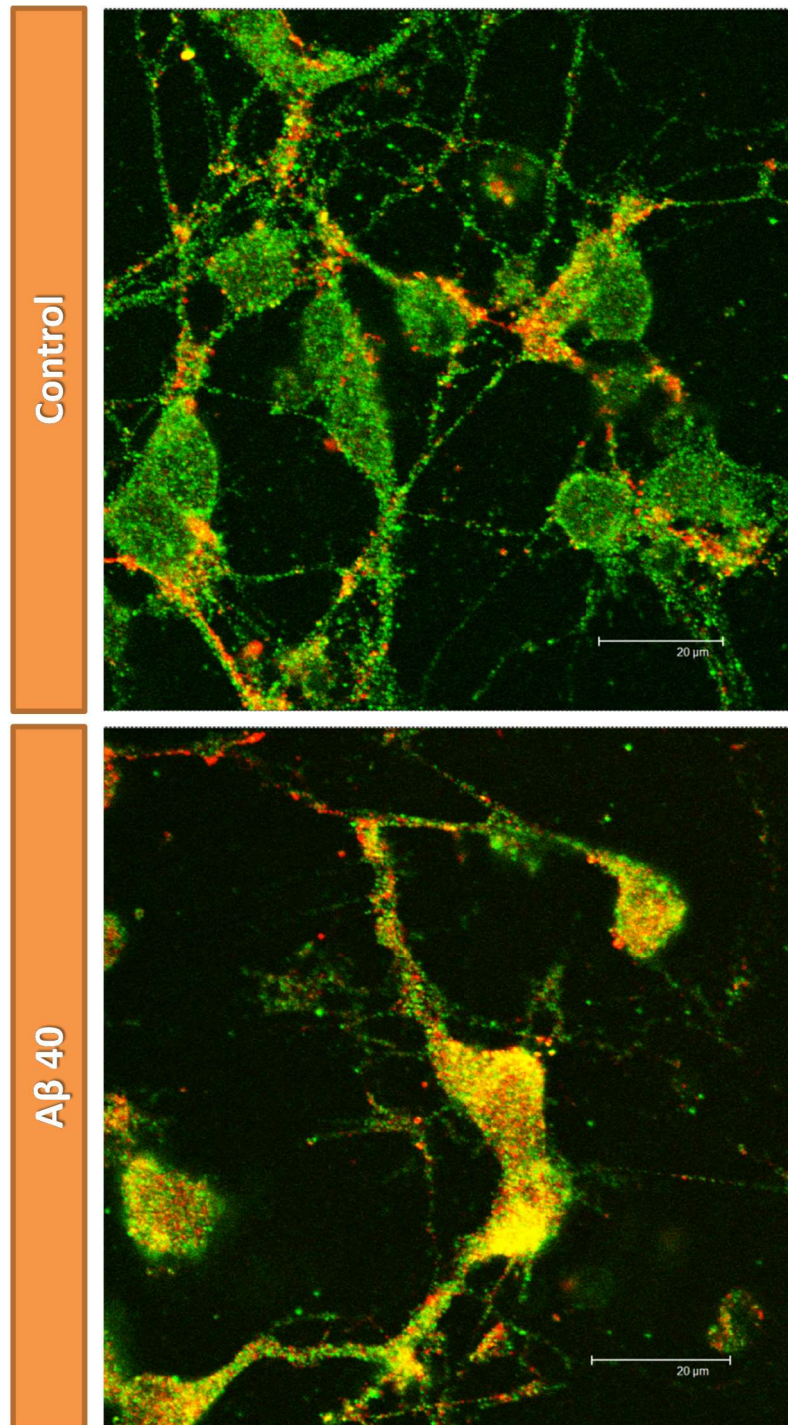


Figura 7b. Detalle del efecto del β -amiloide 40 sobre la localización de PSD-95 y sinaptotagmina (Syt). Neuronas procedentes de un cultivo primario (4 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) del péptido β -amiloide A β 40. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra PSD-95 (verde) y Syt (rojo). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m. Los píxeles amarillos indican colocalización de las dos proteínas marcadas que, al tratarse de una proteína presináptica (Syt) y una postsináptica (PSD-95) indicarían posibles puntos de sinapsis.

Estos resultados indican que el β -amiloide influye en la localización/deslocalización de las proteínas sinápticas aún en tratamientos cortos de 2 horas. Para comprobar si estas modificaciones estaban relacionadas con alteraciones en los niveles de las proteínas ensayadas, cuantificamos la fluorescencia de cada canal. Como se refleja en la figura 8, sólo en el caso del tratamiento con el A β 25-35 existe una disminución significativa de la señal, lo que indicaría que sólo este péptido está alterando la expresión de las proteínas sinápticas con independencia de sus efectos sobre la localización. Sin embargo, los A β 40 y A β 42, sólo afectarían a la localización de la sinaptotagmina y de la PSD-95, no modificando sus niveles totales, al menos en estos tiempos ensayados.

4.2. Efecto protector de la albúmina sérica sobre el efecto deletéreo de los diferentes β -amiloides.

Una vez observados los efectos deletéreos del beta-amiloide sobre los cultivos primarios de neuronas, y basándonos en los estudios previos realizados en el laboratorio, que habían constatado un papel protector de la albúmina sérica frente al A β 25-35 (Vega et al. 2009), quisimos comprobar ese efecto protector frente a los diferentes daños descritos, y con respecto a los A β 40 y A β 42.

4.2.1. Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 25-35.

En primer lugar, quisimos repetir los resultados obtenidos previamente en el laboratorio. Para ello incubamos las células con albúmina sérica humana (HSA) en ausencia o presencia de β -amiloide. Además, utilizamos otra aproximación experimental, la formación del complejo HSA-A β 25-35. Para ello, disolvimos el A β 25-35 en una solución de HSA (1 mM), permitiendo una interacción estrecha entre ambos. Es lo que denominamos “complejo HSA-A β 25-35”, que es el que añadimos al cultivo celular. Así, al mostrar los resultados nos encontraremos con 5 grupos experimentales diferentes: control, HSA, A β 25-35, HSA + A β 25-35 y complejo HSA-A β 25-35.

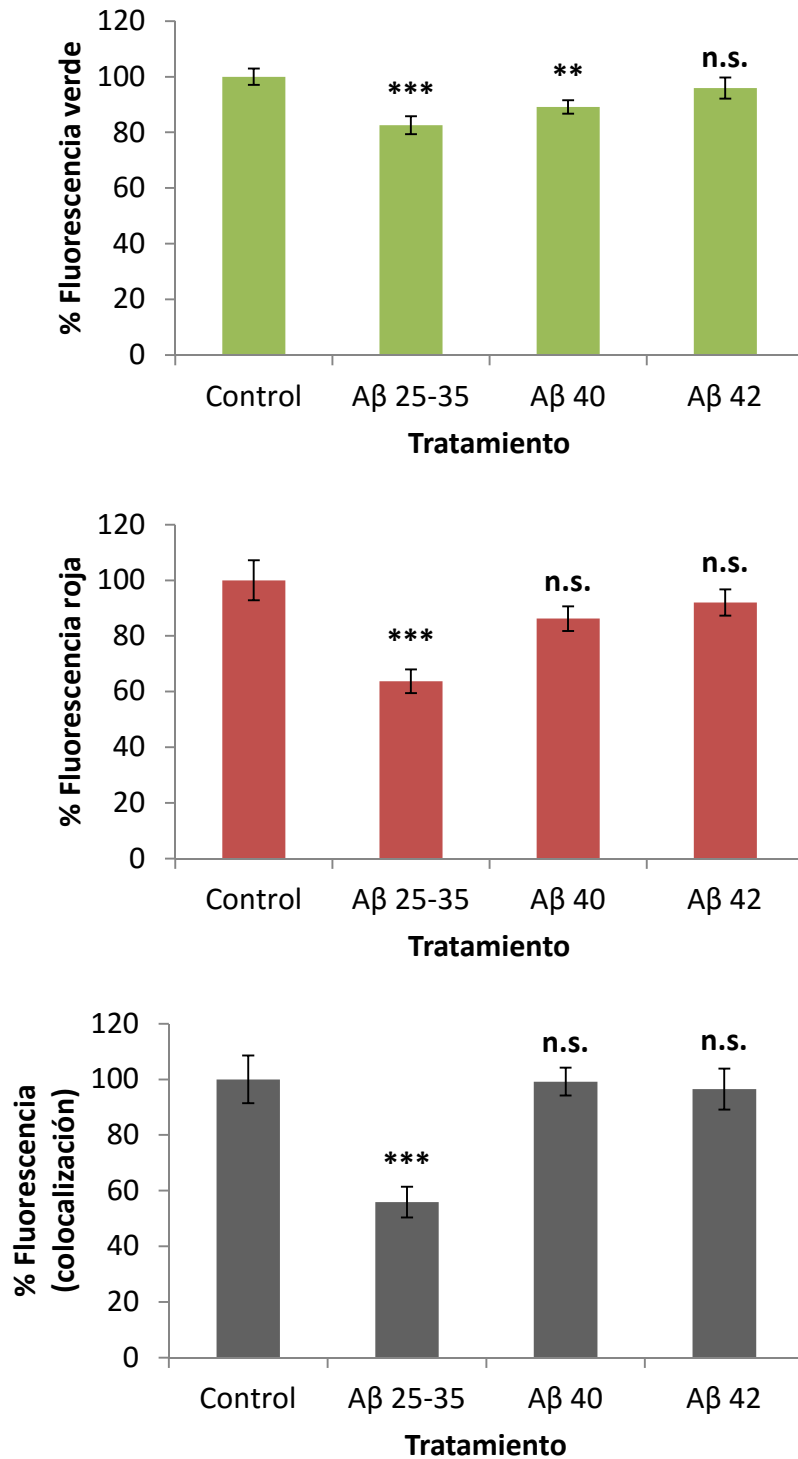


Figura 8. Cuantificación de la fluorescencia detectada en las imágenes de la figura anterior. La fluorescencia de colocalización se refiere a los puntos de coincidencia entre la fluorescencia verde (PSD-95) y la roja (sinaptotagmina). La cuantificación se llevó a cabo mediante la aplicación ImageJ. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 24$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; n.s.: no significativo.

En la figura 9A se resumen los datos de viabilidad celular obtenidos para estos grupos experimentales. Como ya habíamos visto con anterioridad (figura 2), el tratamiento de 20 horas con el A β 25-35 provoca una reducción de aproximadamente el 50% en la viabilidad de neuronas en cultivo primario. Sin embargo, cuando además del A β 25-35, añadimos HSA, la viabilidad aumenta considerablemente, siendo sólo un 20% menor que la observada en la ausencia de β -amiloide. Asimismo, al tratar las neuronas con el complejo HSA-A β 25-35 obtenemos resultados similares a los alcanzados con la HSA no acomplejada, siendo ambos valores significativamente diferentes al del péptido en solitario, aunque aproximadamente un 20% menor que el control. Es decir, la albúmina protege a las neuronas frente a la muerte celular producida por el A β 25-35, tanto libre como acomplejada con el A β .

Cuando valoramos la producción de ROS en estas circunstancias (figura 9B), la albúmina muestra una elevada capacidad antioxidante *per se*, como captadora de radicales libres (Roche et al. 2008). Así, en todas las circunstancias encontramos unos niveles muy bajos de ROS en presencia de HSA, independientemente de que su adición al medio de incubación sea de forma individual o acompañada del A β 25-35 (en torno al 25% con respecto al control). En cambio, cuando la albúmina se encuentra acomplejando al β -amiloide, pierde esa capacidad captadora de ROS, ya que el nivel de producción de ROS es intermedio entre el control y el A β 25-35 solo, aunque las diferencias entre ellos son estadísticamente significativas.

Para valorar el efecto de la albúmina sobre la internalización del A β 25-35 (que ya observamos en la figura 5), incubamos neuronas de 3 DIV en medio Hanks en presencia de A β 25-35 y en ausencia o presencia de HSA (30 μ M para ambos) durante 24 horas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se realizó una inmunocitoquímica contra β -amiloide. Como se observa en la figura 10, la presencia de HSA reduce muy claramente la entrada del A β 25-35 en las neuronas.

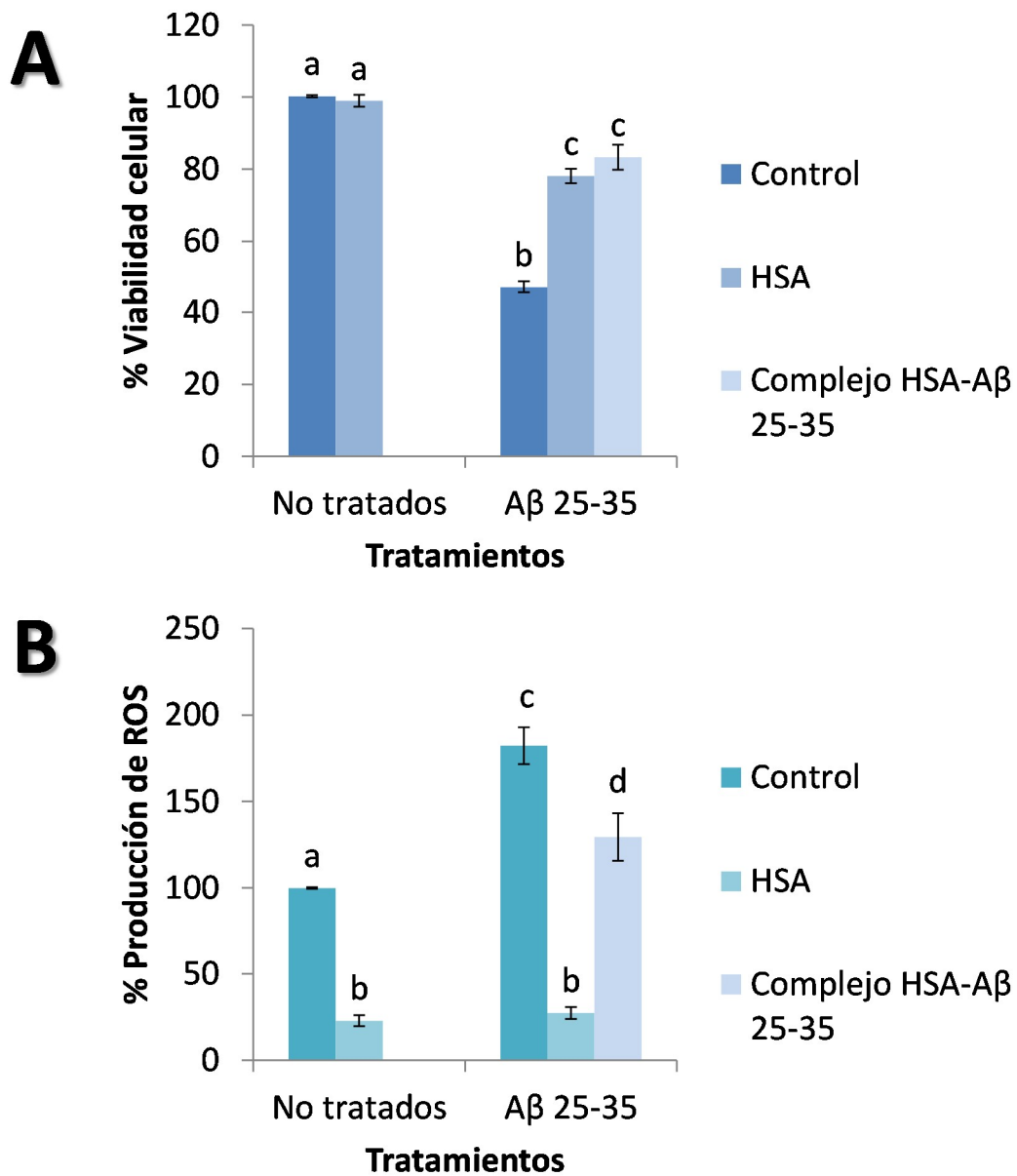


Figura 9. Efecto protector de la albúmina sérica sobre la muerte celular y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) observada en presencia de β -amiloide 25-35. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 25-35, HSA y complejo HSA-A β 25-35. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 11$). La producción de ROS se normalizó con los datos de viabilidad. Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos entre sí se realizó un ANOVA de una vía y test Tukey. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes.

A su vez, quisimos comprobar si existía internalización de la albúmina en estas condiciones. Para ello, incubamos neuronas de 3 DIV en medio Hanks en presencia de HSA y en ausencia o presencia de A β 25-35. Tras dos horas de incubación, las células se tiñeron con el marcador mitocondrial MitotrackerRed (en rojo) y se fijaron con paraformaldehído. A continuación se sometieron a inmunocitoquímica contra HSA (en verde) y se tiñeron los núcleos (en azul). Las imágenes captadas mediante microscopía confocal se muestran en la figura 11. Si comparamos los dos tratamientos, se observa claramente como la albúmina, en ausencia de A β 25-35, entra dentro de las neuronas, colocalizando en algunos puntos con el marcador mitocondrial (puntos amarillos en la imagen). En cambio, cuando las células son además tratadas con el A β 25-35, el marcaje de la HSA se observa rodeando las células, como si quedase excluida de las mismas, quizá asociándose con la membrana pero, en ningún caso, entrando en las neuronas. Esto podría significar que la albúmina es capaz de “secuestrar” el A β 25-35, de modo que ambos permanecen fuera de las neuronas, evitando de este modo algunos de los efectos deletéreos que este péptido provoca.

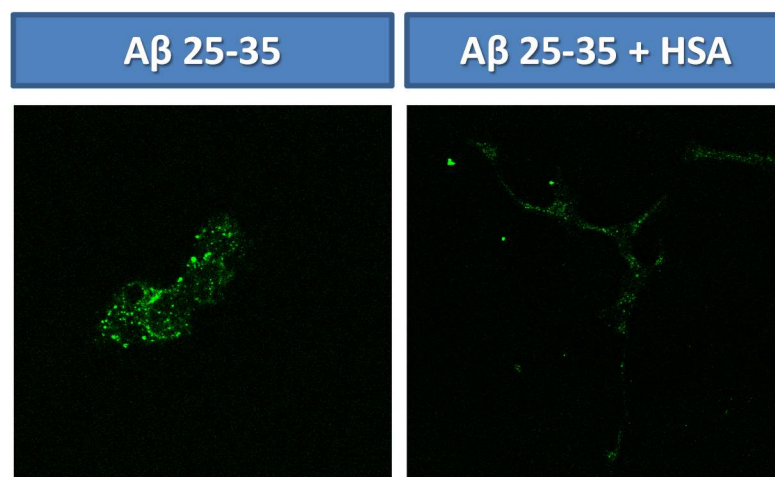


Figura 10. Efecto de la albúmina sérica sobre la internalización del A β 25-35. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 24 horas en medio Hanks en presencia de A β 25-35 (30 μ M) y ausencia o presencia de HSA (30 μ M). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra β -amiloide (verde). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal.

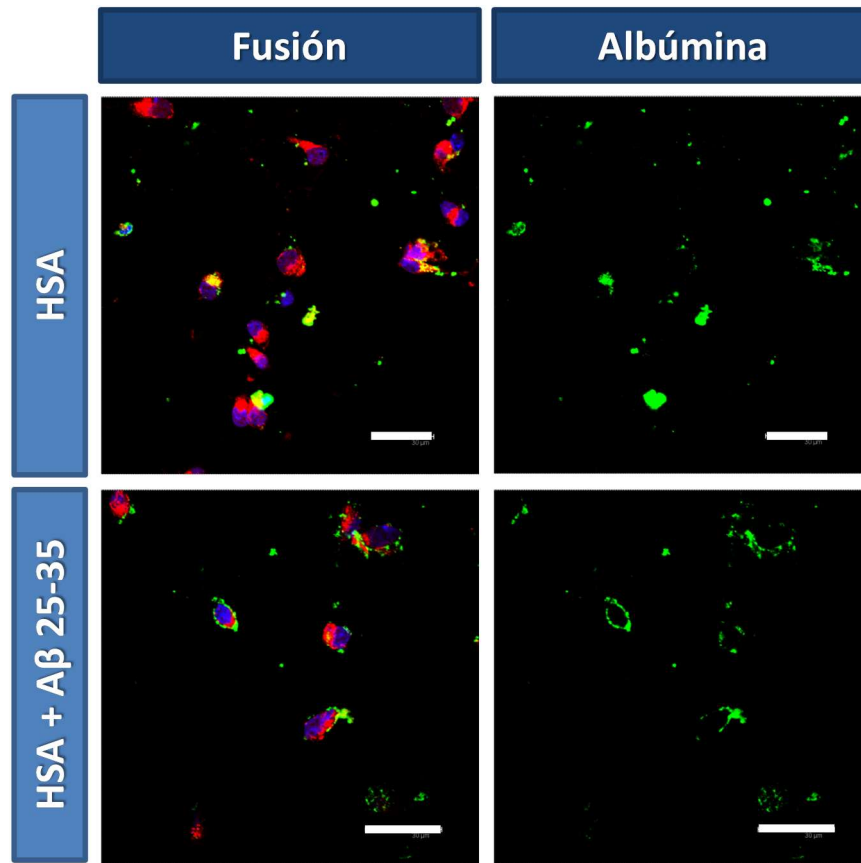


Figura 11. Efecto del A β 25-35 sobre la internalización de la albúmina sérica. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en presencia de HSA y ausencia o presencia de A β 25-35 (30 μ M). Posteriormente, las células se sometieron a una tinción con un marcador mitocondrial (rojo) y se fijaron con paraformaldehído. A continuación se sometieron a inmunocitoquímica contra albúmina (verde) y se tiñeron los núcleos (azul). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal. Escala: 30 μ m.

Para seguir analizando el papel protector de la albúmina frente al A β 25-35, pasamos a valorar los efectos a nivel sináptico. En cuanto al nivel de expresión de la sinaptofisina (figura 12), se observa que el A β 25-35 provoca una disminución del 30% que sólo se evita cuando el A β 25-35 se acompleja previamente con HSA. En estas circunstancias, el valor de expresión no es significativamente diferente del control. Cuando analizamos la localización de los puntos de sinapsis, es decir, la colocalización inmunocitoquímica entre el marcaje de la proteína presináptica sinaptotagmina y la postsináptica PSD-95 (figura 13), el tratamiento con el A β 25-35 reduce el marcaje de ambas proteínas (los datos de cuantificación se reflejan en la figura 14), a la vez que produce la deslocalización de los puntos de coincidencia de las mismas (“puntos de sinapsis”). Es especialmente llamativa la disminución de la fluorescencia roja,

correspondiente al marcaje de la sinaptotagmina. Sin embargo, al incubar las células con A β 25-35 en presencia de HSA, se recuperan los niveles de fluorescencia para ambas proteínas, así como los puntos de colocalización. No obstante, al observar las imágenes de microscopía confocal, los puntos de colocalización no aparecen distribuidos como en el control. En cambio, el tratamiento con el complejo HSA-A β 25-35 provoca una situación intermedia. Por un lado, la localización de los puntos de sinapsis es bastante similar al control, aunque todavía se observa cierta deslocalización. Por otro, la cuantificación de la fluorescencia indica una disminución significativa, parecida a la que provoca el A β 25-35 por sí solo.

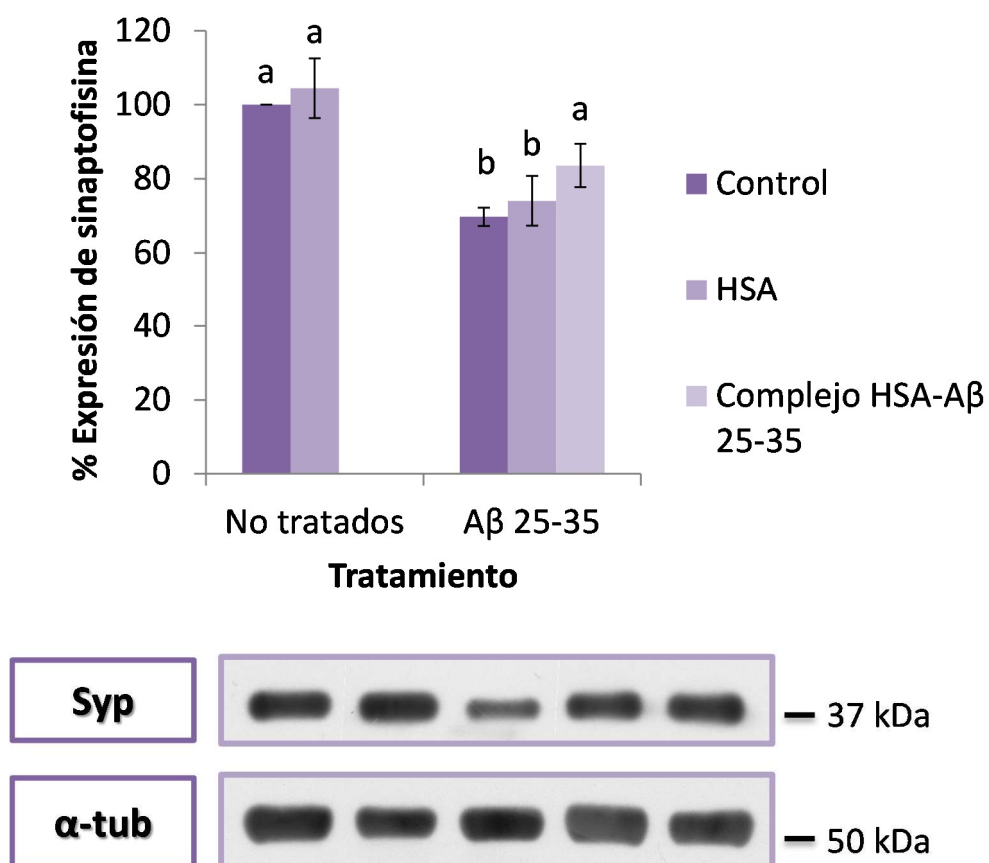


Figura 12. Efecto protector de la albúmina sérica sobre disminución de la expresión de sinaptofisina (Syp) producida por el β -amiloide 25-35. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio DMEM en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 25-35, HSA y complejo HSA-A β 25-35. Posteriormente se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante western-blot. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 7$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

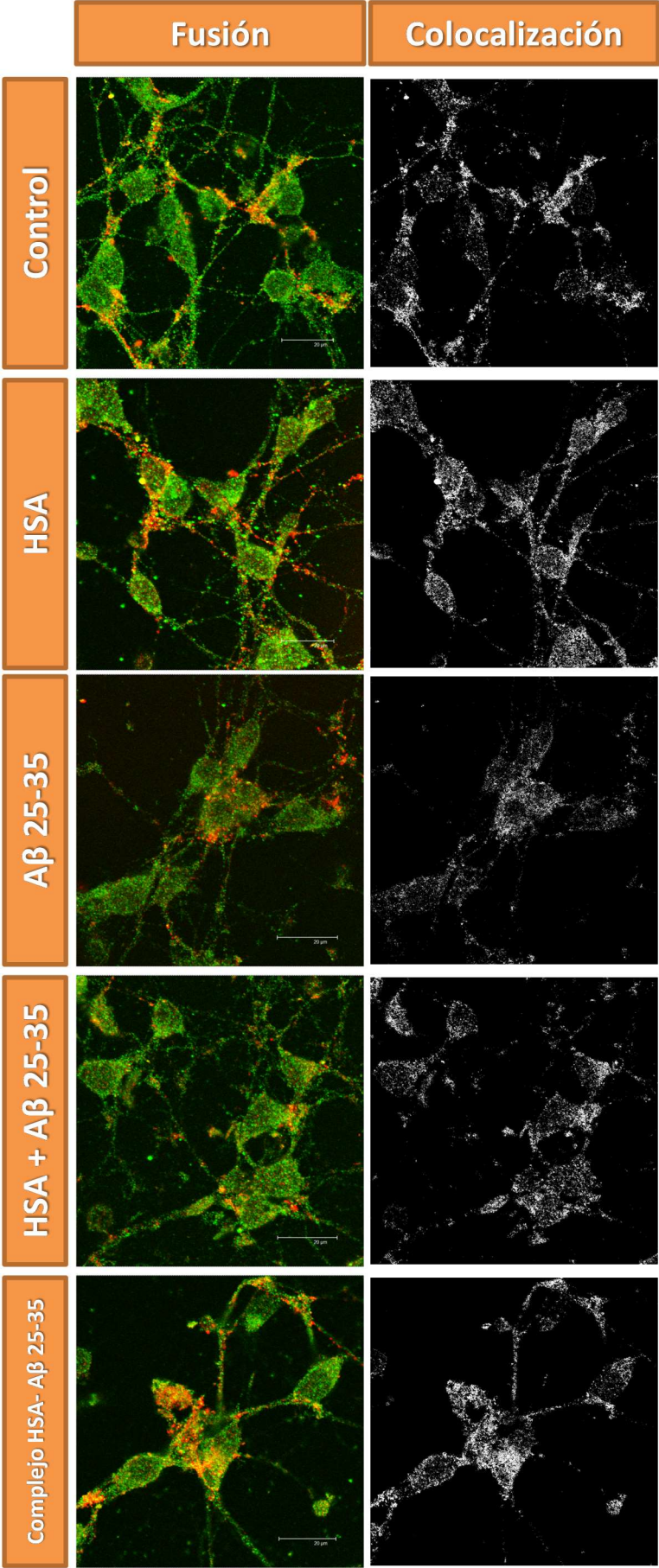


Figura 13. Efecto protector de la albúmina sérica frente a la deslocalización de la PSD-95 y la sinaptotagmina (Syt) provocada por el A β 25-35. Neuronas procedentes de un cultivo primario (4 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 25-35, HSA y complejo HSA-A β 25-35. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra PSD-95 (verde) y Syt (rojo). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Los puntos de colocalización de ambas proteínas se obtuvieron mediante la aplicación ImageJ. Escala: 20 μ m.

En resumen, nuestros resultados indican que la HSA tiene capacidad protectora frente a los efectos nocivos que ejerce el A β 25-35 sobre neuronas en cultivo primario, aunque la protección es parcial, puesto que no consigue evitar completamente los daños que causa el A β . Así, en el caso de la viabilidad celular, la albúmina sola o acompañada con el A β logra evitar un 30% de muerte neuronal. Por otro lado, el complejo evita la disminución en los niveles de expresión de sinaptofisina, aunque no así el tratamiento conjunto de ambos. Y, por último, cuando consideramos el efecto sobre la localización de PSD-95 y sinaptotagmina, la presencia de HSA recupera los niveles de fluorescencia con respecto al control, pero no así la correcta localización de los puntos de coincidencia. Sin embargo, el complejo sí evita la deslocalización pero no la pérdida de fluorescencia.

4.2.2. Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 40.

Del mismo modo que en el caso del A β 25-35, quisimos comprobar el efecto del tratamiento conjunto de HSA y A β 40, así como el tratamiento con el complejo HSA-A β 40 en relación a los daños provocados por el A β 40 en cultivos primarios de neuronas.

En primer lugar, valoramos la viabilidad celular (figura 15A). Como ya habíamos visto en la figura 2, el tratamiento con A β 40, reduce la viabilidad neuronal un 20% con respecto al control. La adición de HSA a este tratamiento no tiene efecto alguno, pero sí el tratamiento con el complejo HSA-A β 40, que no sólo reduce esa mortalidad, sino que la evita por completo, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el control. Encontramos aquí una clara diferencia con respecto a lo observado en el caso del A β 25-35 (figura 9), en el que la presencia de HSA – independientemente del modo de incubación – tenía el mismo efecto, efecto que además no era tan marcado como para alcanzar los niveles de viabilidad del control.

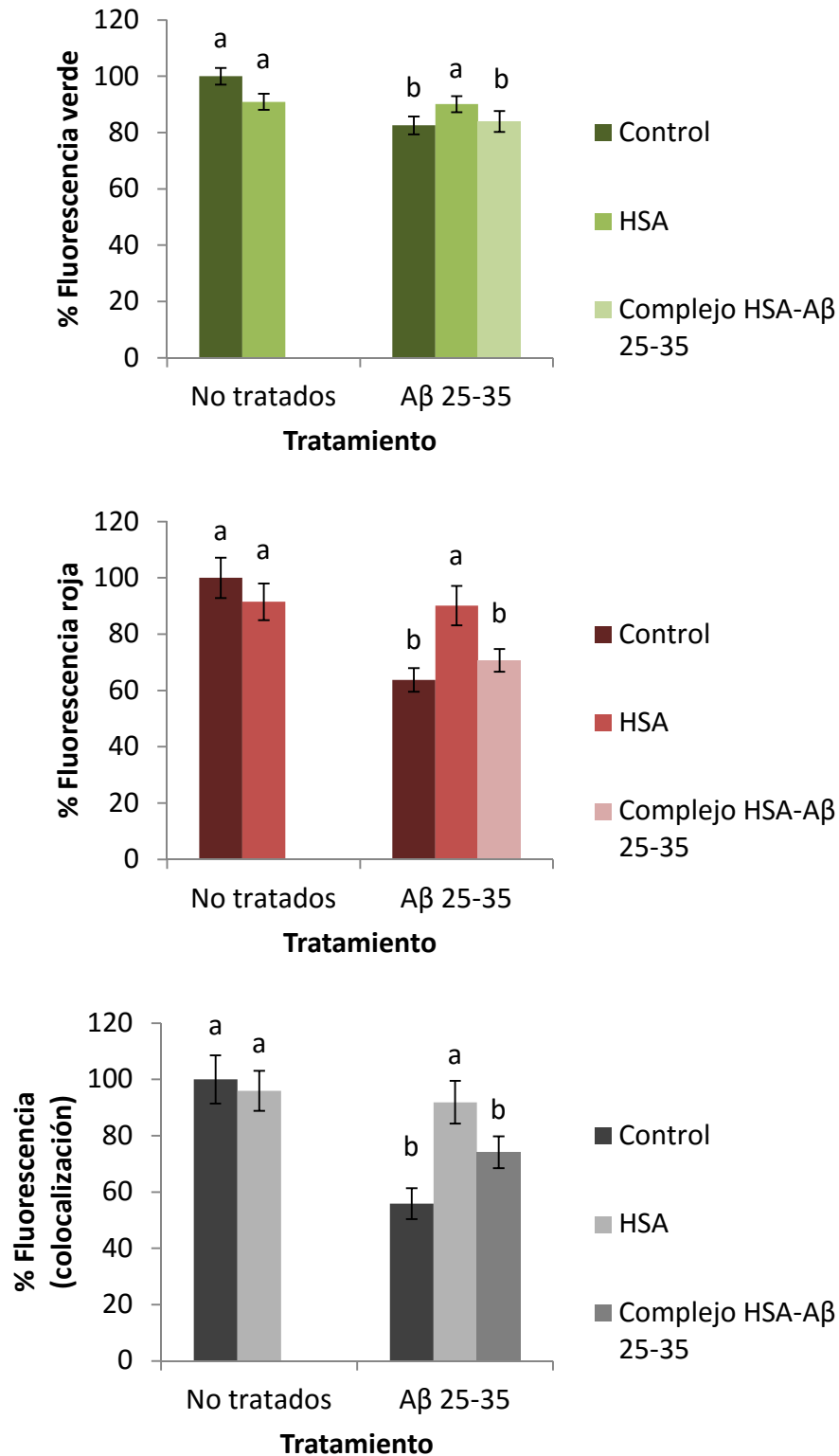


Figura 14. Cuantificación de la fluorescencia detectada en las imágenes de la figura anterior. La fluorescencia de colocalización se refiere a los puntos de coincidencia entre la fluorescencia verde (PSD-95) y la roja (sinaptotagmina). La cuantificación se llevó a cabo mediante la aplicación ImageJ. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 20$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

En cuanto a la producción de ROS, reflejada en la figura 15B, no cabe destacar ningún dato, ya que el A β 40 no inducía modificaciones en dicha producción. Así, la adición de HSA al A β , reduce los valores de ROS, por la capacidad intrínseca captadora de radicales de la albúmina, y el tratamiento con el complejo HSA- A β 40 no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

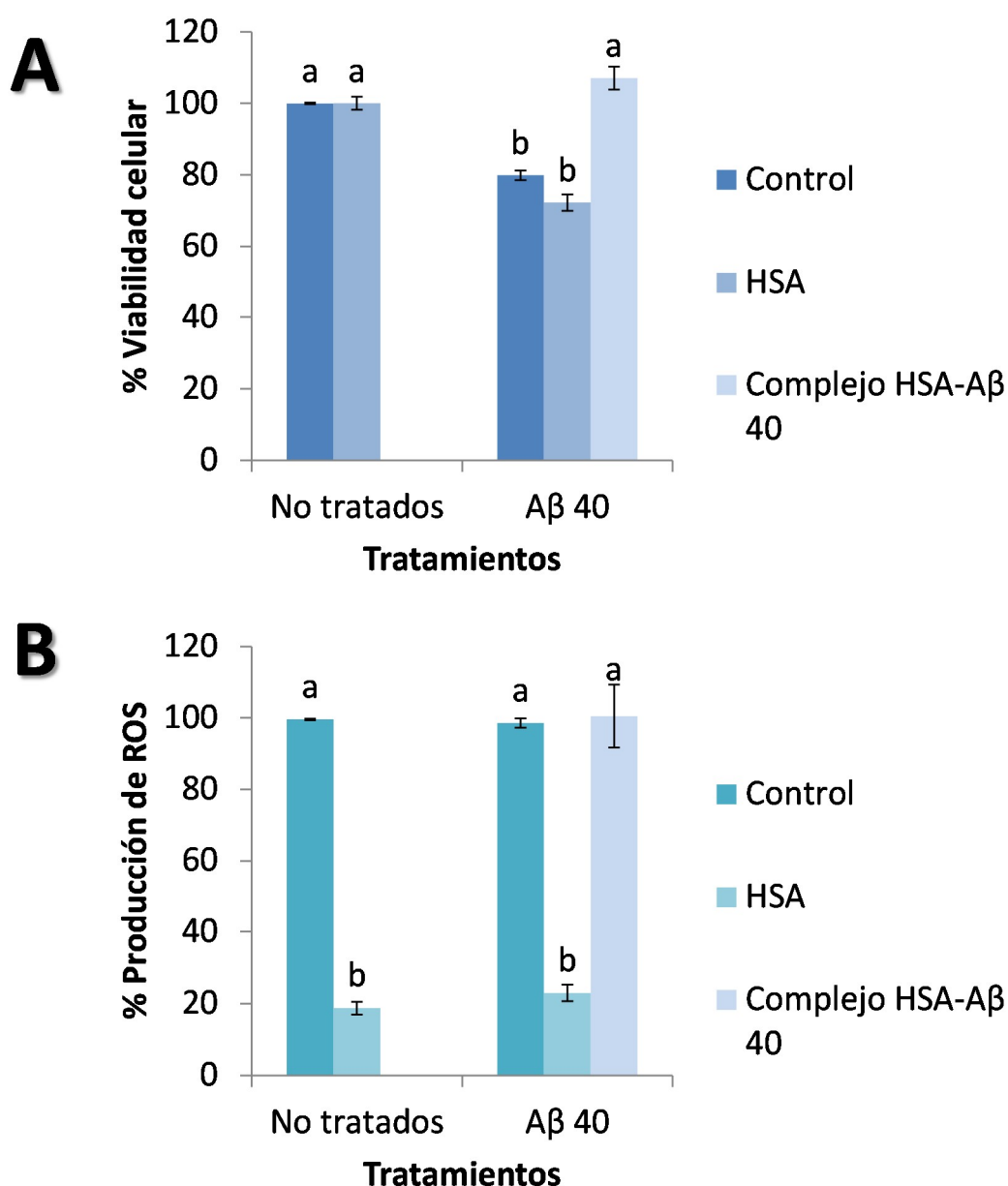


Figura 15. Efecto protector de la albúmina sérica sobre la muerte celular y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) producida por el β -amiloide 40. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 40, HSA y complejo HSA-A β 40. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 6$). La producción de ROS se normalizó con los datos de viabilidad. Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos entre sí se realizó un ANOVA de una vía y test Tukey. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes.

El hecho de que el A β 40 no afecte a la producción de ROS en neuronas parece estar relacionado con que este péptido no se observa dentro de las células en ningún caso (figura 16), de forma que ejercería sus efectos tóxicos desde el exterior. Cabe destacar que cuando el A β 40 se encuentra libre, en presencia o no de HSA, en las preparaciones inmunocitoquímicas aparecen agregados en torno a las células. Estos acúmulos no aparecen en el tratamiento con el complejo HSA-A β 40.

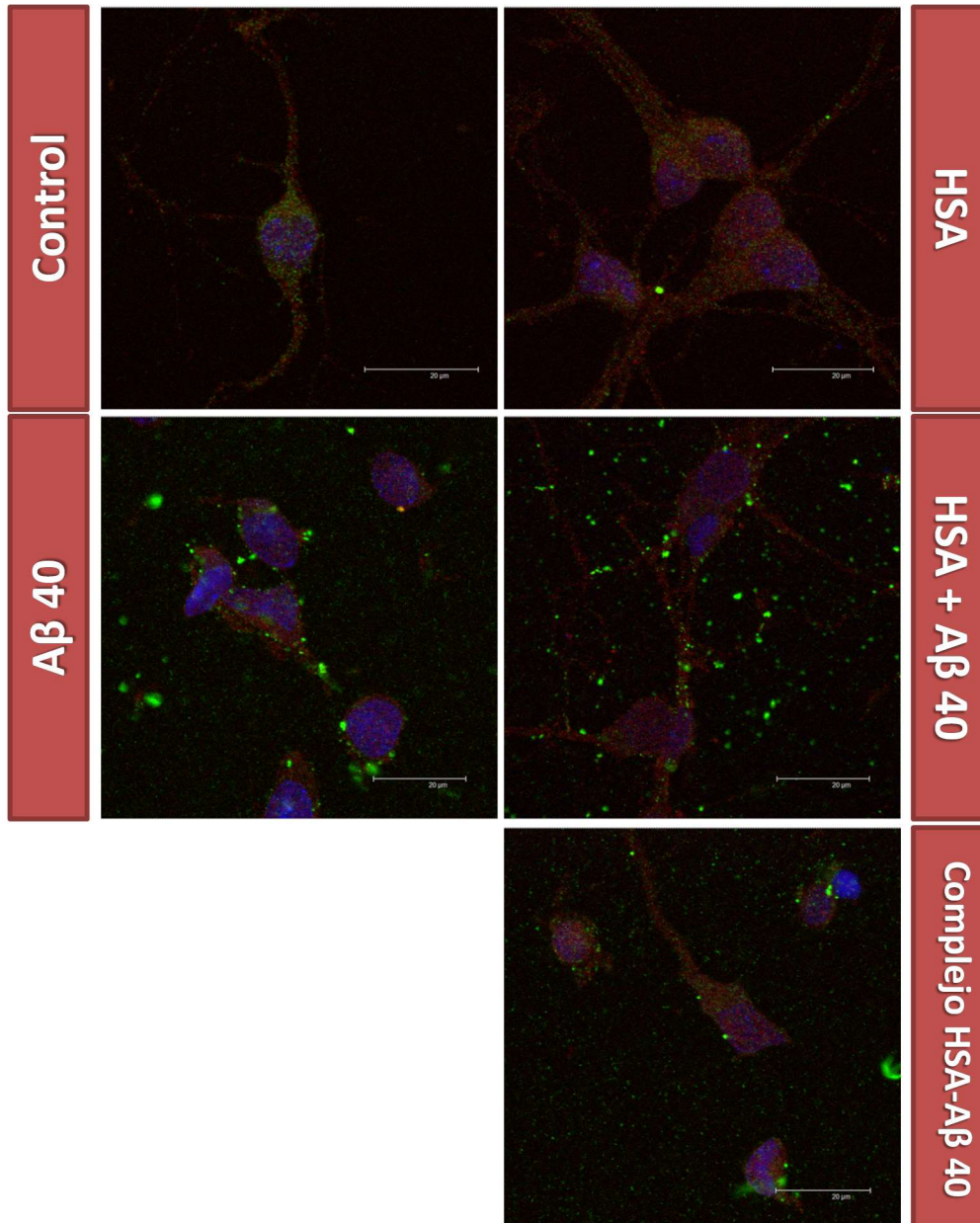


Figura 16. Localización celular del A β 40. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 40, HSA y complejo HSA-A β 40. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra APP (verde) y Glut3 (rojo), y se tiñeron los núcleos (azul). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

Como ya observamos anteriormente (figura 6), el tratamiento con A β 40 reduce el nivel de expresión de la proteína presináptica sinaptofisina más del 30% con respecto al control. Tal como se refleja en la figura 17, esta caída no ocurre cuando tratamos las células con HSA, ya sea en adición al A β 40, o en forma de complejo con el mismo; no encontrando diferencias estadísticamente significativas con el control, ni entre ellos. A pesar de esto último, si se aprecia una tendencia, ya que la protección ejercida por el complejo, parece ser mayor que la llevada a cabo por la adición de la HSA.

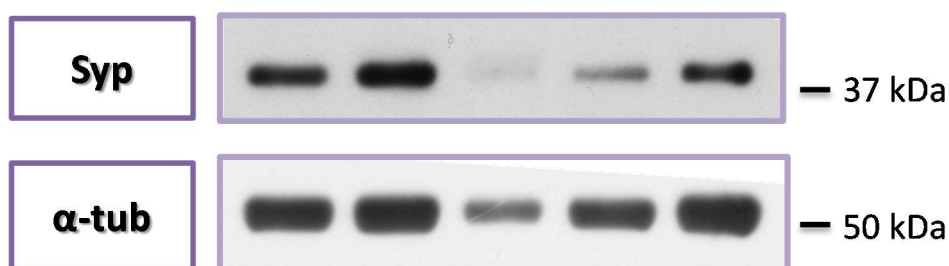
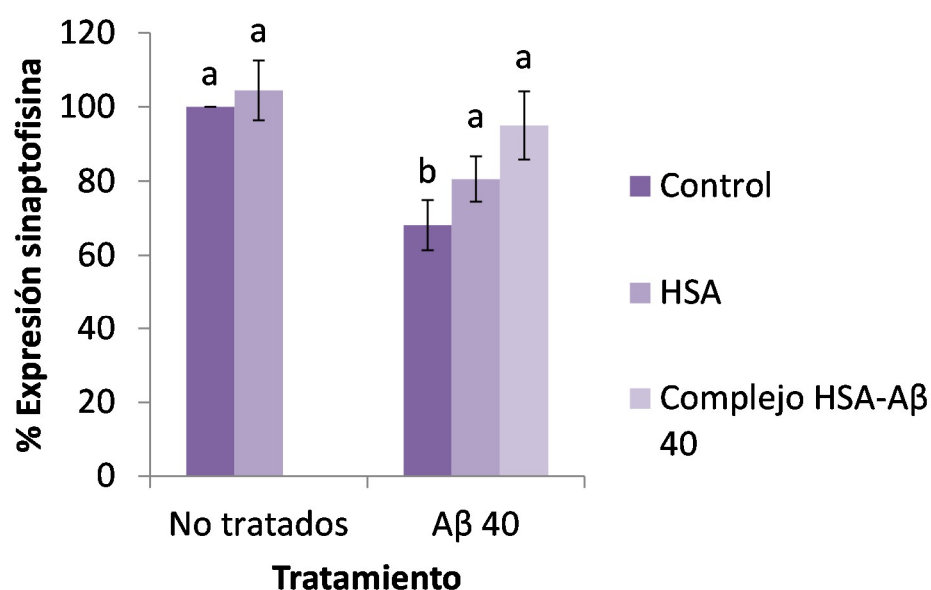


Figura 17. Efecto protector de la albúmina sérica sobre disminución de la expresión de sinaptofisina (Syp) producida por el β -amiloide 40. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio DMEM en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 40, HSA y complejo HSA-A β 40. Posteriormente se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante western-blot. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 10$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

En la figura 18 se representan las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de neuronas incubadas durante 2 horas con los diferentes tratamientos ensayados y sometidas a inmunocitoquímica para la proteína presináptica sinaptotagmina (en rojo) y la proteína postsináptica PSD-95 (en verde). La cuantificación de la fluorescencia por canales de estas imágenes, obtenida mediante la aplicación ImageJ, se recoge en la figura 19. Como podemos comprobar, ninguno de los tratamientos afecta a la cuantificación de la fluorescencia, pero sí se afecta en gran medida a la localización de los puntos de coincidencia (en amarillo en las imágenes). Una corta incubación de 2 horas con el A β 40, provoca una desorganización completa de los puntos de colocalización de las dos proteínas sinápticas, que se sitúan mayoritariamente en los somas neuronales, en lugar de los puntos de contacto entre las neuronas. De esta forma, estas proteínas no pueden llevar a cabo de manera correcta su función normal en el proceso sináptico, por lo que la comunicación interneuronal podría estar viéndose afectada. La adición de HSA al tratamiento con el A β 40, supone una ligera mejoría con respecto a la localización de sinaptotagmina y PSD-95, pero ésta sólo es evidente observada con el tratamiento con el complejo HSA-A β 40. De hecho, en estas circunstancias se observa una distribución de ambas proteínas y de los puntos de colocalización semejante a la situación control.

En resumen, para el A β 40, sólo se consigue protección completa al emplear el complejo con HSA. Es decir, este péptido requiere una interacción estrecha con la HSA para no ejercer sus efectos nocivos sobre las neuronas en cultivo primario. En estas circunstancias se consigue evitar los daños tanto a nivel global de viabilidad celular, como sobre la integridad de las sinapsis.

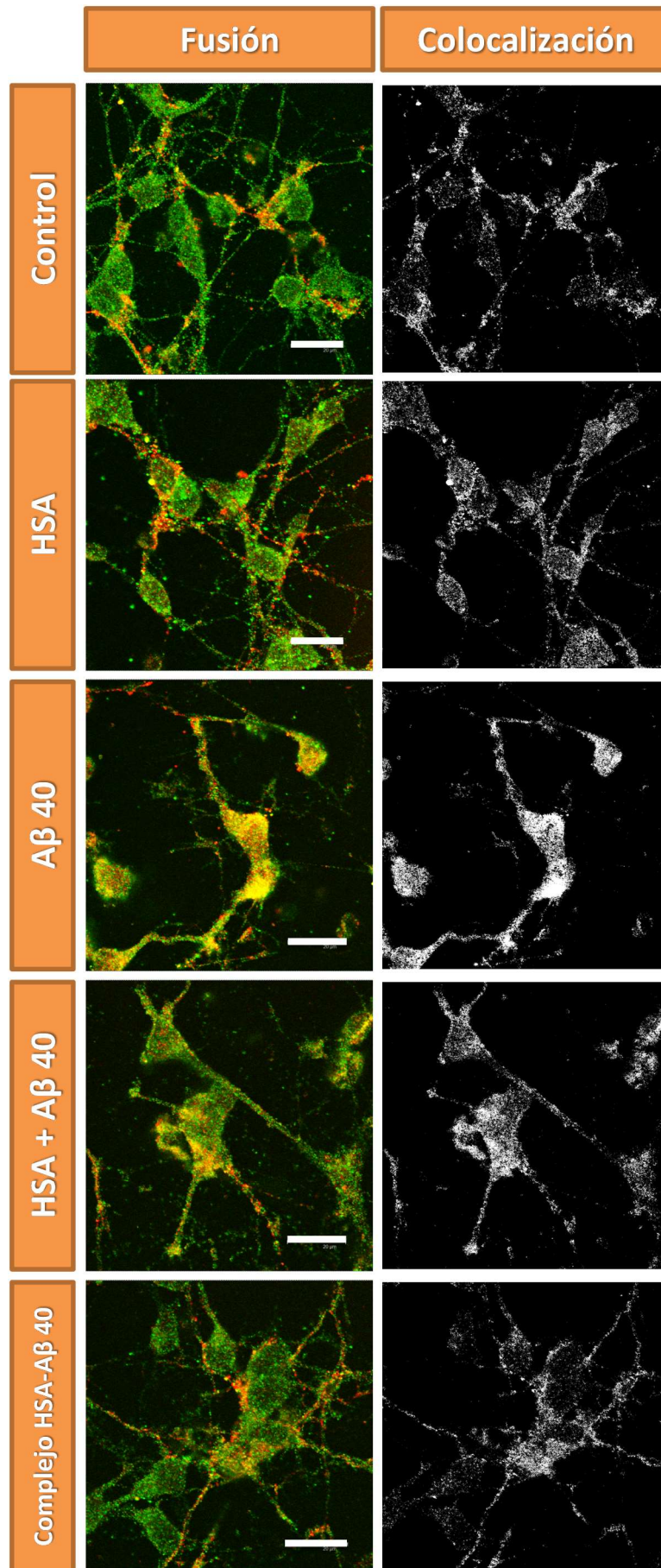


Figura 18. Efecto protector de la albúmina sérica frente a la deslocalización de la PSD-95 y la sinaptotagmina (Syt) provocada por el A β 40. Neuronas procedentes de un cultivo primario (4 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 40, HSA y complejo HSA-A β 40. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra PSD-95 (verde) y Syt (rojo). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Los puntos de colocalización de ambas proteínas se obtuvieron mediante la aplicación ImageJ. Escala: 20 μ m.

4.2.3. Efecto protector de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos del β -amiloide 42.

Por último, realizamos todos los ensayos considerados con anterioridad para valorar el posible papel protector de la HSA sobre los efectos deletéreos del A β 42 en cultivos primarios de neuronas.

En la figura 20A podemos observar como, de un modo muy similar a lo obtenido en el caso del A β 40 (figura 15), sólo el tratamiento con el complejo HSA-A β 42, es capaz de evitar la muerte neuronal provocada por el A β 42. El efecto protector es tal, que la viabilidad de las células incubadas con el complejo no es estadísticamente diferente a la del control.

En este caso y, a diferencia de lo que ocurre con el A β 40, la presencia de A β 42 induce un incremento estadísticamente significativo en la producción de ROS (en torno al 30%), que tal y como se muestra en la figura 20B, su acomplejamiento por parte de la HSA no es capaz de evitar. Por tanto, como ya vimos con anterioridad, la unión íntima de la HSA al A β –ya A β 40, ya A β 42- hace que la HSA pierda su capacidad antioxidante propia. A pesar de este hecho, y de que la producción de ROS en presencia del complejo HSA-A β 42 no es significativamente diferente de la inducida por el A β 42, se consigue evitar la muerte provocada por este péptido en los cultivos primarios de neuronas.

Si observamos la localización celular del A β 42 en nuestras distintas condiciones experimentales (figura 21), podemos comprobar que en su forma libre, en ausencia o presencia de la HSA, el péptido se encuentra íntimamente asociado a la membrana de las neuronas, llegando a entrar en las mismas. Por el contrario, en la forma acomplejada con HSA (complejo HSA-A β 42) no se observan esos acúmulos en la superficie de las células.

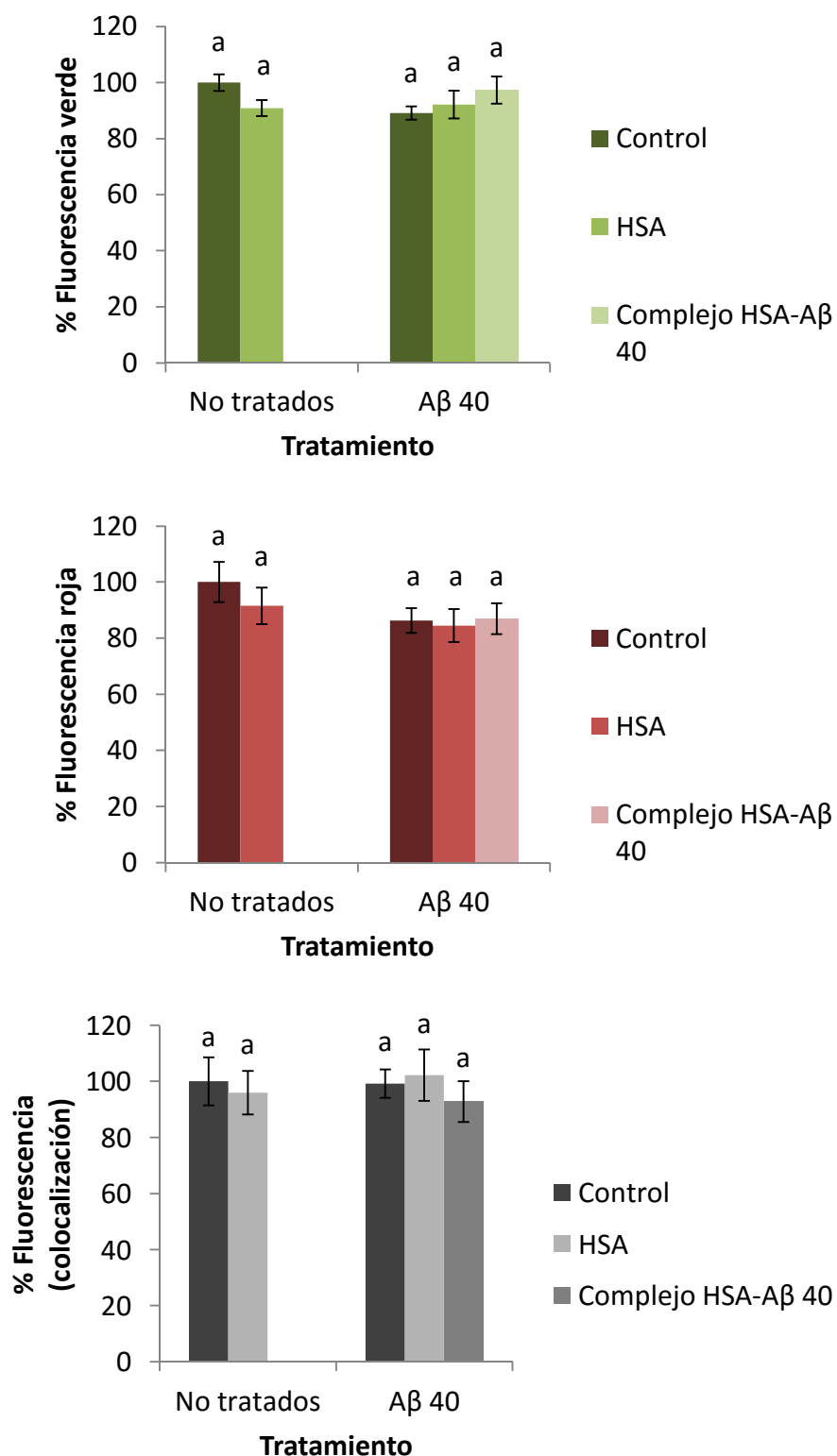


Figura 19. Cuantificación de la fluorescencia detectada en las imágenes de la figura anterior. La fluorescencia de colocalización se refiere a los puntos de coincidencia entre la fluorescencia verde (PSD-95) y la roja (sinaptotagmina). La cuantificación se llevó a cabo mediante la aplicación ImageJ. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 20$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

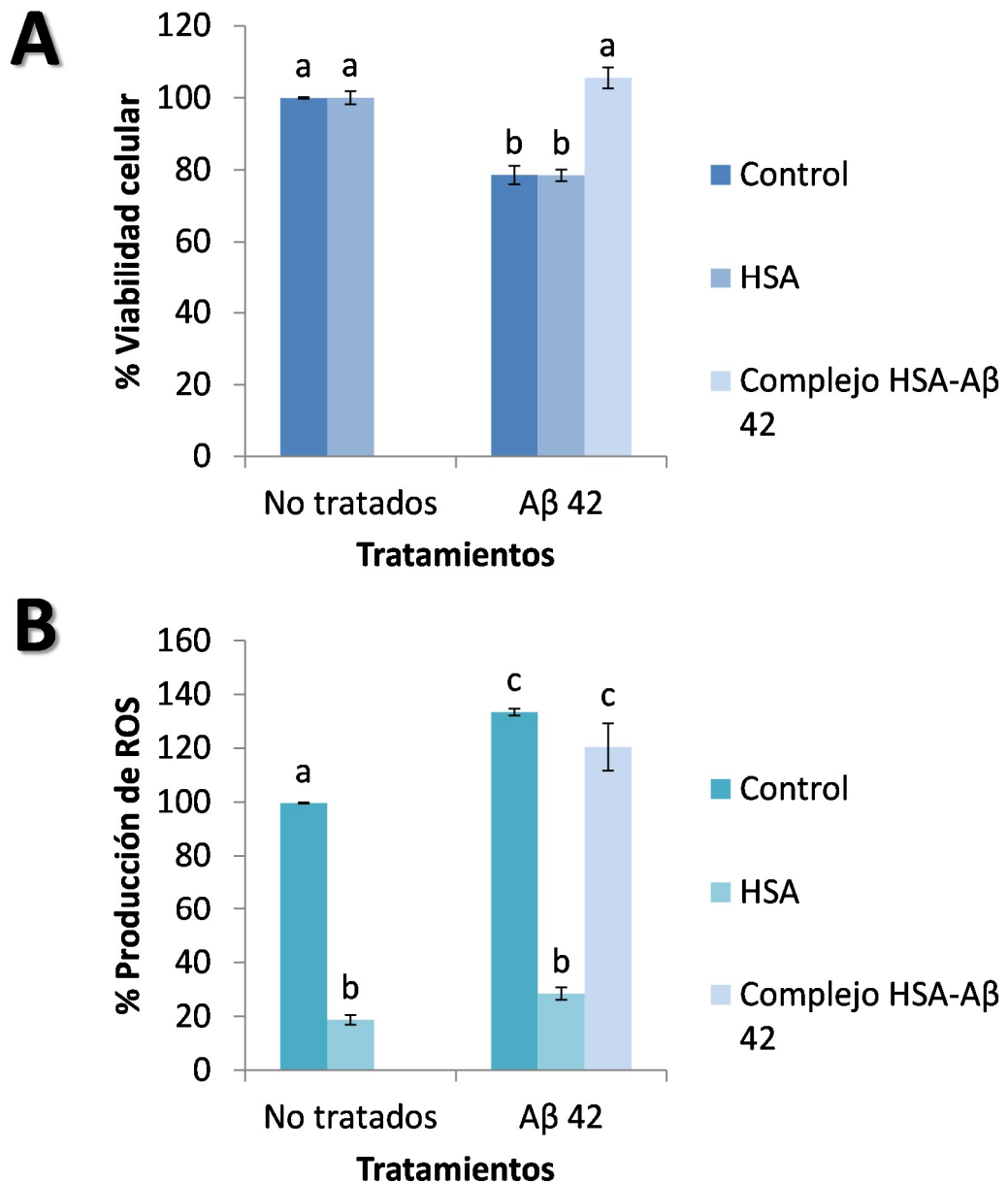


Figura 20. Efecto protector de la albúmina sérica sobre la muerte celular y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) producida por el β -amiloide 42. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 42, HSA y complejo HSA-A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 6$). La producción de ROS se normalizó con los datos de viabilidad. Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos entre sí se realizó un ANOVA de una vía y test Tukey. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes.

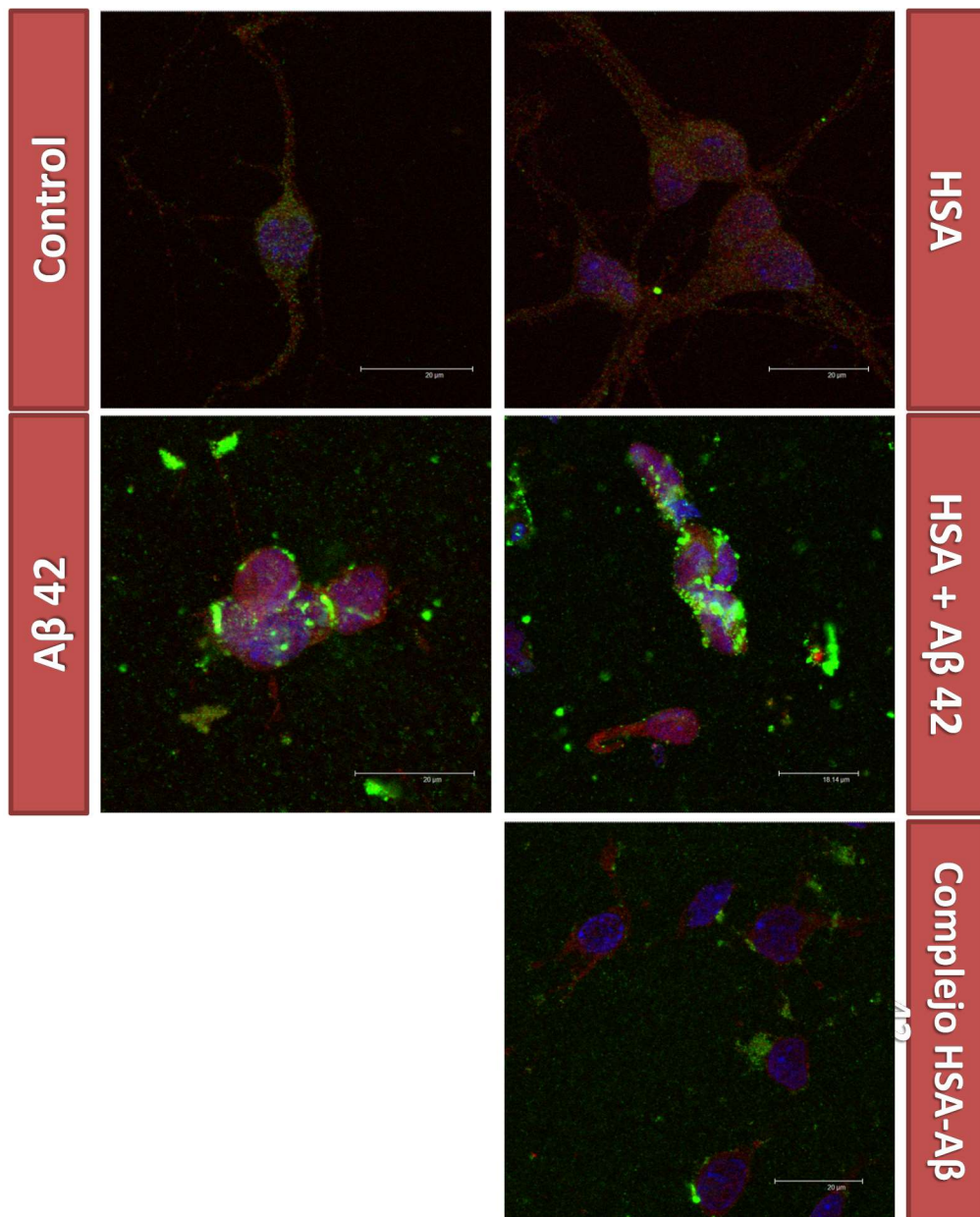


Figura 21. Localización celular del A β 42. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 42, HSA y complejo HSA-A β 42. A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra APP (verde) y Glut3 (rojo), y se tiñeron los núcleos (azul). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

Los efectos del A β 42 a nivel sináptico no son tan marcados como los observados para el A β 40. La exposición al A β 42 disminuye el nivel de expresión de la proteína presináptica sinaptofisina aproximadamente un 20% con respecto al valor control, como se aprecia en la figura 22. Este efecto se evita con el tratamiento con

HSA, en adición al A β , o en forma de complejo HSA-A β 42. En cuanto al papel del A β 42 en la localización de sinaptotagmina y PSD-95, como ya vimos en la figura 7, este péptido provoca la deslocalización de los puntos de coincidencia de ambas proteínas, pero no de forma tan pronunciada como el A β 40. Como se muestra en la figura 23, la adición de HSA supone una situación más similar al control, sin llegar a alcanzar la mejoría observada con el tratamiento con el complejo HSA-A β 42. En cualquier caso, ninguno de los tratamientos modifica la cuantificación de la fluorescencia de los canales verde y rojo, ni de los puntos de colocación (figura 24).

En síntesis, y de modo muy similar a lo dicho en el caso del A β 40, la HSA sólo es capaz de evitar los daños ejercidos por el A β 42 a nivel de viabilidad celular, expresión de proteínas sinápticas y localización de proteínas sinápticas, cuando se encuentra acomplejando a dicho péptido, no pudiendo hacerlo cuando la incubación es conjunta sin un acomplejamiento previo.

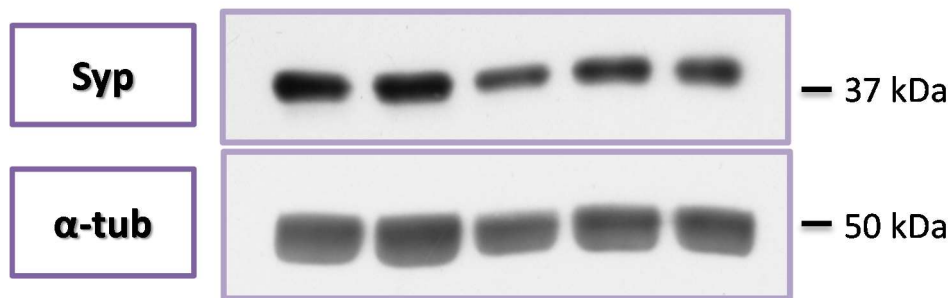
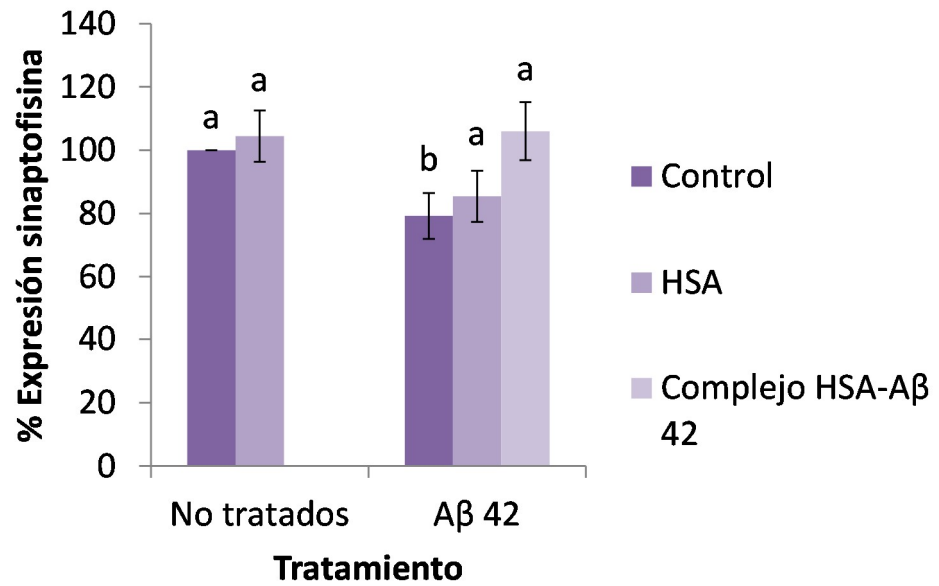
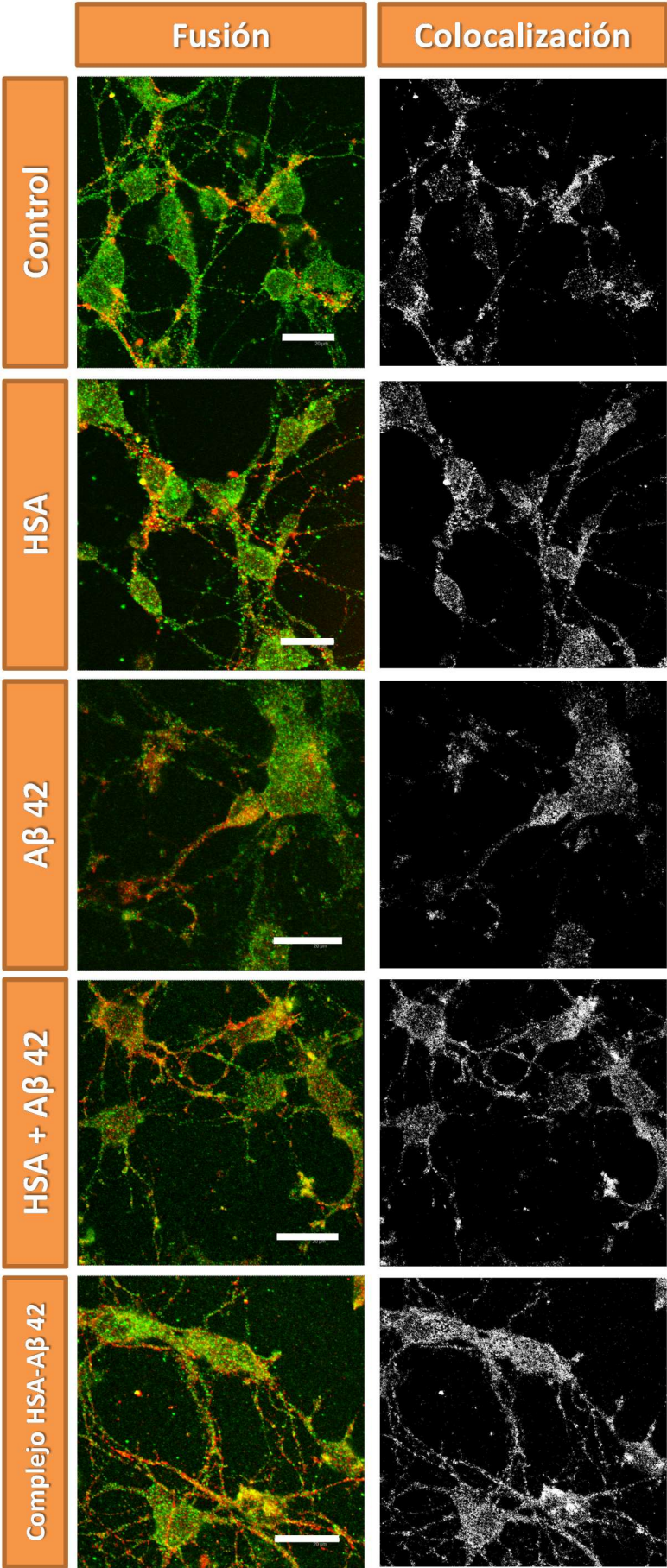


Figura 22. Efecto protector de la albúmina sérica sobre disminución de la expresión de sinaptofisina (Syp) producida por el β -amiloide 42. Neuronas procedentes de un cultivo primario (3 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio DMEM en ausencia o presencia (30 μ M) de A β 42, HSA y complejo HSA-A β 42. Posteriormente se extrajeron las proteínas y se analizaron mediante western-blot. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 9$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

Figura 23. Efecto protector de la albúmina sérica frente a la deslocalización de la PSD-95 y la sinaptotagmina (Syt) provocada por el A β 42. Neuronas procedentes de un cultivo primario (4 DIV) se incubaron durante 2 horas en medio Hanks en ausencia o presencia de A β 42, HSA y complejo HSA-A β 42 (30 μ M). A continuación se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra PSD-95 (verde) y Syt (rojo). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal. Los puntos de colocalización de ambas proteínas se obtuvieron mediante la aplicación ImageJ. Escala: 20 μ m.



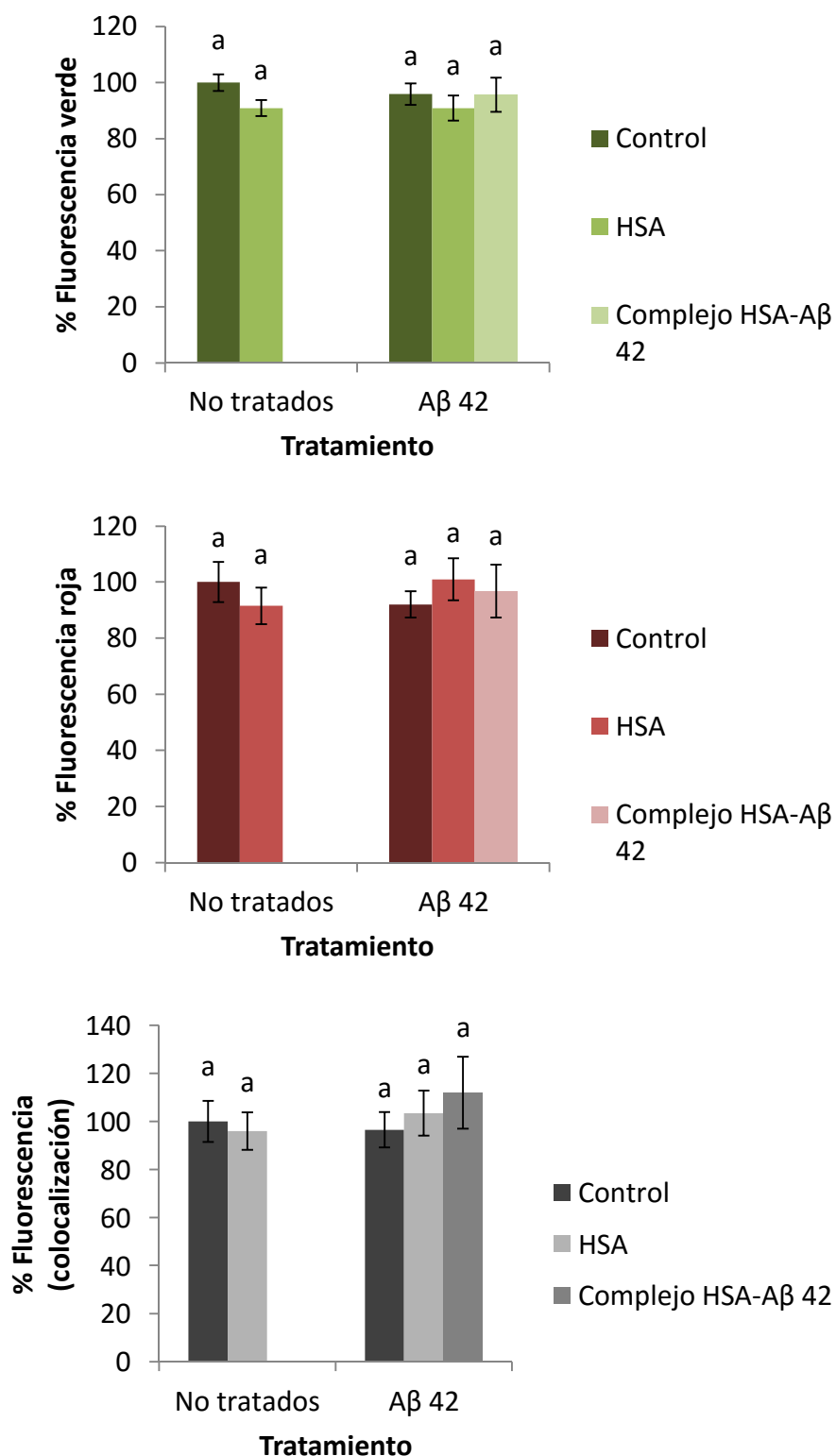


Figura 24. Cuantificación de la fluorescencia detectada en las imágenes de la figura anterior. La fluorescencia de colocalización se refiere a los puntos de coincidencia entre la fluorescencia verde (PSD-95) y la roja (sinaptotagmina). La cuantificación se llevó a cabo mediante la aplicación ImageJ. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 17$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes al control.

4.3. Efecto de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Del mismo modo que en el caso de las neuronas, quisimos valorar los efectos que tenían los diferentes péptidos β -amiloides (A β 25-35, A β 40, A β 42) sobre los astrocitos de rata en cultivo primario.

4.3.1. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad de astrocitos en cultivo primario.

Para estudiar el efecto de los β -amiloides, analizamos en primer lugar la viabilidad celular de los astrocitos en su presencia. De la misma forma que habíamos hecho en el caso de las neuronas (figura 1), expusimos astrocitos maduros durante 20 horas a distintas concentraciones de β -amiloide en medio Hanks, tras lo cual valoramos la viabilidad celular mediante la técnica colorimétrica del MTT, obteniendo así las curvas dosis-respuesta que se muestran en la figura 25.

En esta figura es posible observar como con los tres β -amiloides se alcanzan valores meseta de viabilidad con concentraciones muy bajas de péptido (en torno a 1,5 μ M). Además, ese valor meseta es muy similar para los tres péptidos, siendo aproximadamente un 45% de viabilidad celular (por tanto, un 55% de mortalidad). Si comparamos estos resultados con los obtenidos para las neuronas y representados en la figura 1, encontramos una diferencia muy importante; mientras en el caso del cultivo primario de neuronas los A β 40 y A β 42 sólo disminuyen la viabilidad un 20%, en el cultivo primario de astrocitos se alcanza una disminución del casi 60% en ambos casos. En cuanto al A β 25-35, el valor de viabilidad a la concentración máxima de 30 μ M es aproximadamente del 45% tanto en neuronas como en astrocitos, sin embargo, en el cultivo de astrocitos se alcanza ya con concentraciones mucho menores, no así en el cultivo de neuronas.

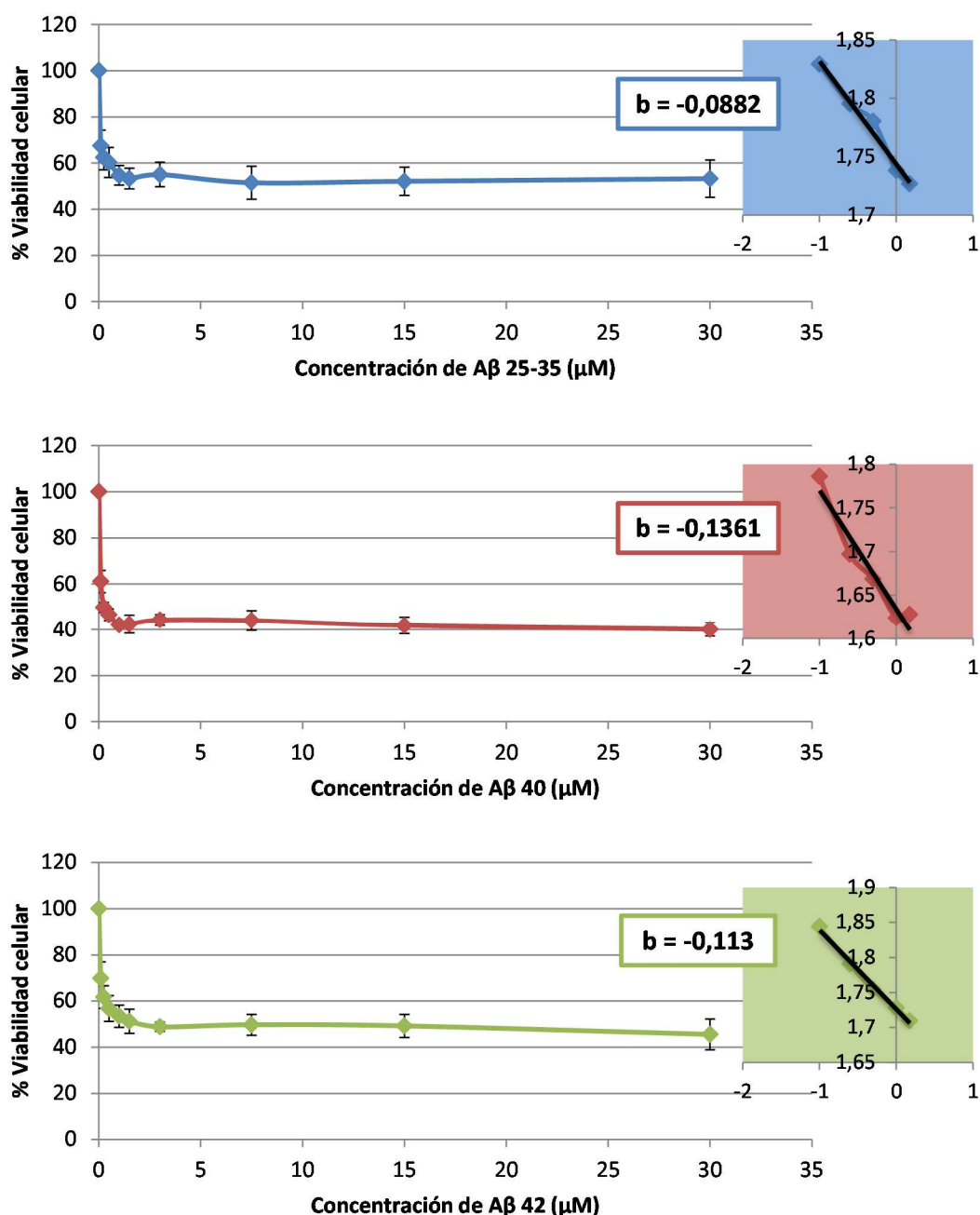


Figura 25. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular frente a los diferentes β-amiloides en astrocitos en cultivo primario. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en presencia de los péptidos β-amiloides: Aβ 25-35, Aβ 40 y Aβ 42 a concentraciones crecientes. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto a la viabilidad en ausencia de los péptidos y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). El término b es la pendiente de la regresión lineal para cada péptido de los 6 primeros pares de valores representados en escala bilogarítmica.

Como hicimos al estudiar el efecto de los β-amiloides en neuronas, también en este caso analizamos la relación viabilidad-concentración de β-amiloide para los primeros seis pares de valores, realizando una regresión lineal de dichos valores

representados en escala bilogarítmica (figura 25, inserto), y obteniendo así la pendiente (b). Mediante este número, podemos valorar la dependencia de la viabilidad celular con respecto a la concentración del péptido. Así, en los astrocitos, la dependencia con respecto a la concentración es mayor en el caso del A β 40; es decir, muy pequeñas variaciones en la concentración de este péptido suponen mayores variaciones en la viabilidad que en el caso del A β 42 y del A β 25-35. Además, en comparación con las neuronas (figura 1), el valor b es más del doble para los tres péptidos, siendo incluso cuatro veces superior para el A β 40.

Por tanto, los astrocitos parecen ser más sensibles que las neuronas a los β -amiloides, ya que en las mismas condiciones experimentales no sólo se alcanzan valores mucho menores de viabilidad celular ante la exposición a los péptidos, sino que pequeños aumentos de concentración de los mismos causan mayores disminuciones de viabilidad en los astrocitos que las observadas en neuronas.

Aunque a partir de los datos obtenidos mediante las curvas dosis-respuesta podríamos haber empleado una concentración menor, decidimos mantener para los experimentos posteriores la concentración de 30 μ M empleada siempre con las neuronas. Así, en la figura 26 resumimos los datos para esta concentración, reflejando que la disminución de la viabilidad de los astrocitos tratados con los tres β -amiloides es estadísticamente significativa con respecto al control, y siendo –como ya dijimos con anterioridad– superior al 50%.

Además, quisimos valorar el efecto de los β -amiloides sobre la morfología de los astrocitos. En las imágenes de contraste de fases (figura 26) se observa que el tratamiento con los péptidos provoca un aumento de la reactividad de los astrocitos, alterándose la monocapa, y apareciendo células muertas.

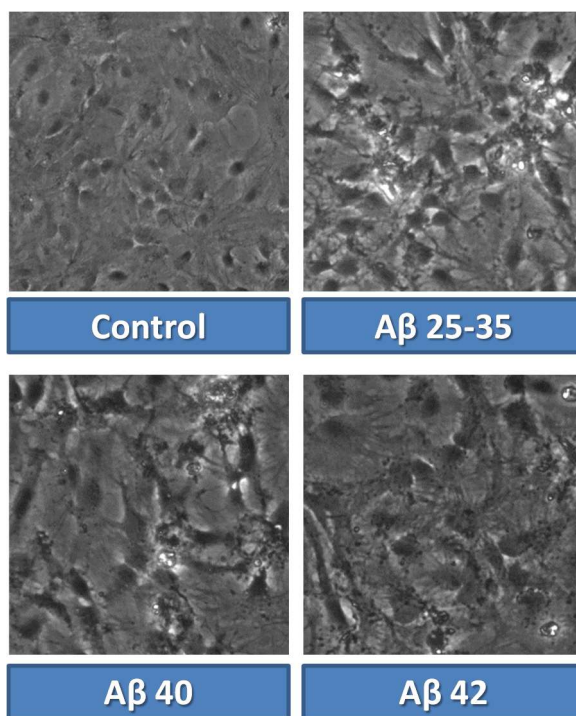
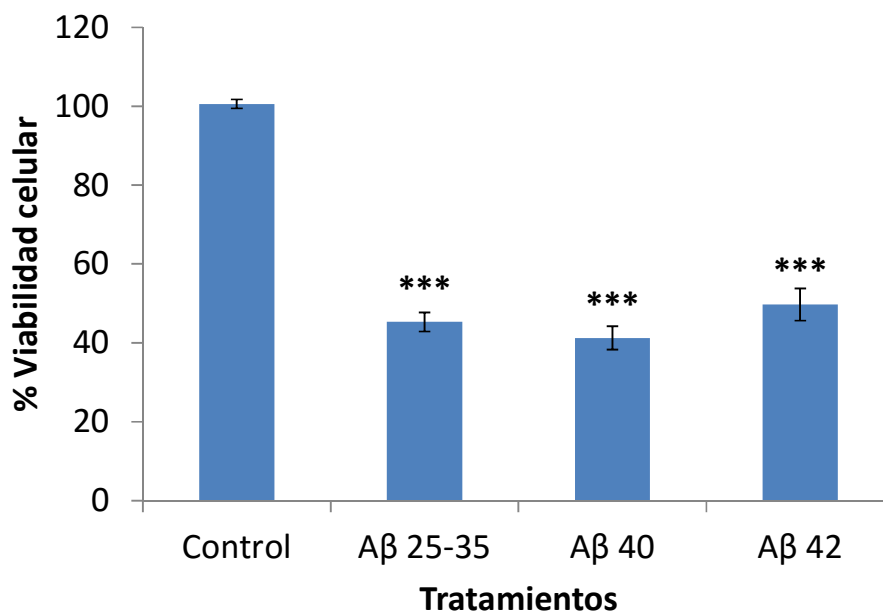


Figura 26. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad y morfología de los astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 11$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$. Las fotografías de contraste de fases muestran que los astrocitos presentan una mayor reactividad en presencia de los β -amiloides.

4.3.2. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de ROS en astrocitos en cultivo primario.

Una vez comprobado que los tres β -amiloides reducían de forma altamente significativa la viabilidad de los astrocitos en cultivo primario, quisimos analizar si, como en el caso de las neuronas, provocaban un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Para ello, incubamos astrocitos de entre 18 y 21 DIV durante 20 horas en ausencia o presencia de los péptidos (30 μ M). Transcurrido ese tiempo determinamos la producción de ROS, normalizando los datos con la viabilidad celular observada en estas circunstancias.

Los resultados obtenidos se resumen en la figura 27. Como podemos apreciar, los tres β -amiloides provocan un incremento altamente significativo en la producción de ROS con respecto al control. La producción de ROS en los tres casos es superior al 200%, y casi del 300% en el tratamiento con el A β 40.

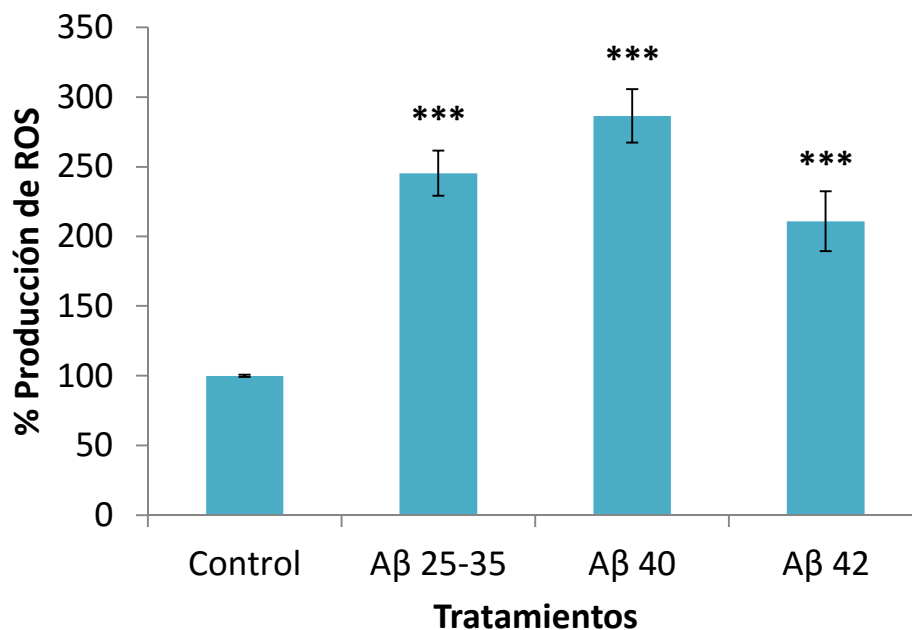


Figura 27. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se normalizaron utilizando los datos de viabilidad celular y se expresan como porcentajes con respecto al control siendo medias \pm SEM ($n \geq 9$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$.

4.3.3. Evolución de la viabilidad de los astrocitos con respecto al tiempo de exposición a los diferentes β -amiloides.

Una vez constatado el efecto dramático de los tres β -amiloides sobre los cultivos primarios de astrocitos, incluso en concentraciones muy bajas, decidimos estudiar sus efectos con respecto al tiempo. Para ello, expusimos los astrocitos durante diferentes tiempos a concentraciones 30 μ M. Al analizar la viabilidad celular transcurridos esos tiempos, pudimos comprobar que el efecto además de muy marcado era muy rápido. Como se refleja en la figura 28, transcurrida media hora de exposición a los péptidos se observa una disminución de 20% en la viabilidad de los astrocitos con los tres β -amiloides ensayados. A las 4 horas de tratamiento ya se alcanzan los valores mínimos de viabilidad (alrededor del 40%), que no decrecen aun aumentando el tiempo de exposición.

De acuerdo con estos datos, decidimos que para experimentos posteriores, podríamos emplear tiempos más cortos de tratamiento, escogiendo para ello 1 hora de exposición a los β -amiloides. En la figura 29 se representan los datos de viabilidad celular y producción de ROS para astrocitos tratados durante 1 hora con los tres péptidos β -amiloides.

En cuanto a la viabilidad celular, el tratamiento de 1 hora con cualquiera de los péptidos produce una mortalidad de aproximadamente el 40% con respecto al control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En el caso de la producción de ROS, los niveles tras sólo una hora de exposición a los β -amiloides ya se sitúan en torno al 200% con respecto a los astrocitos no tratados, provocando el A β 40 un incremento en la producción de ROS ligeramente superior al A β 25-35 y el A β 42.

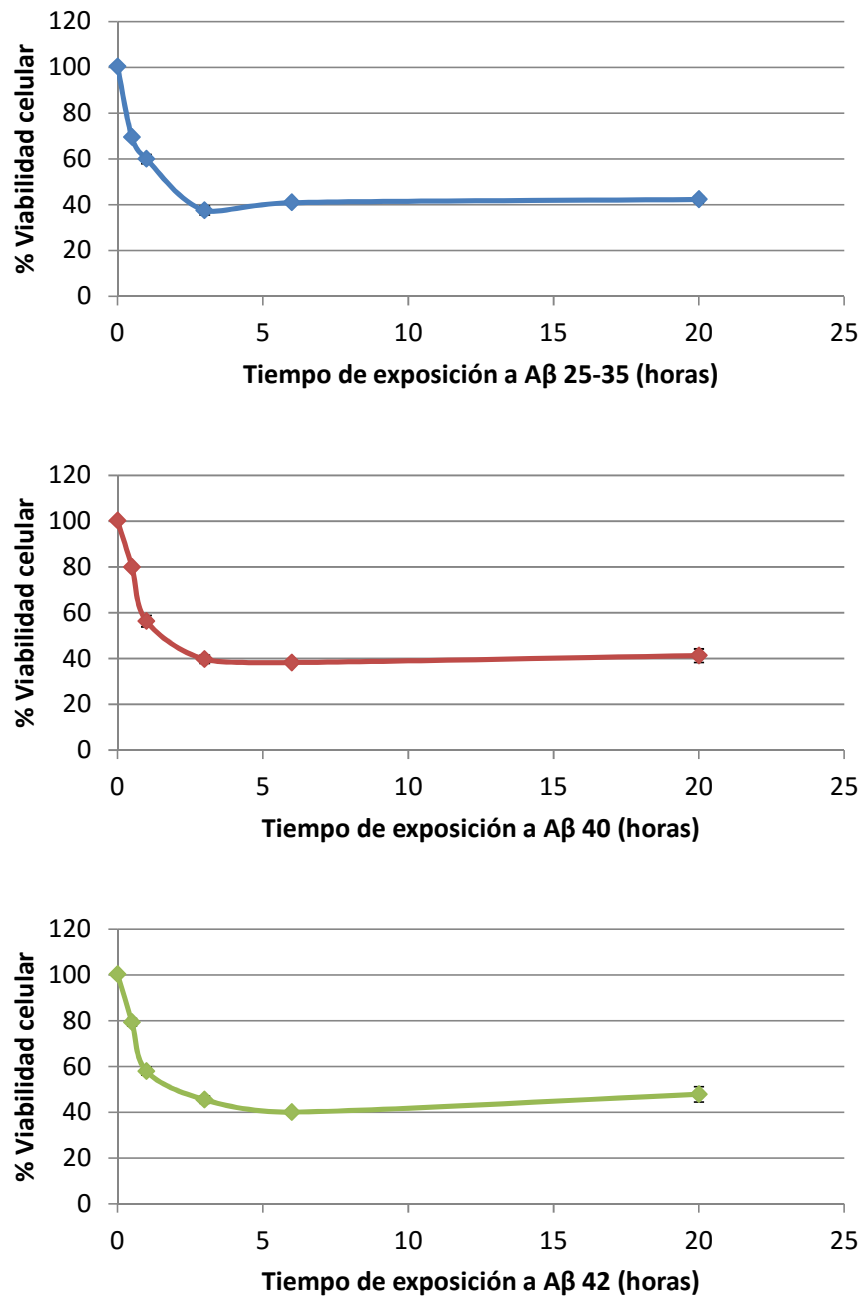


Figura 28. Evolución de la viabilidad celular de los astrocitos con respecto al tiempo de exposición a los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante tiempos crecientes en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al tiempo 0 y son medias \pm SEM ($n \geq 3$).

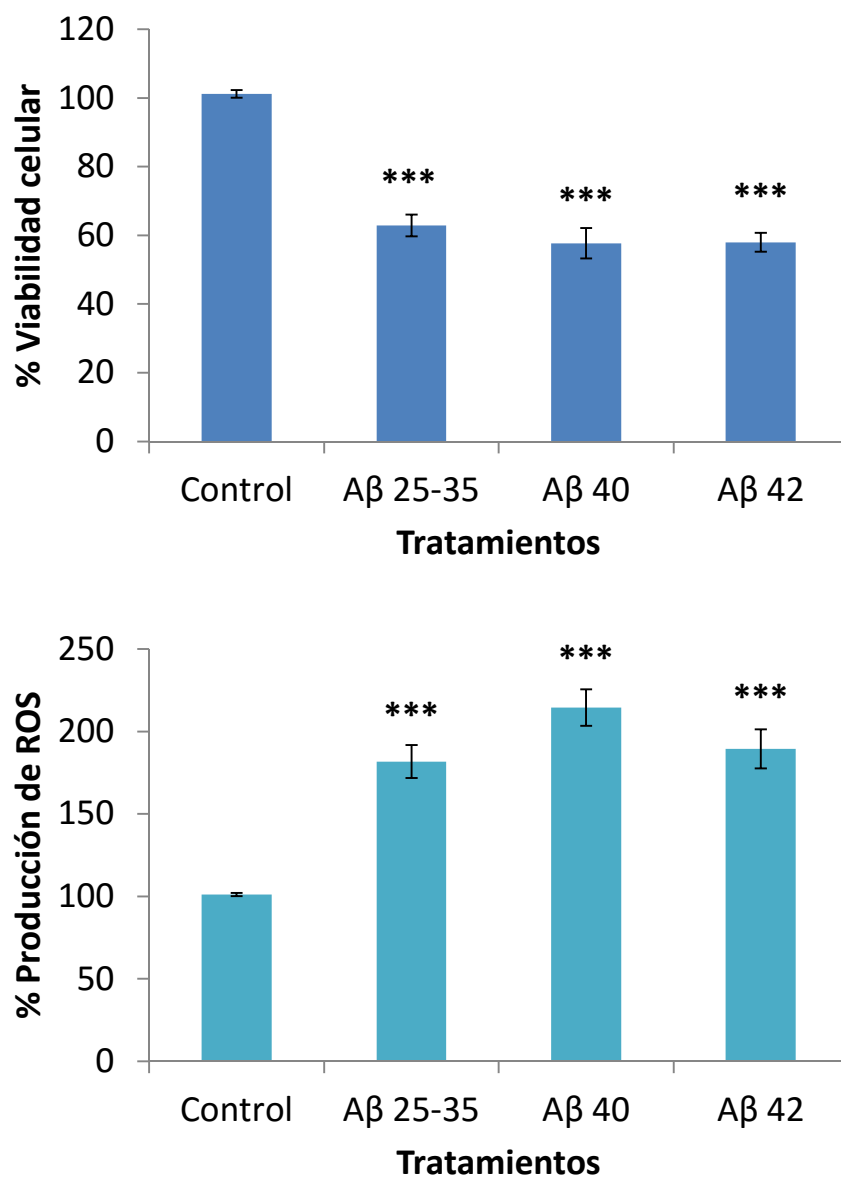


Figura 29. Efecto a corto plazo de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad celular y sobre producción de radicales libres de oxígeno (ROS) en astrocitos en cultivo primario. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 5$). La producción de ROS se normalizó con los datos de viabilidad. Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$.

4.3.4. Inmunolocalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Recapitulando los apartados anteriores, habíamos comprobado que los β -amiloides tenían un efecto rápido y dramático sobre los astrocitos en cultivo primario, incluso a concentraciones muy bajas. Nuestro siguiente objetivo fue investigar si ese daño tan evidente lo causaban desde fuera de las células o si, por el contrario, los péptidos podían entrar en los astrocitos. Para averiguarlo, incubamos astrocitos durante 1 hora en ausencia o presencia de los tres β -amiloides, tras lo cual fueron fijados con paraformaldehído al 4%. A continuación realizamos una inmunocitoquímica contra GFAP (una proteína característica de astrocitos; marcada en rojo) y contra los diferentes β -amiloides (marcados en verde). En la figura 30 aparecen las imágenes tomadas mediante microscopía confocal y en la figura 31 se muestran a mayores aumentos algunas regiones de los mismos campos.

En primer lugar, observamos que los tres péptidos β -amiloides parecen entrar en los astrocitos, aunque el patrón de distribución es muy diferente para cada uno de ellos. Así, el A β 25-35 se distribuye de forma bastante homogénea por todo el interior celular, siendo el marcaje ligeramente más tenue en la región nuclear. Además, el tratamiento con este péptido parece afectar al marcaje de GFAP, que se observa reducido con respecto al control. En los astrocitos tratados con el A β 40, llama la atención la presencia de acúmulos de β -amiloide tanto en las células como entre las mismas. Esta señal tan intensa dificulta observar un marcaje más ligero, que ocupa todo el tapiz celular, salvo las regiones de los núcleos, que aparecen sin señal alguna. Por último, en el tratamiento con el A β 42, se observa que el péptido penetra dentro de los astrocitos, siendo el marcaje muy intenso y homogéneo, incluso en los núcleos celulares, lo que resulta muy llamativo.

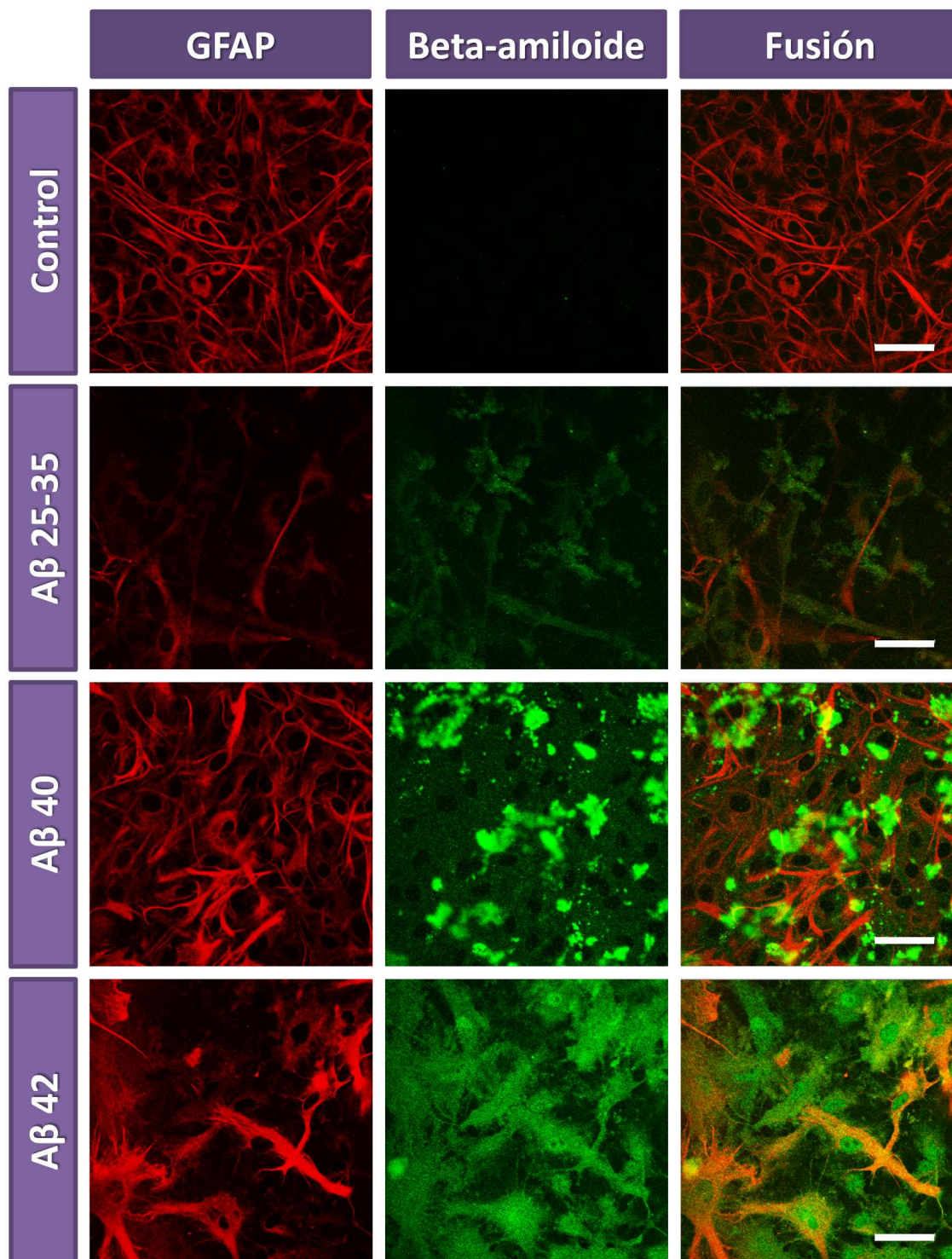


Figura 30. Localización celular de los diferentes β -amiloides. Astrocytos procedentes de un cultivo primario (21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Las imágenes se captaron mediante microscopía confocal. Escala: 50 μ m.

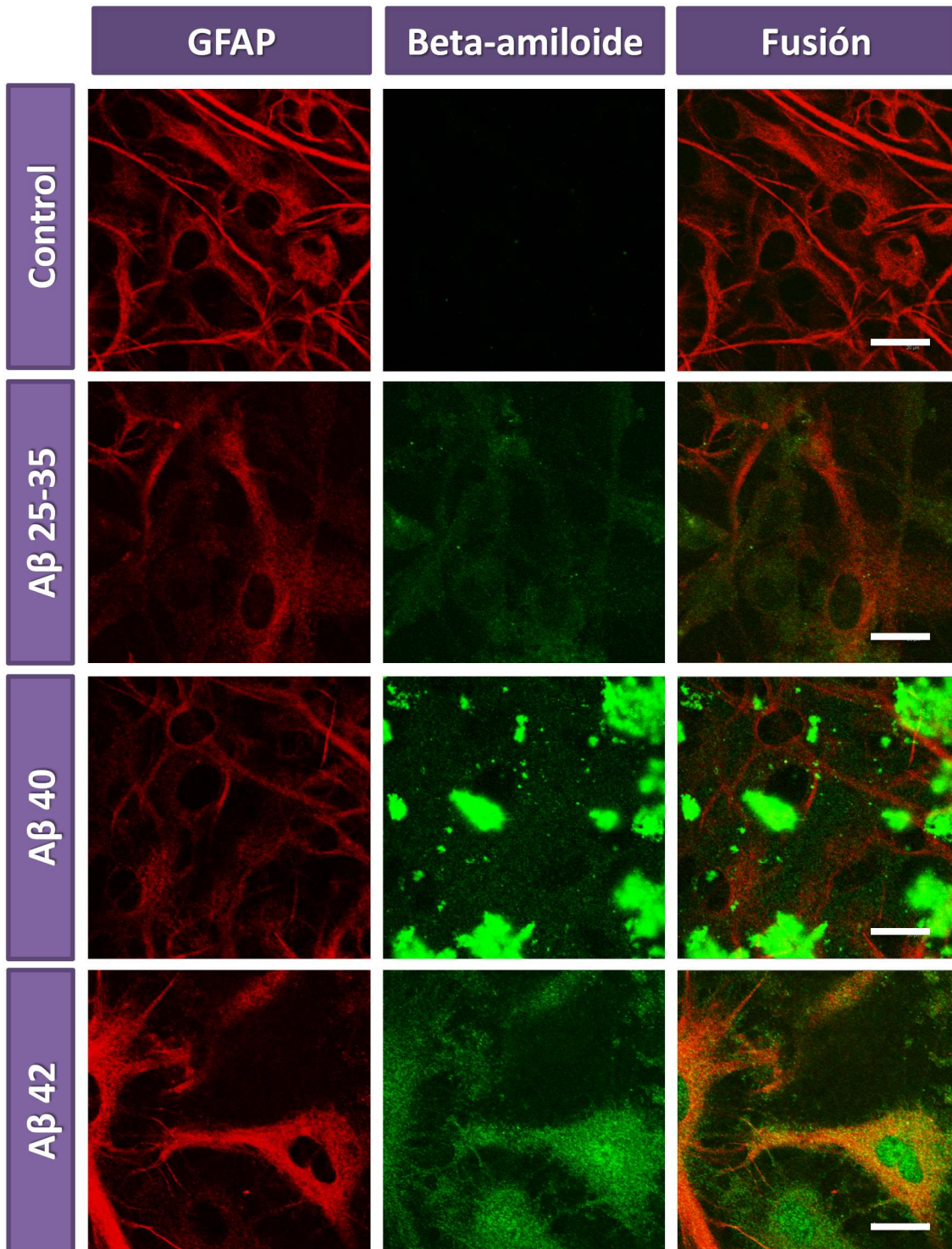


Figura 31. Ampliación de las imágenes de la figura anterior. Astrocytos procedentes de un cultivo primario (21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Las imágenes se captaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

4.4. Internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Cuando comprobamos que los β -amiloides eran internalizados por los astrocitos, quisimos ahondar en los mecanismos que podrían estar participando en la internalización de los mismos. Para ello, investigamos el efecto de diferentes factores como la temperatura, el uso de inhibidores y el silenciamiento de ciertas proteínas sobre el efecto de los β -amiloides.

4.4.1. Efecto de la temperatura sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

En primer lugar, para comprobar si la entrada de los β -amiloides en los astrocitos se produce por un mecanismo pasivo o es un proceso de endocitosis, valoramos el efecto de la temperatura en la viabilidad de los astrocitos en presencia de los péptidos.

Para ello, tras dos lavados con PBS frío (4°C), incubamos los astrocitos durante 30 minutos –bien a 4°C, bien a 37°C- en ausencia o presencia de los tres β -amiloides. A continuación valoramos la viabilidad celular. Los datos obtenidos se resumen en la figura 32, donde podemos apreciar que a 4°C, la disminución de la viabilidad por la presencia de los péptidos es pequeña (A β 25-35: 9%; A β 40: 6%; A β 42: sin disminución). Las diferencias con el control son estadísticamente significativas en el caso del A β 25-35 y el A β 40. A 37°C, sin embargo, la caída de la viabilidad de los astrocitos es mucho mayor, de aproximadamente un 30% en los tres casos, siendo las diferencias altamente significativas con respecto al control. También comprobamos que las diferencias de viabilidad para cada péptido, entre las dos temperaturas de incubación empleadas, eran para los tres β -amiloides estadísticamente significativas.

Constatado un efecto claro de la temperatura sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los β -amiloides, quisimos comprobar si éste era debido a una menor entrada de los péptidos en las células. Para ello, astrocitos incubados en presencia de los β -amiloides a 4°C o 37°C durante 30 minutos, se fijaron y se sometieron a una inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Posteriormente, se tomaron imágenes mediante microscopía confocal. Como

podemos observar en la figura 33, 30 minutos de incubación con los péptidos a 37°C son suficientes para observarlos dentro de los astrocitos. Sin embargo, cuando el tratamiento se realiza a 4°C la internalización es mucho menor.

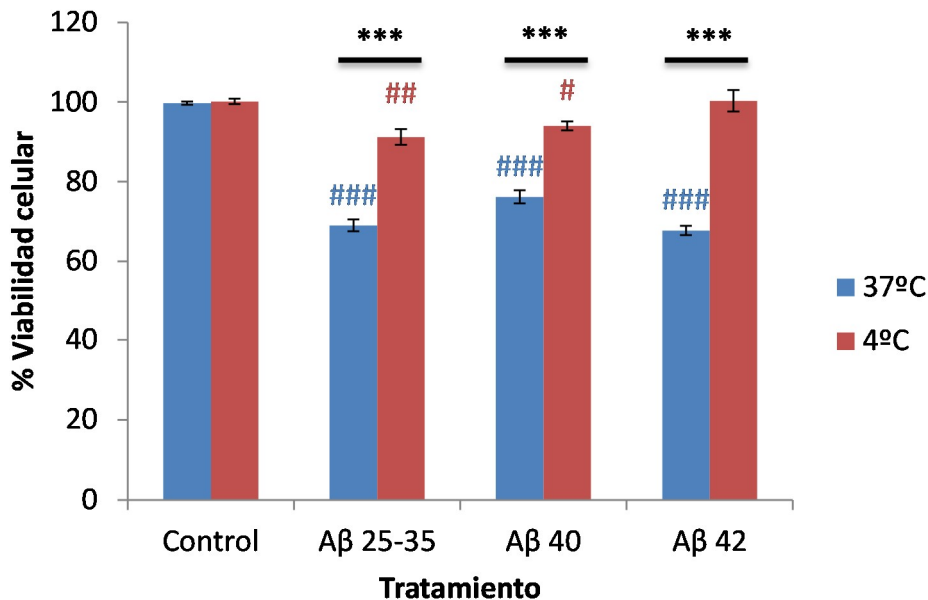


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron a 4°C o 37°C durante 30 minutos en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

Todo este conjunto de datos parece indicar que los β -amiloides han de entrar en los astrocitos para ejercer su efecto nocivo sobre ellos, y que esa internalización estaría mediada por un proceso de endocitosis, ya que hemos comprobado que es dependiente de la temperatura. Este hecho se cumple especialmente en el caso del A β 42, cuyo tratamiento a 4°C no disminuye la viabilidad celular con respecto al control (figura 32), y apenas se observa péptido en el interior de los astrocitos incubados a esta temperatura (figura 33).

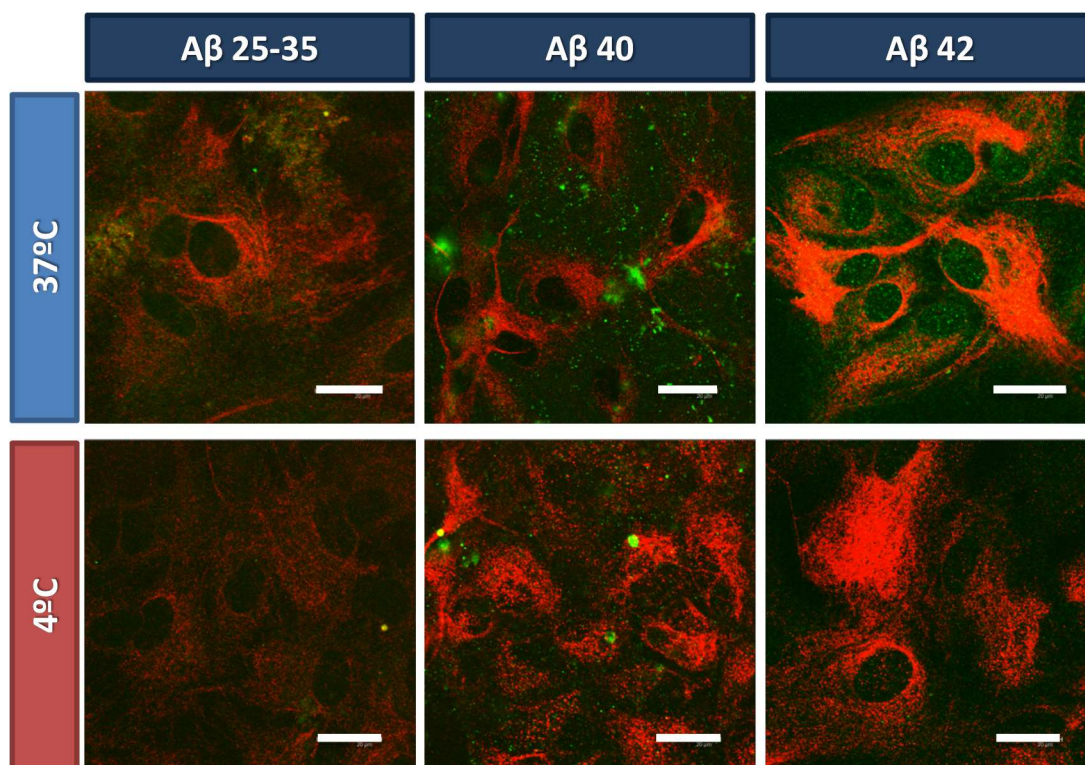


Figura 33. Efecto de la temperatura sobre la internalización del β -amiloide en astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron a 4°C o 37°C durante 30 min en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

4.4.2. Efecto de la clorpromazina sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Establecida la endocitosis como el mecanismo de entrada de los β -amiloides en los astrocitos, decidimos investigar cuál o cuáles de los diferentes tipos de endocitosis podrían estar implicados en la internalización de los β -amiloides.

El proceso de endocitosis más habitual es el mediado por clatrina. Para estudiar su participación en la internalización de los β -amiloides empleamos un inhibidor específico de este tipo de endocitosis, la clorpromazina (Wang *et al.* 1993). Los astrocitos se preincubaron en ausencia o presencia de clorpromazina (10 μ g/mL) durante 1 hora y, a continuación, se incubaron durante 1 hora en ausencia o presencia de los β -amiloides (30 μ M). Transcurrido este tiempo se valoró la viabilidad celular.

De un modo similar a lo que observábamos con la temperatura (figura 32), la clorpromazina provoca que el efecto de los β -amiloides sobre los astrocitos sea mucho menor (figura 34). Así, es un 20% menor en el tratamiento con el A β 25-35, un 25% con el A β 40 y más de un 30% con el A β 42, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en los tres casos.

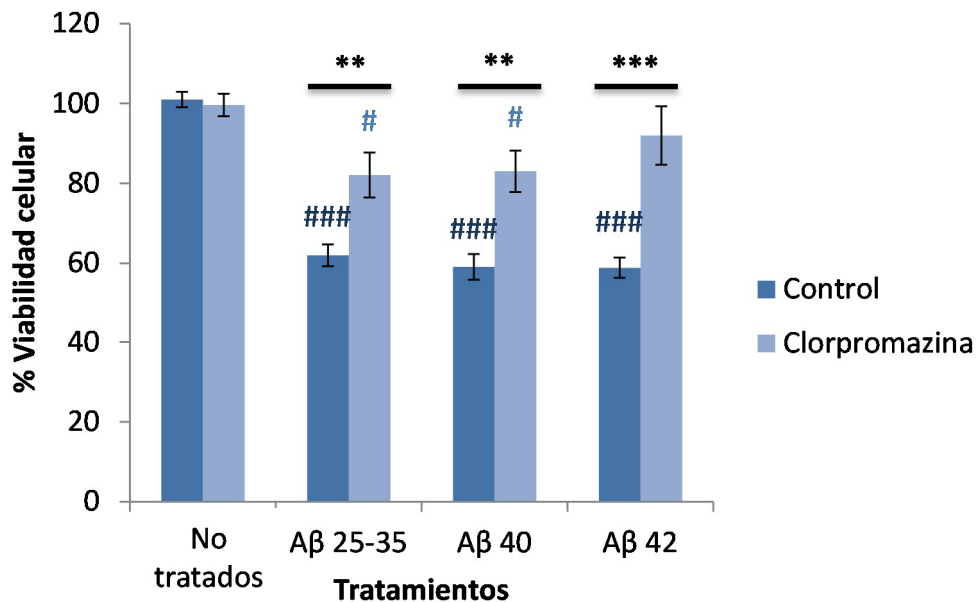


Figura 34. Efecto de la clorpromazina sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de clorpromazina (10 μ g/ml). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

Comprobado este efecto sobre la viabilidad celular de los astrocitos, estudiamos si también estaba mediado por una disminución de la internalización de los péptidos. Para ello realizamos una inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra los β -amiloides (en verde), en ausencia o presencia de clorpromazina, en astrocitos incubados con los tres péptidos. Como podemos apreciar en la figura 35, el tratamiento con clorpromazina reduce de forma muy evidente la internalización de los β -amiloides. Estos hechos sugieren que la endocitosis mediada por clatrina participa en la internalización de los β -amiloides en astrocitos.

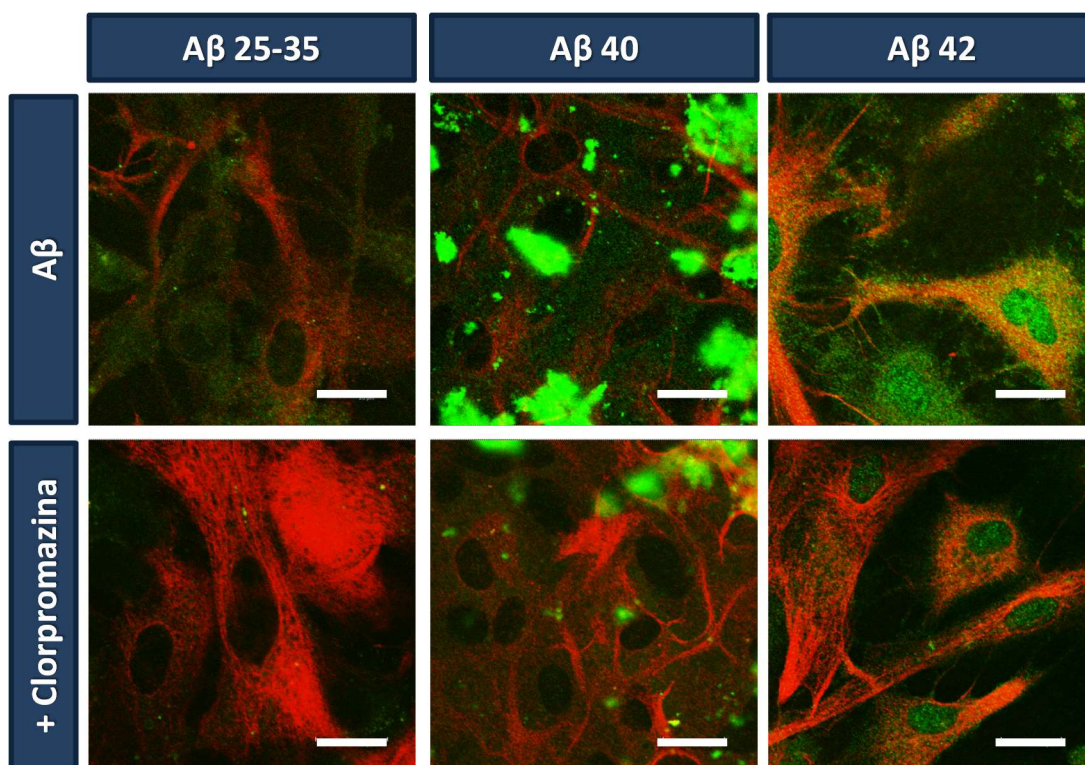


Figura 35. Efecto de la clorpromazina sobre la internalización del β -amiloide en astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloide: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de clorpromazina (10 μ g/ml). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

4.4.3. Efecto de la ciclodextrina sobre la internalización de los diferentes β -amiloide en astrocitos en cultivo primario.

Para continuar evaluando las posibles vías de internalización de los β -amiloide en astrocitos, decidimos investigar la endocitosis mediada por caveolas, utilizando metil- β -ciclodextrina, un inhibidor de esta ruta (Chang *et al.* 1992).

Los astrocitos fueron preincubados durante 30 min en ausencia o presencia de ciclodextrina (25 mM), e incubados 1 hora en ausencia o presencia de los tres β -amiloide. A continuación valoramos la viabilidad celular. En la figura 36, donde se reflejan los resultados obtenidos, observamos que el tratamiento con este inhibidor no supone ninguna diferencia con respecto al efecto que ejercen los péptidos por sí solos. Estos resultados sugieren que la endocitosis mediada por caveolas no participaría en la internalización de los β -amiloide en astrocitos.

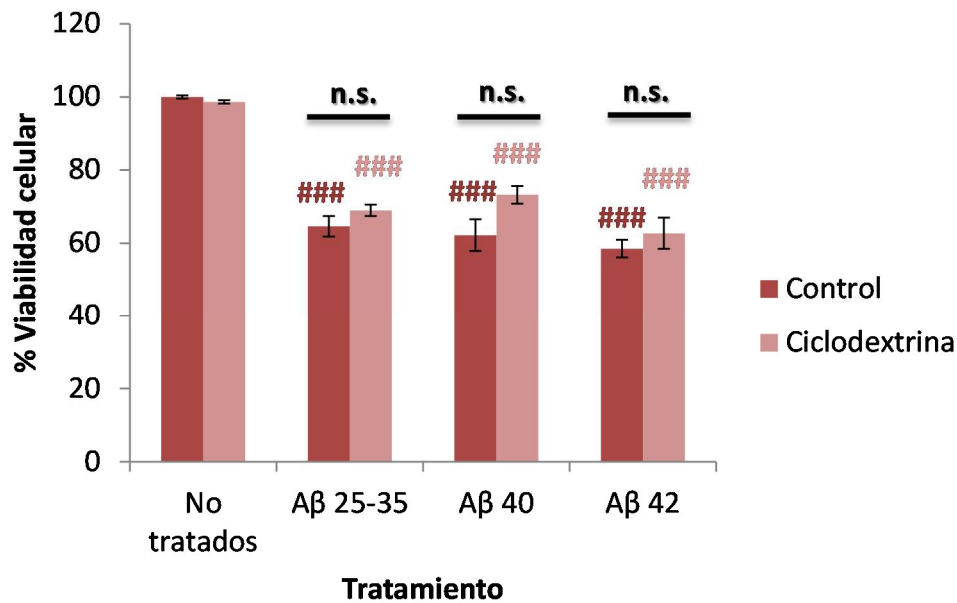


Figura 36. Efecto de la ciclodextrina sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de ciclodextrina (25 mM). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, n.s.: no significativo.

4.4.4. Efecto del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Una vez estudiadas las dos principales rutas endocíticas de las células, pasamos a considerar la posible participación de receptores de membrana en la internalización de los β -amiloides. En primer lugar, valoramos el efecto del óxido de fenilarsina (PAO), que inhibe la internalización de los receptores de membrana al inhibir las tirosina fosfatasas (Garcia-Morales *et al.* 1990).

Para ello, preincubamos los astrocitos durante 20 minutos en ausencia o presencia de PAO (1 μ M) y, a continuación, 1 hora en ausencia o presencia de los diferentes β -amiloides, valorando posteriormente la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con PAO reduce significativamente los efectos de los tres β -amiloides: un 20% en el caso de los A β 25-

35 y A β 40, y un 25% en el A β 42 (figura 37). En resumen, la presencia de PAO disminuye los efectos de los β -amiloides sobre los astrocitos, de manera similar a lo observado con las bajas temperaturas y el tratamiento con clorpromazina.

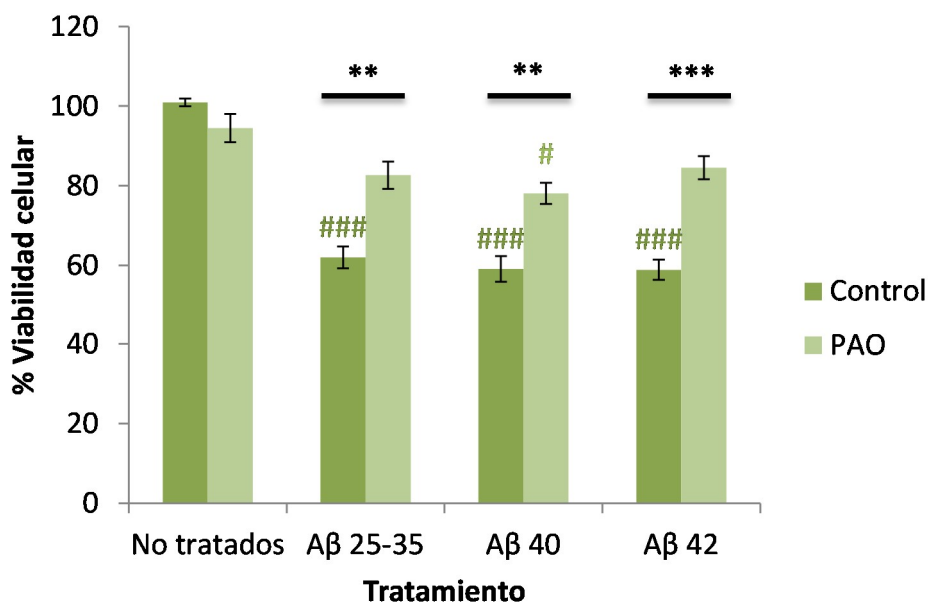


Figura 37. Efecto del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de PAO (1 μ M). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

Como en los casos anteriores, comprobamos si este efecto estaba vinculado con una menor entrada de los β -amiloides en los astrocitos. Así, sometimos a astrocitos incubados en ausencia o presencia de PAO y tratados durante 1 hora con los péptidos, a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y β -amiloide (en verde). En las imágenes captadas mediante microscopía confocal y mostradas en la figura 38 se observa que el tratamiento con PAO disminuye efectivamente la entrada de los β -amiloides en las células, lo que sugiere que en la internalización de los β -amiloides en los astrocitos estaría participando un receptor de membrana.

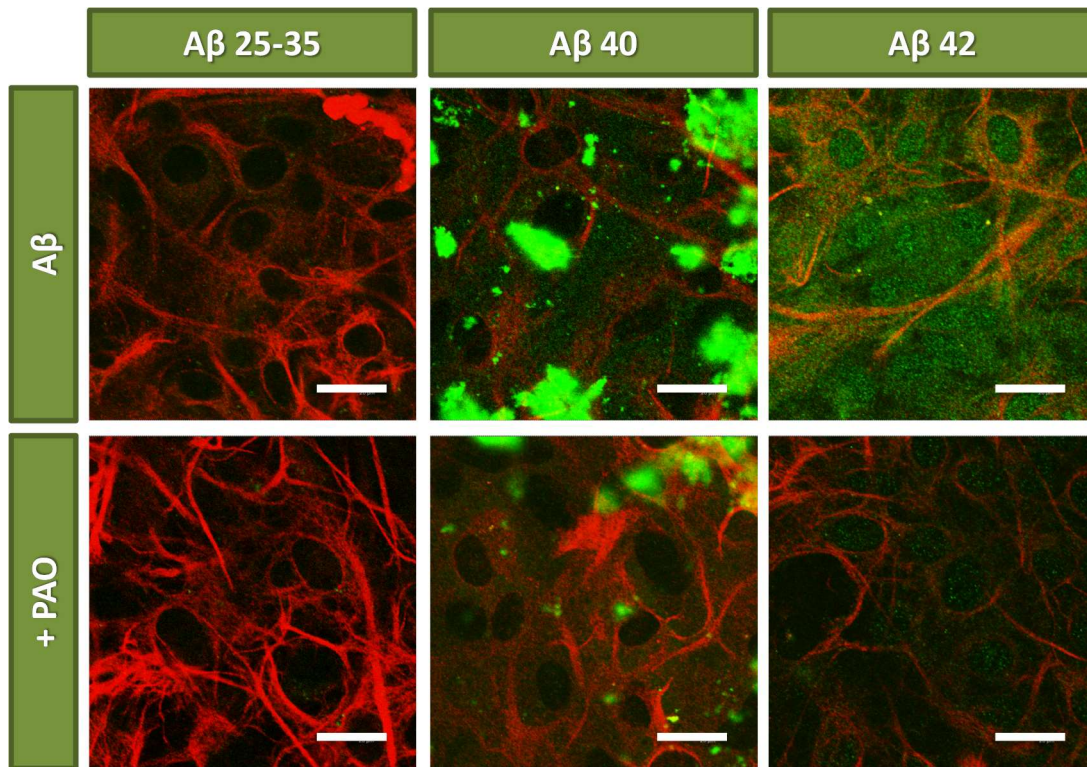


Figura 38. Efecto del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la internalización del β -amiloide en astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de PAO (1 μ M). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído y se sometieron a inmunocitoquímica contra GFAP (en rojo) y contra β -amiloide (en verde). Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

4.4.5. Efecto de la genisteína sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Además de valorar el efecto del óxido de fenilarsina, decidimos estudiar otro inhibidor de la endocitosis mediada por receptor, en este caso la genisteína, un inhibidor selectivo de tirosina kinasas (Akiyama *et al.* 1987).

Pretratamos los astrocitos durante 20 minutos en ausencia o presencia de genisteína (45 μ M), tras lo cual fueron incubados en ausencia o presencia de los tres β -amiloides durante 1 hora. Al valorar la viabilidad celular, no se observaron diferencias entre los astrocitos tratados o no con genisteína, lo que indicaría que este compuesto no afecta a la ruta de internalización de los péptidos (figura 39).

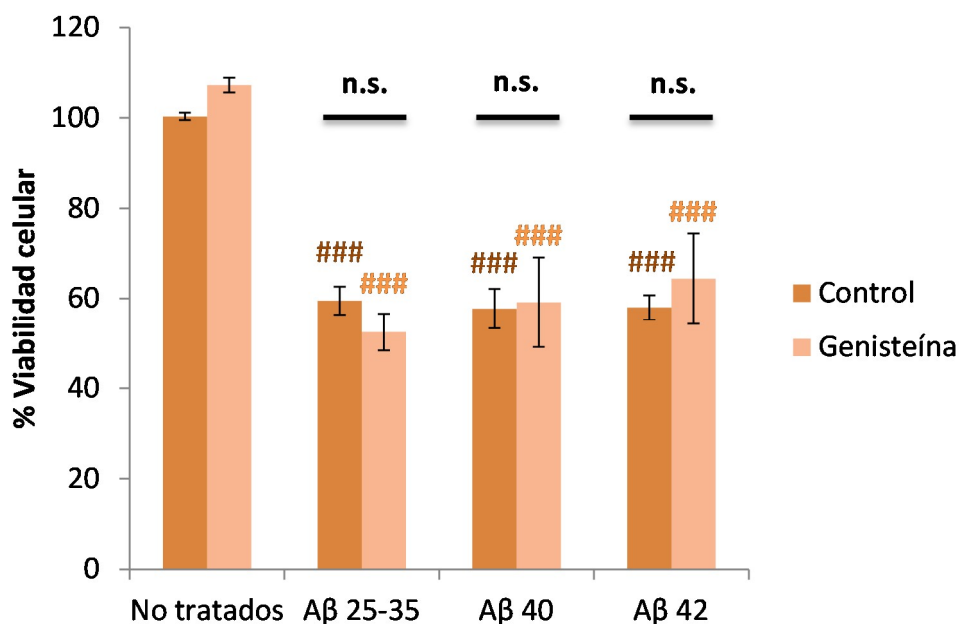


Figura 39. Efecto de la genisteína sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, y en ausencia o presencia de genisteína (45 μ M). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, n.s.: no significativo.

4.4.6. Efecto del silenciamiento de clatrina sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Tras evaluar cómo el tratamiento con distintos inhibidores de la endocitosis afectaba al efecto de los tres β -amiloides sobre los astrocitos en cultivo primario, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento específico de las proteínas implicadas en la endocitosis mediante RNAs de interferencia (siRNAs).

En primer lugar, valoramos el efecto del silenciamiento de clatrina (Clt) sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los tres β -amiloides. Para ello, astrocitos en cultivo primario se trasfectaron con un siRNA específico para clatrina (Sil. Clt) durante 24 horas. Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia de los tres péptidos β -amiloides y se valoró la viabilidad celular mediante la

técnica del MTT. Además, se extrajeron proteínas para comprobar la eficacia del silenciamiento mediante western-blot.

Como se refleja en la figura 40, con un porcentaje medio de silenciamiento de clatrina de aproximadamente el 30%, no se observan diferencias significativas de viabilidad entre las células transfectadas con el siRNA para clatrina y las transfectadas con el NT-siRNA. Por otra parte, el tratamiento con los tres β -amiloides reduce la viabilidad de forma significativa con respecto al control en los astrocitos NT. Sin embargo, el silenciamiento con Clt-siRNA recupera la viabilidad celular en presencia de A β 40 y A β 42, aunque no en presencia de A β 25-35 (figura 40). Lo que parece sugerir que A β 40 y A β 42 penetran en los astrocitos por un mecanismo dependiente –al menos en parte- de clatrina.

4.4.7. Efecto del silenciamiento de caveolina 1 sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

A continuación, valoramos el efecto del silenciamiento de la caveolina 1 (Cav1). Para ello, del mismo modo que para la clatrina, transfectamos durante 72 horas astrocitos con un siRNA específico para caveolina 1, utilizando como control un NT-siRNA. Las células se exponen posteriormente a los β -amiloides durante 1 hora y a continuación se realiza el ensayo de viabilidad.

En este caso, como se observa en la figura 41, el porcentaje de silenciamiento medio es superior al 90%. Sin embargo, en estas circunstancias no se obtienen diferencias significativas entre la viabilidad de los astrocitos silenciados y no silenciados. De hecho, en ninguna de las seis condiciones experimentales ensayadas, el tratamiento de los β -amiloides introduce diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles correspondientes.

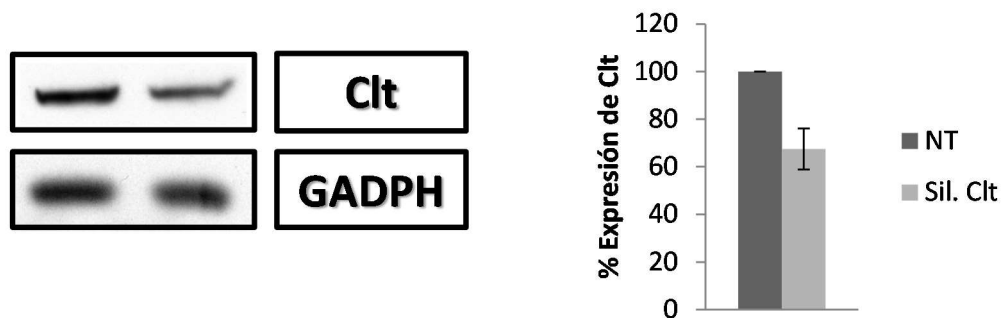
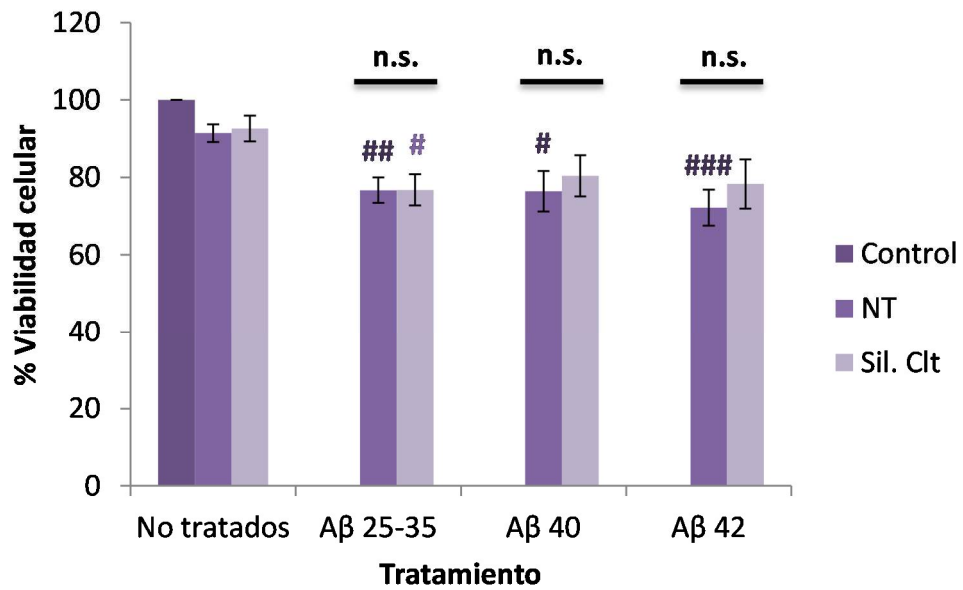


Figura 40. Efecto del silenciamiento de clatrina (Clt) sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico durante 24 horas con objeto de silenciar la expresión de clatrina (Sil. Clt). Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 7$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: no significativo.

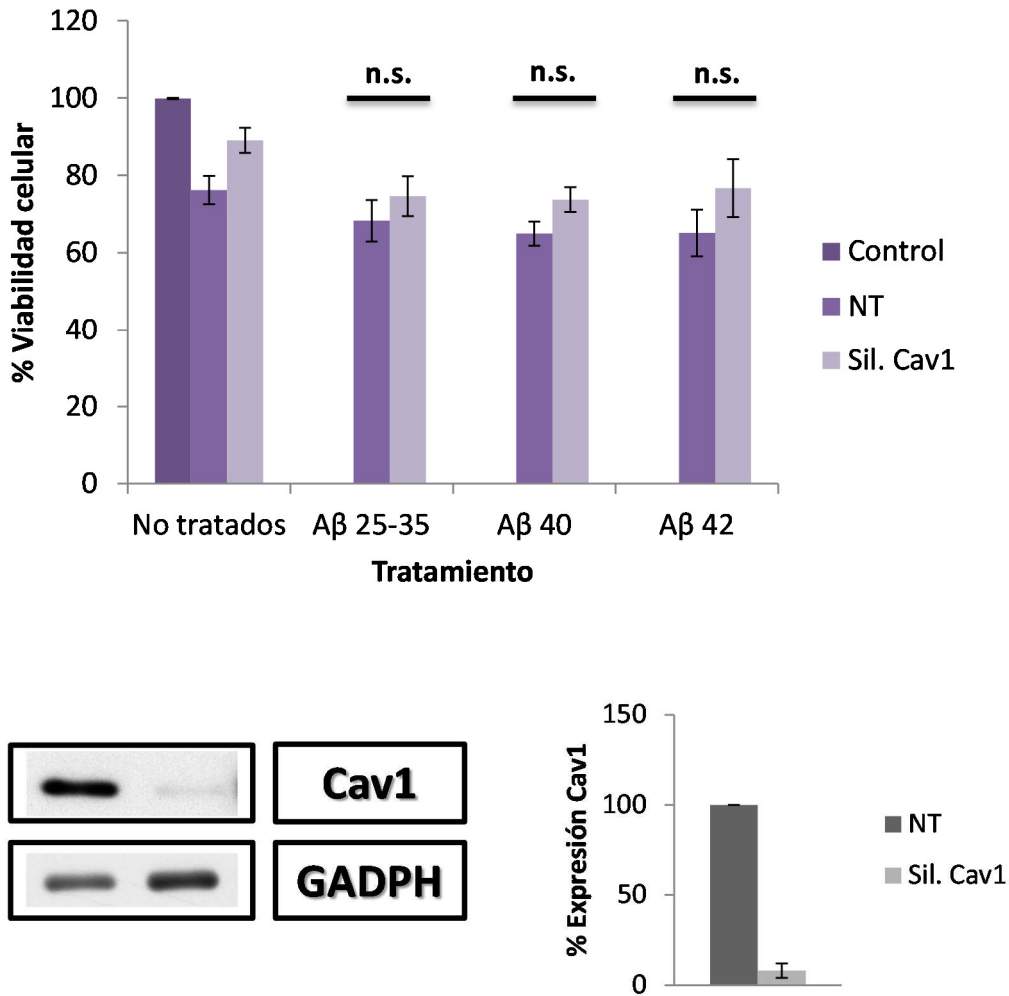


Figura 41. Efecto del silenciamiento de caveolina 1 (Cav1) sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico durante 72 horas con objeto de silenciar la expresión de caveolina 1 (Sil. Cav1). Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). n.s.: no significativo.

4.4.8. Efecto del silenciamiento de LRP1 (“Low density lipoprotein receptor-related protein 1”) sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Una vez estudiados los silenciamientos de clatrina y caveolina 1 y, teniendo en cuenta el efecto observado con el tratamiento con la PAO, pasamos a valorar cómo afectaba el silenciamiento de LRP1 a la viabilidad de los astrocitos en presencia de los β -amiloides. Escogimos este receptor, ya que según la bibliografía disponible es el candidato más claro para ser el receptor del β -amiloide en astrocitos (Koistinaho et al. 2004, Shibata et al. 2000, Kanekiyo & Bu 2014).

Igual que en los casos anteriores, transfectamos los astrocitos con un siRNA específico para LRP1 durante 72 horas, empleando como control de la transfección un siRNA sin diana (NT). Después incubamos con los β -amiloides y valoramos la viabilidad celular, así como extrajimos proteínas para determinar la eficacia de la transfección.

En el caso del LRP1, el porcentaje de silenciamiento medio es del 90%, tal y como se recoge en la figura 42. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los astrocitos en los que se ha silenciado la expresión de LRP1 y en los no silenciados; aunque en todos los casos (si exceptuamos el $A\beta$ 25-35) se registren diferencias significativas con los respectivos controles. Estos resultados significan que este receptor no está participando en la internalización de los β -amiloides en astrocitos.

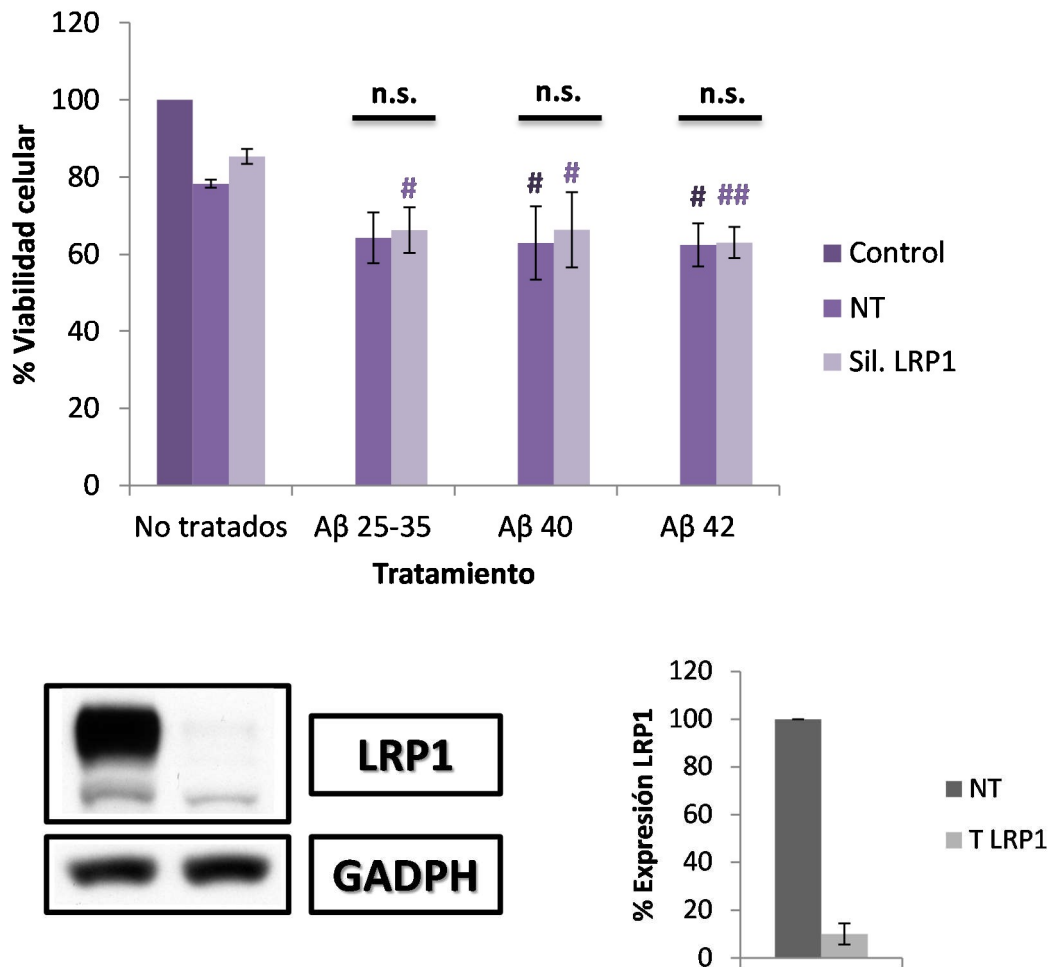


Figura 42. Efecto del silenciamiento de LRP1 sobre la viabilidad de los astrocitos en presencia de los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico durante 72 horas con objeto de silenciar la expresión de LRP1 (Sil. LRP1). Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las diferencias para cada tratamiento mediante t de Student (*). n.s.: no significativo.

4.5. Efecto de la albúmina sérica sobre los efectos deletéreos de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Del mismo modo que hicimos con las neuronas, quisimos comprobar si la albúmina sérica humana (HSA) ejercía algún tipo de efecto protector sobre los daños provocados por los β -amiloides en astrocitos.

4.5.1. Efecto de la albúmina sérica sobre la muerte celular provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

En primer lugar, valoramos el efecto de la presencia de HSA sobre la viabilidad celular, utilizando las condiciones experimentales que ya definimos en el apartado 4.2.: control, HSA, $A\beta$ 25-35, HSA+ $A\beta$ 25-35, complejo HSA- $A\beta$ 25-35, $A\beta$ 40, HSA+ $A\beta$ 40, complejo HSA- $A\beta$ 40, $A\beta$ 42, HSA+ $A\beta$ 42 y complejo HSA- $A\beta$ 42; y que se definen en función del grado de interacción permitido entre los β -amiloides y la HSA.

Tras una incubación de 20 horas, la determinación de la viabilidad celular (figura 43) muestra que la albúmina –en ninguna de sus formas- es capaz de proteger a los astrocitos frente al efecto nocivo de los β -amiloides; no observándose ninguna diferencia entre los tratamientos entre sí, pero sí con los controles no expuestos a los péptidos; lo que supone una clara diferencia con respecto a lo observado en el caso de las neuronas en donde los complejos HSA- $A\beta$ no muestran apenas efectos deletéreos (figuras 9, 15 y 20).

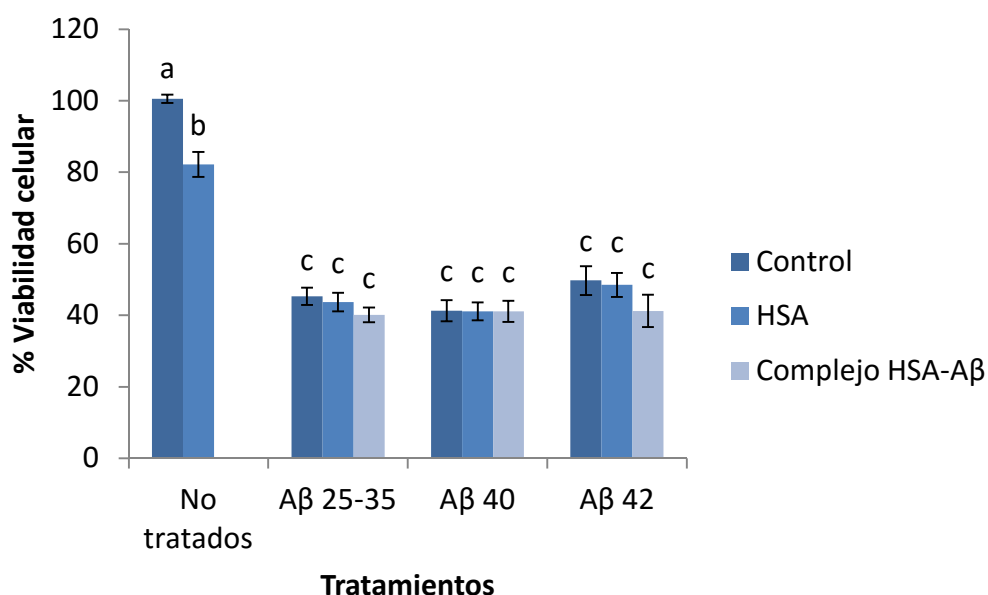


Figura 43. Efecto de la albúmina sérica sobre la muerte celular provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: $A\beta$ 25-35, $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42, libres, incubados con HSA, o en forma de complejo HSA- $A\beta$. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 5$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos entre sí se realizó un ANOVA de una vía y test Tukey. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes.

4.5.2. Efecto de la albúmina sérica sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

Además de sobre la viabilidad, quisimos considerar un posible efecto de la HSA sobre la producción de radicales libres de oxígeno tras la incubación durante 20 horas con los β -amiloides.

Como cabía esperar, en la situación control la presencia de HSA disminuye los niveles de producción de ROS de forma muy significativa, como consecuencia de su capacidad intrínseca de captar radicales libres (figura 44). Esto se mantiene cuando la HSA se incuba con los tres péptidos. En el caso de los complejos, la albúmina de los complejos HSA-A β 40 y HSA-A β 42 es capaz de disminuir la cantidad de ROS (a diferencia de lo que ocurría en las neuronas; figuras 15 y 20) aunque no así en el caso del complejo A β 25-35.

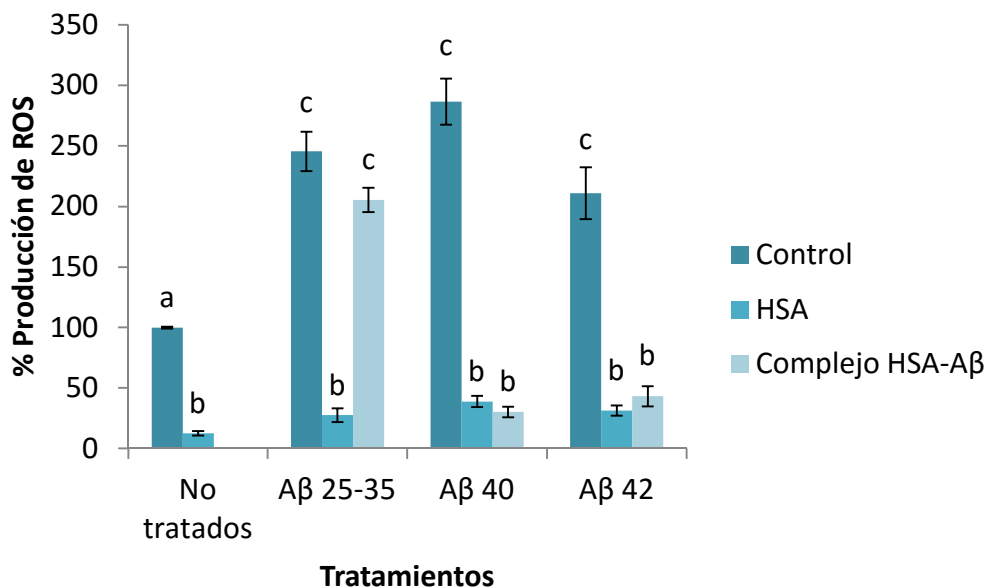


Figura 44. Efecto de la albúmina sérica sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) provocada por los diferentes β -amiloides en astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 20 horas en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los péptidos β -amiloides: A β 25-35, A β 40 y A β 42, libres, incubados con HSA, o en forma de complejo HSA-A β . Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 5$). La producción de ROS se normalizó con los datos de viabilidad. Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos entre sí se realizó un ANOVA de una vía y test Tukey. Diferentes letras indican grupos significativamente diferentes.

4.5.3. Efecto de la albúmina sérica sobre la internalización de los diferentes β -amiloides en astrocitos en cultivo primario.

A pesar de no encontrar un efecto protector de la HSA en astrocitos frente a los β -amiloides, tanto sobre viabilidad celular como sobre la producción de ROS, quisimos estudiar la influencia de la temperatura, el uso de inhibidores de la endocitosis, y el silenciamiento de ciertas proteínas en nuestras circunstancias experimentales.

Para ello, empleamos las mismas estrategias descritas en el punto 4.4., ahora considerando todas las condiciones. En primer lugar, valoramos el efecto de la temperatura, comparando la viabilidad de los astrocitos incubados durante 30 minutos con los diferentes tratamientos, bien a 37°C, bien a 4°C. En estas circunstancias, lo más llamativo es que en todos los tratamientos (excluidos los controles) existen diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad a 4°C y a 37°C; lo que reafirma la importancia de la temperatura en el efecto de los β -amiloides (figura 45). Cabe destacar también que, cuando la incubación se realiza a 4°C, sólo se registran diferencias significativas con respecto al control en los tratamientos con A β 25-35, HSA+A β 40 y complejo HSA-A β 40. Es destacable que en estas condiciones experimentales, se observa una mayor disminución de la viabilidad de los astrocitos incubados con el complejo HSA-A β 40 que en los incubados con el mismo péptido pero no acompañado con la albúmina.

Cuando analizamos el efecto de la clorpromazina sobre la viabilidad celular, encontramos también diferencias significativas entre los astrocitos tratados y no tratados con este compuesto en todos los casos, salvo en aquellos incubados con los complejos HSA-A β 25-35 y HSA-A β 40 (figura 46). Por otro lado, en presencia de clorpromazina sólo los tratamientos con A β 25-35, A β 40, HSA + A β 42 y complejo HSA-A β 40 provocan una reducción de la viabilidad significativa con respecto al control correspondiente.

Es muy llamativo el hecho de que el complejo HSA-A β 40 tiene el mismo efecto nocivo sobre las neuronas en ausencia y presencia de clorpromazina, lo que podría indicar que su mecanismo de internalización no sería dependiente de clatrina, como sí lo sería en los demás casos.

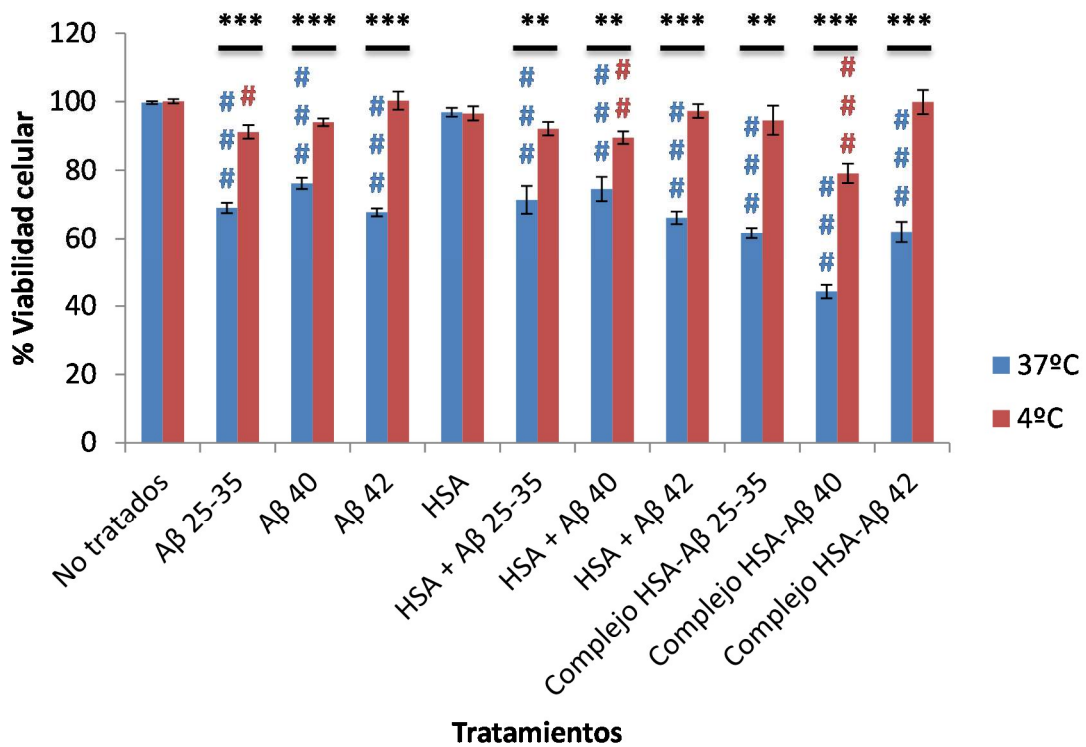


Figura 45. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron a 4°C o 37°C durante 30 minutos en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$.

En el caso de la ciclodextrina (figura 47) que, como ya dijimos, es un inhibidor de la endocitosis mediada por caveolas, no se detectan diferencias significativas por la presencia de este compuesto, salvo en el tratamiento con el complejo HSA-A β 25-35, donde la ciclodextrina provoca que la disminución de la viabilidad sea aún mayor que en su ausencia (figura 47).

La figura 48 resume los datos obtenidos al analizar el efecto del PAO. Como se puede observar, este inhibidor disminuye el efecto negativo de todos los tratamientos sobre la viabilidad de los astrocitos de forma significativa, salvo en el caso del complejo HSA-A β 25-35. Además, en la presencia de PAO, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en los tratamientos con A β 25-35 ni con A β 42.

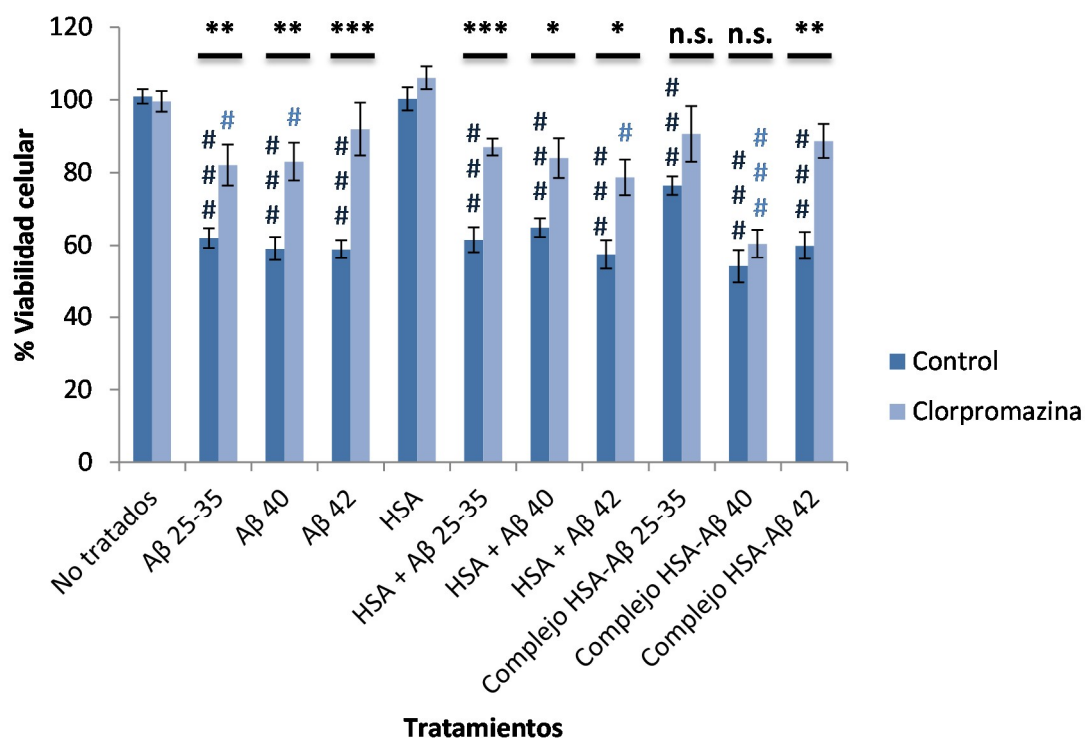


Figura 46. Efecto de la clorpromazina sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos, en ausencia o presencia de clorpromazina (10 μ g/ml). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: no significativo.

En el caso de la genisteína, el último de los inhibidores estudiados, no se detectan diferencias en ninguno de los tratamientos en lo que respecta al efecto de la misma (figura 49).

En cuanto los silenciamientos de clatrina, caveolina 1 y LRP1, en ningún caso suponen una diferencia estadísticamente significativa (astrocitos silenciados vs. no silenciados), tal y como recogen las figuras 50, 51 y 52. Por otro lado, en los astrocitos transfectados con el siRNA para clatrina, sólo el tratamiento con el complejo HSA-A β 40 disminuye la viabilidad celular de forma significativa con respecto al control (figura 50). En los experimentos correspondientes a la caveolina 1, de modo similar, sólo el tratamiento con el complejo HSA-A β 40 reduce significativamente la viabilidad, en ese caso no sólo de los astrocitos silenciados, sino también de los transfectados con el

siRNA NT (figura 51). En el caso del silenciamiento de LRP1, obtenemos más diferencias con respecto al control en los astrocitos silenciados (A β 42, HSA + A β 25-35, HSA + A β 40, HSA + A β 42, complejo HSA-A β 40 y complejo HSA-A β 42) que en los que no lo han sido (HSA + A β 42, complejo HSA-A β 40 y complejo HSA-A β 42), como se recoge en la figura 52.

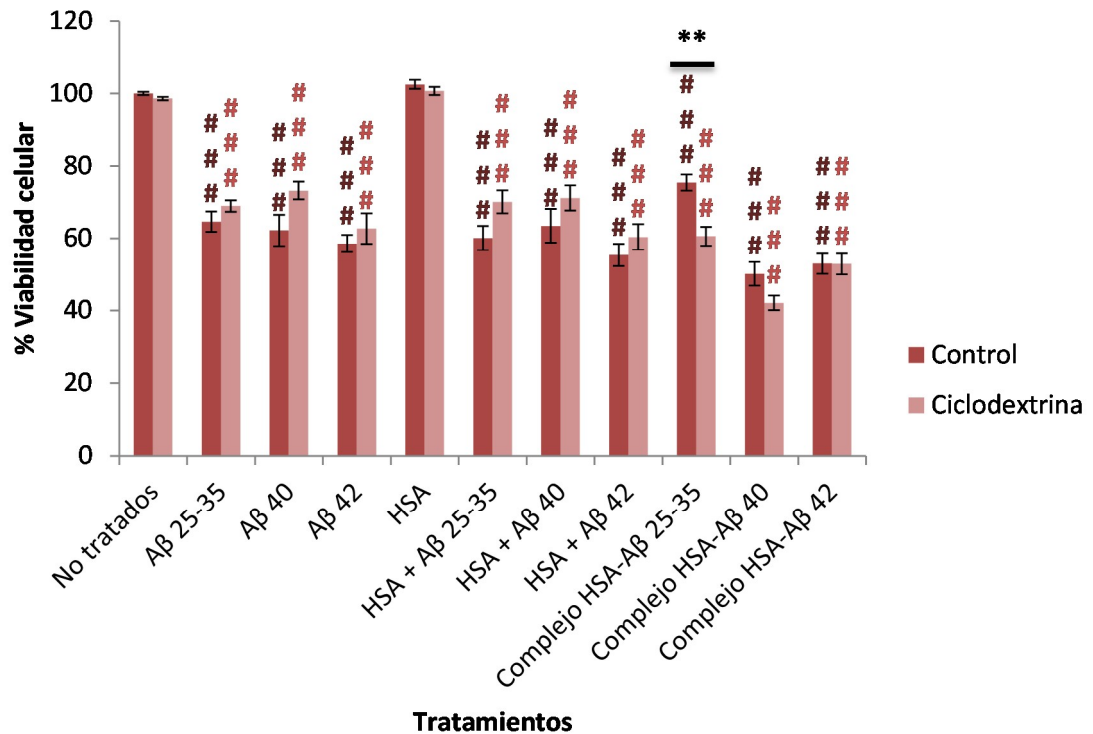


Figura 47. Efecto de la ciclodextrina sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos, en ausencia o presencia de ciclodextrina (25 mM). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM (n \geq 4). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: p < 0.001, **: p < 0.01.

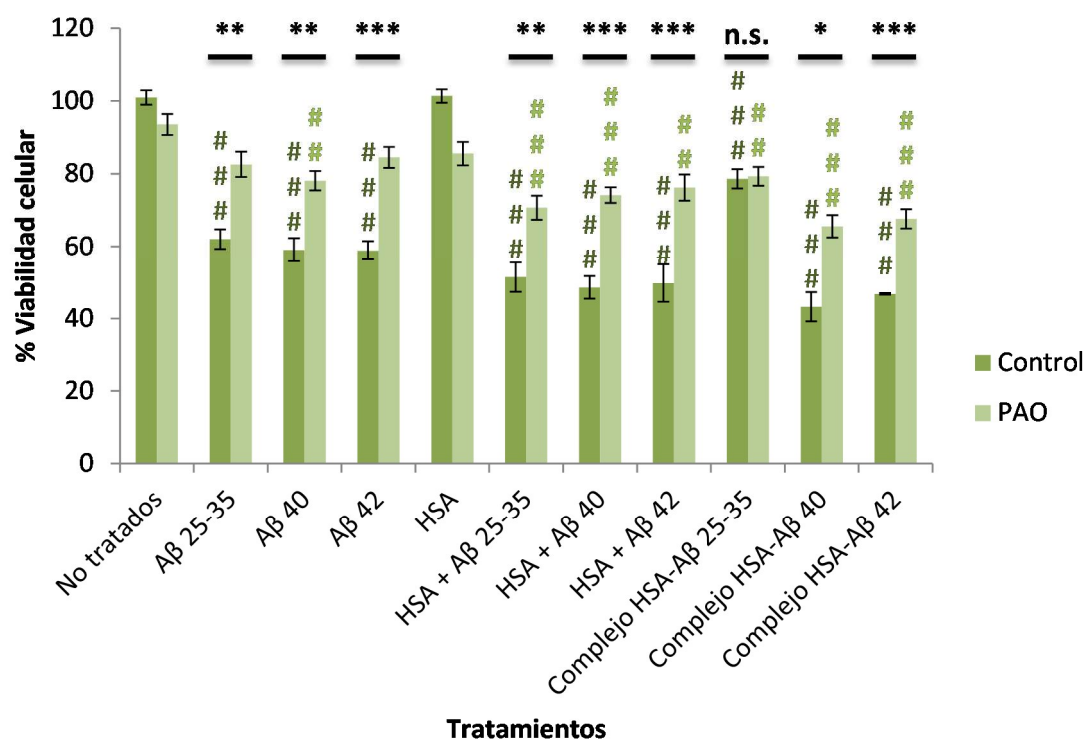


Figura 48. Efecto del óxido de fenilarsina (PAO) sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos, en ausencia o presencia de PAO (1 μ M). Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student (*). ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: no significativo.

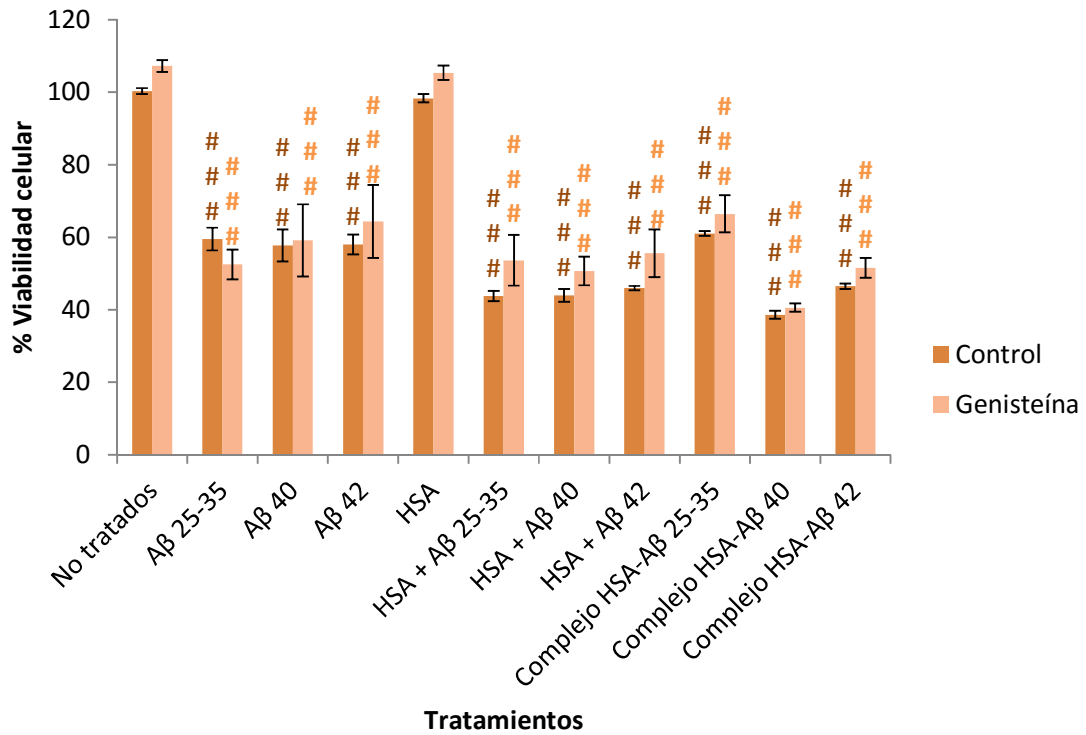


Figura 49. Efecto de la genisteína sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos, en ausencia o presencia (45 μ M) de genisteína. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. ***: $p < 0.001$.

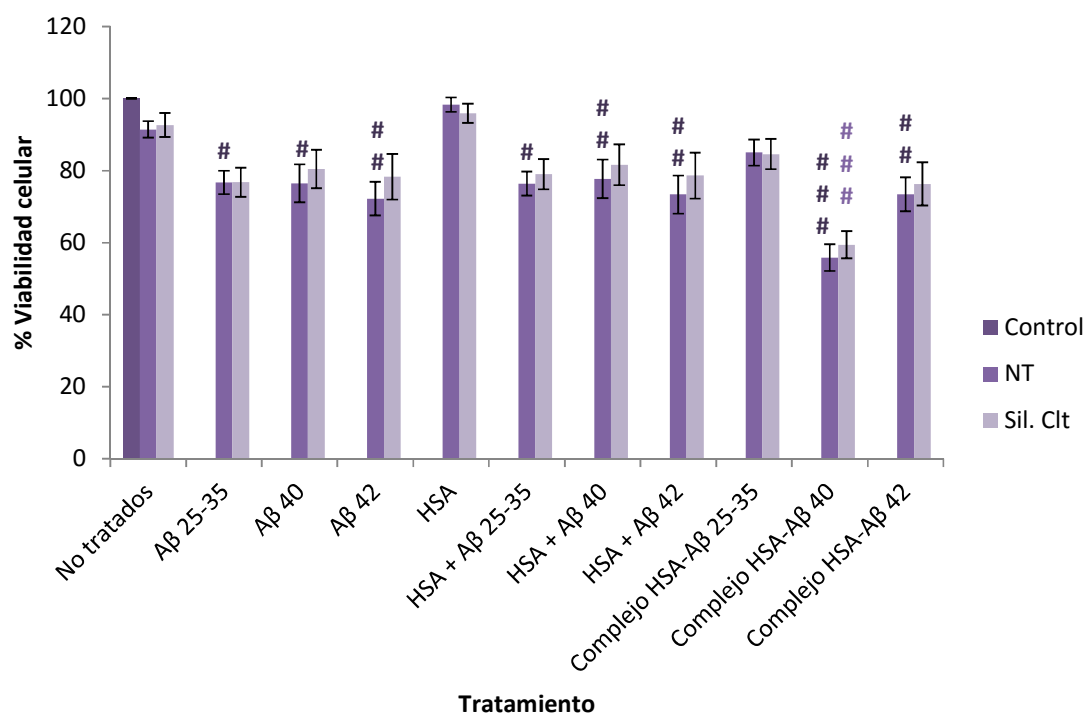


Figura 50. Efecto del silenciamiento de clatrina (Clt) sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico y se silenció la expresión de Clt (Sil. Clt) durante 24 horas. Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 7$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

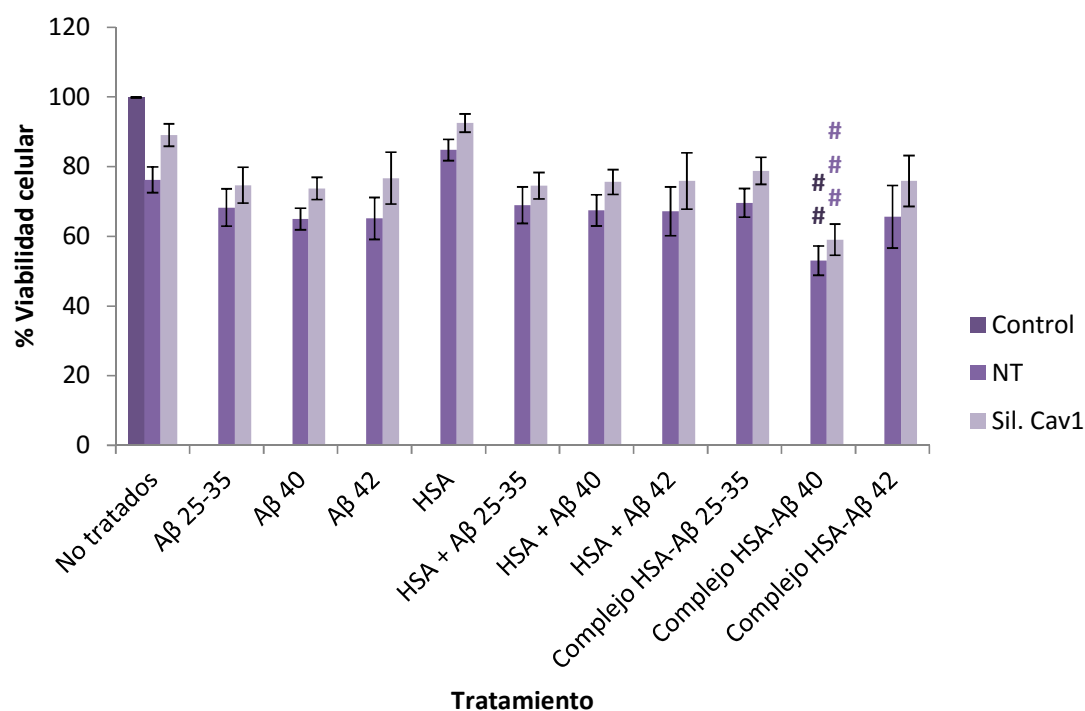


Figura 51. Efecto del silenciamiento de caveolina 1 (Cav1) sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico y se silenció la expresión de Cav1 (Sil. Cav1) durante 72 horas. Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 4$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

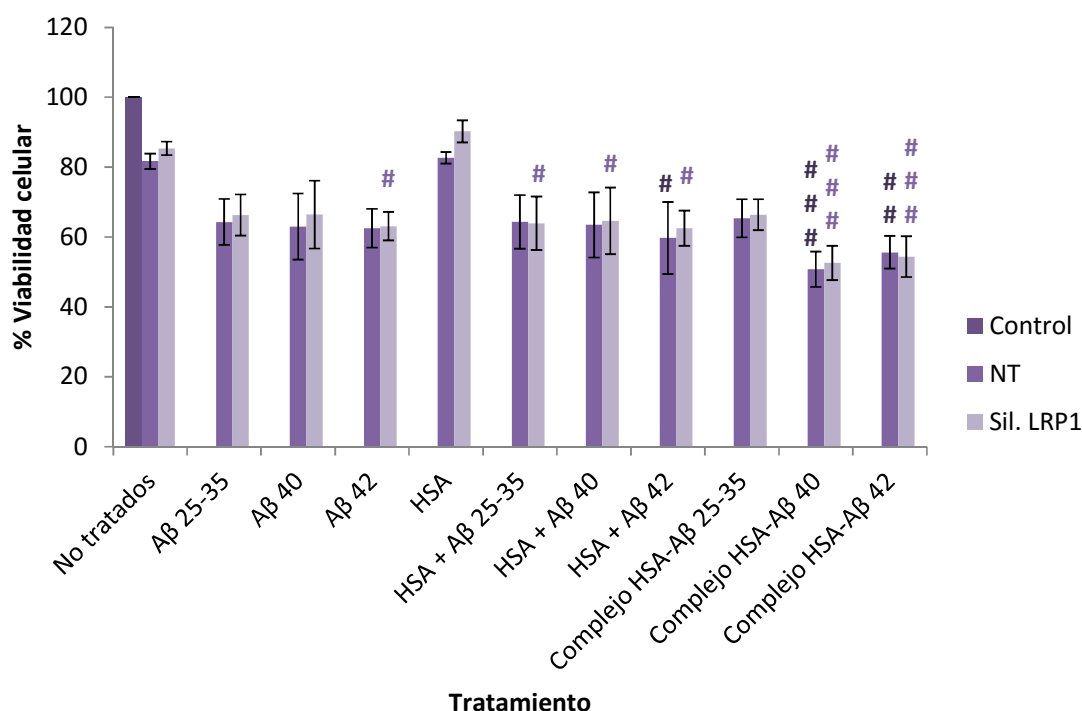


Figura 52. Efecto del silenciamiento de LRP1 sobre la viabilidad de los astrocitos frente a los diferentes β -amiloides en presencia de albúmina sérica. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (18-21 DIV) se transfectaron con un siRNA específico y se silenció la expresión de LRP1 (Sil. LRP1) durante 72 horas. Como control de la transfección se utilizó un siRNA sin diana (NT). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia (30 μ M) de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto a su control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett (#). Además, se analizaron las dos series de datos para cada tratamiento mediante t de Student, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

4.6. Transcitosis de los β -amiloides en cultivos proximales de astrocitos.

Los astrocitos se postulan como participantes activos en el aclaramiento del β -amiloide del cerebro (Tarasoff-Conway et al. 2015). Para ello han de ser capaces de internalizar el péptido y transportarlo. Hasta ahora, nosotros hemos comprobado que los astrocitos en cultivo primario son capaces de captar los tres β -amiloides ensayados. Ahora nos propusimos estudiar si los astrocitos son capaces de liberar los β -amiloides mediante transcitosis. Para estudiar este proceso, sembramos astrocitos en insertos con un tamaño de poro tal que permite el intercambio de fluido entre los

compartimentos superior e inferior, pero no el paso de las células. 72 horas después de la resiembra en los insertos, los astrocitos fueron expuestos a los tres β -amiloides durante 5 minutos (30 μ M). A continuación se lavaron con medio de cultivo fresco, y se colocaron en contacto con astrocitos procedentes del mismo cultivo pero no expuestos a los β -amiloides. Transcurridos diferentes tiempos de contacto, se valoró la viabilidad de los astrocitos no incubados previamente con los péptidos.

En la figura 53 se recogen los resultados obtenidos en dos experimentos independientes para cada uno de los péptidos. Como podemos observar, el contacto con astrocitos expuestos a los β -amiloides, supone una disminución de la viabilidad celular, que es dependiente del tiempo de incubación conjunta. La mayor disminución de la viabilidad se observa con el A β 40, alcanzándose valores en torno al 60% tras 4 horas de contacto. Estos resultados indican que, efectivamente, los astrocitos son capaces no sólo de captar los β -amiloides, sino también de liberarlos. Podemos, pues, afirmar que existe transcitosis de los péptidos β -amiloides en los astrocitos en cultivo primario.

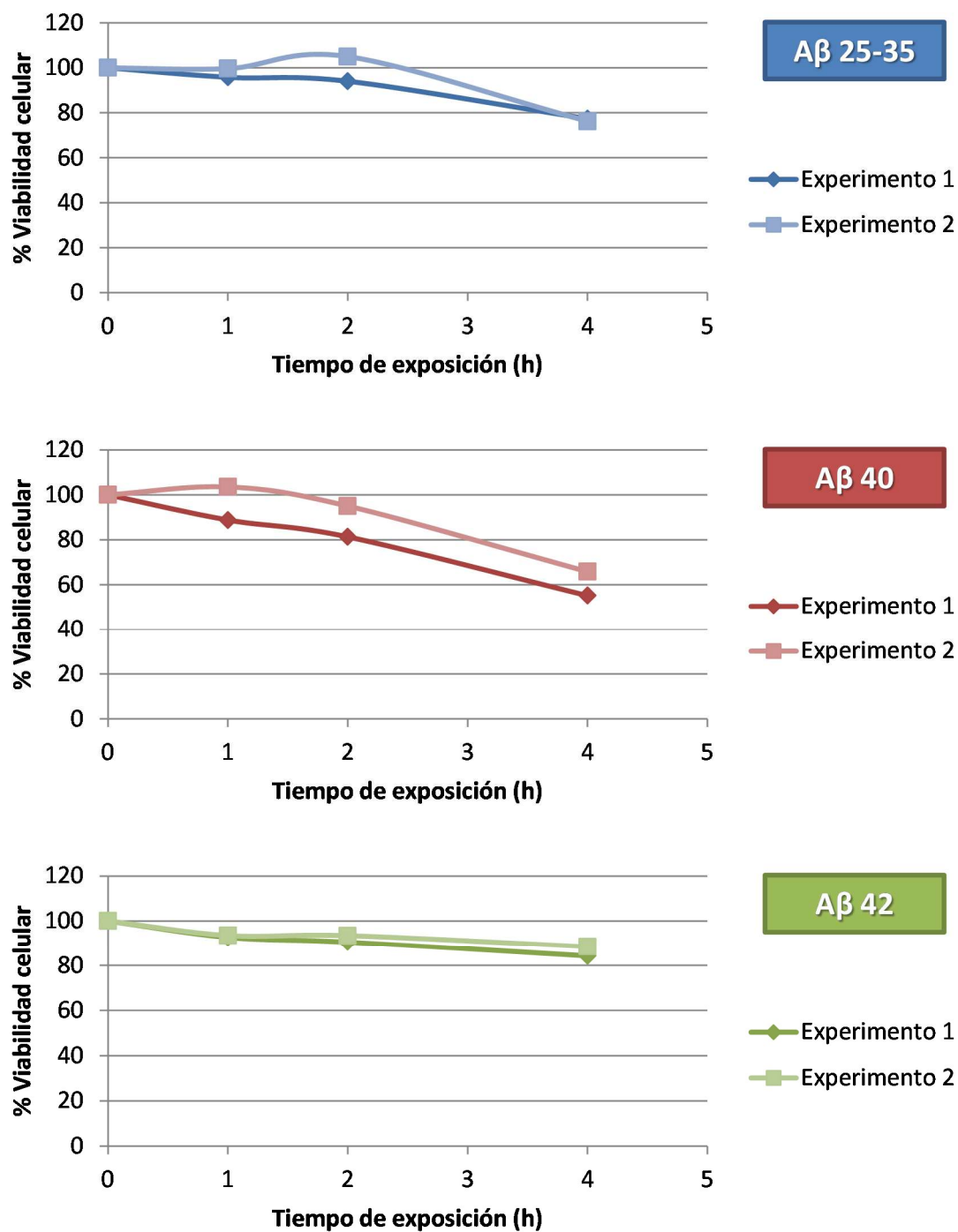


Figura 53. Transcitosis de los diferentes β -amiloides en cultivos proximales de astrocitos. Astrocitos procedentes de un cultivo primario se resembraron en insertos. Posteriormente, fueron expuestos durante 5 minutos a los péptidos β -amiloides ($30 \mu\text{M}$): A β 25-35, A β 40 y A β 42. A continuación se incubaron con otros astrocitos no tratados procedentes del mismo cultivo., pero sin contacto físico entre ellos. Transcurridos distintos tiempos, se valoró la viabilidad de las células no tratadas.

4.7. Resistencia de los astrocitos a la muerte celular provocada por los diferentes β -amiloides.

A lo largo de todos los experimentos realizados en astrocitos, un dato llamó mucho nuestra atención. En efecto, a pesar del rápido y profundo efecto nocivo de los β -amiloides sobre los astrocitos, en ningún caso se alcanzaba una viabilidad celular inferior al 40% con respecto al control. Por consiguiente, decidimos estudiar la posibilidad de que existiese una población de astrocitos resistente a los β -amiloides.

Para ello, tras incubar durante 20 horas astrocitos de 21 DIV en ausencia o presencia de los tres β -amiloides, los resembramos –por separado, es decir, manteniendo independientes los astrocitos procedentes de la exposición a cada péptido- permitiendo que proliferaran y cubrieran la placa durante 72 horas. Así, obtuvimos cuatro poblaciones diferentes de astrocitos: control (incubados en ausencia de β -amiloides), resistentes a A β 25-35 (RE A β 25-35), resistentes a A β 40 (RE A β 40) y resistentes a A β 42 (RE A β 42).

Nuestro primer objetivo fue comprobar que tras las 72 horas de proliferación, obteníamos células similares en morfología y número en todos los casos. Con este fin, fijamos placas de cada una de las poblaciones y teñimos los núcleos con DAPI. Captamos imágenes de contraste de fases, así como de la fluorescencia ultravioleta (núcleos), y contamos el número de células por campo, en no menos de 10 campos por placa.

Como se recoge en la figura 54, las imágenes no ofrecen diferencias apreciables entre las cuatro poblaciones. Así, las células tienen en todos los casos un aspecto similar, característico de un cultivo primario de astrocitos en monocapa. En cuanto al número de células, las placas de astrocitos resistentes muestran una mayor densidad celular que en los no tratados, siendo esta diferencia significativa en los RE A β 25-35 y los RE A β 40, con respecto al control.

El siguiente punto fue constatar si esa supuesta resistencia a los β -amiloides que presentaban esos astrocitos resembrados, era algo intrínseco a ellos mismos y, por consiguiente, se mantenía la resistencia en las células hijas después de la proliferación.

Para hacerlo, incubamos los astrocitos resembrados en ausencia o presencia de los diferentes β -amiloides durante 1 hora, tras lo cual valoramos la viabilidad celular de los mismos. Un resumen de los resultados obtenidos se recoge en la figura 55. En los astrocitos control (sometidos a todo el proceso, salvo la exposición previa de 20 horas a alguno de los péptidos), 1 hora de tratamiento con cualquiera de los tres β -amiloides reduce de forma significativa la viabilidad celular, siendo los valores obtenidos concordantes con resultados previos. En cambio, los tratamientos con los β -amiloides no muestran ningún efecto en los astrocitos que hemos denominado “resistentes”. Es decir, efectivamente, existe una población de astrocitos que son resistentes al efecto nocivo de los β -amiloides.

Además del efecto sobre la viabilidad, decidimos valorar la producción de ROS en los astrocitos resistentes. En este sentido, mientras que en los controles se obtiene el incremento habitual en la producción de ROS tras 1 hora de incubación con los péptidos, en los astrocitos resistentes apenas se modifica la producción de ROS (figura 56). Por consiguiente, los astrocitos resistentes no aumentan la producción de ROS en presencia de los β -amiloides.

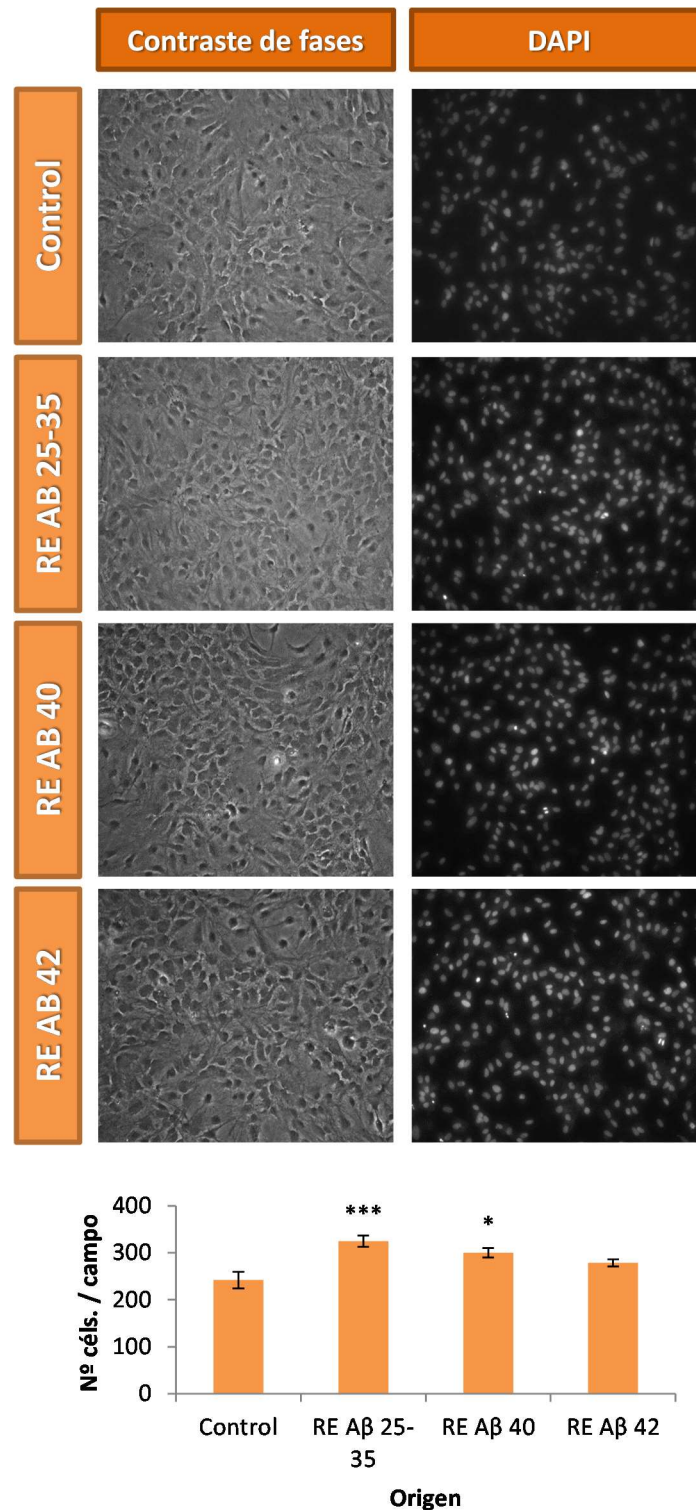


Figura 54. Análisis del número de astrocitos resistentes a los diferentes β -amiloides. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (21 DIV) fueron expuestos durante 20 horas en medio Hanks a los péptidos β -amiloides (30 μ M): A β 25-35, A β 40 y A β 42. A continuación los astrocitos resistentes (RE) se resebraron por separado y se permitió que proliferaran durante 72 horas. Posteriormente, se fijaron las células y se tiñeron los núcleos. Se tomaron fotos y se realizó el conteo de al menos 10 campos para cada placa. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 10$). Para la comparación estadística de los diferentes tratamientos con respecto al control se realizó un ANOVA de una vía y test Dunnett. ***: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$.

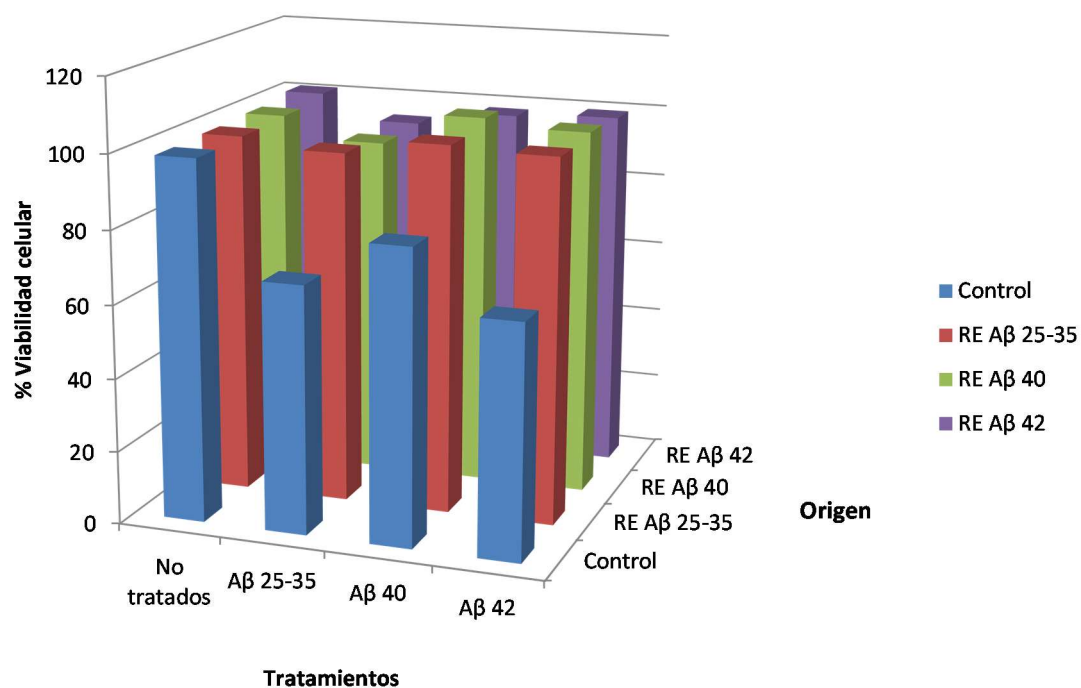


Figura 55. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la viabilidad celular en astrocitos resistentes. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (21 DIV) fueron expuestos durante 20 horas en medio Hanks a los péptidos β -amiloides ($30 \mu\text{M}$): A β 25-35, A β 40 y A β 42. A continuación los astrocitos resistentes (RE) se resemebraron por separado y se permitió que proliferaran durante 72 horas. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia ($30 \mu\text{M}$) de los péptidos β -amiloides. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control y son medias \pm SEM ($n \geq 3$).

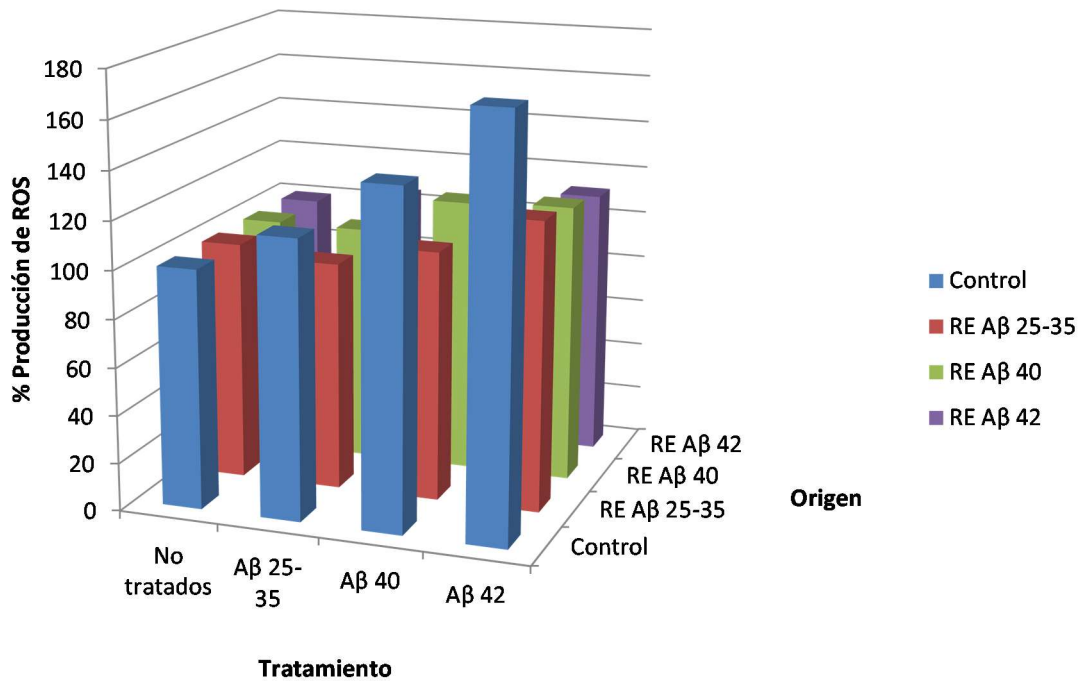
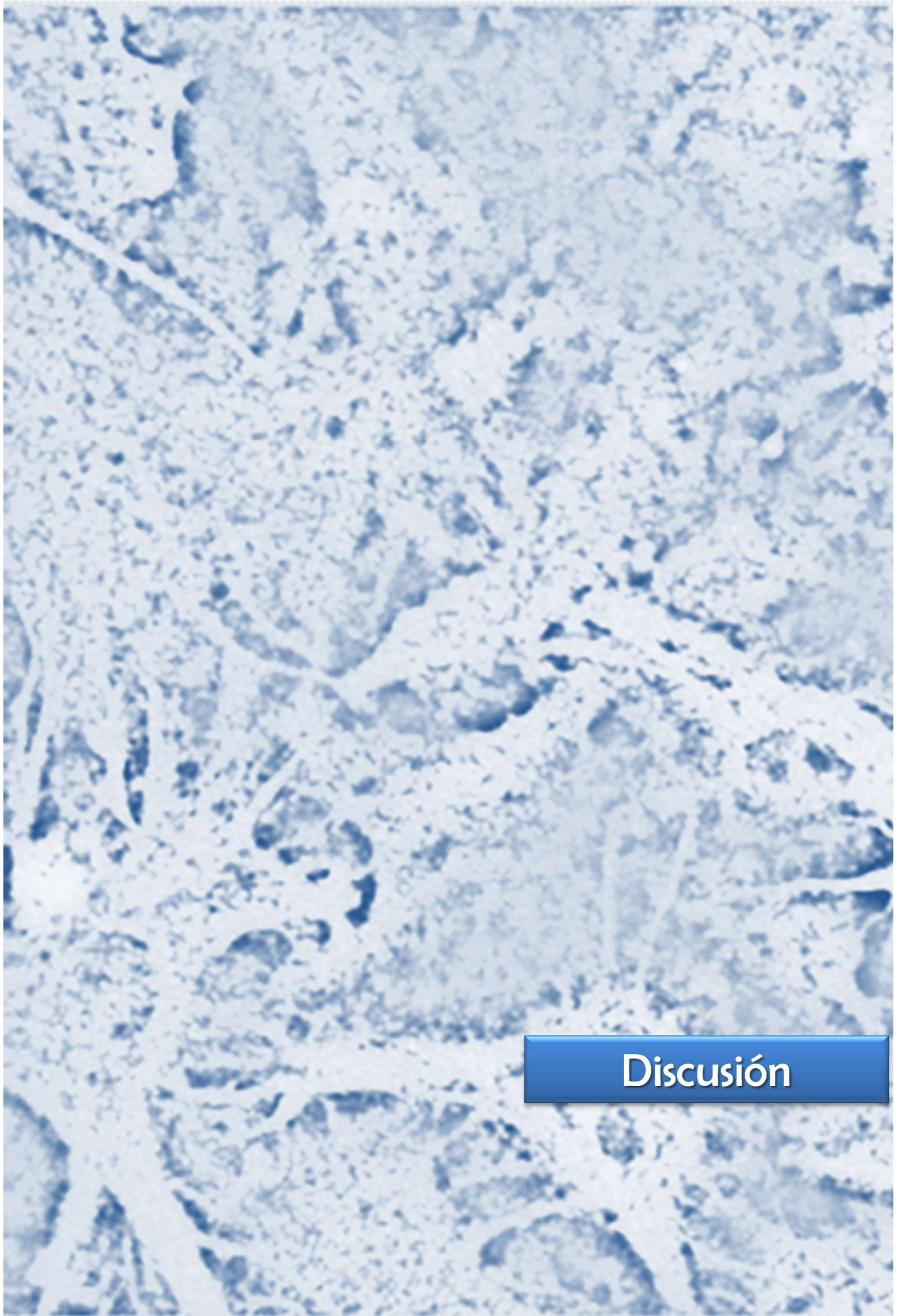


Figura 56. Efecto de los diferentes β -amiloides sobre la producción de radicales libres de oxígeno en astrocitos resistentes. Astrocitos procedentes de un cultivo primario (21 DIV) fueron expuestos durante 20 horas en medio Hanks a los péptidos β -amiloides ($30 \mu\text{M}$): A β 25-35, A β 40 y A β 42. A continuación los astrocitos resistentes (RE) se resembraron por separado y se permitió que proliferaran durante 72 horas. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio Hanks en ausencia o presencia ($30 \mu\text{M}$) de los péptidos β -amiloides. Los resultados se normalizaron utilizando los datos de viabilidad celular y se expresan como porcentajes con respecto al control siendo medias \pm SEM ($n \geq 3$).



Discusión

5. Discusión.

5.1. Efecto de los β -amiloides en neuronas.

En el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se forman acúmulos de β -amiloide que comienzan a agregarse, llegando a formar fibrillas insolubles, que se unen para acabar dando lugar a las denominadas placas seniles o placas amiloides (Masters & Selkoe 2012). Las formas de β -amiloide predominantes en estas placas son el A β 40 y el A β 42, que se generan a partir del procesamiento de la APP (proteína precursora de amiloide) a través de las β y γ -secretasas (Haass et al. 2012). Recientemente se ha descrito que a partir de las placas seniles, pueden desprenderse, de forma espontánea y mediante procesos no enzimáticos, diferentes péptidos, destacando entre ellos –como es lógico– los A β 40 y A β 42 (Lyons et al. 2016). Existe, por tanto, un equilibrio dinámico entre la producción y secreción celular de los β -amiloides, la formación de las placas, y la liberación de los péptidos desde éstas, lo que nos sugiere que en el entorno celular podríamos encontrar los diferentes estados de agregación de los β -amiloides, desde las formas monoméricas simples hasta los agregados más complejos. Por otra parte, el descubrimiento de la forma corta A β 25-35 en el cerebro de enfermos de Alzheimer (Kaneko et al. 2001), ha traído de nuevo a la actualidad la relevancia de este péptido en la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, el A β 25-35 es el péptido de menor tamaño (11 aminoácidos) capaz de provocar los efectos tóxicos observados en los β -amiloides de longitud completa, considerándose la región biológicamente nociva del β -amiloide (Kaminsky et al. 2010, Millucci et al. 2010). No obstante, hasta la detección de este péptido en el cerebro de enfermos de Alzheimer, el A β 25-35 se había considerado exclusivamente una herramienta de laboratorio. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que los procesos normales de envejecimiento suponen la racemización de la serina 26 del A β 40 (Ser²⁶), que pasa de la forma L (L-Ser²⁶) a la forma D (D-Ser²⁶). Con esta conformación, el péptido puede ser atacado por ciertas proteasas existentes en el cerebro dando lugar a formas truncadas, destacando entre ellas el A β 25-35 (Kubo et al. 2002). Por tanto, el A β 25-35 no sólo constituye una importante herramienta experimental para el estudio de los mecanismos patogénicos de la enfermedad de Alzheimer, sino que posee un claro significado biológico.

En este sentido, nuestros resultados indican que el A β 25-35 es un péptido que penetra en el interior de las neuronas y que alcanza las mitocondrias, lo que posiblemente es responsable del incremento en la producción de radicales libres de oxígeno y, con ello, de la disminución de la viabilidad celular (figuras 2, 3 y 4).

A lo largo de los últimos años, se ha realizado un avance muy importante en la comprensión de la interacción mitocondria- β -amiloide, basándose en el hecho de que la disfunción mitocondrial es un evento temprano en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Hauptmann et al. 2009). En primer lugar, se ha demostrado la presencia de β -amiloide en mitocondria tanto en el cerebro de enfermos de Alzheimer como en el de ratones transgénicos para la APP (Caspersen et al. 2005, Manczak et al. 2006). De mismo modo, se han descrito diferentes sitios de interacción del β -amiloide en la mitocondria, que en su mayoría suponen un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno y la alteración de la estructura mitocondrial, provocando un fallo metabólico celular y, finalmente, la muerte neuronal. Así, se sabe que bien la APP, bien el β -amiloide, interaccionan con las translocasas mitocondriales formando complejos, que tienen como consecuencia la inhibición de la importación de proteínas al interior de la mitocondria. Las principales translocasas afectadas son TOM40 (translocasa de la membrana mitocondrial externa 40) y TIM 23 (translocasa de la membrana mitocondrial interna 23) (Devi et al. 2006). El β -amiloide mitocondrial también afecta a la cadena transportadora de electrones, provocando una disminución en la velocidad de síntesis de ATP y contribuyendo a la producción de ROS como resultado del escape de electrones a nivel de los complejos I y III, todo ello como consecuencia de la inhibición del complejo IV (Casley et al. 2002). Además, la interacción del β -amiloide con la ciclofilina D, una parte integral del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), potencia la producción de radicales libres y promueve la apertura del poro de transición, conduciendo con ello a la apoptosis celular (Du & Yan 2010). Son muchas las enzimas mitocondriales cuyos niveles y actividades se encuentran afectados por el β -amiloide. Así, diferentes enzimas del ciclo de Krebs, tales como la piruvato deshidrogenasa o la α -cetoglutarato deshidrogenasa, aparecen disminuidas en tejido cerebral de enfermos de Alzheimer (Perry et al. 1980, Mastrogiacoma et al. 1996). También existe interacción directa del péptido con enzimas mitocondriales. La

unión del β -amiloide con la ABAD (“amyloid-beta binding alcohol dehydrogenase”) causa una producción elevada de ROS y la consiguiente muerte celular. Ambos fenómenos se correlacionan con déficits de aprendizaje y memoria en ratones transgénicos (Yan & Stern 2005).

Teniendo en consideración todo lo anteriormente expuesto, queda ampliamente demostrada la importancia de las mitocondrias en la enfermedad de Alzheimer, ya que su funcionamiento se ve afectado de forma temprana y en alta medida por el β -amiloide. También parece claro que la entrada de los péptidos en las neuronas es necesaria para su llegada a la mitocondria y el consecuente incremento en la producción de radicales libres de oxígeno. Todo esto concuerda con nuestros resultados obtenidos mediante el tratamiento de las neuronas con los péptidos A β 40 y A β 42. Así, en lo que respecta al A β 40, los resultados obtenidos indican que este péptido no entra en la célula, lo que coincide con el nulo incremento en la producción de radicales libres de oxígeno (figuras 3 y 4). Por otro lado, el A β 42 provoca un ligero incremento de la producción de ROS, lo que se corresponde con una somera entrada del péptido en las neuronas. Además, todos estos hechos concuerdan con un menor efecto de los péptidos A β 40 y A β 42 sobre la viabilidad neuronal, con respecto a lo observado en el caso del A β 25-35.

Otro de los eventos tempranos descritos en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es el fallo sináptico, que aparece previamente a la formación de las placas amiloides (Selkoe 2002, Ferreira et al. 2015). Así, las sinapsis se consideran lugares preferentes de acúmulo de β -amiloide (Lacor et al. 2004, Koffie et al. 2009), y la pérdida de las conexiones sinápticas constituye el mejor correlato patológico con el deterioro cognitivo en los enfermos de Alzheimer (DeKosky & Scheff 1990, Masliah et al. 1990, Scheff et al. 2006). Esto es fácilmente comprensible, puesto que las sinapsis son la vía por la que el cerebro transmite, procesa y almacena información, todo lo cual está afectado en la enfermedad de Alzheimer. Se ha descrito ampliamente que el β -amiloide puede inducir alteraciones morfológicas y funcionales en las sinapsis (Coleman & Yao 2003, Almeida et al. 2005), así como en la plasticidad sináptica (Shankar et al. , Li et al. 2009).

Nuestros resultados apoyan estas evidencias, puesto que al analizar la expresión de sinaptofisina, una proteína de la membrana de las vesículas sinápticas, sus niveles disminuyen significativamente ante la exposición de las neuronas a los tres β -amiloides ensayados (figura 6). Sin embargo, dado que los efectos de los β -amiloides sobre las sinapsis son muy precoces, decidimos estudiar la influencia de los mismos a muy corto plazo, escogiendo para ello una proteína presináptica, sinaptotagmina I, y una proteína postsináptica, PSD-95. La sinaptotagmina I es la proteína mejor caracterizada y más abundante de la familia de las sinaptotagminas, y actúa como sensor de calcio en las vesículas sinápticas para la liberación de su contenido (Han *et al.* 2004). La PSD-95 es un miembro de la familia de guanilato kinasas asociadas a membrana (“membrane-associated guanylate kinase”: MAGUK), siendo la principal proteína de andamiaje de la densidad postsináptica (PSD) en las espinas dendríticas (Okabe 2007). Nuestros resultados indican que en tiempos cortos de incubación, el A β 40 y el A β 42 no modifican los niveles de expresión de estas proteínas (figura 8). Sorprendentemente, sin embargo, el efecto de estos péptidos es especialmente destacado en lo que respecta a la colocalización de PSD-95 y sinaptotagmina. En este sentido, estas proteínas deberían localizarse juntas en neuronas adyacentes con objeto de formar sinapsis, pero en presencia de los dos péptidos se observa una colocalización anormal de ambas proteínas. Muy destacadamente en el caso del A β 40, en donde la colocalización tiene lugar prioritariamente en el soma celular y no en los contactos entre axones y dendritas. Este hecho es sorprendente pues como hemos mencionado antes, en circunstancias no patológicas, la sinaptotagmina y la PSD-95 colocalizan en los “puntos sinápticos”, es decir, en uniones interneuronales precursoras de las sinapsis.

Nuestros resultados son insuficientes para entender cómo ocurre la deslocalización de las proteínas pre y postsinápticas, aunque es evidente que esta colocalización anormal afectará a la funcionalidad de las conexiones sinápticas. Hay que resaltar que estos efectos ocurren a muy corto plazo (tras dos horas de incubación con los péptidos), lo que sugiere que su efecto es inmediato sobre el ensamblaje de las proteínas de la sinapsis. Afortunadamente, la bibliografía sí nos ofrece algunas claves para poder comprender estos hechos. Así, encontramos un ingente volumen de

estudios sobre la PSD-95 en la enfermedad de Alzheimer, algunos de ellos con resultados incluso contradictorios. Para explicar todos los cambios de expresión de la PSD-95 encontrados, Savioz y cols. han propuesto un modelo celular de dos compartimentos, el compartimento correspondiente al cuerpo celular y el compartimento integrado por sinapsis y las dendritas (Savioz *et al.* 2014). Según este modelo, en condiciones fisiológicas, la mayoría de PSD-95 se localiza en las espinas dendríticas, donde lleva a cabo su función normal, mientras que muestra niveles bajos en el soma. Como consecuencia del comienzo de la enfermedad, las neuronas aumentarían la expresión de PSD-95 en el soma como mecanismo compensatorio. Con el progreso de la enfermedad, las espinas dendríticas comienzan a degenerar y el citoesqueleto empieza a desorganizarse, de forma que las proteínas recién sintetizadas quedan localizadas en el cuerpo celular, donde se acumulan y donde es posible observarlas (Shao *et al.* 2011). Todo este proceso tiene una estrecha relación con la desorganización del citoesqueleto, valorable a través de la desorganización de los neurofilamentos y la proteína tau.

En resumen, nuestros resultados sugieren que cambios en el citoesqueleto, ocasionados por los β -amiloides conducen a la colocalización anormal de las proteínas presinápticas y postsinápticas, lo que lleva al desensamblaje de las sinapsis y la interrupción de la conexión interneuronal. Si este fenómeno está relacionado con la hiperfosforilación de la tau y con la formación de los ovillos podría establecerse una hipótesis conciliatoria β -amiloide/tau sobre el proceso de degeneración neuronal observado en la enfermedad de Alzheimer.

Como ya comentamos anteriormente, el β -amiloide se encuentra en el fluido intersticial en un equilibrio dinámico entre sus diferentes estados de agregación. La concentración en este fluido depende de las tasas de producción, aclaramiento y agregación. Desde el compartimento intersticial o parénquima cerebral, las formas solubles de β -amiloide –monómeros y oligómeros- pueden pasar al líquido cefalorraquídeo (Fukumoto *et al.* 2010), y de aquí a la circulación periférica general (Roher *et al.* 2009). En este sentido, se ha descrito que aproximadamente el 90% del β -amiloide circulante en el plasma, se encuentra asociado a la albúmina (Biere *et al.* 1996). Esta proteína, la albúmina sérica, es la proteína más abundante en el plasma

sanguíneo, y su interacción con el β -amiloide se ha estudiado en profundidad. Así, actualmente sabemos que la albúmina no sólo se une al β -amiloide, sino que además impide su agregación en estructuras de mayor orden (Milojevic et al. 2009). Asimismo, la estequiometría de la unión es 1:1, aunque cada molécula de albúmina presente varios lugares de unión al β -amiloide (Milojevic & Melacini 2011). Es importante señalar que estos procesos ocurren no sólo en sangre, sino también a nivel cerebral, a pesar de que la concentración de albúmina en el líquido cefalorraquídeo es mucho menor que en el plasma (Stanyon & Viles 2012).

Relacionado con todo lo anteriormente expuesto, resultados previos de nuestro laboratorio (Vega et al. 2009) habían demostrado que la albúmina sérica era capaz de unirse al A β 25-35 y disminuir significativamente la mortalidad neuronal provocada por la presencia del mismo. Sin embargo, los resultados recogidos en el presente trabajo indican claramente que la albúmina *per se* es incapaz de prevenir los efectos deletéreos de los otros β -amiloides ensayados (A β 40 y A β 42), al menos en lo que respecta a la viabilidad celular (figuras 15 y 20). Sorprendentemente, si estos β -amiloides se acomplejaban con la albúmina antes de su exposición a las neuronas, los complejos carecen de actividad deletérea (figuras 15 y 20). Estos resultados sugieren que cuando los péptidos se unen a la albúmina adquieren una configuración que los libera de sus efectos nocivos. Alternativamente, la albúmina podría esconder los residuos tóxicos de los β -amiloides, impidiendo sus efectos indeseables.

Estos resultados tienen un significado fisiológico muy importante, ya que si la albúmina está presente en los lugares donde el β -amiloide está siendo sintetizado, la formación de los complejos albúmina- β -amiloide, evitaría el daño producido por los β -amiloides. Relacionado con esto, se ha descrito que la microglia sintetiza albúmina en el cerebro, y que esta síntesis aumenta cuando las células microgliales están expuestas a β -amiloide (Ahn et al. 2008).

En torno a todos estos hechos relativos a la albúmina y su papel en la enfermedad de Alzheimer se ha elaborado la denominada “peripheral sink hypothesis”, o hipótesis del sumidero periférico. Existe una correlación altamente significativa entre los niveles de β -amiloide plasmático y β -amiloide cerebral, lo que

sugiere que la circulación periférica facilitaría directamente un flujo neto desde el cerebro al plasma, actuando éste como “sumidero periférico” (DeMattos et al.). Basándose en las implicaciones derivadas de esta hipótesis, se han propuesto nuevas estrategias terapéuticas para aclarar el β -amiloide del cerebro mediante la inducción de desequilibrios en la dinámica de transporte. Actualmente, existe un ensayo clínico en marcha, en el que el plasma de enfermos de Alzheimer es reemplazado con albúmina terapéutica (Albutein®), para alterar así el equilibrio dinámico entre el β -amiloide en plasma y el β -amiloide en el líquido cefalorraquídeo. Al reducir el contenido plasmático de β -amiloide, se favorece una mayor liberación de β -amiloide desde el líquido cefalorraquídeo, lo que tiene como consecuencia la disminución del contenido cerebral del péptido y, con ello, la reducción de sus efectos tóxicos (Boada et al. 2009). Esta estrategia se basa, por tanto, en facilitar y favorecer el aclaramiento del β -amiloide cerebral.

En cuanto al papel de la albúmina en la patología de la enfermedad de Alzheimer, cabe destacar que existen estudios que demuestran la existencia de una relación directa entre deterioro cognitivo y bajas concentraciones de albúmina plasmática (Llewellyn et al. 2010), habiéndose detectado niveles inferiores de albúmina sérica en enfermos de Alzheimer con respecto a individuos sanos (Kim et al. 2006).

Los prometedores resultados obtenidos en el estudio piloto con albúmina terapéutica, han permitido ampliarlo y poner en marcha el proyecto AMBAR (Boada et al. 2009). Así, los primeros resultados mostraron una movilización del β -amiloide cerebral y una mejora en la puntuación de diferentes test cognitivos (MMSE: “Mini-Mental Status Examination”, ADAS-cog examination: “Alzheimer’s Disease Assessment Scale, cognitive subscale examination”). Esto se consiguió mediante plasmaféresis con recambio plasmático. Es decir, de la sangre extraída de los pacientes se separaron los elementos formes, que fueron devueltos al paciente, mientras que el plasma, cargado de β -amiloide, fue repuesto por albúmina terapéutica libre de péptido (Costa et al. 2012).

El estudio AMBAR se ha diseñado como multicéntrico, aleatorizado y controlado con grupos paralelos para evaluar los cambios cognitivos, funcionales y conductuales en pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadios leve-moderados. En este proyecto participan casi 400 pacientes procedentes de centros de España y Estados Unidos. Se estudiarán los cambios de concentración de A β 40 y A β 42 en plasma y en líquido cefalorraquídeo. Asimismo se evaluarán los cambios estructurales en volumen de diferentes regiones cerebrales importantes en el progreso de la enfermedad, así como los cambios funcionales en las mismas (Boada et al. 2014). Los resultados obtenidos hasta la fecha son muy prometedores y parecen indicar que esta aproximación terapéutica es capaz de ralentizar de forma significativa el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer, aunque las conclusiones finales del mismo no se obtendrán hasta 2017.

5.2. Efecto de los β -amiloides en astrocitos.

El papel que desempeñan los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer aún hoy resulta controvertido. El estudio de estas células en el contexto de la enfermedad es relativamente reciente, aunque la gliosis reactiva es un rasgo tan característico de esta patología que incluso Alzheimer describió ya la presencia de astrocitos en las placas seniles o amiloides.

La astrogliosis es un conjunto de cambios potenciales en los astrocitos a nivel molecular, celular y funcional, que ocurre en un contexto específico y como resultado de algún tipo de daño en el sistema nervioso central. Estos cambios tienen funciones beneficiosas pero, si se prolongan demasiado, pueden tener efectos dañinos y contribuir al desarrollo de diversas patologías (Sofroniew 2009). En este sentido, la gliosis reactiva probablemente comience en la enfermedad de Alzheimer como un mecanismo defensivo, pero conforme avanza y se mantiene en el tiempo, se convierte en un factor clave en la progresión de la enfermedad. Así, se han encontrado astrocitos rodeando las placas amiloides (Kamphuis et al. 2014), que podrían actuar como barreras protectoras para las neuronas. Posiblemente, estos astrocitos reactivos actúen limitando la extensión del daño, reparando la barrera hematoencefálica y

proveyendo de sustratos energéticos cuando el suministro de ellos está limitado. Sin embargo, si se mantiene la reactividad y la inflamación asociada a la misma, los astrocitos acaban causando la pérdida de funcionalidad que hasta entonces contribuían a mantener.

Los astrocitos, además de rodear los depósitos de β -amiloide, tienen un papel clave en su aclaramiento (Wyss-Coray et al. 2003), lo que les confiere aún más importancia en el desarrollo de la enfermedad (véase la “hipótesis del sumidero periférico” explicada anteriormente). En este sentido, nuestros resultados demuestran que, a diferencia de lo observado en las neuronas, el A β 40 y el A β 42 también penetran en los astrocitos (figura 31). Este hecho puede estar relacionado con el incremento de la producción de radicales libres de oxígeno observado en estas circunstancias (figura 27), lo que posiblemente es responsable del marcado aumento de la muerte celular (figura 26).

El hecho de que los β -amiloides sean internalizados por los astrocitos nos indujo a estudiar los mecanismos implicados en dicha internalización. En este sentido, nuestros resultados indican que los β -amiloides se internalizan en los astrocitos por un mecanismo de endocitosis, dado que la captación de los péptidos es sensible a la temperatura (figuras 32 y 33). Es más, los β -amiloides utilizan la clatrina para su internalización, puesto que el proceso se inhibe por clorpromazina y es sensible al silenciamiento de la clatrina mediante siRNA (figuras 34, 35 y 40). Asimismo, las caveolas no están implicadas en la endocitosis de los β -amiloides, porque el proceso es insensible a la ciclodextrina y al silenciamiento de caveolina 1 mediante siRNA (figuras 36 y 41) (véase (Lee et al. 2015)). Por último, la internalización está mediada por receptor ya que el proceso se inhibe por PAO, un inhibidor de las tirosina fosfatasa que intervienen en la endocitosis mediada por receptor (figuras 37 y 38). Sin embargo, el proceso de internalización no depende de la actividad de tirosina kinasa ya que es insensible a genisteína (figura 39).

Resulta sorprendente que la endocitosis de los β -amiloides no implica al receptor LRP1, pues no se observa ningún efecto tras su silenciamiento (figura 42). De hecho, se ha postulado al LRP1 como uno de los receptores implicados en el

aclaramiento del β -amiloide (Koistinaho et al. 2004, Kanekiyo & Bu 2014). Sin embargo, nuestros resultados sostienen que este receptor no está implicado en la internalización de los β -amiloides en astrocitos, puesto que su silenciamiento no afecta a la viabilidad de los astrocitos.

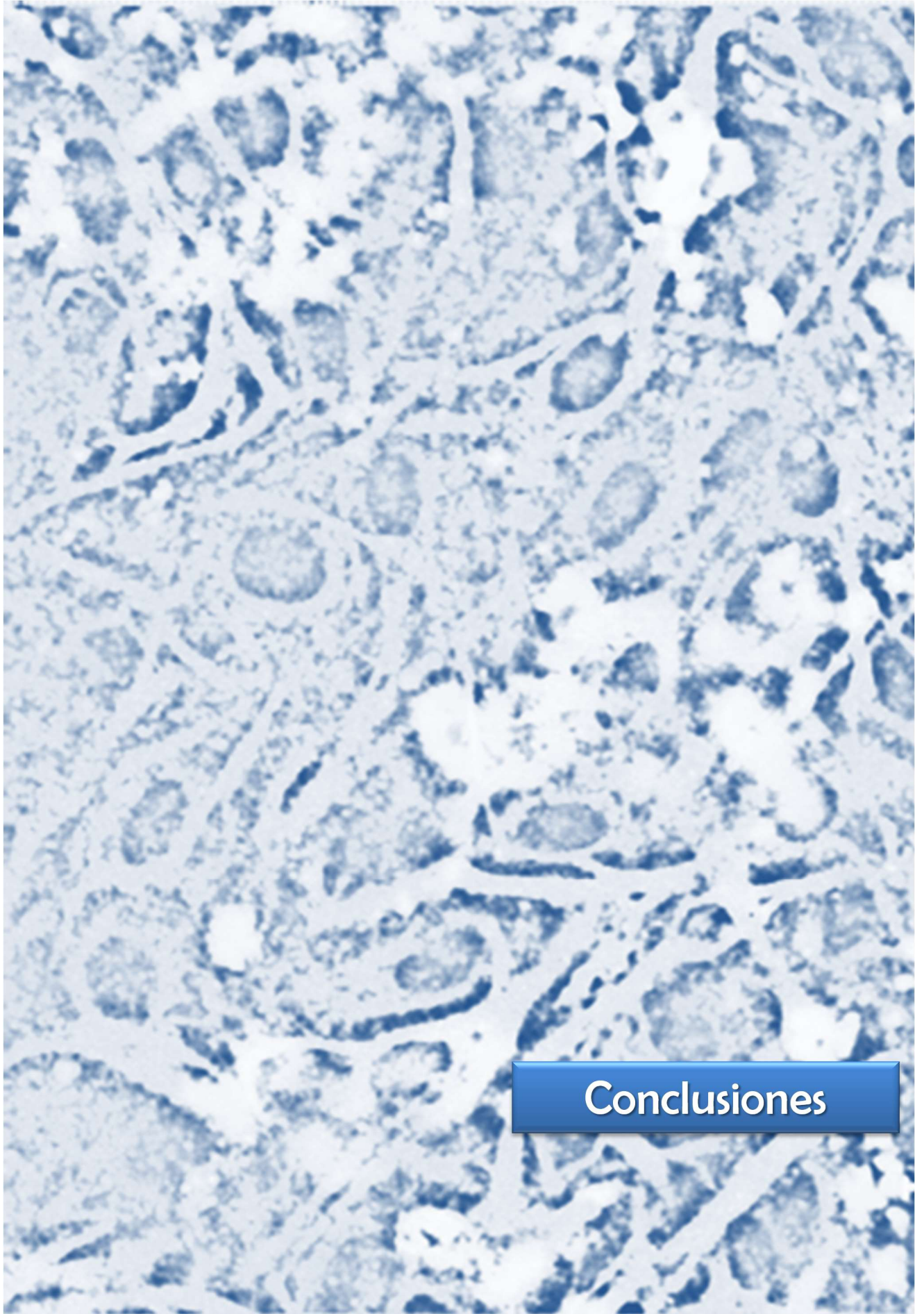
Por otra parte, nuestros estudios de la influencia de la albúmina sérica sobre los efectos de los β -amiloides en astrocitos ponen claramente de manifiesto que, ni la albúmina sola, ni la acomplejada con los β -amiloides, es capaz de proteger frente a los efectos deletéreos provocados por los β -amiloides en astrocitos (figura 43). Sin embargo, este resultado no es sorprendente si tenemos en cuenta que los astrocitos disponen de un mecanismo muy sofisticado para la internalización de la albúmina. En este sentido, nuestro laboratorio ha descrito la presencia de un mecanismo específico y muy eficiente para el transporte de la albúmina al interior del astrocito destinado a la inducción de la síntesis y liberación del factor neurotrófico ácido oleico (Bento-Abreu et al. 2008, Bento-Abreu et al. 2009). Por consiguiente, la presencia de la albúmina facilitaría la entrada de los β -amiloides en los astrocitos, al contrario de lo que ocurre en las neuronas (véase arriba).

Sin embargo, la alta capacidad mostrada por los astrocitos para la captación de β -amiloide puede tener un significado fisiológico. En efecto, la internalización activa de los β -amiloides en los astrocitos podría estar destinada al transporte de los β -amiloides en cadena célula a célula hacia el líquido cefalorraquídeo. En este sentido, los β -amiloides tienen un peso molecular superior al límite de paso de las gap junctions, lo que sugiere que estos péptidos no son transportados por esta vía como otros metabolitos (Giaume *et al.* 1997). Alternativamente, los β -amiloides podrían ser transportados por transcitosis seguida de endocitosis por los astrocitos adyacentes. Para estudiar esta hipótesis realizamos unos experimentos consistentes en aproximar diferentes cultivos de astrocitos “cargados” o no cargados de β -amiloide. Así, si los astrocitos eran capaces de transportar los β -amiloides deberían no sólo captar los β -amiloides, sino también liberarlos, con objeto de que pudieran ser internalizados por los astrocitos adyacentes. En efecto, nuestros resultados (figura 53) indican que los astrocitos son capaces de liberar al medio los β -amiloides y que éstos son posteriormente captados por otros astrocitos libres de β -amiloide.

En resumen, podemos proponer que los astrocitos no sólo contribuyen al aclaramiento del β -amiloide a través de su degradación mediante las enzimas proteolíticas IDE (“insulin degrading enzyme”) y neprilisina (Son *et al.* 2016, Yamamoto *et al.* 2016), sino que servirían de hilo conductor entre el lugar donde se produce el exceso de β -amiloide y el líquido cefalorraquídeo, donde liberarían el β -amiloide, que posteriormente sería transportado por la sangre. Sin embargo, si en algún punto se bloquea este flujo, el astrocito acumularía más β -amiloide del que es capaz de degradar, lo que le causaría la muerte y su incorporación a las placas amiloides, constituyendo las placas “GFAP positivas” descritas en la literatura, y llamadas así por su contenido en GFAP, una proteína característica de los astrocitos (Nagele *et al.* 2003).

En el transcurso de este trabajo, hemos identificado una población de astrocitos resistente a los tres β -amiloides ensayados (figuras 54 y 55). Asimismo, estos astrocitos sobreviven a sucesivas exposiciones a β -amiloide, posiblemente porque su maquinaria de producción de radicales libres de oxígeno es insensible a los β -amiloides (figura 56). Aún no sabemos qué función desempeña esta subpoblación, pero sí somos conscientes de su relevancia para entender la etiología de la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, estos astrocitos podrían constituir la cadena destinada al aclaramiento del β -amiloide, dada su inmunidad al efecto deletéreo de los péptidos.

Recapitulando, en nuestras circunstancias experimentales, los astrocitos son extremadamente sensibles a los tres β -amiloides ensayados, siendo capaces no sólo de internalizarlos, sino también de liberarlos de nuevo. Pero, al mismo tiempo, una subpoblación de estos astrocitos, es resistente a los péptidos y sus efectos; dos caras de una misma moneda que nos muestran cuánto nos queda aún por estudiar y entender en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.



Conclusiones

6. Conclusiones.

1.- Todos los β -amiloides ensayados producen una marcada muerte neuronal, aunque el efecto es más pronunciado en presencia del β -amiloide 25-35.

2.- La muerte neuronal no parece estar relacionada con la producción de radicales libres de oxígeno provocada por la presencia de los β -amiloides. Sin embargo, parece existir una relación directa entre la capacidad de entrada de los β -amiloides en la célula y la producción de radicales libres, posiblemente condicionada por su interacción directa con la mitocondria.

3.- Todos los β -amiloides ensayados reducen la expresión de proteínas sinápticas tales como la sinaptofisina. Sin embargo, a corto plazo sólo el β -amiloide 40 produce una colocalización aberrante de las proteínas pre y postsinápticas, tales como sinaptotagmina y PSD-95.

4.- Todos los efectos deletéreos provocados por los β -amiloides en las neuronas descritos en el presente trabajo, son atenuados por la formación de complejos β -amiloide-albúmina, lo que sugiere que la albúmina sérica cumple un papel esencial en el transporte y aclaramiento del β -amiloide

5.- Los tres β -amiloides ensayados reducen de forma muy significativa la viabilidad en astrocitos, hasta el punto de que su efecto es mucho mayor que el observado en neuronas.

6.- La muerte celular parece estar relacionada con la producción de radicales libres de oxígeno observada en presencia de los β -amiloides y es, posiblemente, consecuencia de la accesibilidad de los péptidos al interior de los astrocitos.

7.- En nuestras condiciones experimentales la internalización de los β -amiloides en astrocitos se produce por un mecanismo de endocitosis mediada por clatrina. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la mencionada endocitosis está mediada por receptor. Sin embargo, el silenciamiento mediante RNA de interferencia del receptor LRP1 no suprime la internalización de los péptidos, lo que

indica que el LRP1 no es el receptor utilizado por los β -amiloides para su entrada en los astrocitos.

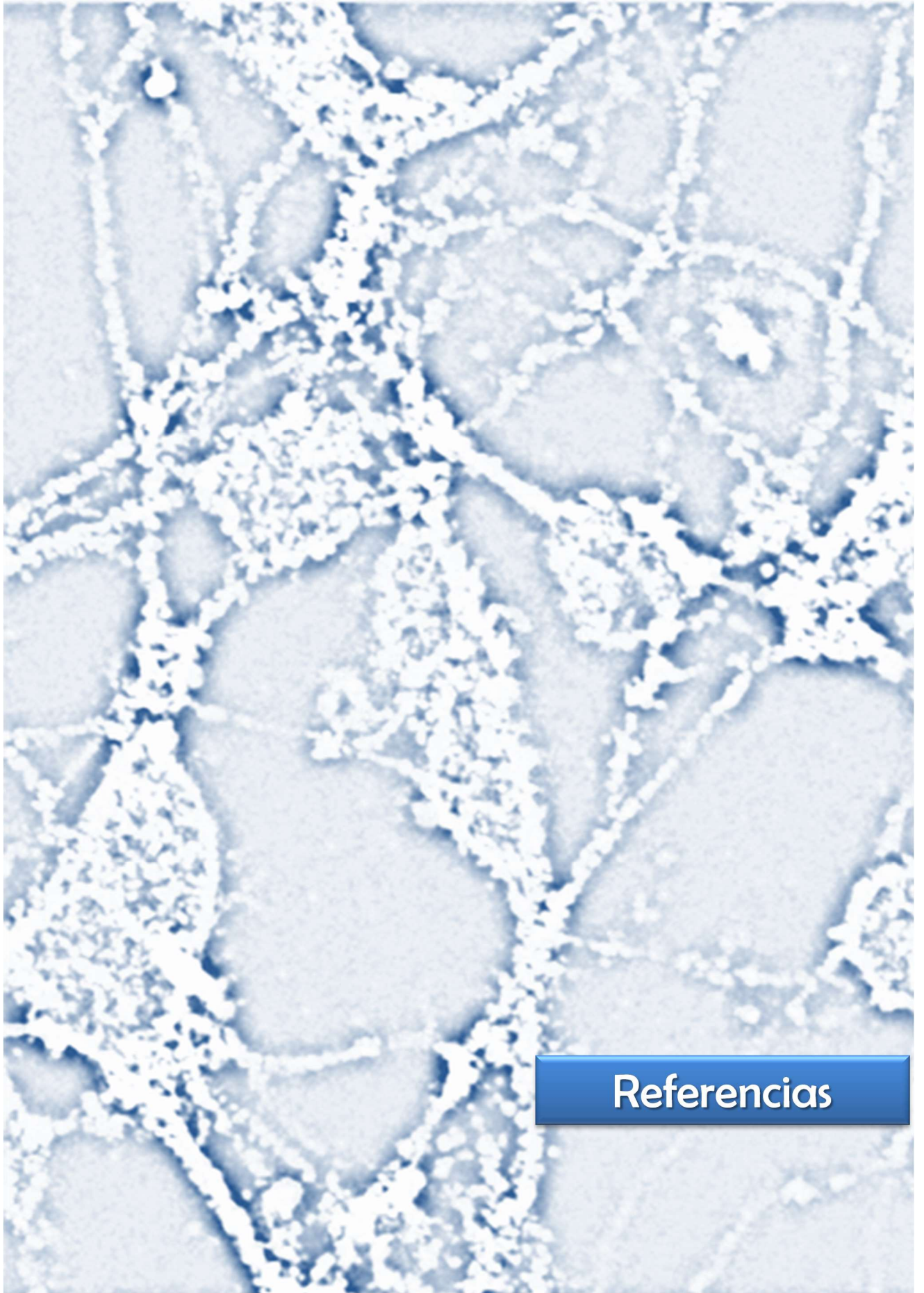
8.- A diferencia de lo observado en neuronas, la albúmina sérica no previene de los efectos deletéreos de los β -amiloides en astrocitos. Este hecho no es sorprendente si tenemos en cuenta que los astrocitos poseen un sistema muy eficiente para la internalización de la albúmina.

9.- Nuestros estudios en cultivos proximales de astrocitos sugieren que los astrocitos llevan a cabo la transcitosis de los β -amiloides, posiblemente formando una cadena de transporte para su liberación al líquido cefalorraquídeo.

10.- Nuestros resultados demuestran la existencia de una población de astrocitos resistentes al β -amiloide. Dichos astrocitos podrían constituir la vía por la que se lleva a cabo la eliminación del β -amiloide cerebral.

CONCLUSIÓN FINAL.

Los resultados recogidos en la presente memoria indican que los efectos deletéreos del β -amiloide comienzan por la disrupción de la estructura de la sinapsis, lo que sin duda conduce al cese de la comunicación interneuronal característico de la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, nuestros resultados indican que los astrocitos pueden constituir el sistema de recogida del β -amiloide sobrante de las sinapsis, por transcitosis, directamente a la sangre o a través del líquido cefalorraquídeo.



Referencias

7. Bibliografía.

- Ahn, S. M., Byun, K., Cho, K. et al. (2008) Human microglial cells synthesize albumin in brain. *PLoS One*, **3**, e2829.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.
- Alikhani, N., Ankarcona, M. and Glaser, E. (2009) Mitochondria and Alzheimer's disease: amyloid-beta peptide uptake and degradation by the presequence protease, hPreP. *J Bioenerg Biomembr*, **41**, 447-451.
- Allaman, I., Gavillet, M., Belanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A. and Magistretti, P. J. (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci*, **30**, 3326-3338.
- Almeida, C. G., Tampellini, D., Takahashi, R. H., Greengard, P., Lin, M. T., Snyder, E. M. and Gouras, G. K. (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis*, **20**, 187-198.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6923-6928.
- Alvira-Botero, X. and Carro, E. M. (2010) Clearance of amyloid-beta peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci*, **3**, 219-229.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. and Murtagh, F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, **8**, 429-431.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M. and Hernandez, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, **84**, 361-384.
- Basak, J. M., Verghese, P. B., Yoon, H., Kim, J. and Holtzman, D. M. (2012) Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of A β uptake and degradation by astrocytes. *J Biol Chem*, **287**, 13959-13971.
- Bell, R. D., Deane, R., Chow, N. et al. (2009) SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol*, **11**, 143-153.
- Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernandez, E., Lillo, C., Kozyraki, R., Tabertero, A. and Medina, J. M. (2009) Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem*, **111**, 49-60.
- Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernandez, E., Perez-Reyes, P. L., Tabertero, A. and Medina, J. M. (2008) Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem*, **106**, 1149-1159.
- Beyreuther, K., Bush, A. I., Dyrks, T. et al. (1991) Mechanisms of amyloid deposition in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **640**, 129-139.
- Biere, A. L., Ostaszewski, B., Stimson, E. R., Hyman, B. T., Maggio, J. E. and Selkoe, D. J. (1996) Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem*, **271**, 32916-32922.
- Binder, L. I., Frankfurter, A. and Rebhun, L. I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, **101**, 1371-1378.

- Boada, M., Ortiz, P., Anaya, F. et al. (2009) Amyloid-targeted therapeutics in Alzheimer's disease: use of human albumin in plasma exchange as a novel approach for Abeta mobilization. *Drug News Perspect*, **22**, 325-339.
- Boada, M., Ramos-Fernandez, E., Guivernau, B. et al. (2014) Treatment of Alzheimer disease using combination therapy with plasma exchange and haemapheresis with albumin and intravenous immunoglobulin: Rationale and treatment approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) study. *Neurologia*.
- Bohm, C., Chen, F., Sevalle, J., Qamar, S., Dodd, R., Li, Y., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E. and St George-Hyslop, P. H. (2015) Current and future implications of basic and translational research on amyloid-beta peptide production and removal pathways. *Mol Cell Neurosci*, **66**, 3-11.
- Bowman, G. L., Kaye, J. A., Moore, M., Waichunas, D., Carlson, N. E. and Quinn, J. F. (2007) Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology*, **68**, 1809-1814.
- Bruschi, M., Santucci, L., Candiano, G. and Ghiggeri, G. M. (2013) Albumin heterogeneity in low-abundance fluids. The case of urine and cerebro-spinal fluid. *Biochim Biophys Acta*, **1830**, 5503-5508.
- Calabrese, B., Shaked, G. M., Tabarean, I. V., Braga, J., Koo, E. H. and Halpain, S. (2007) Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein. *Mol Cell Neurosci*, **35**, 183-193.
- Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B. and Sharpe, M. A. (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem*, **80**, 91-100.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J. et al. (2005) Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *Faseb j*, **19**, 2040-2041.
- Chang, W. J., Rothberg, K. G., Kamen, B. A. and Anderson, R. G. (1992) Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J Cell Biol*, **118**, 63-69.
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W. et al. (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*, **2**, 271-276.
- Citron, M. (2004) Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 92-97.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. and Ashe, K. H. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*, **8**, 79-84.
- Coleman, P. D. and Yao, P. J. (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 1023-1027.
- Costa, M., Ortiz, A. M. and Jorquera, J. I. (2012) Therapeutic albumin binding to remove amyloid-beta. *J Alzheimers Dis*, **29**, 159-170.
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A. et al. (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*, **43**, 333-344.
- DeKosky, S. T. and Scheff, S. W. (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, **27**, 457-464.

- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Paul, S. M. and Holtzman, D. M. (2002) Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*, **295**, 2264-2267.
- Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G. and Anandatheerthavarada, H. K. (2006) Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, **26**, 9057-9068.
- Du, H. and Yan, S. S. (2010) Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 198-204.
- Erickson, M. A. and Banks, W. A. (2013) Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, **33**, 1500-1513.
- Evans, N. A., Facci, L., Owen, D. E., Soden, P. E., Burbidge, S. A., Prinjha, R. K., Richardson, J. C. and Skaper, S. D. (2008) Abeta(1-42) reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J Neurosci Methods*, **175**, 96-103.
- Fernandez-Vizarra, P., Fernandez, A. P., Castro-Blanco, S., Serrano, J., Bentura, M. L., Martinez-Murillo, R., Martinez, A. and Rodrigo, J. (2004) Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*, **19**, 823-844.
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M. and De Felice, F. G. (2015) Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*, **9**, 191.
- Fishman, P. S., Farrand, D. A. and Kristt, D. A. (1990) Internalization of plasma proteins by cerebellar Purkinje cells. *J Neurol Sci*, **100**, 43-49.
- Fukumoto, H., Tokuda, T., Kasai, T., Ishigami, N., Hidaka, H., Kondo, M., Allsop, D. and Nakagawa, M. (2010) High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Faseb j*, **24**, 2716-2726.
- Garcia-Morales, P., Minami, Y., Luong, E., Klausner, R. D. and Samelson, L. E. (1990) Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9255-9259.
- Gekle, M. (2005) Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol*, **67**, 573-594.
- Giaume, C., Tabertero, A. and Medina, J. M. (1997) Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*, **21**, 114-123.
- Giedraitis, V., Sundelof, J., Irizarry, M. C., Garevik, N., Hyman, B. T., Wahlund, L. O., Ingelsson, M. and Lannfelt, L. (2007) The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, **427**, 127-131.
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., De Bona, P., Pappalardo, G., Nicoletti, F., Rizzarelli, E. and Copani, A. (2010) The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev Neurosci*, **21**, 83-93.
- 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 Commun*, **120**, 885-890.
- Granda, B., Tabertero, A., Tello, V. and Medina, J. M. (2003) Oleic acid induces GAP-43 expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5. *Brain Res*, **988**, 1-8.

- Grdadolnik, J. and Marechal, Y. (2005) Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by Fourier transform infrared spectroscopy, part II: kinetic studies. *Appl Spectrosc*, **59**, 1357-1364.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. and Sisodia, S. (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, a006270.
- Hammad, S. M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W. O. and Argraves, W. S. (1997) Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem*, **272**, 18644-18649.
- Han, W., Rhee, J. S., Maximov, A., Lao, Y., Mashimo, T., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C. (2004) N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1. *Neuron*, **41**, 85-99.
- Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K. Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A. and Anderton, B. H. (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem*, **282**, 23645-23654.
- Hardy, J. (1992) An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, **15**, 200-201.
- Hardy, J. and Allsop, D. (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, **12**, 383-388.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353-356.
- Hartman, R. E., Izumi, Y., Bales, K. R., Paul, S. M., Wozniak, D. F. and Holtzman, D. M. (2005) Treatment with an amyloid-beta antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **25**, 6213-6220.
- Hauptmann, S., Scherping, I., Drose, S., Brandt, U., Schulz, K. L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A. and Muller, W. E. (2009) Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging*, **30**, 1574-1586.
- He, X. M. and Carter, D. C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358**, 209-215.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. and Martin, D. W., Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol*, **9**, 1381-1388.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. and Malinow, R. (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, **52**, 831-843.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D. and Yan, R. (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, **9**, 1520-1525.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y. et al. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*, **6**, 143-150.

- Jacob, C. P., Koutsilieri, E., Bartl, J. et al. (2007) Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **11**, 97-116.
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M. et al. (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5161-5166.
- Juurink, B. H. and Devon, R. M. (1990) Macromolecular translocation--a possible function of astrocytes. *Brain Res*, **533**, 73-77.
- Kaether, C. and Haass, C. (2004) A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation. *J Cell Biol*, **167**, 809-812.
- Kaether, C., Haass, C. and Steiner, H. (2006) Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis*, **3**, 275-283.
- Kaminsky, Y. G., Marlatt, M. W., Smith, M. A. and Kosenko, E. A. (2010) Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25-35). *Exp Neurol*, **221**, 26-37.
- Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Kooi, E. J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M. R. and Hol, E. M. (2014) Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **35**, 492-510.
- Kanekiyo, T. and Bu, G. (2014) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, **6**, 93.
- Kanekiyo, T., Liu, C. C., Shinohara, M., Li, J. and Bu, G. (2012) LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid-beta. *J Neurosci*, **32**, 16458-16465.
- Kanekiyo, T., Zhang, J., Liu, Q., Liu, C. C., Zhang, L. and Bu, G. (2011) Heparan sulphate proteoglycan and the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 constitute major pathways for neuronal amyloid-beta uptake. *J Neurosci*, **31**, 1644-1651.
- Kaneko, I., Morimoto, K. and Kubo, T. (2001) Drastic neuronal loss in vivo by beta-amyloid racemized at Ser(26) residue: conversion of non-toxic [D-Ser(26)]beta-amyloid 1-40 to toxic and proteinase-resistant fragments. *Neuroscience*, **104**, 1003-1011.
- Kim, T. S., Pae, C. U., Yoon, S. J. et al. (2006) Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, **21**, 344-348.
- Klyubin, I., Walsh, D. M., Lemere, C. A. et al. (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med*, **11**, 556-561.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T. et al. (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4012-4017.
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X. et al. (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*, **10**, 719-726.
- Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J. and Ripova, D. (2012) Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis*, **2012**, 731526.

- Konietzko, U. (2012) AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, **9**, 200-216.
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **268**, 24374-24384.
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagai, Y. and Kaneko, I. (2002) In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res*, **70**, 474-483.
- Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S. and Lichtenthaler, S. F. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *Embo j*, **29**, 3020-3032.
- Kummer, M. P. and Heneka, M. T. (2014) Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther*, **6**, 28.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L. et al. (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*, **24**, 10191-10200.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L. and Klein, W. L. (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **27**, 796-807.
- Lanz, T. A., Carter, D. B. and Merchant, K. M. (2003) Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis*, **13**, 246-253.
- Laporte, V., Lombard, Y., Levy-Benezra, R., Tranchant, C., Poindron, P. and Warter, J. M. (2004) Uptake of Abeta 1-40- and Abeta 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J Leukoc Biol*, **76**, 451-461.
- Lee, S. J., Seo, B. R. and Koh, J. Y. (2015) Metallothionein-3 modulates the amyloid beta endocytosis of astrocytes through its effects on actin polymerization. *Mol Brain*, **8**, 84.
- Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., Jr. and Trojanowski, J. Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*, **251**, 675-678.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L. et al. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, **293**, 1487-1491.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M. and Selkoe, D. (2009) Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, **62**, 788-801.
- Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S. and Masliah, E. (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 901-911.
- Llewellyn, D. J., Langa, K. M., Friedland, R. P. and Lang, I. A. (2010) Serum albumin concentration and cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res*, **7**, 91-96.
- Lyons, B., Friedrich, M. G., Raftery, M. J. and Truscott, R. J. (2016) Amyloid plaque in the human brain can decompose from Abeta1-40/1-42 by spontaneous non-enzymatic processes. *Anal Chem*.

- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J. and Reddy, P. H. (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet*, **15**, 1437-1449.
- Manczak, M., Calkins, M. J. and Reddy, P. H. (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*, **20**, 2495-2509.
- Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B. and Mandelkow, E. (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging*, **16**, 355-362; discussion 362-353.
- Masliah, E., Terry, R. D., Mallory, M., Alford, M. and Hansen, L. A. (1990) Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **137**, 1293-1297.
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo j*, **4**, 2757-2763.
- Masters, C. L. and Selkoe, D. J. (2012) Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, a006262.
- Mastrogliacoma, F., Lindsay, J. G., Bettendorff, L., Rice, J. and Kish, S. J. (1996) Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **39**, 592-598.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E. and Bateman, R. J. (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, **330**, 1774.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I. and Masters, C. L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **46**, 860-866.
- Meloun, B., Moravek, L. and Kostka, V. (1975) Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett*, **58**, 134-137.
- Millucci, L., Ghezzi, L., Bernardini, G. and Santucci, A. (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci*, **11**, 54-67.
- Milojevic, J. and Melacini, G. (2011) Stoichiometry and affinity of the human serum albumin-Alzheimer's Abeta peptide interactions. *Biophys J*, **100**, 183-192.
- Milojevic, J., Raditsis, A. and Melacini, G. (2009) Human serum albumin inhibits Abeta fibrillization through a "monomer-competitor" mechanism. *Biophys J*, **97**, 2585-2594.
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G. and Love, S. (2008) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, **18**, 240-252.
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E. et al. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 982-985.

- Morley, J. E., Farr, S. A., Banks, W. A., Johnson, S. N., Yamada, K. A. and Xu, L. (2010) A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*, **19**, 441-449.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J. and McNaughton, P. A. (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1426-1430.
- Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V. and Wang, H. Y. (2003) Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res*, **971**, 197-209.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P. and Buxbaum, J. D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama*, **283**, 1571-1577.
- Okabe, S. (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci*, **34**, 503-518.
- Okamoto, K. and Shaw, J. M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **39**, 503-536.
- Olubiyi, O. O. and Strodel, B. (2012) Structures of the amyloid beta-peptides Abeta1-40 and Abeta1-42 as influenced by pH and a D-peptide. *J Phys Chem B*, **116**, 3280-3291.
- Pagani, L. and Eckert, A. (2011) Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis*, **2011**, 925050.
- Pardossi-Piquard, R. and Checler, F. (2012) The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem*, **120 Suppl 1**, 109-124.
- Perry, E. K., Perry, R. H., Tomlinson, B. E., Blessed, G. and Gibson, P. H. (1980) Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett*, **18**, 105-110.
- Puzzo, D. and Arancio, O. (2013) Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis*, **33 Suppl 1**, S111-120.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A. and Arancio, O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*, **28**, 14537-14545.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z. et al. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*, **273**, 32730-32738.
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. and Bourdon, E. (2008) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, **582**, 1783-1787.
- Roher, A. E., Esh, C. L., Kokjohn, T. A. et al. (2009) Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, **5**, 18-29.
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W. and Zlabinger, G. J. (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods*, **156**, 39-45.

- Santos, R. X., Correia, S. C., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., Moreira, P. I. and Zhu, X. (2010) A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **20 Suppl 2**, S401-412.
- Savioz, A., Leuba, G. and Vallet, P. G. (2014) A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, **18**, 86-94.
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A. and Mufson, E. J. (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, **27**, 1372-1384.
- Scimemi, A., Meabon, J. S., Woltjer, R. L., Sullivan, J. M., Diamond, J. S. and Cook, D. G. (2013) Amyloid-beta1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci*, **33**, 5312-5318.
- Selkoe, D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, **298**, 789-791.
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. and Hyman, B. T. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**, a006189.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H. et al. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, **14**, 837-842.
- Shao, C. Y., Mirra, S. S., Sait, H. B., Sacktor, T. C. and Sigurdsson, E. M. (2011) Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, **122**, 285-292.
- Sheng, M., Sabatini, B. L. and Sudhof, T. C. (2012) Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R. et al. (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*, **106**, 1489-1499.
- Shrestha, B. R., Vitolo, O. V., Joshi, P., Lordkipanidze, T., Shelanski, M. and Dunaevsky, A. (2006) Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, **33**, 274-282.
- Silverberg, G. D., Messier, A. A., Miller, M. C., Machan, J. T., Majmudar, S. S., Stopa, E. G., Donahue, J. E. and Johanson, C. E. (2010) Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol*, **69**, 1034-1043.
- Sisodia, S. S. (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6075-6079.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G. et al. (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, **8**, 1051-1058.
- Sofroniew, M. V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, **32**, 638-647.
- Son, S. M., Cha, M. Y., Choi, H., Kang, S., Lee, M. S., Park, S. A. and Mook-Jung, I. (2016) Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy*, **12**, 784-800.

- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J. et al. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*, **5**, e9505.
- Spillantini, M. G., Bird, T. D. and Ghetti, B. (1998) Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol*, **8**, 387-402.
- Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J. and Hyman, B. T. (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*, **25**, 7278-7287.
- Stanyon, H. F. and Viles, J. H. (2012) Human serum albumin can regulate amyloid-beta peptide fiber growth in the brain interstitium: implications for Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **287**, 28163-28168.
- Stevens, R. W., Elmendorf, D., Gourlay, M., Stroebel, E. and Gaafar, H. A. (1979) Application of fluoroimmunoassay to cerebrospinal fluid immunoglobulin G and albumin. *J Clin Microbiol*, **10**, 346-350.
- Tabernerero, A., Bolanos, J. P. and Medina, J. M. (1993) Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J*, **294 (Pt 3)**, 635-638.
- Tabernerero, A., Granda, B., Medina, A., Sanchez-Abarca, L. I., Lavado, E. and Medina, J. M. (2002a) Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J Neurochem*, **81**, 881-891.
- Tabernerero, A., Medina, A., Sanchez-Abarca, L. I., Lavado, E. and Medina, J. M. (1999) The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of cytosolic Ca²⁺ concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia*, **25**, 1-9.
- Tabernerero, A., Orfao, A. and Medina, J. M. (1996) Astrocyte differentiation in primary culture followed by flow cytometry. *Neurosci Res*, **24**, 131-138.
- Tabernerero, A., Velasco, A., Granda, B., Lavado, E. M. and Medina, J. M. (2002b) Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Biol Chem*, **277**, 4240-4246.
- Tamaki, C., Ohtsuki, S., Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Yamada, K., Yabuki, C. and Terasaki, T. (2006) Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm Res*, **23**, 1407-1416.
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S. et al. (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, **11**, 457-470.
- Tian, G., Kong, Q., Lai, L., Ray-Chaudhury, A. and Lin, C. L. (2010) Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **113**, 978-989.
- Tildon, J. T., McKenna, M. C., Stevenson, J. and Couto, R. (1993) Transport of L-lactate by cultured rat brain astrocytes. *Neurochem Res*, **18**, 177-184.
- Ting, J. T., Kelley, B. G., Lambert, T. J., Cook, D. G. and Sullivan, J. M. (2007) Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 353-358.

- van der Kant, R. and Goldstein, L. S. (2015) Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*, **32**, 502-515.
- Vassar, R. (2004) BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, **23**, 105-114.
- Vega, L., Arroyo, A. A., Tabernero, A. and Medina, J. M. (2009) Albumin-blunted deleterious effect of amyloid-beta by preventing the internalization of the peptide into neurons. *J Alzheimers Dis*, **17**, 795-805.
- Vicario, C. and Medina, J. M. (1992) Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period. *J Neurochem*, **59**, 32-40.
- Vicario, C., Tabernero, A. and Medina, J. M. (1993) Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Pediatr Res*, **34**, 709-715.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, **416**, 535-539.
- Walsh, D. M., Townsend, M., Podlisny, M. B., Shankar, G. M., Fadeeva, J. V., El Agnaf, O., Hartley, D. M. and Selkoe, D. J. (2005) Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J Neurosci*, **25**, 2455-2462.
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci*, **25**, 59-68.
- Wang, L. H., Rothberg, K. G. and Anderson, R. G. (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, **123**, 1107-1117.
- Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A. and Zhu, X. (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **29**, 9090-9103.
- Wang, Y., Wang, S. and Huang, M. (2015) Structure and enzymatic activities of human serum albumin. *Curr Pharm Des*, **21**, 1831-1836.
- Wei, W., Nguyen, L. N., Kessels, H. W., Hagiwara, H., Sisodia, S. and Malinow, R. (2010) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci*, **13**, 190-196.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1858-1862.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S. and Couraud, P. O. (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 842-857.
- Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G. Y., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J. and Gauthier, S. (2012) Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci*, **39**, 436-445.
- Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G. Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E. and Mucke, L. (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med*, **7**, 612-618.

- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C. and Husemann, J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*, **9**, 453-457.
- Xiang, Y., Bu, X. L., Liu, Y. H. et al. (2015) Physiological amyloid-beta clearance in the periphery and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, **130**, 487-499.
- Yamada, K., Hashimoto, T., Yabuki, C. et al. (2008) The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem*, **283**, 34554-34562.
- Yamamoto, N., Fujii, Y., Kasahara, R., Tanida, M., Ohora, K., Ono, Y., Suzuki, K. and Sobue, K. (2016) Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid beta-protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. *Glia*, **64**, 952-962.
- Yan, S. D. and Stern, D. M. (2005) Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid-beta peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *Int J Exp Pathol*, **86**, 161-171.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, **250**, 279-282.
- Yasojima, K., McGeer, E. G. and McGeer, P. L. (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res*, **919**, 115-121.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci*, **30**, 11938-11950.
- Zlokovic, B. V. (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 723-738.