



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de BIOQUÍMICA y BIOLOGÍA MOLECULAR y FISIOLÓGIA
INSTITUTO de BIOLOGÍA y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

TESIS DOCTORAL:

**ENTRADA DE CALCIO INDUCIDA POR LOS
OLIGÓMEROS DEL PÉPTIDO AMILOIDE EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Presentada por D^a **ERICA CABALLERO ORTEGA** para
optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. Lucía Núñez Llorente
Dr. Carlos Villalobos Jorge



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

IBGM



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES

Instituto de Biología y Genética Molecular

C/ Sanz y Forés, 3
47003 Valladolid (Spain)
Telf: 983-184801 Fax: 983-184800
<http://www.ibgm.med.uva.es/>

Dña. Lucía Núñez Llorente, Profesora Titular del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid,

y D. Carlos Villalobos Jorge, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid,

CERTIFICAN: que **Dña. Erica Caballero Ortega** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado “**Entrada de calcio inducida por los oligómeros del péptido amiloide en la Enfermedad de Alzheimer**” como Tesis para alcanzar el grado de Doctor, realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Y para que conste donde proceda firman la presente certificación en Valladolid a 25 de Mayo de 2013.

Lucía Núñez Llorente

Carlos Villalobos Jorge

A Manolo y Daniela

Por dar sentido a mi vida

Agradecimientos:

Me gustaría comenzar por aquellos que me dieron la vida. Quiero agradecerte Mamá tu apoyo incondicional en todas mis decisiones, fáciles y difíciles, estés de acuerdo o no, tú siempre me apoyas. Y a ti Papá, por darme tu carácter que de tanto me va a servir en la vida. A los dos deciros que, ojalá yo sea capaz de educar a mis hijos como vosotros lo habéis hecho con Vanessa y conmigo. A mi hermana por ser tan estupenda como eres, mil gracias por darme, junto con David, a mi pequeña Adriana, quien me da su mejor sonrisa cada día y me hace feliz con su inocencia incluso en los peores momentos. A mi abuela que ha sido una segunda madre para nosotras, de la que aprendí a ser una luchadora y que nos ha enseñado tanto en la vida. Sería tan complicado seguir adelante sin todos vosotros que no me lo imagino. Por todo esto sólo me queda deciros que ¡os quiero muchísimo!

También me gustaría agradecerte a ti, Juan Carlos, todo lo que has hecho por mí y recordarte que sin ti yo no hubiera podido seguir con mis estudios y nada de esto se hubiera cumplido. Pero además de eso me diste la oportunidad de “ver”, tú ya me entiendes, y de todo corazón quiero que sepas que te agradezco todo lo que has hecho por mi madre y por mí. Ojala estuvieras más cerca físicamente aunque siempre te llevo en mi corazón. ¡Gracias!

Quiero dar las gracias a mi familia política, la cual considero mi propia familia: mis suegros May y Manolin, mis tíos Bego, Carlitos y Ángel y a mis primos Cris, Diani, Nacho, Andrea, Miguel, David y Azu pero sobre todo a Tati, mi mejor amiga, mi hermana. Gracias a todos por dejarme formar parte de vuestra vida y gracias por ser una familia unida.

A Carlos y Lucía que me brindaron la oportunidad de emprender este viaje tan maravilloso y por enseñarme todo lo que sé. Gracias por ser tan buenos directores de tesis y por ser como sois. Os aseguro que nunca olvidaré todo lo que me habéis enseñado, no sólo dentro del laboratorio sino fuera de él también.

A mis compañeros del laboratorio: Maria, Diego, David, Miriam y sin olvidar a Eva y Carmencita quienes me enseñaron mucho de lo que hoy sé. ¡Gracias chicos! Sin vosotros esto hubiera sido más difícil, me habéis hecho reír cuando las cosas iban mal y espero haber hecho lo mismo por vosotros. Sólo deciros que luchéis como hasta ahora y conseguiréis todo lo que os propongais. María; gracias por todo, por tus cultivos, por tus conversaciones, por tu compañía, por escucharme. Miriam; gracias por tus consejos, por darme tu visión de la vida tan maravillosa, por tus ánimos....

Y de tí pequeño no me voy a olvidar, el pilar de mi vida, quien camina a mi lado en cada paso que doy, con quien he pasado media vida y con quien he creado una familia. Hemos crecido juntos desde niños y seguiremos juntos creciendo y creando el mejor hogar para Daniela, sea cual sea lo que nos depare el futuro. Que más decirte si ya lo sabes, te debo todo lo que soy y todo lo que tengo, te necesito para continuar. Gracias, mil gracias por todo.

A mi hija Daniela.

ÍNDICE

ABREVIATURAS: I

I. INTRODUCCIÓN: 1

1. La Enfermedad de Alzheimer	3
1.1. Definición, Diagnóstico y Evolución	3
1.2. Etiología de la Enfermedad de Alzheimer	8
1.3. Características Neuropatológicas	9
1.4. Tipos de Enfermedad de Alzheimer	11
1.5. Prevalencia e Incidencia de la EA	14
1.6. Tratamientos de la EA.....	16
2. Hipótesis Sobre el Origen de la EA.....	19
2.1. Hipótesis de la Cascada Amiloide	19
2.2. Hipótesis Colinérgica.....	21
2.3. Hipótesis de la Proteína Tau.....	23
3. El Péptido Amiloide.....	25
3.1. Formación del Péptido Amiloide	25
3.2. Péptido Amiloide y EA.....	27
3.3. Estados de Agregación de A β	31
3.4. Mecanismos de Neurotoxicidad de A β	32
4. Proteína Tau	34
4.1. Papel Fisiológico de Tau.....	35
4.2. Mecanismos de Toxicidad de Tau.....	35
5. Homeostasis del Ca ²⁺ Intracelular en Neuronas	39

5.1. Canales de Ca ²⁺ de la membrana plasmática.....	43
5.1.1. Receptor tipo NMDA.....	49
5.1.2. Sincronización neuronal	52
5.2. Sistemas de Extrusión de Ca ²⁺ de la Membrana Plasmática	54
5.3. Canales de Ca ²⁺ del RE	56
5.4. Sistemas de Extrusión de Ca ²⁺ de Endomembranas	58
5.5. Homeostasis del Ca ²⁺ Mitocondrial	60
6. Mitocondria y Muerte Neuronal	62
7. Calcio intracelular y EA.....	67
7.1. Entrada de Ca ²⁺ inducida por A β	73
7.1.1. Poro o canal amiloide.....	74
7.2. Ca ²⁺ y Presenilinas.....	75
<u>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:</u>	79
<u>III. MATERIALES Y MÉTODOS:</u>	83
1. Métodos experimentales	85
1.1. Cultivos neuronales.....	85
1.2. Otros cultivos celulares	88
1.3. Preparación de los oligómeros del péptido amiloide A β ₁₋₄₂	89
1.4. Western blot.....	91
1.5. Imagen de fluorescencia y calcio citosólico	92
1.6. Inmunocitoquímica	97
1.7. Imagen de bioluminiscencia y calcio mitocondrial	100
1.8. Muerte celular.....	105
1.9. Transfección de neuronas y células HEK293	107
1.10. Análisis estadístico y de datos.....	108

2. Materiales y reactivos	108
3. Tampones y soluciones	112
3.1. Soluciones para Western blot	114
3.2. Soluciones para medidas de apoptosis	116
<u>IV. RESULTADOS:</u>	117
1. Preparación de los oligómeros del péptido amiloide	119
2. Efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre calcio y muerte neuronal	131
2.1. Los nuevos oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen el incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas	131
2.2. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial	135
2.3. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen apoptosis	137
3. Posibles vías de entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$	138
4. Las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} revelan la formación de circuitos neurales in vitro susceptibles de ser excitados por los oligómeros	142
5. Contribución del circuito neuronal a la respuesta a los oligómeros	147
6. Efecto de los antagonistas de canales sobre la respuesta a los oligómeros en presencia y ausencia de circuito neuronal	156
7. Efecto de los oligómeros $A\beta_{1-42}$ en líneas celulares que expresan o no expresan receptores tipo NMDA	171

8. Efecto de los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$ en células HEK293 transfectadas con receptores tipo NMDA 173

9. Efecto de los oligómeros $A\beta_{1-42}$ sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en células GT1... 177

V. DISCUSIÓN: 179

VI. CONCLUSIONES: 193

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 199

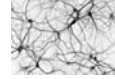
Abreviaturas

$\Delta\Psi_{mit}$	Diferencia de potencial mitocondrial
λ	Longitud de onda
$A\beta$	Péptido amiloide
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AEQ	Aecurina
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMPA	Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
ANOVA	Análisis de varianza
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
$[Ca^{2+}]_{cit}$	Concentración de calcio libre citosólico
$[Ca^{2+}]_{mit}$	Concentración de calcio libre mitocondrial
CaM	Calmodulina
c.p.m.	Cuentas por minuto
c.p.s.	Cuentas por segundo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DHP	Dihidropiridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECC	Entrada capacitativa de calcio
EEM	Error estándar de la media
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonil cianida para-trifluorometoxifenil hidrazina
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía

GFP	Proteína fluorescente verde
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HFIP	Ácido hexafluoro isopropanoico
HS	Suero de caballo
IP₃ (InsP₃)	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP₃R (InsP₃R)	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato
MEC	Medio externo completo
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampón fosfato salino
PEPS	Potencial excitador postsináptico
PFA	Paraformaldehído
PIP₂	Fosfatidil inositol bis-fosfato
PMCA	Ca ²⁺ /ATPasa de la membrana plasmática
PS	Presenilina
PTPm	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
PVDF	Bifluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Canal de calcio operado por receptor
RyR	Receptor de Rianodina
SERCA	Ca ²⁺ /ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico.
SNC	Sistema nervioso central
SOC	Canal de calcio operado por depósito
TTX	Tetrodotoxina
UCM	Uniportador de calcio mitocondrial
VOC	Canal de calcio operado por voltaje

I. INTRODUCCIÓN

La más larga caminata comienza con un paso
Proverbio Hindú



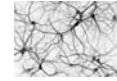
1. La Enfermedad de Alzheimer.

1.1 Definición, Diagnóstico y Evolución.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, por ello es necesario definir este concepto previamente. La demencia es una alteración adquirida y prolongada de diversas funciones cognitivas en un grado tal que dificulta la realización normal de las actividades diarias habituales, entendiendo por alteración adquirida aquella que se presenta en un momento determinado en la vida en el que las funciones cognitivas ya se han desarrollado, experimentando el paciente un deterioro con respecto a su nivel previo. La demencia puede aparecer por muchas causas tales como hipotiroidismo, derrame cerebral, toxicidad de un medicamento o una lesión cerebral.

La Enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por una muerte progresiva neuronal que afecta principalmente a regiones corticales del cerebro y parte del sistema límbico (Selkoe, 1991). La enfermedad puede desarrollarse a lo largo de muchos años en la vida y no ser la responsable de la muerte del individuo. Todas las enfermedades neurodegenerativas cursan con pérdida progresiva de neuronas y muchas comparten dos características con la enfermedad de Alzheimer: una etiología desconocida y tratamientos ineficaces a día de hoy.

Actualmente, la única manera de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer es a través de una autopsia cerebral tras el fallecimiento



del paciente (Post-mortem). Sin embargo, en pacientes vivos, los médicos pueden diagnosticar la enfermedad correctamente alrededor del 90% de los casos basándose en los síntomas mentales y de comportamiento, un examen físico y neuropsicológico. Al tratar de determinar si una persona tiene la enfermedad o no, el médico tomará en primer lugar la historia clínica del paciente seguido de un examen de su estado mental y de su comportamiento, utilizando la información proporcionada por la persona afectada y por la familia.

La EA puede distinguirse de otros tipos de demencia, en parte, por los síntomas presentados, la medida en que estos síntomas ocurren y la rapidez con que la enfermedad progresa. Un examen físico se llevará a cabo para ayudar a identificar y descartar otras posibles causas de demencia. Este examen suele incluir un examen físico general, análisis de sangre y análisis de orina. A través de un análisis de sangre se puede medir la función tiroidea ya que el hipotiroidismo, común en las personas de edad avanzada, puede causar demencia. La demencia también puede ser el resultado de una deficiencia de vitamina B12 que es frecuente en ancianos. También se usan exploraciones cerebrales (como la resonancia magnética) para conocer en detalle las imágenes descartando así otras posibles causas de demencia, incluyendo tumores cerebrales, lesiones cerebro-vasculares, acumulación de sangre en la superficie del cerebro u otras condiciones.

Las exploraciones cerebrales Post-mortem pueden mostrar cambios estructurales característicos presentes en EA como puede observarse en la **Fig. 1**.

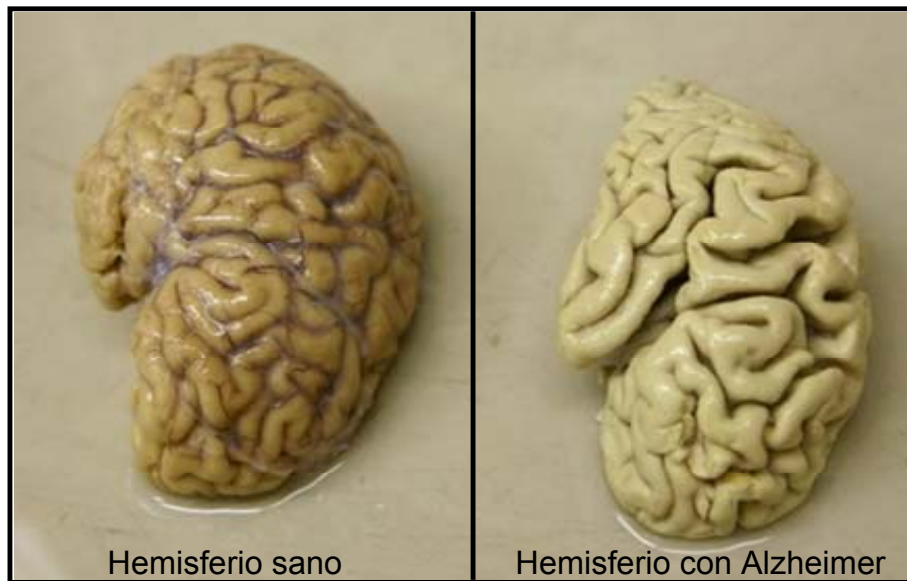
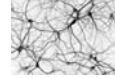
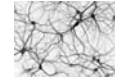


Figura 1. Comparación de dos hemisferios cerebrales humanos, uno sano y otro con enfermedad de Alzheimer. La imagen muestra un hemisferio de un cerebro humano sano (izquierda) junto a un hemisferio del cerebro de una persona con enfermedad de Alzheimer. Foto obtenida de la Unidad Morfológica de la psicopatología en la división de Neuropsiquiatría de la Belle Idée Hospital Universitario de Chene-Bourg, Ginebra, www.spanish.china.org.cn.

A nivel macroscópico puede apreciarse atrofia de la corteza cerebral que aparece más delgada y con circunvoluciones atróficas, el lóbulo temporal también se ve afectado. El grado de atrofia cerebral comunmente se relaciona con el progreso de la enfermedad siendo más evidente la atrofia en estadíos más avanzados de la EA.

A nivel microscópico, los hechos distintivos de la EA, aunque no exclusivos de ella, son los relacionados con los depósitos del péptido β amiloide conocidos como placas seniles o amiloides y con los depósitos intracelulares de la proteína tau anormalmente



fosforilada, conocidos como ovillos neurofibrilares. Más adelante se describe en más detalle ambas estructuras características de la EA.

Se puede realizar un electroencefalograma para medir la actividad eléctrica en el cerebro. Las pruebas neuropsicológicas identifican síntomas del comportamiento mentales asociados con lesiones cerebrales o la función anormal del cerebro. Las pruebas neuropsicológicas utilizadas dependerán de los síntomas y del estado de avance de la demencia. Normalmente se comienza con el examen del estado mini-mental o “mini-mental status examination”, para ayudar a confirmar que el paciente está experimentando problemas con las funciones intelectuales. El MMSE incluye pruebas de memoria, atención, cálculos matemáticos y lenguaje. Si un paciente tiene demencia severa, las pruebas neuropsicológicas más allá del MMSE no suelen ser necesarias. Sin embargo, para los pacientes con déficit intelectual leve, pueden ser necesarias más pruebas para determinar si el paciente está mostrando simplemente signos de edad avanzada o está desarrollando EA. Dependiendo de la distribución de las lesiones en el cerebro existen tres fases evolutivas en la enfermedad (**Fig. 2**).

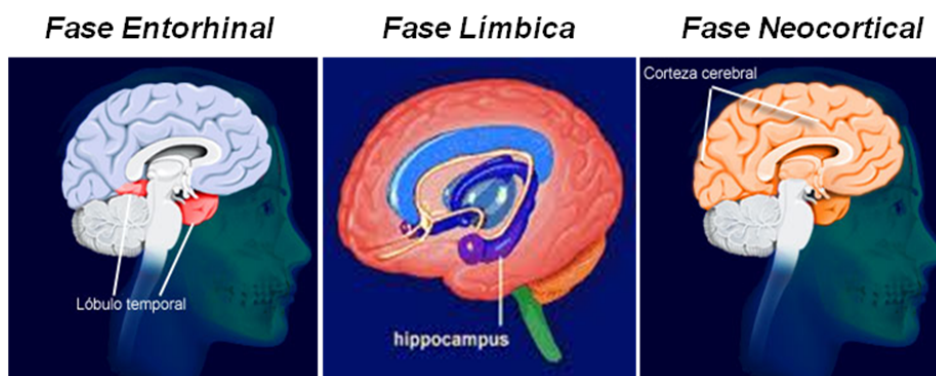
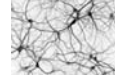


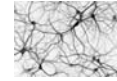
Figura 2. Fases evolutivas de la enfermedad de Alzheimer. Imágenes obtenidas de http://es.brainexplorer.org/glossary/cerebral_cortex.shtml.



La primera fase recibe el nombre de **leve o entorrinal**; las lesiones aparecen en el lóbulo temporal. Esta fase tiene una duración de 2 a 5 años y en ella se observa un deterioro paulatino de la memoria. La persona olvida eventos recientes, disminuye la percepción de su medio ambiente, sufre desorientación, desconcentración, cambios de humor, síntomas de depresión y fatiga. El lenguaje y las habilidades motoras se conservan.

La segunda fase se denomina **moderada o límbica** ya que las lesiones se extienden hacia la región límbica o hipocampo. Esta fase puede durar entre 2 y 10 años. El paciente sufre diversas patologías como afasia (dificultad para hablar), apraxia (dificultad para realizar funciones aprendidas), agnosia (pérdida de la capacidad de reconocimiento), debilidad muscular, alteraciones en la postura, alucinaciones y signos psicóticos.

Más tarde las lesiones aparecen en toda la neocorteza y se le denomina fase **grave o neocortical**. En esta fase los síntomas cerebrales se acentúan, aumenta la rigidez muscular y pueden aparecer temblores e incluso crisis epilépticas. Los pacientes se muestran apáticos, con pérdida de respuesta al dolor, incontinencia urinaria y suelen terminar encamados con alimentación asistida y fallecer por neumonía, infección sistémica u otra enfermedad accidental. Estudios inmunocitoquímicos muestran que en estadios avanzados de la enfermedad aparecen cambios patológicos en el cerebelo (Larner, 1997).

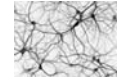


1.2 Etiología de la Enfermedad de Alzheimer.

El origen de la Enfermedad de Alzheimer permanece aún desconocido siendo en la actualidad un tema muy controvertido. Existen varias hipótesis que intentan explicar el origen de la enfermedad, aunque no existe consenso total al respecto. A continuación se exponen las dos hipótesis que han recibido mayor atención en la literatura:

Según la hipótesis colinérgica, la enfermedad se produce por una reducción de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina. La acetilcolina es liberada por las neuronas al espacio sináptico donde ejerce su función sobre otras neuronas u otras células siendo clave en la transmisión de los estímulos nerviosos. Esta hipótesis no ha mantenido un apoyo generalizado ya que la mayoría de los medicamentos que tratan una deficiencia colinérgica tienen muy poca o nula efectividad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Según la hipótesis de la cascada amiloide, la más aceptada, la enfermedad se debería a la acumulación extracelular anómala de proteínas β amiloides ($A\beta$) y a la neurotoxicidad de estos agregados. Esta hipótesis se ve apoyada porque en los casos de EA de origen genético se ha encontrado que todas las mutaciones genéticas aparecen asociadas a proteínas implicadas en la génesis de $A\beta$ que además cursan con depósito excesivo de $A\beta$. En concreto se han encontrado mutaciones en los genes que codifican para presenilina I (PS1), presenilina 2 (PS2) y el gen de la proteína precursora amiloide (APP) localizado en el cromosoma 21. Se cree que las dos presenilinas forman parte del complejo multienzimático implicado en la generación de $A\beta$ a partir de APP. Otra evidencia importante que

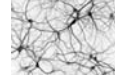


apoya esta hipótesis es que la presencia de la isoforma de la Apolipoproteína E4 (*APOE4*), que tiende a una superproducción amiloide en el cerebro antes de que aparezcan los primeros síntomas de la EA, es un factor de riesgo para sufrir la enfermedad.

1.3 Características Neuropatológicas.

Como se ha comentado anteriormente, existen dos características neuropatológicas fundamentales en la EA (**Fig. 3**), las placas seniles o amiloides y los ovillos neurofibrilares (Arriagada *et al.*, 1992).

Las placas amiloides son depósitos insolubles extracelulares cuyo elemento fundamental es la proteína β -amiloide ($A\beta$) (Glennner y Wong, 1984). La proteína β -amiloide está compuesta por 40 o 42 aminoácidos y es el producto de la ruptura de la proteína precursora amiloide (APP) (Masters *et al.*, 1985). Aunque se ha descrito una amplia variedad morfológica de placas amiloides, se pueden resumir en dos, según sus características tintoriales y los hallazgos neuropatológicos asociados: placas difusas y placas compactas. Las placas difusas no inducen respuesta glial a su alrededor, por lo que se consideran relativamente benignas; de hecho son frecuentes en la corteza cerebral de sujetos de edad avanzada sin deterioro cognitivo (Arriagada *et al.*, 1992). Por el contrario las placas compactas contienen o están rodeadas de neuritas distróficas o placas neuríticas, astrocitos reactivos y microglía activada. Estas placas compactas se consideran tóxicas, aunque todavía se ignora si las



placas difusas presentes en el envejecimiento normal evolucionan hacia placas compactas.

Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares cuyo principal componente es la proteína tau. Estos ovillos se forman por una hiperfosforilación y plegamiento anómalo de la proteína tau que distorsiona la arquitectura de los neurotúbulos y microfilamentos impidiendo así el flujo axonal. En la EA, tau se agrega formando filamentos helicoidales pareados y adoptando una conformación típica de lámina- β . Es precisamente la combinación de estos dos tipos de agregados, formados por dos tipos de proteínas diferentes, en dos compartimentos separados, intraneuronal y extracelular, lo que hace única y especialmente compleja a la EA.

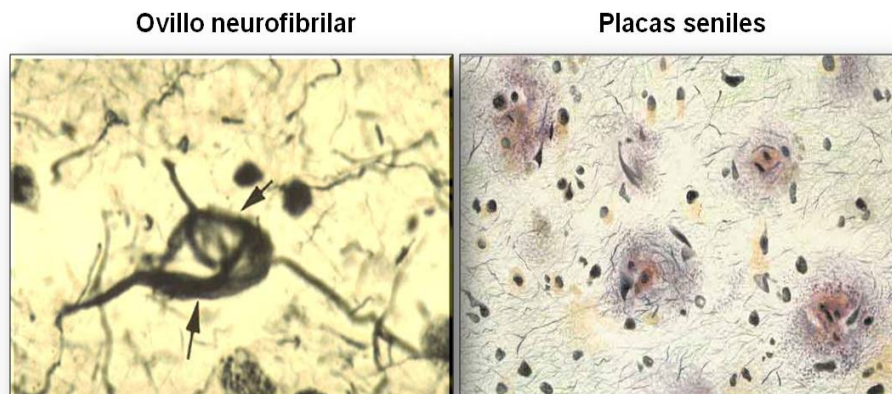
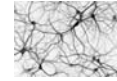


Figura 3. Características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer. La imagen de la izquierda muestra un ovillo neurofibrilar. Foto obtenida de Commonwealth University *publicado en R+D CSIC*. La imagen de la derecha muestra un conjunto de placas amiloides en el cerebro, imagen obtenida de http://www.zonamedica.com.ar/Categorias/medicinailustrada/enfermedaddeal/placas_seniles.htm

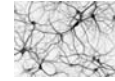


Numerosos estudios realizados en la década de los 90 demostraron que tanto la cantidad de ovillos neurofibrilares como la pérdida neuronal, y especialmente la pérdida de sinapsis, se correlacionan con la gravedad de la demencia. Sin embargo, los estudios también pusieron de manifiesto que la denominada “carga amiloide” no se correlaciona bien con la gravedad de los síntomas cognitivos (Arriagada *et al.*, 1992; Bierer *et al.*, 1995; Dekosky *et al.*, 1990; Gomez-Isla., 1996; Terry, 1991).

Sin embargo, otros estudios ponen de manifiesto que la acumulación de A β es suficiente para causar demencia. Esto es apoyado por el hecho de que pacientes con Síndrome de Down, los cuales tienen una copia extra del cromosoma 21 que contiene el gen para la proteína precursora amiloide (APP), forman placas amiloides y sufren demencia a una edad muy temprana. A pesar de estas discrepancias, a día de hoy se concede al péptido amiloide un papel protagonista en la fisiopatología de la EA.

1.4 Tipos de Enfermedad de Alzheimer

La mayoría de casos de EA son esporádicos. Sin embargo, aproximadamente un 5% corresponde a formas familiares frecuentemente de inicio temprano (Shastry y Gibilin, 1999). Por lo tanto podemos distinguir dos tipos de enfermedad de Alzheimer: la familiar y la esporádica. La forma familiar está asociada a genes portadores de mutaciones responsables de la EA (**Fig. 4**), como pueden ser mutaciones patogénicas en los genes de la proteína precursora del péptido amiloide (APP en el cromosoma 21),



presenilina 1 (PS1 en el cromosoma 14q) y presenilina 2 (PS2 en el cromosoma 1) (Bertram *et al.*, 2003). Las mutaciones en APP se encuentran en las zonas de escisión relacionadas con la producción del péptido, mientras que la PS1 forma parte del complejo γ -secretasa, un enzima crucial para la formación del péptido amiloide. Por tanto, mutaciones en los genes involucrados en la síntesis o degradación anormal de APP tienen la capacidad de producir un cuadro completo de EA incluyendo el componente amiloide y el componente neurofibrilar. Asimismo, duplicaciones de APP también son causantes de EA, como en el Síndrome de Down. Todas las mutaciones tienen como resultado la formación anómala del péptido $A\beta$ produciendo posteriormente placas amiloides.

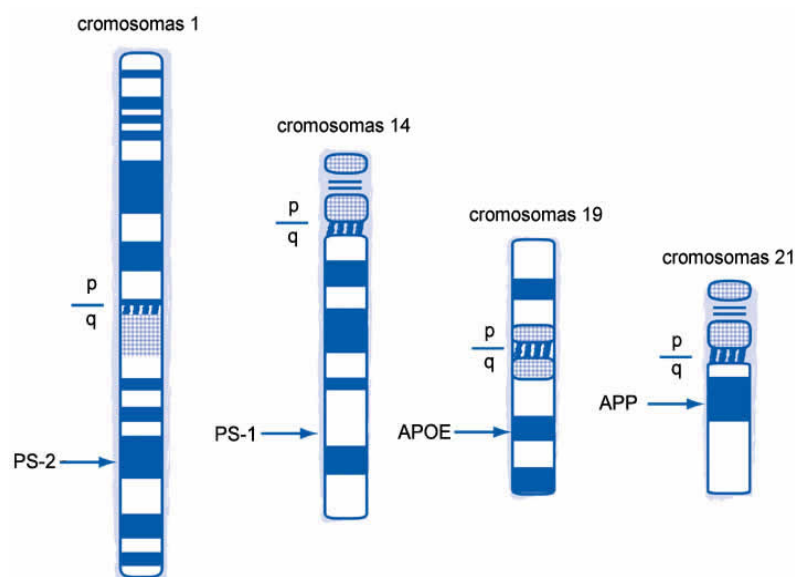
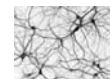


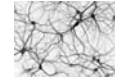
Figura 4. Cromosomas implicados en la Enfermedad de Alzheimer de origen familiar. Imagen obtenida de www.ccr.fr/sites/alzheimer/sp/maladie.htm



Los estudios genéticos en las formas de inicio tardío de EA esporádico han mostrado asociación de riesgo con diversos genes (**Tabla 1**) especialmente con Apolipoproteína E4 (Apo E4), isoforma de la proteína transportadora de lípidos Apo E codificada en el cromosoma 19. Se desconoce el papel de Apo E en los depósitos amiloides, aunque se ha sugerido que el aumento de lípidos y de colesterol incrementa la producción de A β . Los portadores de Apo E4 tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad, aunque éste no la produce directamente (Dupuy *et al.*, 2001; Poirier, 2005). Otros genes relacionados con EA de inicio tardío han sido A2M (codifica γ 2-macroglobulina), LRP1 (codifica la proteína 1 relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad) ambos en el cromosoma 12; polimorfismos en VLDL-R (codifica el receptor de las lipoproteínas de muy bajo peso molecular) en el cromosoma 9 y IL1A (codifica la interleucina-1 α) en el cromosoma 2.

Denominación	Cr.	Gen	Edad de inicio	% de casos familiares	% total EA	Proteína
Familiar AD de inicio precoz	21	APP	42-68	2-3 <20 familias	<1	Precursora del amiloide
Familiar o esporádica de inicio tardío asociada al alelo APOE ₄	19	APOE	>55	-	50-90	APOE ₄
Familiar AD de inicio muy precoz	14	S ₁ B ₂	30-60	70-80	5-10	Membrana, Presenilina1
Familiar AD de inicio precoz ("alemanes del Volga")	1	STM ₂	40-70	20	2-3	Membrana, Presenilina2
Familiar o esporádica de inicio tardío no asociada al alelo APOE ₄	?	?	>75	?	10-40	-
Esporádica no familiar de inicio temprano	?	?	<65	-	?	-

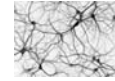
Tabla 1. Genes relacionados con EA familiar o susceptibilidad a EA. Tomado de Casabella Abril B, Espinàs Boquet J, coordinadores Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. Demencias. Editorial EdiDe, Barcelona; 1999.



1.5 Prevalencia e Incidencia de la EA.

La prevalencia es la proporción de individuos de un grupo o una población que presenta una característica común en un determinado momento o período de tiempo determinado. La prevalencia depende de la incidencia y de la mortalidad, y en ausencia de estrategias preventivas, los cambios en la prevalencia dependen solamente de la mortalidad. Existen un gran número de estudios de prevalencia de la EA en los que, a pesar de la utilización de los mismos criterios diagnósticos, las tasas presentan grandes variaciones dependiendo de la metodología utilizada para el cribado y el ajuste de los criterios de diagnóstico. Todos los trabajos señalan un incremento exponencial con la edad que se dobla cada 4,5 años a partir de los 65 años (Jorm, 1987).

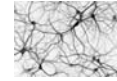
El estudio sobre prevalencia de demencia en personas de 65 o más años en el grupo EURODERM, que incluyó 11 estudios realizados en Europa en la década de los 90, mostró que el 53,7% de los casos de demencia correspondían a EA, lo que supone una prevalencia del 4,4%. En dicho estudio se observó una correlación entre el incremento de la prevalencia y la edad con un aumento mayor para el sexo femenino. En España, la prevalencia de la EA se incrementa por la edad y por el sexo (**Tabla 2**), siendo significativamente mayor en las mujeres (Pedro-Cuesta, 2009). Recientemente se ha dado a conocer la prevalencia en España de la EA, que se ha establecido en el 5,6% en la población de 75 años o más (Virués-Ortega *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios indican una mayor prevalencia en mujeres que en hombres y se han propuesto diversas razones que podrían explicar esta observación.



EDAD	HOMBRES	MUJERES
65-69	0,6	0,7
70-74	1,5	2,3
75-79	1,8	4,3
80-84	6,3	8,4
85-89	8,8	14,2
≥90	17,6	23,6

Tabla 2. Prevalencia de enfermedad de Alzheimer ajustada por edad y sexo en Europa. Imagen obtenida de Prevalencia of dementia and major subtypes in Europe de Lobo A *et al.*, 2000.

Por un lado una supervivencia selectiva de las mujeres en edades avanzadas, niveles bajos de estrógenos en las mujeres frente a los hombres o que el sexo femenino presenta una mayor susceptibilidad genética. La incidencia de una enfermedad es el número de casos nuevos cada año. El número de estudios sobre incidencia es menor debido a que tienen un mayor coste económico y a que requieren un período de tiempo más largo para su desarrollo. Todos los estudios muestran que la EA aumenta con la edad y que el número de casos se multiplica por 3 cada 10 años a partir de los 65 años. La tasa de incidencia total oscila entre 10,3 /1000 y 39,1 /1000 casos anuales en mayores de 65 años, dependiendo de la metodología usada y la zona geográfica en la que se ha llevado el estudio (Hendrie *et al.*, 1995; Rajkumar *et al.*, 1997). Actualmente se estiman unos 13 millones de pacientes con enfermedad de Alzheimer en todo el mundo y de ellos 800.000 en España. Sin embargo, debido a que la tasa de diagnóstico es baja, en torno al 60 %, se estima que en realidad podría haber 20 millones de casos a nivel mundial. La aparición de la enfermedad es más frecuente en países desarrollados

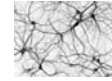


ya que la esperanza de vida media es mayor en ellos. En España en el año 1900 la esperanza de vida media era de 40 años y a finales de siglo aumentó hasta los 75 años. Se estima que en el año 2050 la esperanza de vida podría aumentar hasta los 100 años lo que supondría llegar hasta 80 millones de casos de afectados por la EA (Blesa, 2008).

1.6 Tratamientos de la EA.

Los tratamientos de la EA se centran en el deterioro cognitivo y los problemas de comportamiento afectivo. No existe un tratamiento que cure la EA, éstos simplemente sirven para paliar los síntomas producidos por la enfermedad. Existen diversos fármacos que pueden ser utilizados dependiendo de la fase de demencia que presente el paciente (**Tabla 3**).

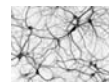
En la **demencia leve a moderada** se lesiona el núcleo de Meynert, del que nace el sistema colinérgico, muy relacionado con la capacidad cognitiva y la memoria. La degeneración de este sistema causa una disminución de acetilcolina en las sinapsis corticales y un fallo de la neurotransmisión colinérgica. Sin embargo, es posible estimular los receptores de acetilcolina de la segunda neurona colinérgica porque están mejor conservados y para ello se aumenta la cantidad de acetilcolina en la sinapsis cortical mediante inhibidores de la acetilcolinesterasa (IACE), que inhiben la enzima que hidroliza el neurotransmisor. Este grupo farmacológico incluye tacrina (autorizada el año 1993, aunque actualmente no se utiliza por su hepatotoxicidad), donepezilo (autorizada el año 1998), rivastigmina



(autorizada el año 2000) y galantamina (autorizada el año 2001). Estos medicamentos permiten reducir la sintomatología pero no impiden el progreso de la enfermedad, ya que a medida que el tiempo avanza, el cerebro produce menos acetilcolina y por tanto los medicamentos pierden su efecto.

MEDICAMENTO	TIPO DE DROGA Y USO	FUNCIONAMIENTO	EFFECTOS
MEMANTINA	Antagonista de NMDA, prescrito para tratar síntomas de moderado a severo.	Bloquea los efectos tóxicos asociados con el exceso de glutamato.	Confusión, dolor de cabeza y estreñimiento.
GALANTAMINA	Inhibidor de la colinesterasa, prescrito para casos leve y moderado.	Previene la hidrólisis de acetilcolina y la estimulación de receptores nicotínicos.	Nauseas, vómitos, diarrea, pérdida de apetito.
RIVASTIGMINA	Inhibidor de la colinesterasa, prescrito para casos leve y moderado.	Previene la hidrólisis de acetilcolina en el cerebro.	Nauseas, vómitos, diarrea, pérdida de apetito, pérdida de fuerza muscular.
DONEPEZILO	Inhibidor de la colinesterasa, prescrito para casos de leve a moderado y de moderado a severo.	Previene la hidrólisis de acetilcolina en el cerebro.	Nauseas, vómitos, diarrea,

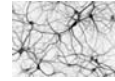
Tabla 3. Medicamentos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Imagen modificada de ¿Qué sabemos de? El Alzheimer; Martínez A, ED: catarata; CSIC, 2009.



En la **demencia moderada a severa**, la elevación patológica de los niveles tónicos de glutamato puede contribuir a la disfunción neuronal y a la muerte neuronal que causa la EA. Para contrarrestarlo se utilizan inhibidores del receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspartato) con el fin de impedir estos efectos nocivos, sin alterar el papel fisiológico que tiene este sistema, necesario para el aprendizaje y la memoria. Este medicamento se conoce como Memantina siendo en la actualidad el único medicamento antidemencia con la indicación de intensidad moderada a severa (Portela-Romero *et al.*, 2005). La Memantina es un antagonista no competitivo del receptor NMDA de baja afinidad que bloquea los efectos de los niveles basales de glutamato elevados patológicamente que pueden provocar disfunción neuronal.

Estudios recientes señalan que diversos anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) podrían tener efecto neuroprotector ayudando a retrasar la progresión de la enfermedad (In t'Veld *et al.*, 2001; Weggen *et al.*, 2001; Townsend y Pratico, 2005) aunque el posible mecanismo de neuroprotección sería independiente de sus efectos anti-inflamatorios.

Actualmente existen diversos grupos de investigación españoles dedicados a la obtención de fármacos que proporcionen un tratamiento más eficaz para la enfermedad de Alzheimer aunque todavía se encuentran en fase de estudio. Uno de ellos ha diseñado un nuevo modelo de vacuna (EE-AD-S1P) que previene la enfermedad y reduce eficientemente las lesiones cerebrales en aquellos casos en los que la enfermedad ya se ha manifestado. Esta vacuna de carácter preventivo y terapéutico se caracteriza por la introducción de un nuevo inmunógeno adyuvante diseñado para



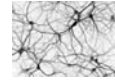
generar anticuerpos contra las placas neuríticas donde se acumula la proteína beta-amiloide ($A\beta$) que daña el cerebro de los pacientes con Alzheimer (Carrera y Cacabelos, 2012).

2. Hipótesis Sobre el Origen de la EA.

Como ya se ha comentado anteriormente la causa directa que produce la EA es desconocida, aunque existen una serie de hipótesis que intentan explicar su origen. Lo que se sabe con certeza es que la edad es el mayor factor de riesgo para padecerla. En los últimos años, los investigadores han descubierto algunos de los cambios moleculares que se producen en la EA lo que ha llevado a la existencia de varias hipótesis que proponen el posible origen de la enfermedad. Estas hipótesis proponen que el origen de la enfermedad de Alzheimer se debe bien a la deficiencia de un neurotransmisor, bien a alteraciones en la proteína tau o bien a la neurotoxicidad y acumulación asociada al péptido β amiloide. La hipótesis más aceptada en la actualidad es la de la cascada amiloide.

2.1 Hipótesis de la Cascada Amiloide.

La hipótesis amiloide postula que el origen de la EA esporádica se debe a un exceso del péptido beta-amiloide ($A\beta$) en el exterior de la neurona, resultante de un desequilibrio entre su producción y su eliminación. Esta hipótesis sugiere que $A\beta$ podría desencadenar una cascada cuyo resultado final son los síntomas relacionados con la EA



(Fig. 5) (Haass y Selkoe, 2007). Mutaciones de la proteína precursora amiloide (APP), Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 1 (PS2) producen incremento de la producción de $A\beta_{1-42}$.

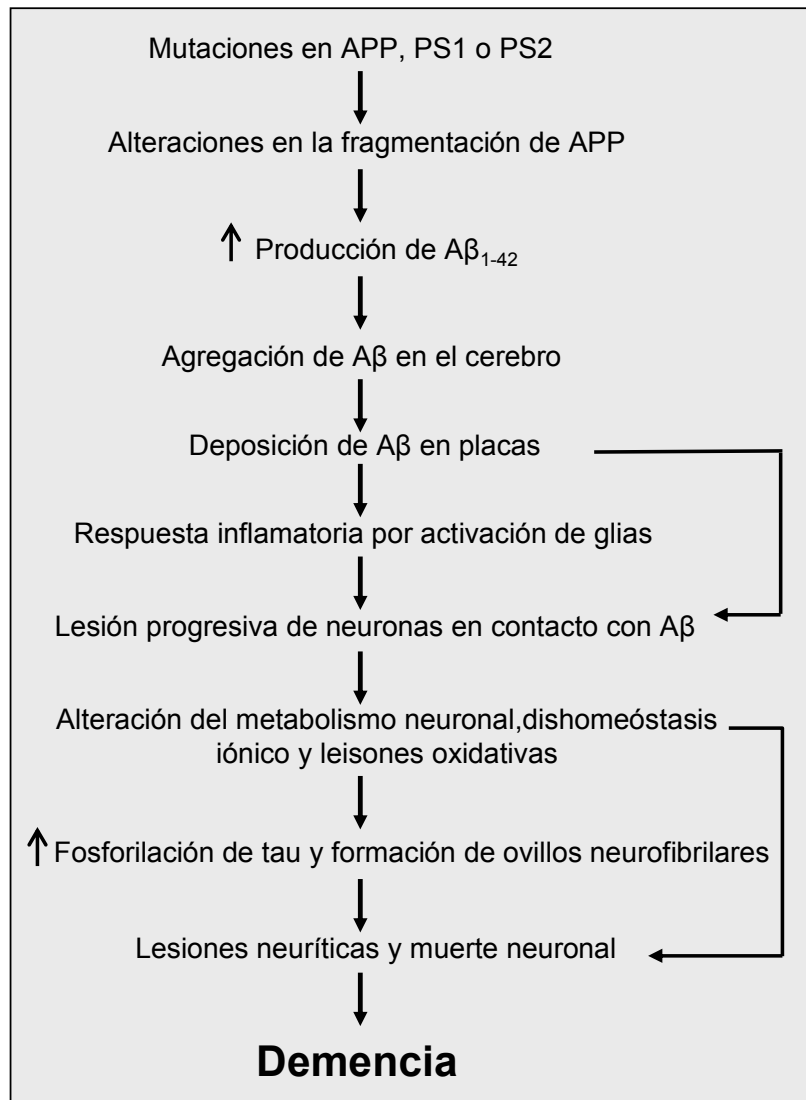
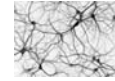


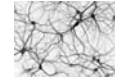
Figura 5. Hipótesis de la cascada amiloide de la Enfermedad de Alzheimer. En la EA, está aumentada la producción y acumulación excesiva de $A\beta_{1-42}$ en el cerebro, que conlleva una serie de alteraciones como inflamación, dishomeóstasis iónica, daño oxidativo, aumento de tau y en último término neurodegeneración y demencia. Modificado de Hardy y Selkoe, 2002.



En la EA esporádica existe un aumento tanto de los niveles cerebrales de A β soluble como insoluble y un ligero aumento de A β ₁₋₄₂, pero los mecanismos por los que se produce este aumento aún no están claros: se piensa que contribuirían tanto factores de riesgo genéticos como adquiridos, causando el desequilibrio entre síntesis y degradación de A β . Por lo tanto, una producción excesiva del péptido, al igual que defectos en los mecanismos de su aclaramiento, podrían desencadenar una cascada patológica que incluye inflamación, déficits neuríticos y sinápticos, aparición de ovillos neurofibrilares, pérdida de neurotransmisores y por último muerte neuronal (Stutzmann, 2007). En cuanto a los factores genéticos, la presencia del alelo E4 del gen de la ApoE es el único polimorfismo genético consistentemente asociado al desarrollo de la EA. En cuanto a factores de riesgo adquiridos destacan la isquemia cerebral y el traumatismo craneoencefálico.

2.2 Hipótesis Colinérgica.

La hipótesis colinérgica relacionada con la disfunción de la memoria fue descrita en 1982 por Bartus y colaboradores (Bartus *et al.*, 1982). Esta hipótesis propone la existencia de una alteración y disfunción de la actividad colinérgica en cerebros de ancianos y en pacientes con demencia producida por la deficiencia del neurotransmisor acetilcolina y que esta alteración juega un papel importante en la pérdida de memoria y los problemas cognitivos. La hipótesis colinérgica se apoya, sobre todo, en que los inhibidores de la colinesterasa muestran efectos positivos sobre las capacidades cognitivas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Hansen *et*



al., 2008). En condiciones fisiológicas, acetilcolina (ACh) es sintetizada en el interior de la neurona a partir de la colina (Ch) por la acción de la enzima colinacetiltransferasa (ChAT). Una vez sintetizada la ACh se almacena en vesículas en el interior de la neurona presináptica. Cuando se produce el impulso nervioso la ACh se vierte al espacio intersináptico e interacciona con receptores colinérgicos de la neurona postsináptica. Estos receptores pueden ser de dos tipos; receptores nicotínicos (activados por nicotina) y receptores muscarínicos (activados por muscarina). En el espacio intersináptico hay una enzima que se encarga de regular la concentración de ACh por degradación de la misma conocida como acetilcolinesterasa (AChE) (Fig. 6).

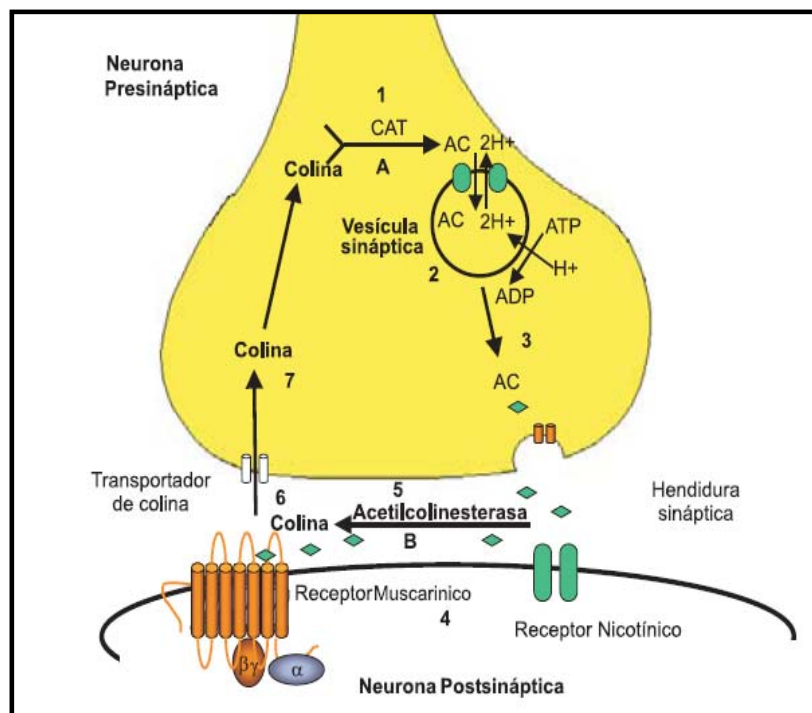
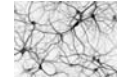


Figura 6. Transmisión colinérgica. Tras un impulso nervioso la acetilcolina se libera al espacio sináptico y puede actuar sobre receptores o puede ser hidrolizada por la acetilcolinesterasa convirtiéndose en colina. Imagen obtenida de Changeux JP, 1984.



Aunque en el cerebro de pacientes con EA existen deficiencias de ACh, se cree que ésta no es la causa original de la enfermedad sino más bien otra de las consecuencias de los daños cerebrales producidos por la misma. Puesto que la muerte neuronal afecta en una primera etapa a las neuronas colinérgicas parece lógico que exista una deficiencia de acetilcolina en la EA.

2.3 Hipótesis de la Proteína Tau.

Una de las proteínas que se acumulan de forma anómala en el cerebro de pacientes con EA es la proteína tau. Tau es el componente mayoritario de los ovillos neurofibrilares y se expresa en neuronas del sistema nervioso central (SNC). Se sabe que esta proteína también está involucrada en la patogénesis de otras enfermedades neurodegenerativas. El desarrollo de una taupatía o acumulación de formas insolubles e hiperfosforiladas de la proteína tau y su posible relación con EA fue descrito por Brakk (Brakk y Brakk, 1991). Durante el desarrollo de la EA tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios y se integra dentro de los filamentos helicoidales apareados (PHFs) para dar lugar a los complejos proteicos denominados desarreglos neurofibrilares (NFTS), perdiendo sus funciones fisiológicas. La hiperfosforilación de tau es el resultado del desequilibrio de la acción de diferentes quinasas y fosfatasas (**Fig. 7**).

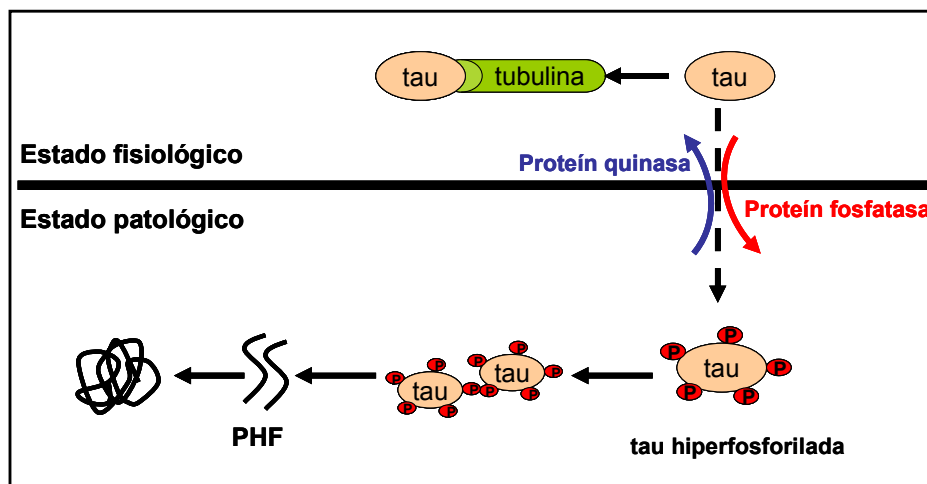
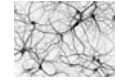
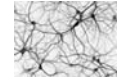


Figura 7. Esquema de la fisiología y patología de la proteína tau. Esquema modificado de ¿Qué sabemos de? El Alzheimer; Martínez A, ED: catarata; CSIC, 2009.

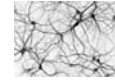
La severidad de la demencia se ha relacionado con la deposición de los ovillos neurofibrilares (Caughey y Lansbury, 2003), siendo más abundantes en las áreas donde es más intensa la destrucción neuronal, es decir, el hipocampo y las zonas adyacentes del lóbulo temporal, unas estructuras que tienen una gran importancia en la función de la memoria (Solomon PR, 1996). Los ovillos neurofibrilares no son exclusivos de la enfermedad de Alzheimer ya que aparecen en otras enfermedades neurodegenerativas. En los ovillos neurofibrilares la agregación de tau se produce porque ésta sufre una fosforilación irreversible, que impide su función normal a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas. El efecto de estos eventos es la alteración de la estructura de los microtúbulos, que junto con el empaquetamiento de la proteína tau provocan alteraciones en el mecanismo de transporte neuronal. Como consecuencia, la neurona no puede transmitir señales eléctricas ni transportar nutrientes adecuadamente.



3. El Péptido Amiloide.

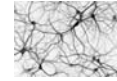
3.1 Formación del Péptido Amiloide.

El péptido amiloide es un producto resultante del catabolismo de la APP, tras su proteólisis secuencial mediada por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa. Este procesamiento amiloidogénico sucede mayoritariamente a nivel de los endosomas tras la endocitosis de APP desde la membrana plasmática, donde se localiza normalmente para ejercer su función. La otra vía alternativa llamada no amiloidogénica no produce formación del péptido amiloide. En condiciones normales se producen niveles muy bajos de péptido amiloide (rango picomolar) con 40 o 42 aminoácidos dependiendo del sitio de escisión del fragmento C-terminal de APP, siendo el fragmento 1-40 más abundante que el 1-42. A pesar de diferenciarse en tan sólo dos aminoácidos, los dos péptidos tienen propiedades físico-químicas muy distintas. *In vitro*, 1-42 tiene una mayor tendencia a polimerizar, formando oligómeros solubles, que a su vez se agregan en protofibrillas formándose finalmente fibras insolubles similares a las presentes en las placa seniles de la EA. En condiciones normales la concentración del péptido amiloide está muy regulada, existiendo un equilibrio entre su generación y su eliminación por parte de enzimas degradadoras como neprililina (enzima degradadora de insulina) y posiblemente la enzima convertidora de la angiotensina I. Además, parte del péptido fluye desde el parénquima cerebral al líquido cefalorraquídeo a través de la barrera hematoencefálica, de ahí que $A\beta$ sea detectable en el líquido cefalorraquídeo y en plasma.



A pesar de que APP y A β han sido muy estudiados, su función fisiológica todavía es un misterio. La APP es una proteína transmembrana a la que se ha atribuido un papel crítico durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, tanto central (SNC) como periférico, actuando como molécula de adhesión intercelular necesaria en la formación de nuevas sinapsis en el SNC y en la unión neuromuscular (Soba *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009), así como en la migración de los precursores neuronales hacia la corteza cerebral (Young–Pearse *et al.*, 2007) y en la regresión de axones mal dirigidos y neuronas excedentes con el fin de refinar las conexiones de los circuitos neuronales (Nikolaiev *et al.*, 2009). También se cree que APP participa en la transducción de señales extracelulares a través de su unión a proteínas G (Nishimoto *et al.*, 1993) y en transporte axonal a través de su interacción con Kinesina-I (Kamal *et al.*, 2000). APP aparece principalmente anclada a la membrana plasmática diferenciándose una región extracelular, una región transmembranal y otra región citoplásmica. Sin embargo, la contribución de APP al funcionamiento normal del sistema nervioso adulto no es bien conocida y menos aún su papel en la neurodegeneración de la EA.

En cuanto al péptido A β , durante mucho tiempo ha sido considerado un catabolito incidental sin función fisiológica alguna. Recientemente, experimentos con microdiálisis cerebral en ratones han mostrado que los niveles de A β en el flujo intersticial del cerebro aumentan cuando lo hace la actividad neuronal y disminuyen cuando ésta es inhibida (Cirrito *et al.*, 2005). Así pues, la actividad sináptica induciría la endocitosis de APP desde la membrana plasmática favoreciendo así su procesamiento amiloidogénico en los endosomas (Cirrito *et al.*, 2008). Se cree que el aumento del péptido en respuesta



a un aumento de la actividad neuronal sería parte de un mecanismo compensatorio de retroalimentación negativo ya que a concentraciones fisiológicas de A β , el péptido es capaz de regular la actividad sináptica (Abramov *et al.*, 2009). Este acoplamiento bidireccional entre actividad neuronal y producción de A β podría explicar por qué en el cerebro normal la concentración de A β está tan regulada. Otra posibilidad es que los monómeros de A β tengan una función protectora, de tal manera que el efecto neurotóxico de los oligómeros y fibras presentes en la EA se debería, al menos en parte, a una pérdida de neuroprotección por parte de los monómeros (Giuffrida *et al.*, 2009).

3.2 Péptido amiloide y EA.

Una de las señas de identidad de la EA a nivel patológico es la presencia en el cerebro de A β procedente de la hidrólisis de la proteína precursora amiloide (APP). En condiciones fisiológicas la APP es procesada de forma secuencial por distintas proteasas. Las proteasas son proteínas que fragmentan otras proteínas y se las puede encontrar en el sistema gastrointestinal participando en la digestión de proteínas ingeridas en la dieta o ejerciendo funciones reguladoras (inactivando o activando las proteínas que procesan o liberando productos con función metabólica). En el caso de la APP encontramos tres actividades proteasas principales llamadas alfa (α), beta (β) y gamma (γ) secretasas. Estas tres actividades enzimáticas distinguen dos vías principales para su procesamiento (**Fig. 8**).

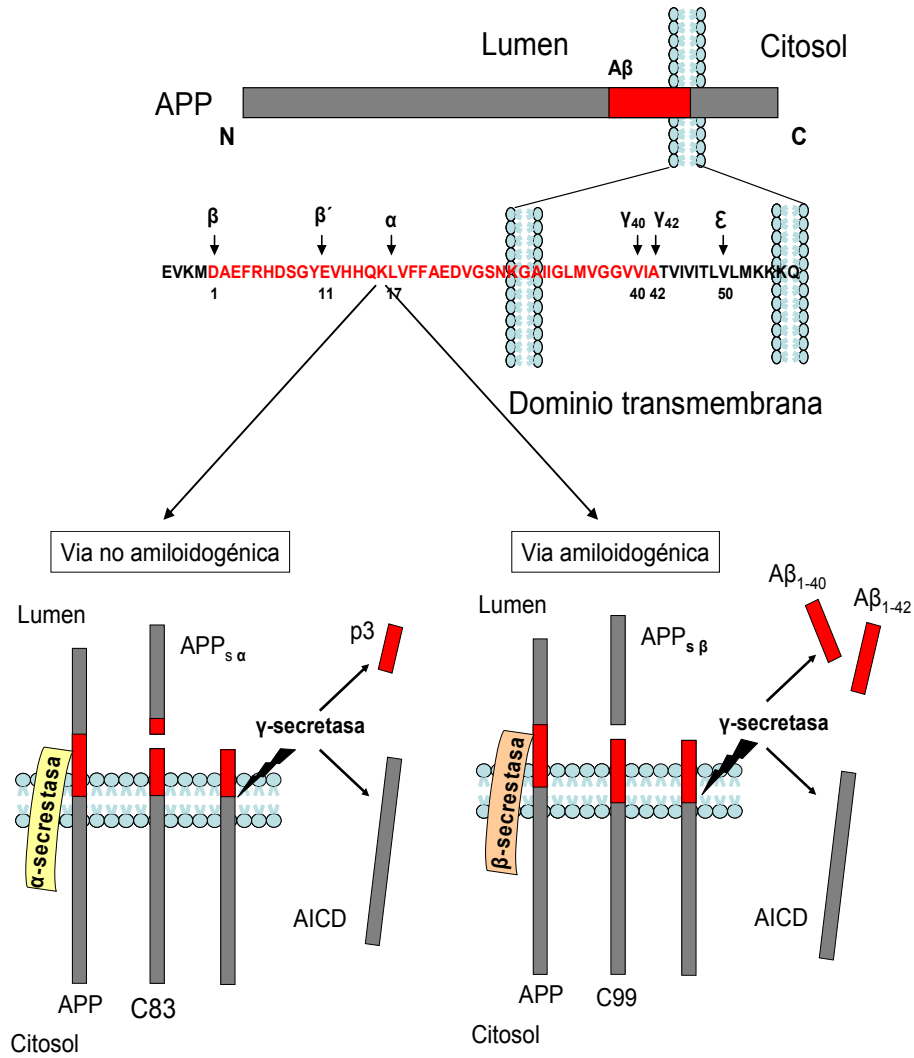
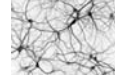
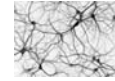


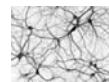
Figura 8. Vías de procesamiento de la APP. Estructura esquemática de la APP en la que se muestra el dominio del péptido Aβ. Figura modificada de Thinakaran y Koo, 2008.



La **vía no amiloidogénica** y la **vía amiloidogénica**, siendo esta segunda vía la que en última instancia es responsable de la formación de los depósitos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer.

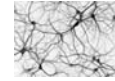
La **vía no amiloidogénica** comienza con la acción de la α -secretasa. Al ser APP una proteína transmembranal, su procesamiento proteolítico tiene lugar en la propia membrana plasmática y no produce depósitos amiloides. La α -secretasa realiza un corte en la parte extracelular de la APP a nivel del aminoácido 687. Este corte libera casi todo ese extremo extracelular de la APP, el cual es soluble y se denomina sAPP α . Por otro lado actúa la γ -secretasa liberando un pequeño fragmento C-terminal conocido como P3. Los fragmentos liberados por la actividad α -secretasa no son patogénicos (Canevari *et al.*, 2004). La γ -secretasa es un complejo enzimático formado por presenilinas PS1 o PS2 junto con nicastrin, Aph-1 y Pen-2 (Kimberly *et al.*, 2003) proteínas en su mayoría asociadas con el retículo endoplásmico.

La **vía amiloidogénica** comienza con la actividad β -secretasa que realiza el corte en la APP algo antes en la secuencia de aminoácidos, concretamente a nivel del aminoácido 671, liberando de esta forma una porción extracelular de 16 aminoácidos más corta que la sAPP α , llamada sAPP β . Hace relativamente poco tiempo que los investigadores han puesto nombre propio a la actividad β -secretasa. Las principales enzimas responsables de esta actividad son las proteasas BACE1 y BACE2 (del inglés *beta-site APP cleaving enzyme*) localizadas en el aparato de Golgi y endosomas y con función fisiológica aún desconocida.



BACE1 parece ser la enzima más importante y es una proteasa anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana. Esta enzima posee un dominio aspartil-proteasa (utiliza un aspartato para la reacción de catálisis) en su porción extracelular, que es el que realiza el corte. Los estudio *in vitro* con APP sintética confirman este procesamiento por BACE1, ya que el ratón transgénico que carece de BACE tiene un fenotipo normal (Roberds *et al.*, 2001). Actualmente, se asume que la actividad de BACE1 es el factor limitante a la hora de generar A β y por lo tanto, no es de extrañar el interés suscitado por esta proteasa como diana terapéutica para tratar la EA. El procesamiento proteolítico de la APP por BACE genera también un fragmento soluble (APPs β) más corto que APPs α .

En resumen en condiciones fisiológicas a través de la vía no amiloidogénica actúan las α y γ -secretasas (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). En condiciones patológicas actúan las β y γ -secretasas. Según el punto de ruptura de la γ -secretasa, se producirán dos formas principales de A β de 40 o 42 aminoácidos. Así pues los péptidos amiloides o A β resulta de la hidrólisis de APP que puede dar especies de diferente tamaño desde A β ₁₋₃₈ hasta A β ₁₋₄₃ siendo el péptido de 42 aminoácidos, el más relacionado con la toxicidad neuronal, conocido como A β ₁₋₄₂. Como se ha comentado anteriormente la mera presencia de A β no causa neurodegeneración. Sin embargo, el desequilibrio en su producción y su degradación que conduce al exceso de péptido se considera causante de la degeneración neuronal (Pearson *et al.*, 1991).



3.3 Estados de Agregación de A β .

El péptido A β es tóxico para las células tanto en cultivo como *in vivo* (Pike *et al*, 1993; Geula *et al*, 1998). La forma más tóxica es el péptido A β_{1-42} . Las moléculas de A β puede presentar diferentes estados de agregación de forma aleatoria formando estructuras diversas que pueden variar desde secuencias de bajo peso molecular compuestas por una unidad (monómeros), oligómeros (formado por agregados desde 2 hasta 24 unidades) hasta cortas protofibrillas flexibles y largas fibrillas rígidas; todas en un equilibrio dinámico entre ellas (**Fig. 9**). La toxicidad inducida por A β depende de su estado de agregación (Klein *et al.*, 2004). La mayor parte de los estudios realizados han considerado las fibrillas como las causantes de la toxicidad. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que los oligómeros solubles, al contrario que las fibrillas depositadas en las placas amiloides en las inmediaciones de las neuronas, podrían acumularse en las sinapsis neuronales reduciendo así la transmisión glutamatérgica y comprometiendo la función sináptica y la potenciación a largo plazo.

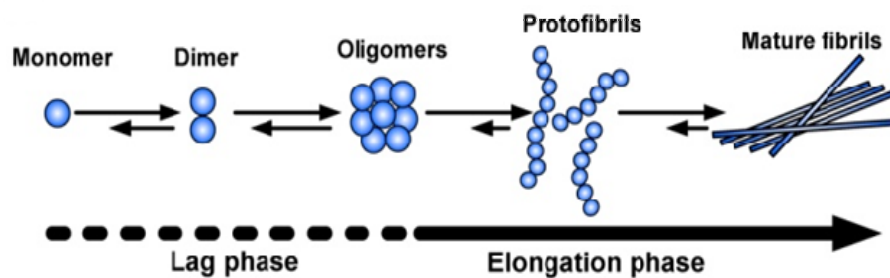
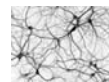


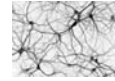
Figura 9. Estados de agregación del péptido amiloide. La agregación de A β tiene dos fases cinéticas. En la “fase de latencia”, la forma oligomérica se forma en un proceso lento (líneas discontinuas). En la “fase de elongación”, la forma oligomérica promueve la formación de fibrillas. Imagen obtenida de Kumar S. *et al.*, 2011.



De hecho, se ha propuesto que los oligómeros solubles serían la toxina neuronal más probable en la EA (Haass y Selkoe, 2007). No se conoce en detalle las condiciones que favorecen la formación de una u otra forma. Sin embargo, ciertos factores podrían favorecer la agregación de formas solubles de oligómeros incluyendo la alta concentración del péptido, el pH ácido (Burdick *et al.*, 1992), la presencia de iones metálicos como hierro, zinc y aluminio (Manthy, 1993) y el estrés oxidativo (Walsh, 2000).

3.4 Mecanismos de Neurotoxicidad de A β .

La secuencia exacta de eventos que dan lugar al daño neuronal en la EA es aún desconocida. Parecen ser activadas varias vías potencialmente perjudiciales, algunas de las cuales son consecuencia de los efectos directos de A β . Parece claro que los efectos de A β están asociados con estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, alteraciones de la homeóstasis del Ca²⁺ intracelular, generación de especies reactivas de oxígeno y activación microglial, pero la causa exacta por la cual suceden estos acontecimientos sigue siendo fuente de controversia. Varios estudios sugieren una prevalencia de muerte por necrosis en la EA (Lucassen *et al.*, 1997). Sin embargo, otros estudios muestran evidencias de que la muerte neuronal en la EA ocurre por apoptosis incluyendo la fragmentación del ADN (Su *et al.*, 1994) y la alteración del balance entre moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas (Kitamura *et al.*, 1998). Otros estudios demuestran que el tratamiento con A β de células *in vitro* induce apoptosis (Estus *et al.*, 1997 y Tamagno *et al.*, 2003). La

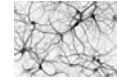


activación de proteínas caspasas también está implicada en la toxicidad por A β , especialmente las caspasas 2, 3, 8 y 9 (Roth *et al.*, 2001) pero no hay consenso sobre la relevancia que puedan tener en la patogénesis de la EA. Una posibilidad es que la activación de caspasas pueda jugar un papel no necesariamente relacionado con la apoptosis; ambos APP y PS son procesados por caspasa-3 incrementando la producción de A β (Kim *et al.*, 1997; Gervais *et al.*, 1999).

Se ha postulado que el A β provoca disfunción mitocondrial y apoptosis, y que esta toxicidad contribuye al desarrollo de la EA (Canevari *et al.*, 2004) aunque el mecanismo no está claro. A β podría asociarse con las membranas mitocondriales en ratones mutados y en pacientes con EA. Además, las mitocondrias de estos ratones muestran niveles de consumo de oxígeno menores y reducción de la actividad enzimática asociada con los complejos respiratorios mitocondriales sugiriendo que la unión del A β a mitocondrias podría alterar la actividad mitocondrial y aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno, llevando a neurotoxicidad (Caspersen *et al.*, 2005; Manczak *et al.*, 2006; Reddy y Beal, 2008).

También se ha postulado que el A β provoca disfunción sináptica. Existe cada vez más consenso en que los oligómeros de A β son sinaptotóxicos. Tanto en neuronas *in vitro* como en modelos animales, los oligómeros de A β co-localizan con las densidades post-sinápticas de las espinas dendríticas (Koffie *et al.*, 2009; Lacor *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2010).

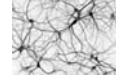
Finalmente, una nueva hipótesis no excluyente con las anteriores, propone que la neurotoxicidad inducida por A β en la EA



estaría relacionada con la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular, un segundo mensajero clave en multitud de funciones neuronales. De hecho, un número creciente de estudios muestra que las mutaciones en presenilinas en diferentes modelos neuronales (células PC12, fibroblastos) y la consiguiente elevación de los niveles de $\text{A}\beta$ conducen a la disregulación del Ca^{2+} intracelular (LaFerla, 2002), aunque no se ha establecido claramente qué conformación de $\text{A}\beta$ es la que ocasiona esta alteración. El $\text{A}\beta$ podría promover la entrada de Ca^{2+} en el interior de las neuronas, pero los resultados son aún contradictorios (Abramov *et al.*, 2003; Marx, 2007). Se ha planteado que la procedencia del Ca^{2+} sea extracelular (Sanz-Blasco *et al.*, 2008) y penetre en las neuronas a través de canales dependientes de voltaje, a través de receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA, AMPA) o nicotínicos de acetilcolina. Incluso se ha propuesto que los oligómeros podrían formar canales de membrana que permitirían la entrada de Ca^{2+} extracelular en las neuronas (Kayed *et al.*, 2003; Kayed *et al.*, 2009). Otra posible fuente de este Ca^{2+} citosólico excesivo podrían ser los reservorios intracelulares naturales de Ca^{2+} como el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria.

4. Proteína Tau.

Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs. Los microtúbulos son uno de los tres constituyentes principales del citoesqueleto neuronal, los otros dos son los neurofilamentos y los microfilamentos. Todos forman parte de la infraestructura neuronal y participan en funciones como el



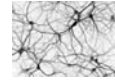
transporte axonal de nutrientes y otras sustancias, así como el mantenimiento de la integridad estructural de la neurona.

4.1 Papel Fisiológico de Tau.

La proteína tau, componente principal de los ovillos neurofibrilares, es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa en las neuronas del SNC. Se localiza normalmente en el axón, donde su función estabilizadora de los microtúbulos permite que el transporte axonal de proteínas, vesículas y orgánulos sea fluido en ambos sentidos. El gen que codifica para la proteína tau se encuentra en el cromosoma 17 y produce un mensajero que se procesa dando lugar hasta 6 isoformas diferentes generadas por el corte alternativo de un solo gen. Estas isoformas se diferencian entre sí en la presencia o la ausencia de los exones 2, 3 y 10; las combinaciones de estos exones son las que originan las 6 isoformas. El tipo de isoforma que agrega en cada tipo de enfermedad neurodegenerativa es relativamente específico; en la EA las 6 isoformas pueden formar parte de los ovillos neurofibrilares.

4.2 Mecanismos de Toxicidad de Tau.

La proteína tau se encuentra anormalmente hiperfosforilada en la EA. Esta hiperfosforilación produce desestabilización de los microtúbulos y agregación patológica de la proteína en el compartimento somatodendrítico de la neurona dando lugar al ovillo neurofibrilar. Aunque parece que la hiperfosforilación de tau precede



y acelera la agregación, algunos estudios *in vitro* sugieren un círculo vicioso en el que la hiperfosforilación promovería su agregación y ésta a su vez facilitaría la hiperfosforilación (**Fig. 10**).

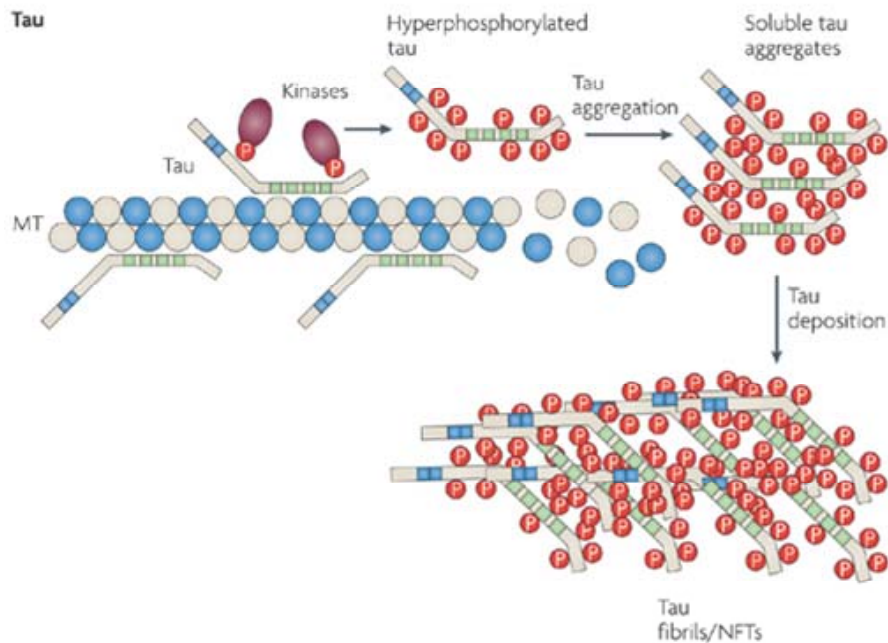
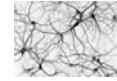


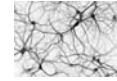
Figura 10. Hiperfosforilación de la proteína tau. Imagen obtenida de Jürgen Götz y Lars M. Ittner, 2008.

En cualquier caso, la acumulación de tau en el compartimento somatodendrítico provocaría una pérdida de su función normal en el axón y alteraría el transporte axonal de proteínas y orgánulos, lo que tendría consecuencias muy negativas para las neuronas (Polydoro *et al.*, 2009; Stokin *et al.*, 2005).



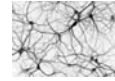
La muerte neuronal en la EA es muy prominente, aunque circunscrita a regiones vulnerables como el sistema límbico o el núcleo de Meyner. Por el contrario, las neuronas de la corteza motora suelen estar relativamente preservadas incluso en la EA avanzada. La muerte neuronal se ha relacionado con la patología neurofibrilar basándose en diversas evidencias. En primer lugar, el patrón de distribución regional y temporal coincide con el de los ovillos neurofibrilares. En segundo lugar, la descripción de los ovillos libres (conocidos como ovillos fantasmas) presentes en el espacio extracelular, sobre todo en el hipocampo y la corteza entorrinal, sirvió de apoyo a la idea de que los ovillos neurofibrilares son responsables de la muerte de las neuronas que los albergan. En tercer lugar, los modelos animales que sobreexpresan mutaciones de la proteína tau que favorecen los agregados intraneuronales similares a ovillos neurofibrilares presentan una importante muerte neuronal, mientras que los modelos basados en la sobreexpresión de APP humana, muestran poca o ninguna pérdida neuronal (Götz *et al.*, 2008). Se cree que la muerte celular programada o apoptosis es el mecanismo de muerte predominante en la EA (Friedlander, 2003). Según la visión tradicional, la agregación e hiperfosforilación de tau en ovillos neurofibrilares activaría las enzimas caspasas e iniciaría la cascada apoptótica, causando la muerte de las neuronas portadoras de dichos ovillos.

Sin embargo, otros estudios discrepan en la relación causa-efecto entre ovillos neurofibrilares y muerte neuronal. Por ejemplo, diversos estudios que utilizan la técnica estereológica de cuantificación muestran que la muerte neuronal en el surco temporal superior excede el número de ovillos presentes en esa región (Gómez-Isla *et al.*, 1997). Este hallazgo sugirió la existencia de



mecanismos de muerte neuronal independientes de la agregación de tau en forma de ovillos. Además otros estudios, que emplean la misma técnica de cuantificación, sugieren una disociación regional entre muerte neuronal y ovillos neurofibrilares en varios modelos animales, observándose regiones en las que la muerte neuronal precede a la aparición del ovillo y otras en las que no existe una pérdida neuronal evidente a pesar de la abundancia de ovillos (Spires *et al.*, 2006).

Estudios recientes de imagen *in vivo* en animales transgénicos con taupatía indican que la activación de las caspasas precede a la formación del ovillo. Según esto, las caspasas serían activadas por especies oligoméricas solubles de tau y una vez activas causarían la proteólisis de la proteína tau, dando lugar a fragmentos con tendencia a agregar formando el ovillo neurofibrilar. Una vez formado el ovillo, las caspasas se inactivarían y la neurona escaparía de la apoptosis. De hecho, la supresión de la expresión del transgen y, por consiguiente, de la producción de especies solubles de tau, aborta la activación de las caspasas. En este escenario aún por confirmar, las neuronas que albergan un ovillo en su compartimento somatodendrítico sufrirían una muerte retardada debida a las consecuencias de la disrupción del transporte axonal. El proceso de muerte llevaría mucho tiempo, de ahí que los ovillos fantasmas, predominen en el hipocampo y en la corteza entorrinal, que son las primeras regiones afectadas por la degeneración neurofibrilar en la EA. En cambio, las neuronas incapaces de formar ovillo, morirían pocos minutos después de la activación de las caspasas, lo que explicaría que la pérdida de neuronas exceda el número de ovillos presentes en una misma región. En este hipotético escenario, los ovillos representarían al mismo tiempo un mecanismo de defensa

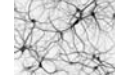


protector de las neuronas y un marcador de enfermedad de las neuronas, ya que comprometería su fisiología normal (de Calignon *et al.*, 2009; de Calignon *et al.*, 2010; Spires-Jones *et al.*, 2008). A día de hoy se mantiene la controversia respecto a la toxicidad de tau (ovillos insolubles frente a oligómeros solubles de tau), un dilema similar al de la toxicidad de la patología amiloide (placas insolubles frente a oligómeros solubles de A β).

5. Homeostasis del Ca²⁺ Intracelular en Neuronas.

Debido a la importancia de la hipótesis del Ca²⁺ en la EA es necesario repasar brevemente la homeóstasis del Ca²⁺ intracelular en neuronas en condiciones fisiológicas. Las neuronas son células excitables que utilizan las señales de Ca²⁺ para controlar diversas funciones como la plasticidad sináptica, la excitabilidad de la membrana, el crecimiento neuronal, la diferenciación y la propia muerte por apoptosis (Bezprozvanny y Mattson, 2008) entre otras. La actividad neuronal depende del aumento de la [Ca²⁺]_{cit} producido bien por la entrada de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática y/o la liberación de Ca²⁺ de los compartimentos intracelulares.

En condiciones normales, las concentraciones plasmáticas de Ca²⁺ están en torno a 1-2 mM y se mantienen constantes gracias a los distintos sistemas homeostáticos del organismo. Sin embargo, en el citosol celular, la concentración de Ca²⁺ libre está en torno a 0,1



μM (100 nM), unas 10.000 veces menor al medio extracelular. A este gradiente químico se le une el potencial de membrana, negativo en el interior celular, que hace que el gradiente electroquímico favorezca enormemente la entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, debido a la actividad de una serie de sistemas de transporte activo que consumen energía, las células en reposo mantienen este gradiente (Fig. 11).

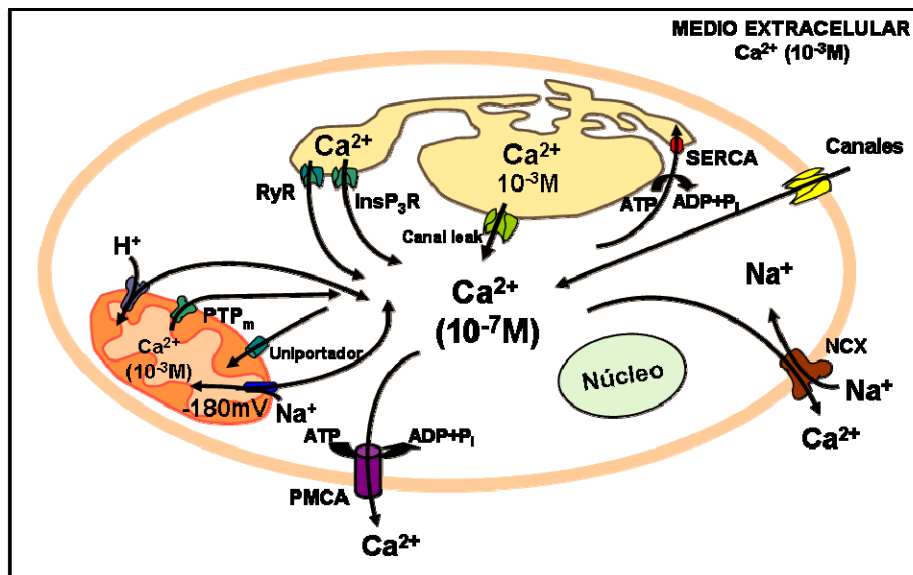
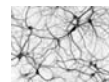
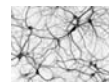


Figura 11. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En la membrana plasmática, los canales de Ca^{2+} permiten la entrada de Ca^{2+} desde el exterior (10^{-3}M) al interior celular (10^{-7}M) a favor del enorme gradiente electroquímico. La bomba de Ca^{2+} tipo PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permiten la salida de Ca^{2+} en contra de gradiente. El Ca^{2+} citosólico puede ser tamponado por proteínas citosólicas que unen Ca^{2+} y/o captado por el RE, en contra de gradiente a través de bombas de Ca^{2+} tipo SERCA, donde alcanza una concentración muy elevada (10^{-3}M). El exceso de Ca^{2+} también puede ser captado por la mitocondria a favor de gradiente eléctrico, el potencial mitocondrial (-180mV), a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. El Ca^{2+} almacenado en depósitos puede ser liberado al citosol o al núcleo a través de canales de Ca^{2+} de endomembranas activadas por IP_3 (IP_3R), o el propio Ca^{2+} , a través del receptor de rianodina (RyR). La mitocondria no se considera un depósito de Ca^{2+} ya que el Ca^{2+} que entra a las mitocondrias regresa al citosol inmediatamente a través de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, o bien al activarse el poro de transición de permeabilidad en la membrana mitocondrial interna. Figura adaptada de Carafoli, 2002.



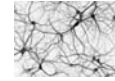
En la célula existen numerosas proteínas y enzimas cuya actividad está regulada directa o indirectamente por Ca^{2+} intracelular, de modo que pequeños cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ pueden resultar en la activación de múltiples procesos celulares (Berridge, 1995). La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ no es homogénea en el interior celular. Existen compartimentos subcelulares que acumulan Ca^{2+} en su interior como el retículo endoplásmico (RE) que tiene una concentración de Ca^{2+} libre similar a la presente en el líquido extracelular (Montero *et al.*, 2000). Este Ca^{2+} es además movilizable ya que la estimulación celular conduce frecuentemente a la liberación transitoria de este Ca^{2+} almacenado. Existen también depósitos de Ca^{2+} en otros orgánulos como el aparato de Golgi, la envoltura nuclear o incluso las vesículas secretoras en células especializadas, pero su papel en la señalización por Ca^{2+} es mucho menos conocido. El núcleo y las mitocondrias también pueden capturar Ca^{2+} tras la estimulación celular pero sólo de modo transitorio ya que en condiciones basales presentan una concentración de Ca^{2+} libre similar al citosol (Montero *et al.*, 2000; Chamero *et al.*, 2002). Así, el estudio de la señal de Ca^{2+} ha pasado en los últimos años del análisis global al estudio subcelular (Álvarez *et al.*, 2002).

Durante el proceso de estimulación celular los mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} al citosol y de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, son los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. No obstante, una elevación mantenida de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tiene efectos negativos que pueden conducir a la muerte celular. Así, para evitar la continua activación celular, mantener los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y preparar las células para estímulos consecutivos existen diversos sistemas de extrusión del Ca^{2+} tanto en la membrana



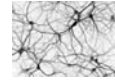
plasmática como en las endomembranas. En primer lugar, las bombas de Ca^{2+} que extruyen Ca^{2+} a expensas de la hidrólisis de ATP incluyen a la Ca^{2+} /ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) que bombea Ca^{2+} al exterior celular y a la Ca^{2+} /ATPasa del RE que bombea Ca^{2+} al interior del RE (SERCA). En segundo lugar existen intercambiadores como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que en condiciones normales transporta Ca^{2+} al exterior celular en intercambio con la entrada de Na^+ que es energéticamente favorable. Recientemente se ha descrito que el transporte de Ca^{2+} a la mitocondria a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) también contribuye a aclarar los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Todos estos sistemas, retiran el Ca^{2+} del citosol bien al exterior celular o al interior de orgánulos. En todos los casos, excepto en la mitocondria, este transporte es en contra de gradiente por lo que se requiere energía en forma de ATP (bombas) o almacenada en forma de otros gradientes que se disipan al transportar Ca^{2+} (intercambiadores).

Por otra parte, los orgánulos intracelulares son capaces no sólo de captar sino también de liberar Ca^{2+} a favor de gradiente gracias a la presencia de canales de Ca^{2+} de endomembranas. En situación de reposo la actividad de las bombas mantiene muy bajo el nivel de Ca^{2+} citosólico. Se puede afirmar que, en general, las señales intracelulares de Ca^{2+} se generan por cambios en la actividad de los canales tanto aquellos presentes en la membrana plasmática como los específicos de endomembranas más que por cambios en la actividad de las bombas.



5.1 Canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

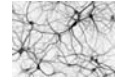
La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana al interior celular desde el exterior está regulada por diversos tipos de canales de Ca^{2+} . Los canales de Ca^{2+} son proteínas transmembranales ubicuas, que forman poros a través de los cuales se produce el flujo selectivo de Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico. El gran gradiente de concentración de Ca^{2+} , junto al potencial negativo del interior celular, hace que exista un enorme gradiente electroquímico que favorece el flujo de Ca^{2+} en la membrana plasmática a través de canales específicos. Existen diversos tipos de canales de Ca^{2+} que se pueden clasificar en base a dos criterios: su mecanismo de activación y su localización subcelular. Dependiendo del mecanismo de activación, los canales de Ca^{2+} pueden agruparse en dos familias: los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs), dominantes en las células excitables; y los canales de Ca^{2+} no operados por voltaje, que pueden ser activados por ligandos extracelulares o intracelulares (segundos mensajeros) denominados ROCs (del inglés *receptor-operated channels*), SMOCs por *second-messenger operated channels* y SOCs, por *store-operated channels*. Este segundo grupo es dominante en las células no excitables, aunque estos canales también están presentes en células excitables. En los VOCs, la probabilidad de apertura del canal se modifica bruscamente con el voltaje a partir de un cierto potencial transmembranal (umbral). Sin embargo, en el resto de canales el potencial de membrana contribuye al gradiente electroquímico, fuerza electromotriz que impulsa el flujo de Ca^{2+} , pero su apertura o cierre viene determinada por la unión de un ligando extracelular (ROCs) o intracelular (SMOCs, SOCs) o incluso por cambios físicos en el ambiente (temperatura, tensión,



presión osmótica, etc.) como es el caso de muchos canales de la superfamilia de canales TRP.

Los VOCs o canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se abren bruscamente en respuesta a una despolarización suficiente de la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol. Esta entrada suele ser muy rápida debido al enorme gradiente electroquímico para este ión. Muchos canales inactivan rápidamente para limitar el influjo de Ca^{2+} y la repolarización de la membrana produce el cierre de estos canales. Los VOCs están presentes en muchos tipos de células excitables como las neuronas y participan en diversos procesos fisiológicos que requieren flujos rápidos de Ca^{2+} como la secreción de neurotransmisores en los terminales sinápticos. Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Zhang *et al.*, 1993) que han sido denominados T, L, N, P, Q y R. Desde un punto de vista funcional, existen dos grandes tipos de VOCs: los canales de bajo umbral de activación y los de alto umbral de activación (Catterall, 2000).

Los canales de umbral de activación bajo, también denominados **tipo T** (transitorios), se activan por pequeñas despolarizaciones desde potenciales muy negativos e inactivan rápidamente de un modo dependiente de voltaje. Estos canales son insensibles a dihidropiridinas (DHP), a los antagonistas de Ca^{2+} orgánicos y a la mayoría de los inorgánicos. Por su baja conductancia y corto periodo de apertura, su función probablemente está más relacionada con el inicio del potencial de acción que con la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular.



Los canales de alto umbral de activación se activan por despolarizaciones más intensas de la membrana plasmática. Existen varios subtipos, denominados **L** (por su larga duración), **N** (por su origen neuronal), **P** (por su descripción en células de Purkinje), **Q** (relacionado con la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central) y **R** (por su carácter residual).

Todos los tipos de VOCs son muy selectivos para el Ca^{2+} respecto al Na^+ o al K^+ , e insensibles a los bloqueantes tradicionales de canales de Na^+ como la tetrodotoxina (TTX). El uso de inhibidores selectivos de los VOCs ha permitido discernir la contribución que cada tipo de canal hace a la corriente total de Ca^{2+} en granos de cerebelo y neuronas de hipocampo (**Fig. 12**).

En los **granos de cerebelo** se han descrito cinco tipos de corrientes de Ca^{2+} : L, N, P, Q y R donde el componente mayoritario son los canales tipo P/Q. Los canales tipo L se inhiben completamente con dihidropiridinas como Nimodipina o Nifedipina. Los canales tipo P o Q, muy similares, son inhibidos de forma muy selectiva por toxinas como la ω -agatoxina. Los canales tipo N, minoritarios, son inhibidos específicamente por la ω -conotoxina. El componente R es insensible a los tres antagonistas mencionados.

En las **neuronas de hipocampo** el componente mayoritario (50-70%) son los canales tipo P/Q seguido de los canales tipo L (40-50%) con una contribución minoritaria del tipo N (10-20%) y el R.

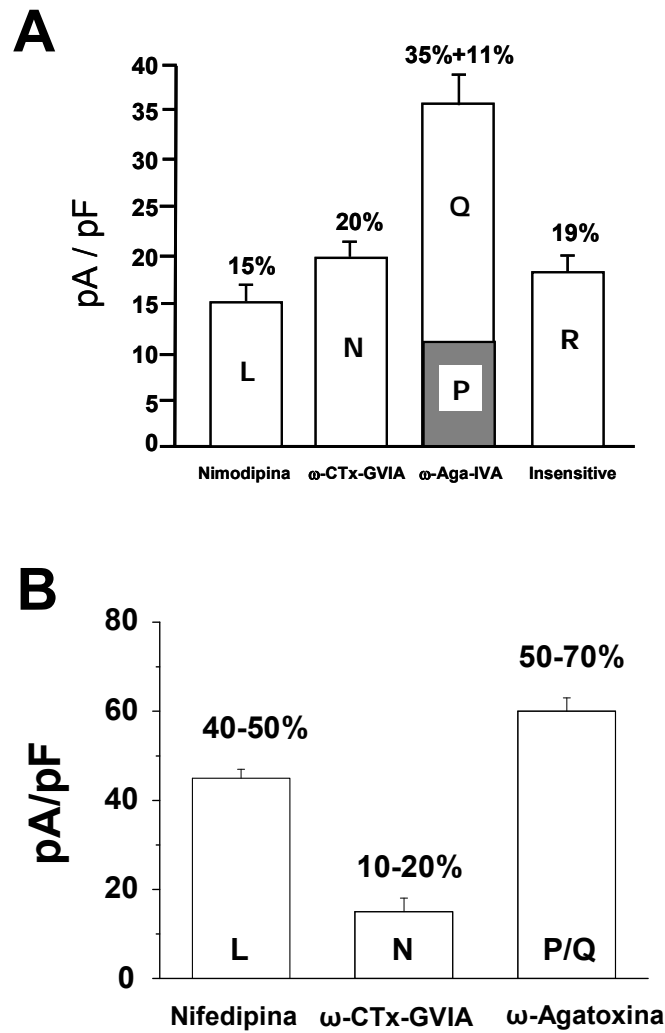
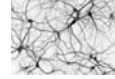
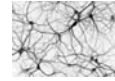


Figura 12. Contribución de los distintos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje a la corriente total de Ca^{2+} en granos de cerebelo (A) y neuronas de hipocampo (B). Fracción total de densidad de corriente en granos de cerebelo (A) y neuronas de hipocampo (B) sensible a antagonistas de canales VOCs incluyendo Nimodipina (L, 10 μM), conotoxina GVIA (N, 1 μM), ω -agatoxina IV A (P+Q, 3 μM); La fracción de corriente Residual (R) es la fracción restante la adición de los tres inhibidores. Los componentes P y Q se distinguieron por su inactivación. La corriente de Ca^{2+} se trazó con Ba^{2+} . Tomada de Randall y T sien, 1995.



En los ROCs o canales de Ca^{2+} operados por receptor, la activación del receptor por un ligando condiciona la apertura del canal. En las neuronas de hipocampo y granos de cerebelo el canal asociado al receptor de glutamato tipo NMDA es permeable tanto a cationes monovalentes como a Ca^{2+} . El glutamato es uno de los neurotransmisores más abundantes e importantes en el sistema nervioso central y lleva a cabo su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Hasta el momento se han identificado varios tipos de receptores para el glutamato (**Fig. 13**).

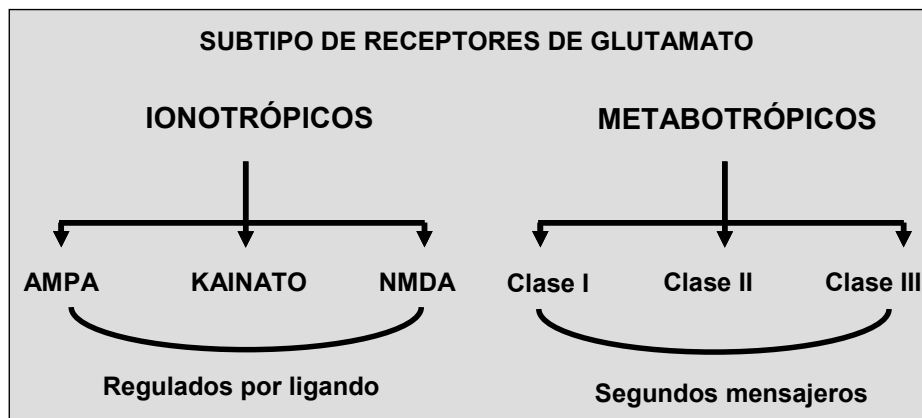
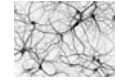


Figura 13. Clasificación de los receptores de glutamato. Esquema modificado de Sanz-Blasco 2009, Tesis Doctoral.

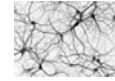
Tres de los receptores glutamatérgicos son en realidad canales iónicos regulados por ligando denominados receptores ionotrópicos, mientras que otros tres tipos, denominados receptores metabotrópicos de glutamato, dan lugar a la generación de segundos mensajeros químicos y no son canales iónicos aunque puede actuar indirectamente sobre otros canales.



En los receptores ionotrópicos la unión del neurotransmisor al receptor induce la apertura del canal con el consiguiente paso de iones, es decir, induce cambios en las permeabilidades iónicas que provocan cambios del potencial de membrana y, en su caso, cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Los receptores ionotrópicos de glutamato se denominan frecuentemente por el nombre del agonista más característico: Por ejemplo N-metil-D-aspartato, para los **receptores tipo NMDA**, amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato para los **receptores tipo AMPA** y ácido kaínico para los **receptores tipo Kainato**. Estos tres tipos de receptores forman canales catiónicos no selectivos, permeables a Na^+ y, en menor medida a Ca^{2+} , de manera que la unión de glutamato sobre cualquiera de ellos induce despolarización de la membrana post-sináptica y, especialmente en el receptor tipo NMDA, entrada de Ca^{2+} . Los receptores metabotrópicos de glutamato, activados por el agonista quisqualato, generan una cascada de segundos mensajeros que, o bien abren canales, o inducen otras señales celulares que se han implicado en procesos como la potenciación a largo plazo, base de la memoria y el aprendizaje.

Los SMOCs son canales activados por segundos mensajeros generados como consecuencia de la activación celular. Existen principalmente 2 tipos de canales: los activados por nucleótidos cíclicos (CNGA1-4, CNGB1, CNGB3) y los activados por ácido araquidónico.

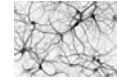
Los SOCs o canales de Ca^{2+} operados por depósitos son una vía de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática activada tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} que ocurre frecuentemente tras la activación celular. Este mecanismo



denominado entrada capacitativa del Ca^{2+} (ECC) es un mecanismo ubicuo, especialmente relevante en las células no excitables, y que regula muchas funciones celulares como por ejemplo, la proliferación celular. Además, la ECC guarda una importante relación funcional con diversos orgánulos subcelulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular: el RE y la mitocondria. Durante muchos años el mecanismo de activación y la naturaleza molecular de los SOCs ha sido un enigma. Su búsqueda iniciada hace más de 20 años ha conducido al descubrimiento de una nueva superfamilia de canales iónicos, los canales TRP (del inglés *transient receptor potential*), algunos de los cuales son considerados SOCs. Además, recientemente se han descubierto dos nuevas proteínas esenciales en la ECC: las familias de proteínas STIM y ORAI.

5.1.1 Receptor tipo NMDA.

A diferencia de los otros dos tipos de receptores ionotrópicos (receptores tipo AMPA y kainato) el receptor tipo NMDA (NMDA-R) posee una serie de características distintivas que lo hacen único entre todos los receptores ionotrópicos. Uno de esos aspectos, quizás el más significativo, es que el canal asociado al receptor permite el paso de una gran cantidad de iones Ca^{2+} , además de Na^+ y K^+ , lo que implica que su activación puede inducir el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ en la neurona post-sináptica. Probablemente existen más estudios sobre los receptores de tipo NMDA que sobre cualquier otro receptor en el sistema nervioso. Ello se debe a que los receptores NMDA además de ser muy abundantes en el sistema nervioso, están implicados en las funciones superiores del sistema nervioso central



como la memoria y el aprendizaje. Finalmente, el receptor NMDA también está implicado en la muerte neuronal por excitotoxicidad o trastornos como la epilepsia.

El NMDA-R es un complejo multi-proteico muy regulado (**Fig. 14**) cuya actividad es modificada por múltiples ligandos. De hecho, para que el canal asociado al receptor se abra se necesita, además de glutamato (o aspartato), la presencia de un co-agonista, que puede ser el aminoácido glicina (o D-serina). Ciertas poliaminas modulan positivamente el canal mientras que el ión Zn^{2+} y los iones H^+ lo modulan negativamente (antagonistas).

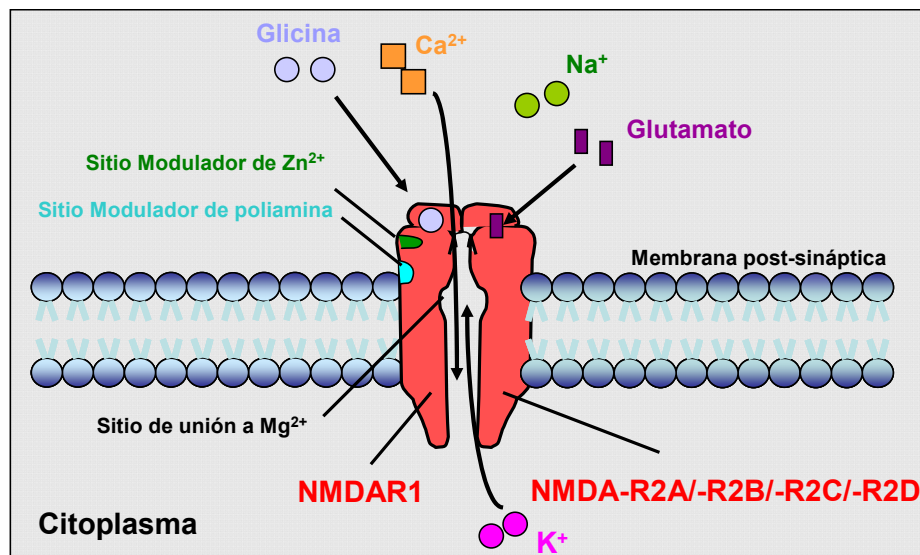
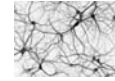
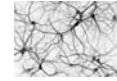


Figura 14. Estructura del receptor glutamatérgico tipo NMDA. Adaptado de Amino acid transmitters. In: Pharmacology, 3rd edition. Rang HP, Dale MM and Ritter JM. Edinburgh, UK: Harcourt Publishers 2001:470–482. Scatton B. Fundam Clin Pharmacol 1993;7(8):389–400.



La conductancia al Ca^{2+} es notablemente alta y es ésta quizá su característica más destacable y la responsable de muchas de sus funciones. Otro aspecto llamativo del NMDA-R es que comparte características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje. Esta propiedad está relacionada con el bloqueo dependiente de voltaje por el ión Mg^{2+} . El bloqueo es eliminado transitoriamente cuando la membrana se despolariza. De este modo, la unión de glutamato no abre de modo eficaz el canal asociado a no ser que, previamente, la neurona se haya despolarizado. Esta característica hace que el receptor tipo NMDA pueda actuar como detector de coincidencias pues solo se abre si coinciden en el tiempo el neurotransmisor glutamato y un pulso despolarizante suficiente.

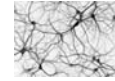
Los receptores tipo NMDA son complejos proteicos formados por diferentes combinaciones de varias subunidades denominadas NMDAR1, NMDAR2A-2D y NMDAR3A-3B. La subunidad NMDAR1 posee todas las propiedades fundamentales necesarias para constituir un canal funcional y puede estar presente en ocho isoformas diferentes. La otra familia de proteínas que contribuye a la formación de receptores NMDA funcionales está constituida por cuatro variantes de la subunidad NMDAR2A-2D codificadas por cuatro genes separados y/o la subunidad NMDAR3A-3B. Distintas combinaciones de la subunidad fundamental NMDAR1 con las otras subunidades dan lugar a receptores NMDA con propiedades funcionales diferentes, que pueden estar distribuidas en áreas encefálicas específicas y/o que pueden definir funciones fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al glutamato.



Una gran parte de las acciones mediadas por los receptores NMDA se basan en la regulación del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. La activación de los receptores NMDA permitiría un rápido influjo de Ca^{2+} , con elevación intracelular de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, lo cual dispararía una cascada de sistemas de segundos mensajeros que podría producir acciones muy diversas. Tanto el glutamato como los receptores tipo NMDA están implicados en numerosas funciones dentro del sistema nervioso. Uno de los procesos más estudiados en el que los receptores NMDA parecen jugar un papel clave es la plasticidad sináptica. La maduración de los circuitos nerviosos (establecimiento de conexiones funcionales) durante el desarrollo, y también en la vida adulta, depende de la activación y consolidación de ciertas sinapsis, mediante mecanismos de plasticidad en los que están involucrados los receptores NMDA. La potenciación a largo plazo (LTP), una forma de plasticidad sináptica que está en la base de los procesos de aprendizaje y memoria, también requiere la activación de receptores tipo NMDA. Las sinapsis glutamatérgicas se pueden formar espontáneamente *in vitro* dando lugar a fenómenos de sincronización neuronal que parecen ser la base de fenómenos epilépticos.

5.1.2 Sincronización neuronal.

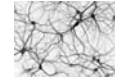
Las neuronas en cultivo tienen la capacidad de formar conexiones sinápticas entre ellas tras varios días en cultivo. Las conexiones entre las neuronas son tan abundantes que inicialmente se pensó que el sistema debería funcionar como una red continua (Teoría reticular de Gerlach y Golgi). Cajal fue el primero en proponer el funcionamiento de las neuronas como las unidades funcionales independientes a nivel anatómico y fisiológico del sistema nervioso



(Teoría de la neurona) y en definir las propiedades de la transmisión del impulso nervioso a través de las neuritas y las sinapsis (Teoría de la polaridad dinámica). La individualidad de las vías es necesaria para la individualidad de las funciones (Hjelmfelt y Ross, 1994), esto sería necesario para que, por ejemplo, no se mezclen sensaciones.

Se sabe que en los cultivos neuronales cursan fenómenos de sincronización. *In vitro* se ha observado que existe una actividad sincrónica y oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ tras la retirada de Mg^{2+} del medio extracelular en neuronas de la corteza (Murphy *et al.*, 1991), granos de cerebelo (Lawrie *et al.*, 1993; Núñez *et al.*, 1996) y neuronas de hipocampo (Bacci *et al.*, 1999). En todos los casos la formación de conexiones sinápticas entre las células en cultivo es un requisito para esta actividad sincrónica. En granos de cerebelo la retirada del ión Mg^{2+} del medio extracelular elimina el bloqueo del receptor tipo NMDA de modo que una pequeña excitación de una única neurona puede propagarse por toda la red. La propagación comenzaría como un pulso despolarizante conducido por los canales de Na^+ dependientes de voltaje (sensibles a tetrodotoxina) a todas las terminales sinápticas de la neurona excitada. El pulso despolarizante abriría los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q (sensibles a ω -agatoxina) induciendo la entrada de Ca^{2+} a los terminals presinápticos y la liberación de glutamato. La activación de receptores tipo NMDA post-sinápticos estimularía las neuronas colindantes conectadas y, así sucesivamente, a toda la red neuronal acoplada a la neurona original (Núñez *et al.*, 1996).

Aunque menos conocido, este sistema caracterizado originalmente en neuronas de cerebelo y corteza podría funcionar de modo similar en neuronas de hipocampo. Con respecto a los canales

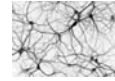


tipo P/Q, no aparecen en todas las células del hipocampo. En algunas células, tienen un papel de acoplamiento a receptores AMPA/kainato activando la entrada de Ca^{2+} y en otras células, estos canales de Ca^{2+} no contribuyen en absoluto a la entrada de Ca^{2+} a la célula. (Santiago *et al.*, 2008). El hecho de que diferentes tipos de canales de Ca^{2+} estén acoplados a la activación de receptores de tipo no NMDA podría tener consecuencias en términos de procesamiento de información y podría contribuir a las variaciones que existen en los cultivos en respuesta a estímulos.

5.2 Sistemas de Extrusión de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática.

El aumento mantenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tiene efectos negativos en la célula hasta incluso producir muerte celular. Para evitarlo existen diversos sistemas de extrusión de Ca^{2+} en las células, manteniendo así los niveles basales de Ca^{2+} . Por un lado están las bombas de Ca^{2+} con actividad ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) que expulsan Ca^{2+} con gasto de energía. Por otro lado existen los intercambiadores (NCX) que pueden transportar Ca^{2+} al exterior celular gracias al intercambio de otros iones de forma energéticamente favorable. Finalmente colaboran en el aclaramiento diversas proteínas con función tamponadora denominadas proteínas ligadoras de Ca^{2+} .

Las PMCA son bombas de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática de todas las células eucariotas. Aunque su capacidad máxima de bombeo no es excesivamente grande, su afinidad es muy alta lo que les permite operar incluso a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de las células en



reposo, satisfaciendo así las demandas para el ajuste basal de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

El intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) es un sistema de transporte de baja afinidad y alta capacidad. Se trata de un transportador electrogénico ya que en condiciones normales se intercambia 1 ion de Ca^{2+} citosólico por 3 iones de Na^+ extracelular ($3Na^+:1Ca^{2+}$). La energía para el flujo proviene del gradiente electroquímico para el Na^+ , que lo impulsa hacia el interior de la célula. El sistema es reversible y la dirección de los flujos puede variar dependiendo de la magnitud y potencial de membrana y de los gradientes iónicos. En condiciones de reposo, el flujo neto de Ca^{2+} es prácticamente nulo. NCX se expresa en la membrana plasmática del tejido muscular cardíaco, liso y en ciertos tejidos endocrinos y nerviosos. Un sistema de transporte semejante se ha encontrado también en células no excitables, como plaquetas, espermatozoides y células de riñón (Philipson *et al.*, 2002). Numerosas proteínas ligadoras de Ca^{2+} contribuyen al aclaramiento participando así en la homeostasis de Ca^{2+} actuando como tampones de Ca^{2+} . Muchas de estas proteínas transducen la señal de calcio hacia otras proteínas efectoras, la más conocida de ellas es la calmodulina (Clapham, D.E. 2007). La **Fig. 15** muestra un resumen de los componentes que participan en la homeostasis de Ca^{2+} en la membrana plasmática.

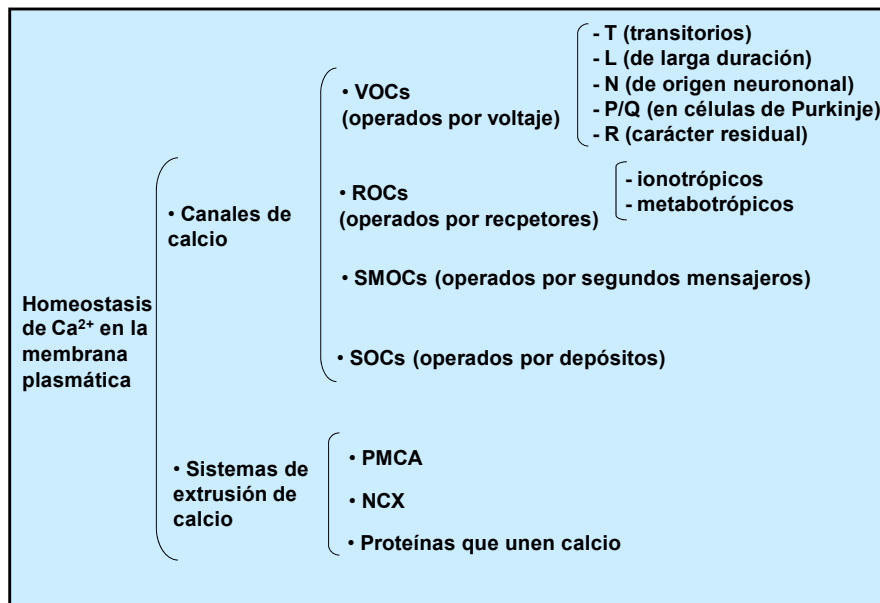
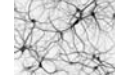
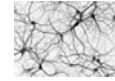


Figura 15. Sistemas de transporte de Ca²⁺ de la membrana plasmática.

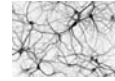
5.3. Canales de Ca²⁺ del RE.

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo presente en todos los tipos de células eucariotas y con un elevado grado de plasticidad que le permite una organización estructural heterogénea por la que se distinguen dos tipos, el retículo endoplásmico liso y el rugoso. El RE es considerado un depósito intracelular de Ca²⁺. Sin embargo, estos depósitos no son un mero almacén pasivo de Ca²⁺, sino que participan activamente en los cambios de la [Ca²⁺]_{cit} que tienen lugar durante la activación celular. En condiciones normales la concentración de Ca²⁺ libre en el RE es similar a la concentración de Ca²⁺ del líquido extracelular (Montero *et al.*, 2000). El RE liso está implicado en la señalización de Ca²⁺ en neuronas. Para ello, la membrana del RE posee receptores responsables de la liberación de



Ca^{2+} en respuesta a estímulos. Éstos incluyen el receptor de rianodina (RyR) y el receptor de inositol trifosfato (InsP_3R). Por el contrario para el relleno de Ca^{2+} el RE utiliza bombas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico o sarcoplásmico con actividad ATPasa (SERCA). La movilización del Ca^{2+} que está almacenado en los compartimentos como el RE tienen un papel muy importante en el origen de las señales de Ca^{2+} en todos los tipos de células tanto excitables como no excitables (Tsien y Tsien, 1990). Los canales de Ca^{2+} del RE se clasifican en función de su unión a ligandos como inositol trifosfato (IP_3), un segundo mensajero intracelular o el alcaloide rianodina (Ry). Ambos canales son también sensibles al Ca^{2+} , presentan homología parcial de secuencia, organización estructural y funciones fisiológicas similares, sugiriendo que podrían derivar de una proteína ancestral común (Berridge, 1993).

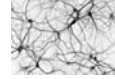
El canal de Ca^{2+} asociado al receptor de IP_3 (IP_3R) es un canal permeable a Ca^{2+} con una estructura tetramérica compuesta por cuatro subunidades (Supattapone *et al.*, 1988) que conforman el poro poco selectivo. Cada subunidad contiene un único sitio de unión al IP_3 localizado en el dominio citosólico y atraviesa 6 veces la membrana, participando en la formación del poro (Taylor *et al.*, 2004). Entre el dominio citosólico y los dominios transmembranales existe una región conocida como dominio modulador, que presenta numerosos sitios de unión a otros ligandos como ATP o Ca^{2+} que pueden modular su actividad. Por tanto, IP_3R posee 3 dominios funcionales; el dominio de unión a IP_3 , el modulador y el poro. Los IP_3R se encuentran en diferentes sistemas de endomembranas excepto las de las mitocondrias (Ross *et al.*, 1989).



El canal de Ca^{2+} del receptor de rianodina (RyR) presenta gran homología estructural con los IP_3R sobre todo en la zona de anclaje a la membrana del RE. Presenta sitios de unión para Ca^{2+} , calmodulina (CaM), y ATP. Existen tres isoformas que se hayan encontrado en mamíferos denominadas RyR1, RyR2, RyR3. Cada isoforma está codificada por un gen distinto y los tres son homólogos en un 70% de su secuencia (Rossi *et al.*, 2002).

5.4 Sistemas de Extrusión de Ca^{2+} de Endomembranas.

Las SERCA son bombas de Ca^{2+} similares a las bombas tipo PMCA pero localizadas en la membrana del RE. Conforman un sistema de transporte de muy alta afinidad por Ca^{2+} capaces de responder a pequeñas elevaciones de la Ca^{2+} y así ajustar los valores basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en reposo. El Ca^{2+} es transportado desde el citosol hacia el interior del RE. Al igual que PMCA, la bomba SERCA también pertenece al grupo de ATPasas de tipo P que operan en contra de un enorme gradiente electroquímico. En este caso, el número de iones de Ca^{2+} transportados por molécula de ATP hidrolizado son dos. Al igual que para las PMCA, la SERCA requiere la presencia de Mg^{2+} en el lado citosólico de la membrana, aunque una concentración elevada de Mg^{2+} reduce la tasa de transporte por la competición del Mg^{2+} por el sitio de transporte. Las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol y en el lumen del RE también modulan la actividad de las bombas a ambos lados de la membrana (Yano *et al.*, 2004).



Las SPCAs son bombas de Ca^{2+} con actividad ATPasa presentes en otros compartimentos subcelulares. Estas bombas estarían relacionadas con las SERCA pero tendrían funciones y propiedades distintas. Las SPCAs pueden ser responsables de la acumulación de Ca^{2+} en los compartimentos del sistema de Golgi (Rizzuto, 2001; Mitchell *et al.*, 2001), lo que es crucial para la regulación de la secreción y de los contactos celulares. La **Fig. 16** muestra un resumen de los canales y sistemas de extrusión de Ca^{2+} presentes en endomembranas excluyendo la mitocondria.

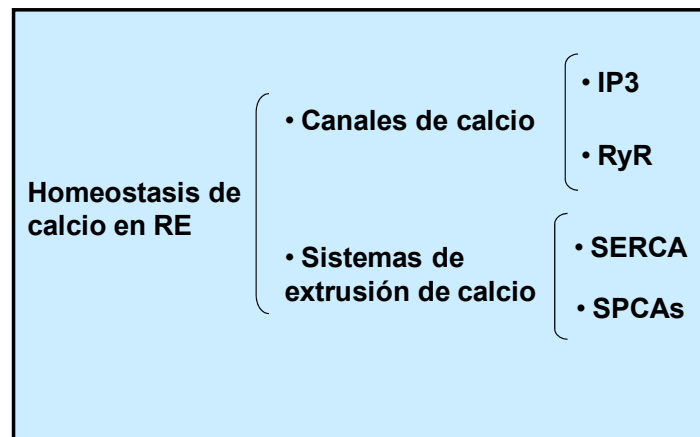
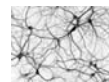


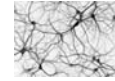
Figura 16. Sistemas de Transporte de Ca^{2+} en RE.



5.5 Homeostasis del Ca^{2+} Mitocondrial.

El otro orgánulo subcelular implicado activamente en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular es la mitocondria, aunque su papel en este aspecto ha sido reconocido más recientemente. La mitocondria está delimitada por dos membranas (interna y externa) que envuelven a la matriz mitocondrial. En la membrana externa se localizan numerosas proteínas formadoras de canales conocidas como porinas. La membrana interna, es impermeable a iones y a toda molécula pequeña con carga, además forma unos pliegues aumentando así su superficie total. Esta membrana contiene una serie de proteínas que llevan a cabo diversas funciones como reacciones de oxidación de la cadena de transporte de electrones, producción de ATP y transporte de metabolitos a la matriz y al exterior de la mitocondria. En los años 50 se descubrió la capacidad de transporte de Ca^{2+} y otros cationes divalentes en las mitocondrias. Britton Chance describió que el transporte mitocondrial era un proceso activo que implicaba la interacción de Ca^{2+} con un transportador dependiente del potencial de membrana mitocondrial (ψ_M) (Chance B, 1965). Más tarde se describió el concepto de uniportador como mecanismo de transporte de un único ión lo que consolidó la idea anterior (Mitchell, 1966). Recientemente se han identificado distintos componentes moleculares que parecen conformar el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} y otras proteínas reguladoras (De Stefani *et al.*, 2011; Baughman *et al.*, 2011).

Aunque la mitocondria tiene una gran capacidad para capturar Ca^{2+} sin consumo de energía y lo hace además muy rápidamente, el Ca^{2+} acumulado en la mitocondria retorna (algo más lentamente) al



citocitol celular gracias a la activación de sistemas de intercambio de Ca^{2+} con Na^+ o protones (**Fig. 17**). Por ello, aunque la concentración de Ca^{2+} mitocondrial puede alcanzar el nivel mM, retorna en un periodo razonable a los niveles basales cercanos a los que hay en citosol, pues de lo contrario se podría iniciar un proceso de muerte celular apoptótica conocido como vía intrínseca o mitocondrial.

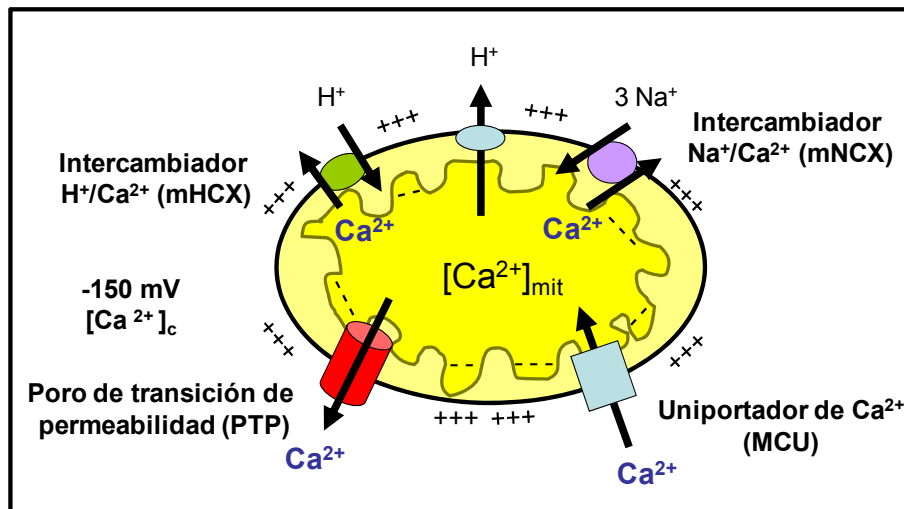
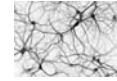


Figura 17. Homeostasis de Ca^{2+} mitocondrial. En condiciones fisiológicas la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se produce a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Las vías de salida de Ca^{2+} son los intercambiadores $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El PTP permite la salida de Ca^{2+} además de factores pro-apoptóticos.

En la última década se ha estudiado el papel de la mitocondria como liberadora de factores apoptóticos al citosol (Ferri y Kroemer, 2001) y en la señalización intracelular por Ca^{2+} (Babcock y Hille, 1998; Rizzuto *et al.*, 2000). Las mitocondrias tienen la capacidad de ser muy móviles, sobre todo en neuronas (Hollenbeck y Saxton,

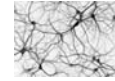


2005) y suelen estar localizadas en regiones con alta demanda metabólica como los axones. La diferencia de potencial ($\Delta\psi_M$), de -150 mV en el interior de la matriz mitocondrial, es el mayor gradiente electroquímico para la entrada de Ca^{2+} . La mitocondria produce la mayor parte del ATP en neuronas necesario para la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Mattson, 2007).

La mitocondria tiene gran importancia en la regulación local de la homeóstasis de Ca^{2+} celular ya que capta Ca^{2+} del citosol en respuesta a flujos de Ca^{2+} a través de canales en la membrana plasmática o liberación de Ca^{2+} desde el RE (Simpson, 2000). Las interacciones entre la mitocondria y el RE están mediadas por Ca^{2+} y participan en la plasticidad y supervivencia neuronal (Chan *et al.*, 2004; Mironov *et al.*, 2005).

6. Mitocondria y Muerte Neuronal.

Las mitocondrias tienen un papel esencial en la vía intrínseca de la muerte celular, especialmente en la muerte neuronal, ya que en las neuronas la apoptosis por la vía intrínseca es mayoritaria. La vía intrínseca de la apoptosis es un fenómeno complejo, casi estadístico, en el que la convergencia de una serie de factores que actúan en concierto promueve de modo irreversible la muerte neuronal. Estos factores incluyen la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, el estrés metabólico (bajos niveles de ATP) y el estrés oxidativo (exceso de especies reactivas de O_2 o ROS). Se cree que la coincidencia de al menos dos de estos fenómenos induce la vía intrínseca. Ésta comienza por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial



(PTPm) y la liberación de citocromo c que lleva de modo irreversible a la activación de una serie de caspasas intracelulares que digieren de modo secuencial a la célula llevando a la muerte celular (Duchen, 2000). El PTPm es un poro que permite el flujo de proteínas pro-apoptóticas, como citocromo c, que recluta una serie de proteasas llamadas caspasas que conducen a la muerte celular. Una vez liberado el citocromo c la célula está condenada a morir sin posibilidad de retorno (**Fig. 18**) (Adrain y Martin, 2001).

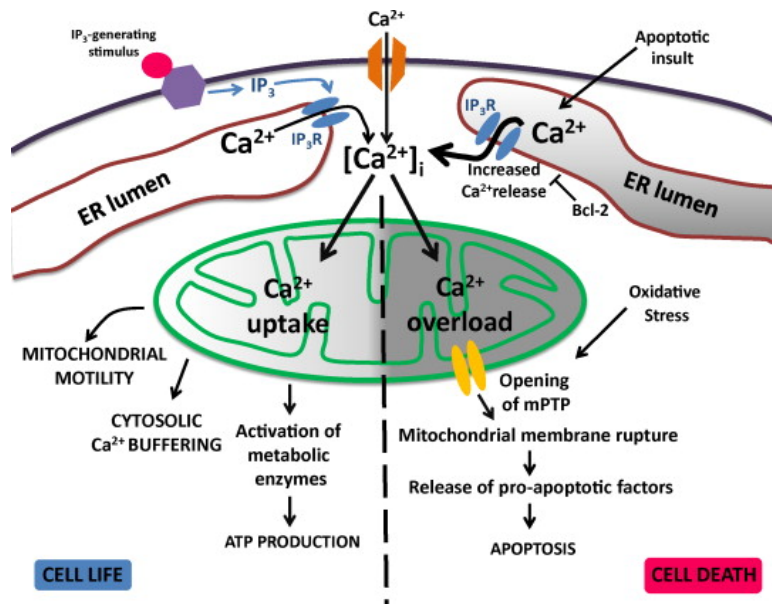
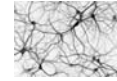
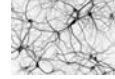


Figura 18. Acumulación de Ca^{2+} mitocondrial. A la izquierda en condiciones normales, flujo de Ca^{2+} desde el medio extracelular o salida de Ca^{2+} desde el RE causa un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Rápidamente la mitocondria capta Ca^{2+} del citosol, mecanismo crucial para la homeóstasis de Ca^{2+} y el metabolismo. A la derecha, cuando la mitocondria sufre una sobrecarga de Ca^{2+} , se produce la apertura del PTPm, varios factores pro-apoptóticos podrían salir al citosol induciendo apoptosis. Imagen tomada de Clara Hiu-Ling *et al.*, 2010.



No todos los mecanismos de apoptosis establecidos en células tumorales y linfocitos se aplican necesariamente a las neuronas. Lecoeur (Lecoeur *et al.*, 2004) ha propuesto que las neuronas, en ausencia de factores de supervivencia como el suero fetal bovino, siguen una serie de pasos en el proceso de la apoptosis. El primer evento detectable son los cambios morfológicos, traducidos en una reducción progresiva del perímetro nuclear, lo que parece preceder a modificaciones en el tamaño neuronal. La disipación o colapso del potencial mitocondrial será el siguiente factor, que precede a la activación de caspasas 3 y 9, exposición de la fosfatidil-serina, condensación y ruptura del núcleo. La exposición de fosfatidil-serina y la condensación nuclear dependerán de la activación de la caspasa 9, pero no de la 3. Finalmente se produce la permeabilización de la membrana plasmática. Esta permeabilidad en la membrana es un signo post-apoptótico que sólo ocurre en neuronas con la cromatina condensada en las que se ha producido el encogimiento característico de la apoptosis y la exposición de fosfatidil-serina. Al contrario, cuando se induce la permeabilización de la membrana, por ejemplo con el detergente tritón, no se producirá encogimiento neuronal ni condensación de la cromatina (Lecoeur *et al.*, 2004).

Como se ha dicho anteriormente, la apertura del PTPm es un punto de inflexión que determina si una célula está destinada a morir. No se conoce bien el mecanismo de apertura del PTPm, aunque sí se conocen ciertos factores implicados que lo promueven, siendo el más importante la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. De hecho, se ha demostrado en neuronas que la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es capaz de proteger de la muerte inducida por excitotoxicidad (exceso de glutamato) a las neuronas.



Se ha propuesto que la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} por la mitocondria prevendría la apertura del PTPm. Así, evitar la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria en los momentos en los que se produzca un daño neuronal podría proteger a las neuronas (Deshpande *et al.*, 1987; Korde *et al.*, 2005; Zaidan y Sims, 1994). Otros factores de la vía intrínseca implicados en la muerte celular son algunas proteínas de la familia de Bcl-2 que interaccionan con la membrana de la mitocondria para aumentar su permeabilidad e inducir apoptosis (Bax y Bak) o para estabilizar la membrana y prevenir la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL, entre otros). (**Fig. 19**).

La disfunción mitocondrial y particularmente la formación de ROS en el SNC ha sido implicada en daños agudos como la isquemia y en daños neurodegenerativos crónicos como las enfermedades de Alzheimer o de Parkinson (Chinopoulos y Adam-Vizi, 2006; Orth y Schapira, 2001).

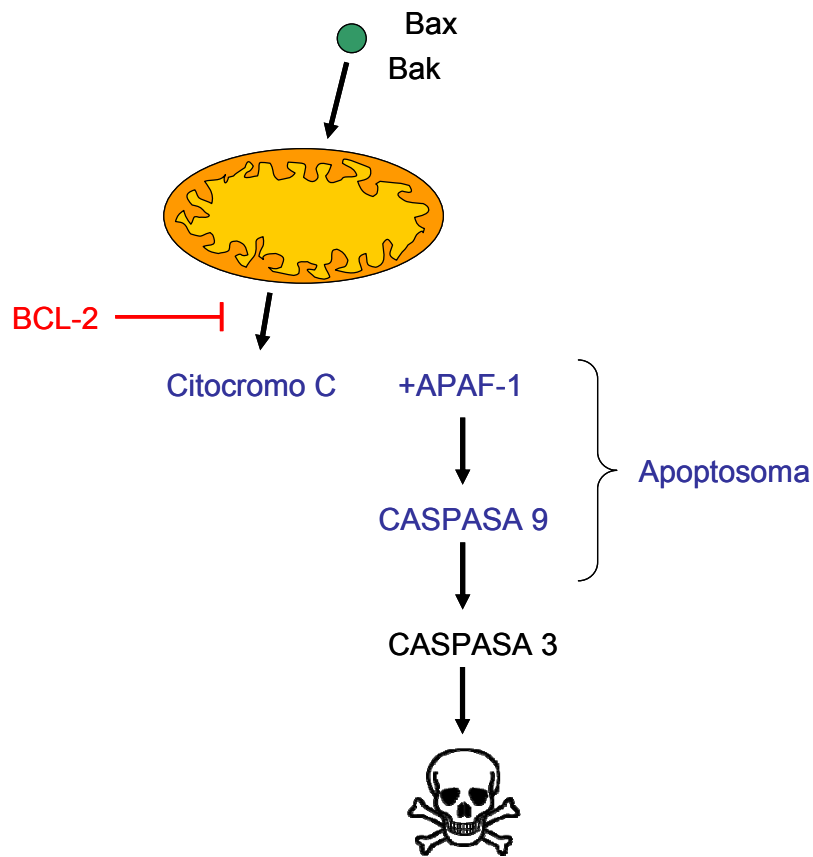
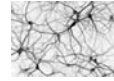
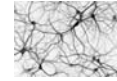


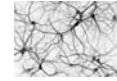
Figura 19. Vía intrínseca de la muerte celular por apoptosis. La vía intrínseca de la apoptosis es disparada precisamente en la mitocondria por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm). Proteínas proapoptóticas como Bax y Bak interaccionarán con la membrana mitocondrial desencadenando la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, lo que conllevará a la muerte celular. El citocromo c junto con la proteína Apaf-1 y la procaspasa 9 forman el complejo multimérico denominado apoptosoma. Este proceso se inhibe con proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2. Modificado de Fadeel *et al.*, 2008.



7. Calcio Intracelular y EA.

Desde los años 90 diversos autores han propuesto que la enfermedad de Alzheimer podría estar relacionada con una dis-homeostasis o pérdida de homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Aunque no se conoce el mecanismo íntimo, esta pérdida se ha relacionado frecuentemente con efectos tempranos inducidos por el péptido amiloide (Khachaturian, 1987; Mattson *et al.*, 1993). Esta hipótesis fue propuesta originalmente por Khachaturian quien postuló que una alteración mantenida de la concentración de Ca^{2+} intracelular estaría relacionada con diversos desórdenes neurodegenerativos, entre ellos la EA (Khachaturian, 1994). Esta teoría recibió apoyo experimental en estudios que demostraron alteraciones de la señalización de Ca^{2+} intracelular tanto en la forma esporádica como en la familiar (Ito *et al.*, 1994; La Ferla, 2002).

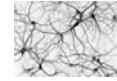
Es bien conocido que una gran variedad de funciones neuronales dependen de la señalización por Ca^{2+} intracelular. Por tanto, no es extraño suponer que una alteración del Ca^{2+} intracelular pueda estar en el origen del daño y disfunción neuronal de la EA. Mattson *et al.*, describieron (Mattson *et al.*, 1992) que la incubación con $\text{A}\beta$ durante varias horas produce el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, lo que reflejaría una disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Goodmann and Mattson, 1994; Mattson *et al.*, 1993). Esta alteración podría ser el origen de una variedad de efectos como la activación de enzimas celulares incluyendo proteasas, daños en el citoesqueleto y apoptosis (Mattson *et al.*, 1991; Mattson, 1994).



Adicionalmente, otro grupo propuso que A β podría insertarse en la membrana plasmática de las células y formar allí poros o canales iónicos más o menos selectivos, los llamados canales amilodeos (Arispe *et al.*, 1993; Kagan *et al.*, 2004).

Otro posible mecanismo por el cual puede A β puede producir dis-homeostasis del Ca²⁺ intracelular podría ser la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se sabe que los ROS producen peroxidación de la membrana lipídica (Hensley *et al.*, 1994) lo que podría alterar sistemas de transporte de membrana incluyendo canales iónicos (Keller *et al.*, 1997).

Todos los estudios mencionados fueron llevados a cabo utilizando fracciones no fisiológicas del péptido A β como el A β ₂₅₋₃₅, fibrillas o bien preparaciones de A β sin caracterizar. Más recientemente, diversos estudios han sugerido que, en realidad, la forma más tóxica de A β eran pequeños agregados formados por dímeros, tetrámeros, pentámeros y agregados con mayor número de copias (hasta 24) colectivamente conocidos como oligómeros del péptido amiloide. Lo cierto es que el péptido amiloide, especialmente la forma A β ₁₋₄₂ más hidrofóbica tiende a agregar. El nivel de agregación no está relacionado de forma sencilla con la concentración sino que más bien, dependiendo de las especies existentes y las condiciones del entorno, existe una concentración umbral por encima de la cual la formación de oligómeros se precipita. Además, los estudios más recientes sugieren que son los oligómeros antes que otros estados de agregación, los que son realmente tóxicos en la EA.



Los oligómeros son capaces de producir cambios en procesos relacionados con la plasticidad sináptica como la depresión a largo plazo (LTD) y la potenciación a largo plazo (LTP) esenciales en los procesos de memoria y aprendizaje (Hardy y Selkoe, 2002; Klein *et al.*, 2001). Otros estudios aún más recientes han mostrado que los oligómeros inducen el incremento agudo de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico y muerte celular en células de neuroblastoma humano (Demuro *et al.*, 2005; Sokolov *et al.*, 2006). Estos datos llevaron a la conclusión de que el péptido amiloide es sinaptotóxico y neurotóxico y sus efectos están mediados en buena medida por agregados solubles u oligómeros de $\text{A}\beta$ más que por monómeros o grandes agregados como las fibrillas.

El mecanismo por el que los oligómeros inducen entrada de Ca^{2+} ha sido investigado profusamente sin haberse alcanzado un consenso al respecto. Inicialmente se propuso que la entrada de Ca^{2+} sería debida a la permeabilización inespecífica de la membrana plasmática (Demuro *et al.*, 2005; Sokolov *et al.*, 2006) o bien la activación y/o formación de canales de Ca^{2+} como los canales amiloides. También se ha propuesto que los oligómeros podrían actuar directamente sobre canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, especialmente el canal asociado al receptor glutamatérgico del tipo NMDA (**Fig. 20**).

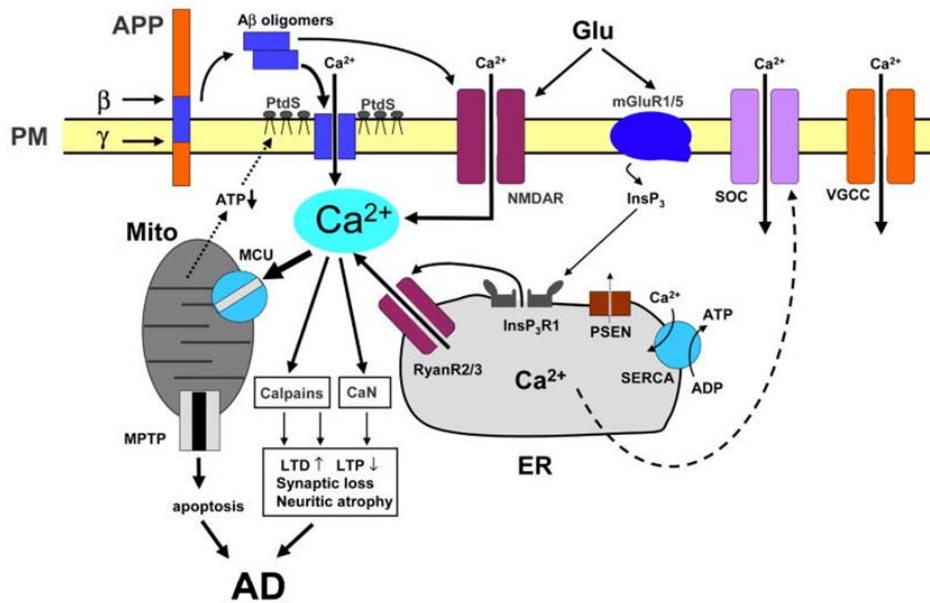
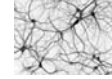
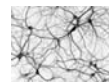


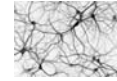
Figura 20. Esquema de la hipótesis del calcio en la EA. La desregulación del calcio en la enfermedad de Alzheimer está iniciada por el procesamiento de la APP por β -secretasa y γ -secretasa que produce péptido amiloide ($A\beta$) que tiende a agregar formando oligómeros. Los oligómeros de $A\beta$ pueden inducir incrementos de Ca^{2+} por diversos mecanismos. Por ejemplo, se pueden insertar en la membrana plasmática y formar poros permeables a Ca^{2+} . La asociación de oligómeros con la membrana plasmática se ve facilitada por la unión a fosfatidilserina (PtdS). Reducción en los niveles de ATP y la pérdida de integridad de la membrana provoca la despolarización de membrana, lo que conduce a la entrada de Ca^{2+} a través de NMDAR y VGCC. Los oligómeros también pueden afectar a la actividad de receptores tipo NMDA, AMPA y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) directamente. El glutamato estimula la activación de los receptores mGluR1 / 5, la producción de $InsP_3$ y $InsP_3R$ mediada por la liberación de Ca^{2+} del RE. La actividad de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática puede verse afectada indirectamente por las mutaciones de PS a través de la modulación de la actividad SERCA. Incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ dan lugar a la activación de la calcineurina y calpains produciendo modificación del citoesqueleto neuronal, pérdida de sináptica y atrofia neuríticas. El exceso de Ca^{2+} es absorbido por las mitocondrias a través del MCU, lo que supone la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial y apoptosis. Imagen obtenida de Bezprozvany *et al.*, 2010.



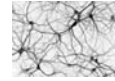
Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que los oligómeros del péptido amiloide, pero no las fibrillas, inducían entrada de Ca^{2+} en granos de cerebelo (pero no en células de la glía) seguido de sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y muerte neuronal por apoptosis. Este efecto era esencial para la neurotoxicidad ya que la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial por anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) protegía, al menos parcialmente, frente a la muerte neuronal asociada (Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Aunque en este estudio no se analizó en detalle el mecanismo de entrada de Ca^{2+} , si se pudo comprobar que la entrada no era debida a un efecto inespecífico de permeabilización de la membrana plasmática (Sanz-Blasco *et al.*, 2008).

Una nueva metodología de imagen de Ca^{2+} *in vivo* mediante microscopía de dos fotones ha mostrado que las neuronas más cercanas a placas amiloides en cerebros de ratones transgénicos modelo de EA mostraban hiperexcitabilidad y aumento de oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ comparado con aquellas neuronas más alejadas de las placas. La sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol era diez veces mayor que en los ratones no-transgénicos y los efectos eran inversamente proporcional a la distancia a las placas (Kuchibhotla *et al.*, 2008). Esta hiperexcitabilidad puede conducir a pérdida de la compartimentalización de la señal de Ca^{2+} , cambios morfológicos, disrupción de los circuitos neuronales y muerte celular (Busche *et al.*, 2008; Kuchibhotla *et al.*, 2008).

Como se menciona arriba existe una gran controversia sobre cuál es el mecanismo por el que $\text{A}\beta$ produce una alteración del Ca^{2+} intracelular. Como ya se ha dicho, el péptido $\text{A}\beta$ no es una única forma



química estable, sino que puede presentar distintos estados de agregación incluyendo monómeros, pequeños oligómeros solubles o las grandes fibrillas que forman las placas amiloides. Así, se ha propuesto que los mecanismos de neurotoxicidad de las distintas formas de A β podrían ser diferentes para cada estado de agregación (Deshpande *et al.*, 2006). Se han realizado estudios con distintas formas del péptido amiloide, y se ha propuesto que determinadas conformaciones de A β inducen alteraciones de los niveles de Ca²⁺ sólo en tipos celulares determinados (Fraser *et al.*, 1997). Por ejemplo se ha propuesto que A β sería activo en astrocitos pero no en neuronas (Abramov *et al.*, 2004). Esta controversia puede ser debida a la conformación de A β utilizada o a los pasos de disolución para conseguir una conformación determinada del amiloide. Así, el fragmento de 40 aminoácidos A β ₁₋₄₀ fue inicialmente muy utilizado en el estudio de alteraciones de Ca²⁺ intracelular en modelos celulares que comprometían la viabilidad neuronal (Arispe *et al.*, 1994; Goodman y Mattson, 1994; Hartmann *et al.*, 1993). Con el fragmento tóxico no fisiológico A β ₂₅₋₃₅ se han reproducido muchos de los efectos tóxicos del péptido amiloide, entre ellos las alteraciones en el Ca²⁺ citosólico que conducirán a la degeneración celular por diferentes vías apoptóticas o de excitotoxicidad (Mattson *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2004; Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Una vez que se vio que, aunque la forma de 40 aminoácidos era la más abundante en cerebros normales, era el A β de 42 aminoácidos la forma mayoritaria en la EA se empezó a utilizar esta forma para los estudios de neurotoxicidad (Janciauskiene *et al.*, 1999).



Un gran número de evidencias y estudios en modelos de Alzheimer han identificado la disrupción de la señal de Ca^{2+} neuronal como un factor temprano en la EA, ocurriendo esta disrupción antes del desarrollo de las placas y ovillos neurofibrilares cuyo componente principal es la forma fibrilar del $\text{A}\beta_{1-42}$ (Sanz-Blasco *et al.*, 2008). De hecho, ya años antes se había planteado que el $\text{A}\beta_{1-42}$ se auto-asociaba en oligómeros más tóxicos que la forma fibrilar (Lambert *et al.*, 1998).

7.1 Entrada de Ca^{2+} Inducida por $\text{A}\beta$.

Existe una gran controversia sobre cuál es el mecanismo por el que los oligómeros de $\text{A}\beta$ inducen entrada de Ca^{2+} . Como se ha comentado anteriormente se han propuesto algunos mecanismos incluyendo la formación de canales amiloides (Arispe *et al.*, 1993), la permeabilización inespecífica de la membrana (Demuro *et al.*, 2005; Glabe, 2005) y la activación de canales de Ca^{2+} , incluyendo la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Klein *et al.*, 2007). Así, según estos autores, el péptido $\text{A}\beta$ aumentaría el flujo de Ca^{2+} cuando el neurotransmisor glutamato activa el receptor NMDA (Pellistri *et al.*, 2008) y este efecto sería inhibido por Memantina, un antagonista de baja afinidad y no competitivo de este tipo de receptor (De Felice *et al.*, 2007) (**Fig. 21**).

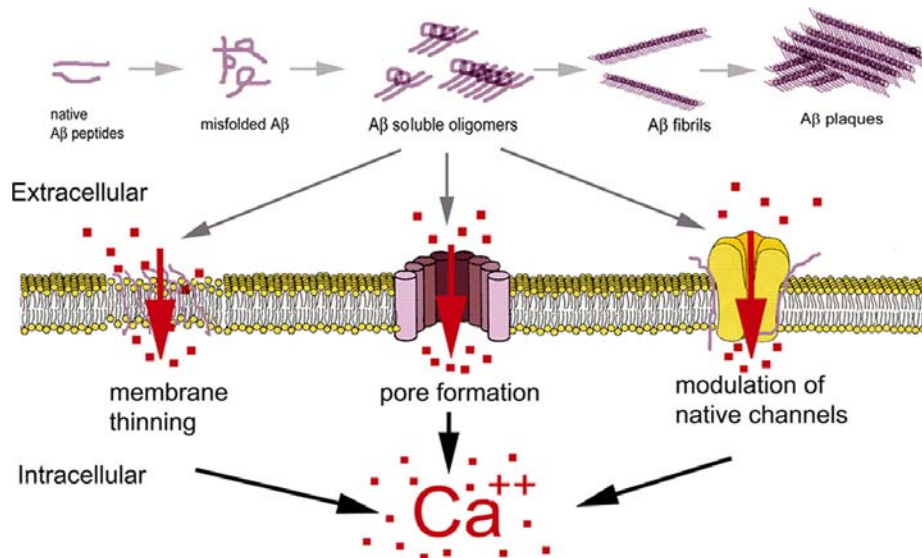
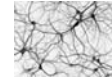
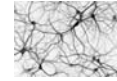


Figura 21. Modelo esquemático de la agregación del péptido amiloide y esquema de los mecanismos de toxicidad de los oligómeros solubles. Los agregados formados por 2-50 monómeros son considerados la forma más tóxica. Los mecanismos de entrada de calcio inducido por los oligómeros del péptido amiloide pueden ser, aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, formación de un canal o poro amiloide y modulación de diversos canales. Figura tomada de Demuro *et al.*, 2010.

7.1.1 Poro o canal amiloide.

En los años 90 se propuso un posible nexo entre el β -amiloide y la hipótesis del Ca^{2+} sugiriendo que la proteína podría formar canales en la membrana que permitían el flujo de cationes, como el Ca^{2+} , al interior de la célula. De esta forma, el A β podría formar estructuras tipo canal (Simakova y Arispe, 2006) catión-selectivas y permeables a Ca^{2+} (canales amiloides) en preparaciones de bicapas lipídicas (Arispe *et al.*, 1993; Kawahara y Kuroda, 2000) y en una variedad de líneas celulares como fibroblastos humanos, neuronas de hipotálamo (Kawahara *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000) e hipocampo (Sepúlveda *et*



al., 2010). Otros estudios más recientes del mismo grupo mostraron que A β (sin una conformación determinada) inducía entrada de Ca $^{2+}$ y muerte celular en las líneas neuronales GT1-7, PC12, y en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y corteza de rata. Ambos efectos eran inhibidos por una serie de péptidos diseñados ad-hoc para impedir la formación de los canales amiloides (Simakova and Arispe, 2006, Arispe *et al.*, 2007) incluyendo el péptido NA7. Otros autores han mostrado también que el péptido amiloide, al igual que otras proteínas que producen agregados insolubles y depósitos similares en otros tejidos, es capaz de formar poros o canales en membranas artificiales (Quist *et al.*, 2005). La **Fig. 22** muestra los diversos péptidos bloqueantes formados a partir de la propia secuencia del péptido amiloide.

7.2 Ca $^{2+}$ y Presenilinas.

Aparte de los posibles cambios en la homeostasis del Ca $^{2+}$ intracelular derivados del exceso de metabolismo de APP en la enfermedad de Alzheimer se conocen otras posibles alteraciones en formas familiares de la enfermedad, casi todas ellas asociadas a mutaciones en presenilinas. Las presenilinas son proteínas transmembrana que forman parte del complejo de la γ -secretasa. En la enfermedad de Alzheimer familiar, mutaciones en las presenilinas, proteínas que forman parte del complejo con actividad secretasas implicada en la ruptura del A β , llevan a una dis-homeostasis del Ca $^{2+}$ que conlleva generalmente un aumento del Ca $^{2+}$ almacenado en el retículo endoplasmático, lo que induce una mayor liberación de Ca $^{2+}$ tras la estimulación celular (LaFerla, 2002), aunque esta conclusión es todavía controvertida.

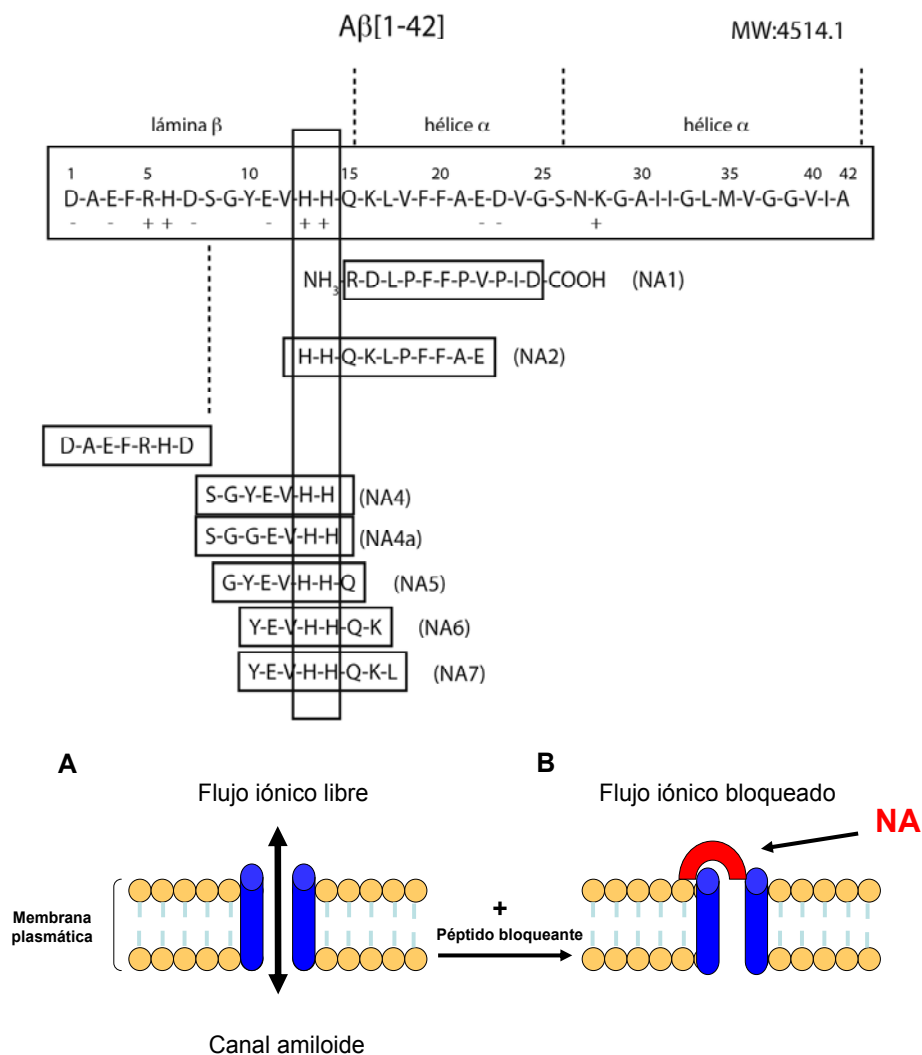
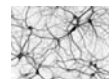
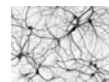
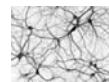


Figura 22. Secuencias del péptido A β ₁₋₄₂ y de los péptidos bloqueantes del canal amiloide. Modelo de su mecanismo de acción. En el panel superior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido A β ₁₋₄₂. Debajo se representan las secuencias de diferentes péptidos bloqueantes propuestos por Arispe. El cuadro vertical señala los dos residuos de histidina comunes con el A β ₁₋₄₂ en 6 de los péptidos. Debajo se muestra un modelo esquemático del mecanismo de acción del péptido bloqueante. **A.** Canal formado por el péptido A β ₁₋₄₂ en la membrana plasmática que permite el flujo libre de iones. **B.** El péptido bloqueante se une al poro interactuando con las regiones complementarias del A β ₁₋₄₂, bloqueando el flujo libre de iones. Modificado de Arispe, 2004.



Existen varias hipótesis para explicar la remodelación de Ca^{2+} en el RE: 1) en primer lugar se ha propuesto que las presenilinas podrían actuar como canales de Ca^{2+} tipo “*leak*” que permiten el flujo pasivo de Ca^{2+} desde el RE al citosol (Bezprozvanny y Mattson, 2008; Tu *et al.*, 2006). Otros autores defienden que las mutaciones en presenilinas alteran la homeostasis de Ca^{2+} de forma diferente. Así, se ha propuesto que las PS podrían regular la entrada capacitativa de Ca^{2+} de una forma independiente de la γ -secretasa (Akbari *et al.*, 2004). También se ha propuesto que las mutaciones en presenilinas conducen a cambios en la expresión de canales de Ca^{2+} asociados a endomembranas incluyendo el receptor de IP_3 y el receptor de rianodina (Chan *et al.*, 2000; Leissring *et al.*, 1999).

Por otra parte es conocido que $\text{A}\beta_{1-42}$ aumenta la expresión del RyR en los ratones mutados en APP, lo que sugiere un nexo crítico entre la disregulación del Ca^{2+} específica del RE y las mutaciones relacionadas con la EA. Recientemente, Foskett ha propuesto que las presenilinas no formarían un canal de Ca^{2+} en el RE, sino que se unirían al receptor de IP_3 modulando su actividad como canal intracelular de Ca^{2+} . En las formas mutadas la interacción con IP_3R resultaría en una mayor liberación de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación con agonistas (Cheung *et al.*, 2008; Stutzmann *et al.*, 2004). Además se ha propuesto una relación entre la capacidad de las PS de regular la actividad del Ins_3PR y su actividad como secretasas, ya que el procesamiento de la APP podría aumentar con elevaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Buxbaum *et al.*, 1994) y disminuir por una inhibición de la liberación de Ca^{2+} desde el RE (Buxbaum *et al.*, 1994). Es importante resaltar que el procesamiento de APP es dependiente del InsP_3R , ya



que la producción de A β disminuye sustancialmente en líneas deficientes en este receptor (Cheung *et al.*, 2008).

Otra posible diana de las presenilinas podrían ser las bombas tipo SERCA ya que se ha descrito que para el funcionamiento normal de estas bombas son necesarias las presenilinas. Así mutaciones en estas proteínas afectarían al funcionamiento de las SERCA, y por tanto a la acumulación de Ca²⁺ al interior del RE. Las células a las que se les ha retirado las PS tienen un comportamiento similar a la inhibición de la actividad de las bombas SERCA (Green *et al.*, 2008). Por otra parte, la sobreexpresión de PS acelera la captación de Ca²⁺ al RE, un efecto bloqueado por la inhibición farmacológica de SERCA, lo que sugiere que las PS modulan la función de las bombas tipo SERCA.

Por tanto los datos anteriores sugieren que las PS modulan la actividad de los sistemas de transporte de Ca²⁺ del RE, llevando a un aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular que, a su vez, es determinante en la producción de A β (Bird *et al.*, 1989) (**Fig. 23**). En resumen, numerosas evidencias sugieren que la alteración de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular podría ser un elemento esencial, incluso primario en la etiología de la Enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto el estudio de los distintos aspectos alterados del Ca²⁺ intracelular podría ser esencial para conocer la etiología de la enfermedad y así poder desarrollar nuevas terapias verdaderamente eficaces.

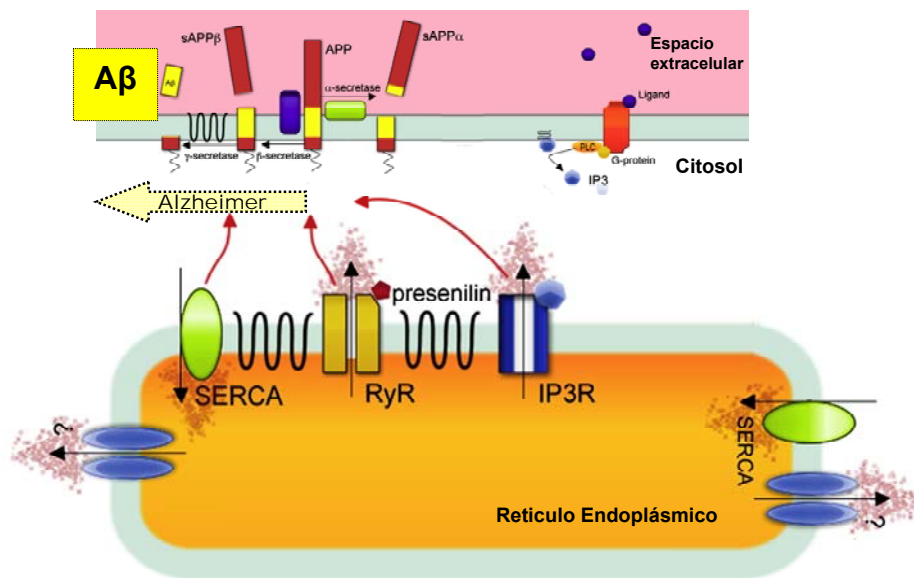
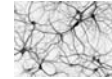
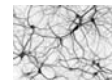


Figura 23. Modelo de las vías de regulación de calcio en células neuronales con mutaciones en APP o en PS. Las PS se localizan en el RE, pero también en la membrana plasmática. Tanto las PS normales como las mutadas asociadas con la EA familiar aumentan la liberación de Ca²⁺ mediada por el IP₃R, así como modulan la actividad del RyR y de las bombas tipo SERCA. Además, las PS mutadas podrían actuar como canales de Ca²⁺ tipo "leak" en el RE. Según el modelo, el aumento de Ca²⁺ en el citosol desde el RE se asocia con un aumento en la producción de A β . Dibujo modificado de Green y LaFerla, 2008.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

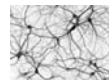
Los obstáculos son esas cosas espantosas que ves cuando apartas los ojos de tu meta.

Henry Ford



La neurodegeneración característica de la Enfermedad de Alzheimer está causada por la disfunción y muerte neuronal asociada a la formación de placas amiloides cuyo componente fundamental es el péptido amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$). Hemos descrito que los oligómeros del péptido amiloide inducen entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y muerte neuronal por apoptosis en granos de cerebelo en cultivo primario (Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Estos oligómeros también inducen entrada de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo de rata neonatal por un mecanismo o vía desconocido. Diversos estudios posteriores han confirmado estos hallazgos y han propuesto que los efectos de los oligómeros son debidos completamente al receptor tipo NMDA. Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido que los efectos descritos podrían ser un artefacto del medio de oligomerización del péptido que contiene trazas de glutamato.

El objetivo general de este trabajo es determinar el efecto agudo de los oligómeros del péptido amiloide sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular y, en su caso, identificar la/s vía/s de entrada de Ca^{2+} activada/s por ellos. Por tanto, la hipótesis de partida es que los oligómeros del péptido amiloide serían capaces de formar y/o activar canales amiloides capaces de reclutar al receptor/canal NMDA. La respuesta a los oligómeros podría verse fuertemente influenciada por la capacidad de las neuronas en cultivo de formar circuitos o redes neuronales que podrían amplificar la respuesta primaria.

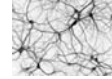


Por tanto, para alcanzar el objetivo general anterior nos planteamos abordar los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de un protocolo válido de oligomerización y testado los efectos de los oligómeros del péptido amiloide sobre calcio citosólico, calcio mitocondrial y muerte neuronal en granos de cerebelo y neuronas de hipocampo de rata neonatal.
2. Estudiar la contribución de la formación de redes o circuitos neuronales a la respuesta a los oligómeros del péptido amiloide.
3. Determinar si el receptor NMDA es necesario y suficiente para la entrada de Ca^{2+} inducida por oligómeros del péptido amiloide.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

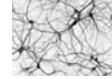
Si no puedo dibujarlo, es que no lo entiendo.
Albert Einstein



1. Métodos Experimentales.

1.1 Cultivos Neuronales.

Las **neuronas de hipocampo** se extrajeron de ratas Wistar el mismo día de su nacimiento (día 0) sacrificadas por decapitación siguiendo el protocolo de Brewer (Brewer *et al.*, 1993) con las modificaciones introducidas por Pérez-Otaño (Pérez-Otaño *et al.*, 2006) en condiciones de esterilidad. Tras la extracción del cerebro (**Fig. 24**) se realizó un corte diagonal con el bisturí entre la corteza y el mesencéfalo y se transfirieron las dos partes seccionadas a una placa *Petri* con medio HAM'S F12. Se retiraron las meninges con ayuda de una lupa separando el hipocampo de la corteza. El tejido se troceó e incubó durante 30 min en medio con papaína (20 u/ml) a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂. A los 15 min de la incubación se añadió DNasa I (50 µg/ml). Seguidamente se lavó varias veces con medio Neurobasal y el tejido fue disociado primero con una pipeta de 5 ml y luego con una pipeta Pasteur silanizada hasta obtener una suspensión de células. Entonces la suspensión celular fue centrifugada a 200 g durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 900 µl de medio Neurobasal suplementado con 100 µl de suero de caballo (HS). Las células se sembraron a una densidad de 70-90 x 10³ células/ml sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro tratados previamente con poli-D-lisina y se cultivaron en medio Neurobasal suplementado con L-glutamina (2 mM), gentamicina (1 µg/ml), B27 y 10% de FBS, y se mantuvieron en una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Los experimentos se realizaron entre 1 y 8 días *in vitro* (DIV).



Los **granos de cerebelo** se extrajeron de ratas Wistar neonatas (4-7 días) sacrificadas por decapitación. Las células se prepararon en condiciones de esterilidad de forma similar a la descrita anteriormente (Núñez *et al.*, 1996). Se abrió el cráneo y el cerebro fue trasladado a una placa *Petri* con medio HAM'S F12 para extraer el cerebelo. Se eliminaron las meninges y se transfirió el tejido a una placa con medio de Hank carente de Ca^{2+} o Mg^{2+} a 4 °C. El cerebelo se cortó en pequeños trozos de unos 2 mm que se digirieron con dispasa II (5 mg/ml) en el baño durante 30 min a 37 °C. Seguidamente el tejido se disgregó utilizando una pipeta Pasteur silanizada y se dejó reposar para que los restos de tejido decantasen. El sobrenadante se llevó a un tubo con unos 7 ml de medio DMEM conteniendo 4.5 g/l glucosa. La suspensión celular se centrifugó a 200 g durante 7 minutos y el sedimento en y 900 μl de medio suplementado con 100 μl de suero de caballo. La suspensión celular se volvió a centrifugar, resuspendiéndose las células finalmente en el medio con suero. Las células se sembraron en forma de gotas de 50 μl a una densidad de 10×10^5 células/ml sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro tratados previamente con poli-L-lisina (0,01 mg/ml). Las neuronas se mantuvieron en incubador a 37 °C en una atmósfera al 10% de CO_2 . El medio de cultivo utilizado fue el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4500 mg/ml de glucosa, 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 5% de Suero de Caballo (HS), y una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 μg /ml). Tras 24 h, el medio fue sustituido por medio Sato (Bottenstein y Sato, 1979) con un 5 % de HS para evitar una proliferación excesiva de las glías (Núñez *et al.*, 1996). Los experimentos se realizaron tras 1 u 8 días in vitro (DIV).

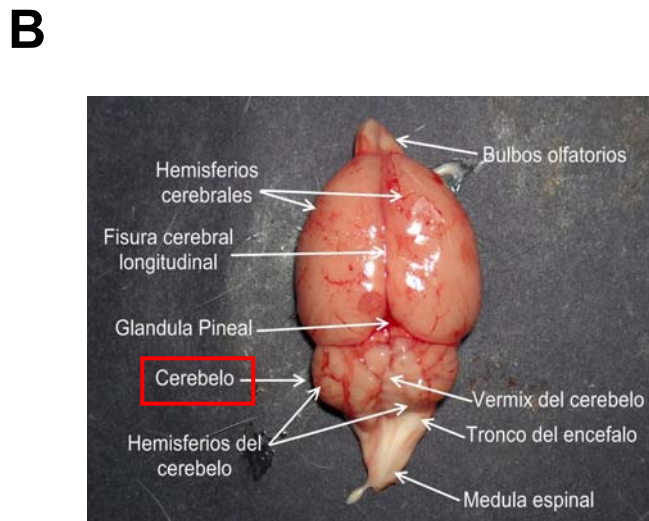
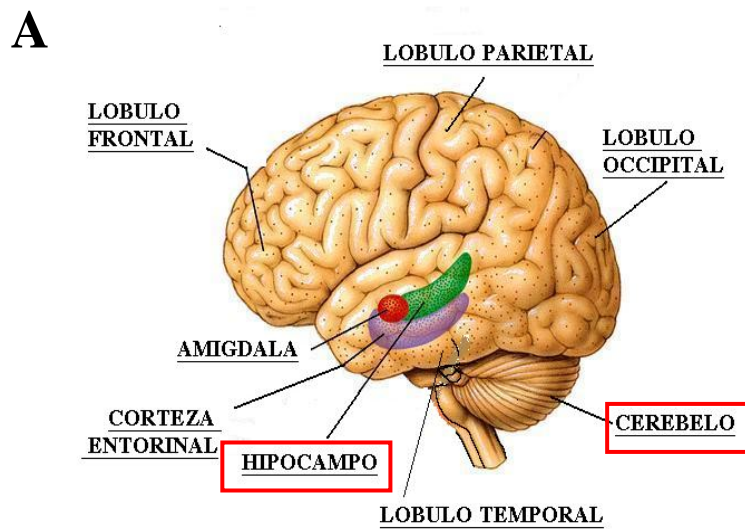
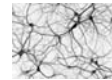
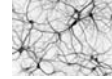


Figura 24. Anatomía del cerebro humano y de rata. A, se distinguen entre otros la localización del hipocampo y del cerebelo en el cerebro humano, cuya anatomía es similar a la del cerebro de rata. **B,** Vista dorsal del cerebro de rata. Figuras modificadas de Felix Larocca, 2009 y Grupo Anatomía Bioterio - FCV UBA respectivamente.



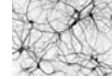
1.2 Otros Cultivos Celulares.

Las **células HEK293** (ATCC CRL-1573), células embrionarias de riñón humano, se cultivaron en medio DMEM con 1000 mg/ml de glucosa, 10 % de FBS, y una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml) sembradas a una densidad de 2×10^4 células/ml y se incubaron a 37 °C al 10 % de CO₂ 24 h antes de los experimentos.

Las **células Jurkat** (ATCC TIB-152) fueron donadas por la Dra. Yolanda Bayón (IBGM-CSIC, Valladolid). Las células procedentes de una leucemia linfocítica (células T tumorales) humana se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2 mM), una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml), FBS (2,5%) y HS (15%). Las células se incubaron en una atmósfera a 37 °C al 5 % de CO₂ y se sembraron en cubreobjetos de cristal pre-tratados con fibronectina (20 µg/ml) a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células por pocillo unas 5 h antes de los experimentos.

Las **células HT29** (ATCC HTB-38) fueron donadas por el Dr. JC Fernández-Checa (IDIBAPS-CSIC, Barcelona). Son células de carcinoma de colon humano y se cultivaron en medio DMEM con 1000 mg/ml de glucosa, 10% de FBS, y una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml) se sembraron a una densidad de 2×10^4 células por pocillo y se incubaron a 37°C al 10% de CO₂ durante 24 h antes de los experimentos.

La línea inmortalizada de neuronas de hipotálamo de rata **GT1-7** donada por el Dr. Rafael Solís (Universidad de La Laguna, Tenerife) fue cultivada en medio DMEM con 4500 mg/ml de glucosa, 10% de FBS, 5% de HS y una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/ml) y

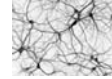


estreptomomicina (100 µg/ml). Las células se sembraron 24 horas antes del experimento en cubreobjetos de cristal de 12 mm pre-tratados con poli-L-lisina (Núñez *et al.*, 1998) a una densidad de 10^5 células/ml y se incubaron a 37°C al 10% de CO₂ al menos 24 h antes de su uso.

Finalmente utilizamos también el cultivo primario de **células adenohipofisarias** de rata neonata (5-7 días) obtenidas según el protocolo de Dobson y Brown (Dobson y Brown, 1985). Las células se sembraron a una densidad de $5-7 \times 10^5$ células/ml en cubreobjetos de cristal pretratados con poli-L-lisina (0.01 mg/ml). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera al 10 % de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue DMEM con 1000 mg/ml de glucosa y FBS al 10%. Las células se sembraron 24 h antes del experimento.

1.3 Preparación de los Oligómeros del Péptido Amiloide A β ₁₋₄₂.

La preparación del péptido amiloide requiere un protocolo complejo y específico. En este trabajo se han preparado los oligómeros utilizando diferentes protocolos y se ha diseñado un nuevo protocolo mediante la combinación de otros anteriores. Inicialmente los oligómeros se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Klein (Klein *et al.* 2002), un trabajo que ha sido citado en más de 2.000 publicaciones científicas. Posteriormente, se prepararon los oligómeros mediante un nuevo protocolo basado en los protocolos de Fa M y Ottavio Arancio 2010; Itkin A y Meagan L. Wisniewski *et al* 2011. La **Fig. 25** muestra esquemáticamente el protocolo de Klein. El A β ₁₋₄₂ liofilizado comercial se disolvió a una concentración de 1 mM en ácido hexafluoroisopropanoico (HFIP) en tubos de microcentrífuga no



silanzados. Seguidamente se dejó el tubo abierto toda la noche para permitir la evaporación del ácido. A continuación el tubo se llevó a una centrifuga de vacío (SpeedVac SPD111V) para su completa evaporación. El péptido se resuspendió en DMSO seco a una concentración de 5 mM y se procedió a la preparación de los oligómeros. Para ello, el péptido disuelto en DMSO se diluyó en medio DMEM F-12 sin rojo fenol hasta una concentración de 100 μ M, y se incubó durante 24 h a 4°C. La muestra se centrifugó entonces a 14.000 g (10 min, 4 °C) y se separó el sobrenadante (oligómeros) del precipitado (agregados insolubles), llevando el primero a un tubo estéril limpio. Los oligómeros se almacenaron a -20°C. Antes de su uso los oligómeros fueron tratados en sonicador de baño unos 5 min.

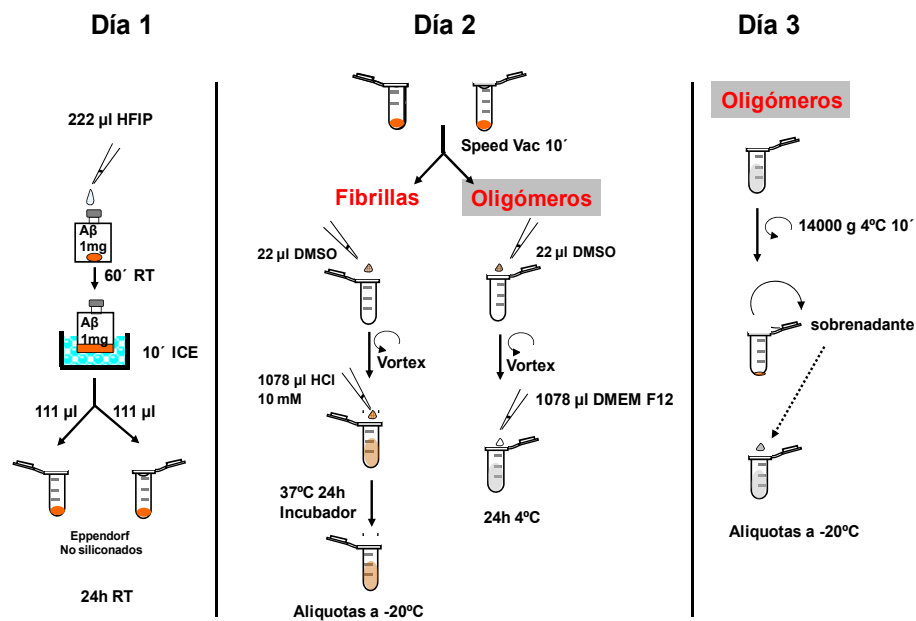
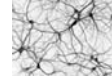


Figura 25. Protocolo de Klein de obtención de oligómeros. Esquema modificado de Dahlgren et al., 2002 y Klein W.L., 2002.

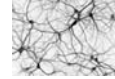


1.4 Western Blot.

Para confirmar la presencia de oligómeros se utilizó la técnica de Western Blot. Esta técnica se emplea para separar proteínas en base a su peso molecular. Se procede con la separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en un medio disociante. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF (bifluoruro de polivinilideno) e incubadas con una solución de anticuerpos específicos dirigidos a la proteína de interés. Por último se revela dicha reacción agregando un segundo anticuerpo ligado a una enzima reportera dando lugar una banda visible.

Se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) con gel de poliacrilamida al 15% como gel separador y al 3 % como gel concentrador como se indica en la siguiente tabla así como dodecil-sulfato sódico como tampón (SDS).

	Gel separador (15%)	Gel concentrador (3%)
PAA 30%	7,5 ml	0,5 ml
Separation gel buffer	5 ml	
Stacking gel buffer		1 ml
Agua bidestilada	2,25 ml	3,40 ml
TEME 10%	250 μ l	100 μ l
APS	100 μ l	30 μ l



Las proteínas sufren un tratamiento por agentes reductores que provocan la pérdida de la estructura secundaria manteniendo los polipéptidos en este estado desnaturalizado. Así, la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, y éstas pueden separarse únicamente en función de su tamaño. Se utilizó como anticuerpo primario anti- β amiloide (Clone W0-2) monoclonal de ratón y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (obtenido en cabra) conjugado con biotina a una dilución de 1:1000 y 1:5000, respectivamente. Para terminar se utilizó un cromógeno anti-Biotin-Peroxidasa. El revelado se llevó a cabo mediante un kit de revelado (Pierce ECL Western Blotting Substrate).

1.5 Imagen de Fluorescencia y Calcio Citosólico.

Las medidas de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico a nivel de célula única se realizaron mediante imagen de fluorescencia utilizando el colorante fluorescente fura-2. La molécula de fura-2 contiene restos aromáticos que ofrecen propiedades fluorescentes a este quelante de alta afinidad por Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} al colorante modifica el espectro de excitación del fura-2. La **Fig. 26** muestra los espectros de excitación del fura-2 con diferentes concentraciones de calcio. A medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} , aumenta la emisión de fluorescencia a 500 nm al excitar el fluoróforo con luz de 340 nm y disminuye la emisión de luz excitada a 380 nm. De este modo el cociente o ratio de las intensidades de luz emitidas al excitar a 340 y 380 nm aumenta considerablemente con la concentración de Ca^{2+} y hace las medidas independientes de la cantidad de colorante.

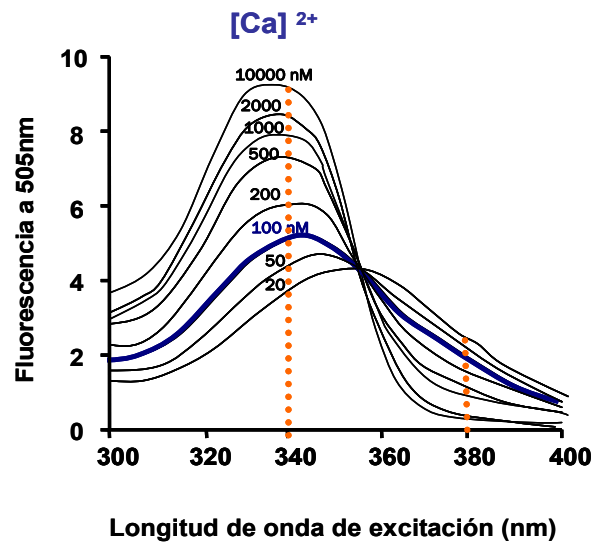
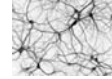
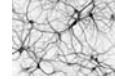


Figura 26. Espectro de excitación del fura-2 a distintas concentraciones de Ca^{2+} . La gráfica muestra la emisión de fluorescencia de fura-2 a 505 nm cuando se le excita con luz de longitudes de onda entre 300 y 400 nm. Las medidas se realizaron a 20 °C con Ca^{2+} libre a concentraciones entre 20 y 10.000 nM (10 μ M). Se observa cómo el máximo de emisión del complejo fura-2- Ca^{2+} sucede a 340 nm y el mínimo a 380 nm. En condiciones basales, la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ es aproximadamente 100 nM (línea azul). Al aumentar la $[Ca^{2+}]_{Cit}$, aumentará la fluorescencia a 340 nm y disminuirá a 380 nm. Modificado de Grynkiewicz et al., 1985.

El fura-2 es una molécula muy polar y, por tanto, incapaz de atravesar las membranas celulares. La internalización citosólica del colorante requiere la incubación de las células con el derivado penta-acetoximetil éster del fura-2 (fura-2/AM), que es hidrofóbico y atraviesa fácilmente la membrana celular. Éste es de-esterificado por esterasas intracelulares en el citosol, liberándose la molécula de fura-2 en su forma de ácido libre que, por presentar cuatro cargas negativas netas queda retenida en el interior celular. Una vez allí, el fura-2 puede ser excitado a diferentes longitudes de onda. El registro de la emisión de fluorescencia en tiempo real permite la monitorización continua, en células vivas, de la $[Ca^{2+}]_i$, estimada a partir



del cociente de las fluorescencias excitadas a 340 nM y a 380 nM. El procedimiento ofrece claras ventajas sobre otros colorantes basados en una única longitud de onda como Fluo3 ya que las estimaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ son independientes de la cantidad de colorante acumulado en el citosol y permite eliminar muchos artefactos, que habitualmente afectan de forma similar a las fluorescencias excitadas a las dos longitudes de onda (Tsien, 1988).

Para las medidas de fluorescencia, las células sembradas en cubreobjetos, se incubaron en medio con fura-2/AM 4 μ M durante 1 hora a T^a ambiente y en oscuridad total. La incubación se realizó en medio externo completo (MEC), compuesto por (en mM): NaCl, 145; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 1; Glucosa, 10; HEPES/NaOH, 10; pH 7,42. Después de la incubación, los cubreobjetos con las células se colocaron en el "Holder" (Warner Instruments) acoplado a la platina de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert S100 TV, **Fig. 27**). Las células se perfundieron constantemente con un sistema de perfusión (Warner Instruments) a 37 °C y fueron epi-iluminadas alternativamente con luz de longitudes de onda 340 y 380 nm (\pm 10 nm) mediante una rueda de filtros acoplada a la fuente de excitación. La fluorescencia emitida a longitudes de onda superiores a 520 nm fue desviada por un espejo dicróico y recogida a través de un objetivo 40x (Zeiss 40/1,30 oil) y una cámara digital (OrcaER de Hamamatsu Photonics) (**Fig. 27**). Las imágenes de fluorescencia fueron analizadas mediante el programa de análisis AquaCosmos 2.0 de Hamamatsu.

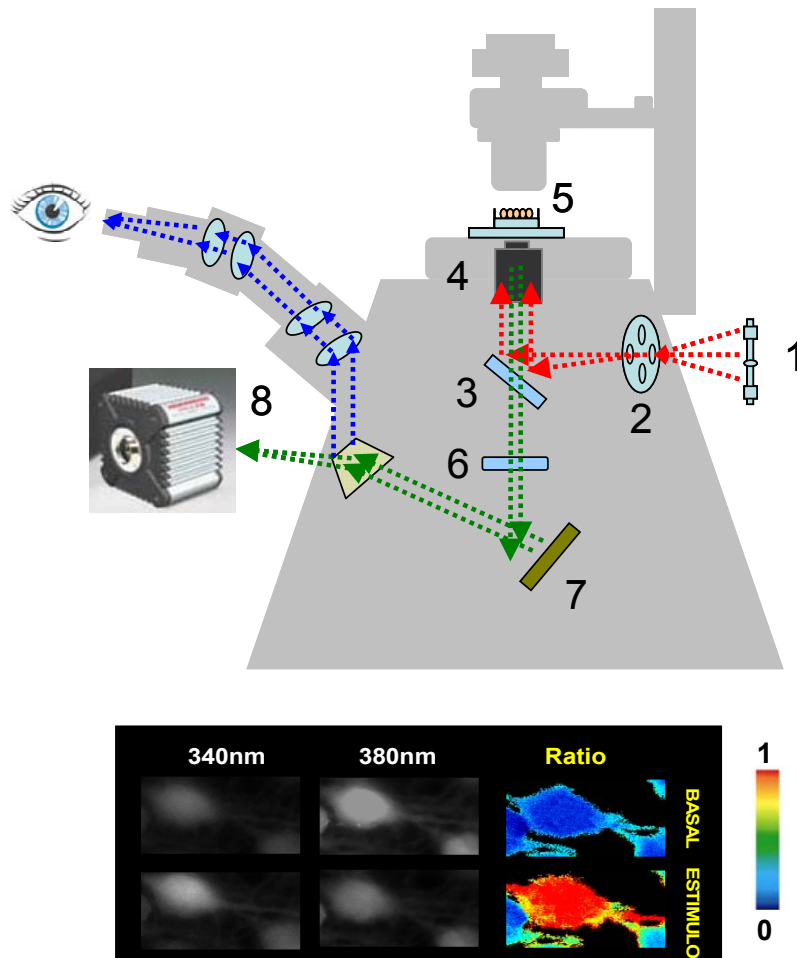
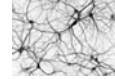
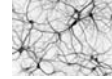


Figura 27. Imagen de calcio citosólico mediante microscopía de fluorescencia.

El esquema muestra el equipo utilizado para los experimentos de imagen de fluorescencia. La lámpara de excitación (1) emite la luz que atraviesa la rueda de filtros de excitación (2). El espejo dicróico (3) desvía la luz ultravioleta (340 y 380 nm) hacia el objetivo de inmersión 40X (4) (Zeiss 40/1.30 oil) y la muestra de células (5). La emisión de fluorescencia ($\lambda = 520$ nm) atraviesa el dicróico (5) y es dirigida por diferentes lentes (6,7) para su captura por la cámara digital (capturadas por una cámara digital de alta sensibilidad (8)). Finalmente un ordenador procesará las imágenes. Debajo del esquema se muestran imágenes típicas de la fluorescencia excitadas a 340 y 380 nm de neuronas cargadas con fura2/AM, así como el valor del cociente de las F_{340}/F_{380} codificado en pseudocolor en situación de reposo (fila de imágenes superior) y tras la estimulación (fila inferior). La escala de pseudocolor bajo las imágenes muestra el código de colores para las distintas $[Ca^{2+}]_{Cit}$ de 0 (azul) a 2 μM (rojo). Obsérvese que la estimulación aumenta la fluorescencia excitada a 340 nm y disminuye la emisión de fluorescencia excitada a 380 nm.



El registro de fluorescencia en tiempo real permite la monitorización continua de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en las células vivas. La unión entre el Ca^{2+} y el fura-2 tiene una estequiometría 1:1, de modo que se puede derivar la siguiente ecuación de la ley de acción de masas (Grynkiewicz et al., 1985).

$$[Ca^{2+}]_{libre} = K_d (F - F_{mín}) / (F_{máx} - F)$$

Donde:

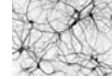
- K_d , es la constante de disociación del complejo fura-2- Ca^{2+} . Así, la K_d para el fura-2 es 0,14-0,22 μM (Molecular Probes).
- F , es la fluorescencia emitida a una $[Ca^{2+}]$ dada en cada punto.
- $F_{máx}$, es la fluorescencia emitida en condiciones de saturación del colorante (con alta concentración de Ca^{2+} en el medio).
- $F_{mín}$, es la fluorescencia emitida del indicador en ausencia total de Ca^{2+} .

Al aplicar esta ecuación a la fluorescencia emitida cuando se excita a las dos longitudes de onda de interés, 340 nm y 380 nm, y realizar el cociente entre ambas puede derivarse la siguiente expresión:

$$[Ca^{2+}]_{libre} = K_d \beta (R - R_{mín}) / (R_{máx} - R);$$

Donde:

- R , es el cociente (ratio) de las fluorescencias obtenidas al excitar a 340 y 380 nm para una determinada $[Ca^{2+}]_{Cit}$, aumentando la fluorescencia cuando el fluoróforo saturado con Ca^{2+} se excita a una longitud de onda de 340 nm y disminuyendo en ausencia de Ca^{2+} cuando se excita a una longitud de onda de 380 nm.

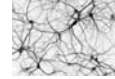


- $R_{\text{máx}}$ es el cociente de ambas fluorescencias cuando el colorante está saturado de Ca^{2+} .
- $R_{\text{mín}}$ representa dicho cociente en ausencia total de Ca^{2+} .
- β es el cociente $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$ a 380 nm.

Sabiendo que el valor de la K_d es de 224 nM a 37 °C y 135 nM a 22 °C (Grynkiewicz et al., 1985), la ecuación permite calcular la $[\text{Ca}^{2+}]$ a partir del valor de R. Los valores de $R_{\text{máx}}$, $R_{\text{mín}}$ y β pueden determinarse experimentalmente a partir de una solución de fura-2 ácido realizando dos lecturas, una en ausencia total de Ca^{2+} y otra en presencia de un exceso del mismo. En algunos experimentos se muestran incrementos del cociente de fluorescencias que eliminan la posible interferencia de la calibración. En muchos experimentos se observa que hay células que responden a los estímulos con incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ mientras que otras células no responden. Para el análisis cuantitativo de estos experimentos se calculó la fracción de células que responden (tanto por uno), el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de las células que responden y, para tener en un único parámetro el incremento de todas las células, calculamos el producto de este incremento por la fracción de células que responden, un parámetro que denominamos factor de activación.

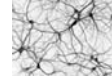
1.6 Inmunocitoquímica.

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten identificar diferentes antígenos en células y tejidos si se dispone de anticuerpos específicos y si la unión del anticuerpo con su antígeno puede ser detectada mediante alguna técnica de revelado. Los cultivos primarios de células de cerebelo e hipocampo contienen dos tipos de células: neuronas y células de la glía o glías. Por ello, se utilizó un procedimiento que permite identificar por inmunocitoquímica el tipo celular tras los



experimentos de imagen de Ca^{2+} intracelular. De esta forma, se puede correlacionar las respuestas obtenidas en cada célula con su naturaleza fenotípica (Núñez *et al.*, 1996). Para identificar los dos tipos de células se realizó una doble inmunocitoquímica en las mismas células en las que se llevó a cabo la imagen de Ca^{2+} intracelular (**Fig. 28**). Para identificar las neuronas se utilizó como anticuerpo primario anti- β -tubulina III de ratón, que se une a una proteína del citoesqueleto específica de las neuronas. Como anticuerpo secundario se utilizó α -FITC de ratón que emite fluorescencia verde. Para la identificación de las glías se utilizó anti-proteína fibrilar ácida de la glía de conejo (α -GFAP), como anticuerpo primario y anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 como anticuerpo secundario que emite fluorescencia roja.

Para realizar los experimentos mixtos de análisis de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a nivel de célula única seguido de la identificación inmunocitoquímica de las células presentes en el campo microscópico, las células se sembraron en cristales de 12 mm tratados con poli-D-lisina. Una vez realizado el experimento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se fijan las células con paraformaldehído (PFA) al 4% en solución tampón fosfato (PBS) durante 10 min sin mover el campo microscópico. Seguidamente se utiliza el sistema de perfusión para lavar muy extensa y muy rápidamente las células con MEC durante 15 min. A continuación se añade Tritón 1X al 0.1% y se incuba durante 5 min antes de volver a lavar profusamente con MEC. Entonces las células fijadas son incubadas con suero de cabra al 20% para saturar los sitios inespecíficos durante 10 minutos tras los cuales se retira el medio pero no se lava el preparado. Posteriormente se añaden los dos anticuerpos primarios en medio con suero de cabra al 10% a una dilución 1:300 y se incuban durante 45 minutos *in situ*. A continuación



se vuelve a lavar la preparación profusamente con MEC y se incuba con los anticuerpos secundarios (1:100) durante otros 45 min. Finalmente se añade Dapi (1:5000, 5 min) en suero de cabra al 10% durante 5 min para teñir todos los núcleos de las células. La **Tabla 4** muestra los anticuerpos y diluciones utilizados para la realización del Western Blot. Finalmente, se lava con MEC y se capturan las imágenes de fluorescencia utilizando los sets de filtros verde (β -tubulina), rojo (GFAP) y UV (Dapi) (**Fig. 28**).

<i>Tipo celular</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Dilución</i>
Neurona	Anticuerpo primario	Ratón anti β -Tubulina III	1:300
	Anticuerpo secundario	Ratón FITC	1:300
Glía	Anticuerpo primario	Conejo anti GFAP	1:100
	Anticuerpo secundario	Conejo Alexa flúor 594 rojo	1:100

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la realización del Western Blot.

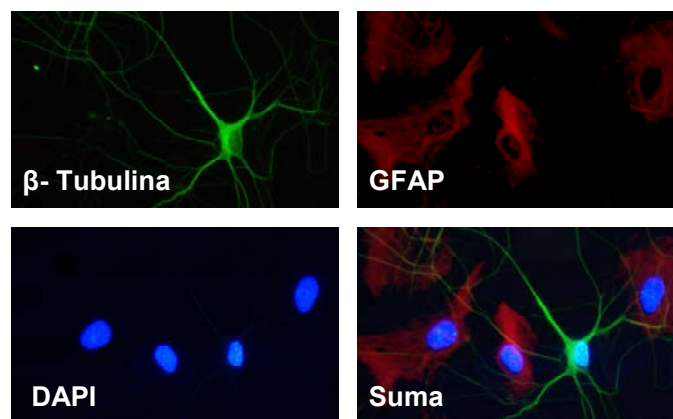
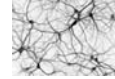


Figura 28. Doble inmunocitoquímica. Imagen de una doble inmunocitoquímica en un cultivo mixto de neuronas de hipocampo y glías a 7 días de cultivo in vitro (7 DIV).



1.7 Imagen de Bioluminiscencia y Calcio Mitochondrial.

Para monitorizar los niveles de la $[Ca^{2+}]$ en orgánulos subcelulares como la mitocondria se necesitan sondas de Ca^{2+} basadas en proteínas susceptibles de ser dirigidas específicamente al orgánulo a estudiar. Para ello, utilizamos la proteína aecuorina (AEQ) dirigida a la mitocondria (**Fig. 29**).

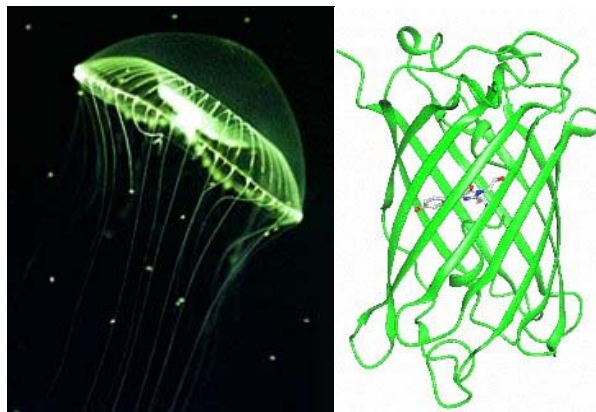
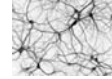


Figura 29. Medusa *Aequorea victoria* y estructura de la proteína fluorescente verde (CGP) obtenida de dicha medusa. Imagen obtenida de Ludin, Beat, and Andrew Matus. *Gfp In Motion*. [Oxford]: Elsevier, 1999.

La AEQ es una fotoproteína que se obtiene de la medusa *Aequorea victoria* capaz de emitir luz azul en presencia de Ca^{2+} sin necesidad de ser iluminada, un fenómeno denominado bioluminiscencia. AEQ presenta tres dominios de unión a Ca^{2+} (Shimomura *et al.*, 1962; Shimomura, 1995). Gracias al aislamiento y purificación de la AEQ y su microinyección en células vivas la AEQ ha sido utilizada durante décadas como indicador de la $[Ca^{2+}]$ en células intactas (Blinks *et al.*, 1978; Cobbold, 1980; Ridgway y Ashley, 1967).



La clonación de AEQ y su fusión a secuencias de direccionalidad hacia distintos compartimentos subcelulares permitieron la monitorización de la $[Ca^{2+}]$ en distintos orgánulos incluyendo el núcleo (Brini *et al.*, 1993), la mitocondria (Rizzuto *et al.*, 1992), el propio citosol (Badminton *et al.*, 1996) y el retículo endoplásmico (Badminton *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1995). Cuando AEQ se une a Ca^{2+} emite una luz siempre que la proteína esté reconstituida en su forma activa. Durante la reconstitución, la apoaeuorina expresada en las células se une a la celenterazina que actúa de cofactor. La celenterazina es capaz de atravesar las membranas celulares con facilidad gracias a sus propiedades lipofílicas (Blinks *et al.*, 1976). Cuando AEQ es reconstituida emite una luz azul en el rango visible ($\lambda_{max} = 465 \text{ nm}$) en función de la $[Ca^{2+}]$. Durante este proceso se genera un producto intramolecular formado por el complejo apoaeuorina, celenteramida y CO_2 (Fig. 30).

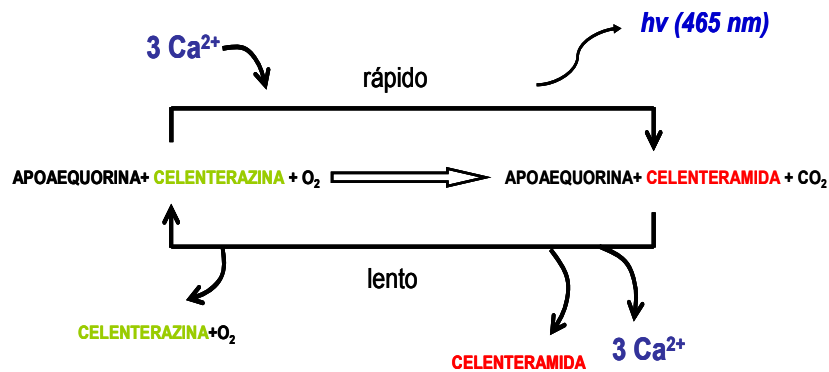
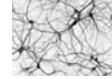
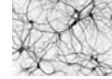


Figura 30. Reacción bioluminiscente de la aequorina. La AEQ es reconstituída en aequorina original por incubación con celenterazina. En presencia de O_2 los iones de Ca^{2+} se unen a la aequorina reconstituída provocando la oxidación de celenterazina a celenteramida, la formación de apoaeuorina, acompañada por la generación de CO_2 y la emisión de luz bioluminiscente azul ($\lambda=465\text{nm}$).



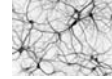
Una vez oxidada la celenterazina a celenteramida, la unión de la apoaeuorina a una nueva molécula de celenterazina es lenta, por lo que el proceso puede considerarse irreversible. La cantidad de sonda activa disponible para la medida de Ca^{2+} , disminuye progresivamente a lo largo de cada experimento, siendo la velocidad relativa de consumo, proporcional a la concentración de Ca^{2+} . Con la AEQ nativa seríamos capaces de medir concentraciones de Ca^{2+} comprendidas entre 0,1 y 10 μM (Blinks *et al.*, 1978). La velocidad de consumo en presencia de concentraciones de Ca^{2+} elevadas es tan grande que toda la AEQ se consumiría en pocos segundos, siendo poco práctica su utilización como indicador en entornos con altas concentraciones de Ca^{2+} como puede ser, al menos transitoriamente la mitocondria. Para poder medir los niveles de cientos de μM que se podrían alcanzar en las mitocondrias (Montero *et al.*, 2000), es necesario reducir la afinidad por Ca^{2+} de la AEQ al menos dos órdenes de magnitud. Para ello, se utiliza una AEQ mutante de baja afinidad por el Ca^{2+} (mutAEQ) en la que está sustituido el residuo aspártico en posición 119 por alanina (Asp119-Ala) (Montero *et al.*, 1995). El uso de celenterazina reduce la velocidad de emisión de luminiscencia (Shimomura *et al.*, 1993) y amplía el rango de medida de $[\text{Ca}^{2+}]$ al nivel mM (Álvarez y Montero, 2002). El principal problema de la medida de Ca^{2+} mediante bioluminiscencia de AEQ es la baja emisión de luz comparada con la fluorescencia. Sin embargo el desarrollo de cámaras ultrasensibles ha permitido llevar a cabo la imagen de bioluminiscencia para la monitorización de Ca^{2+} subcelular a nivel de células individuales.

Para los experimentos de imagen de AEQ, las células fueron transfectadas con la sonda basada en AEQ. La expresión de la AEQ dirigida a mitocondria en neuronas de hipocampo se realizó por



transfección del plásmido con la proteína aecurina mutada de baja afinidad por Ca^{2+} a la que se le ha unido la proteína verde fluorescente GFP (GFP-mutAEQmit) (Baubet *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2005). La finalidad de utilizar un plásmido que contenga la proteína GFP unida a la proteína aecurina será identificar en el microscopio de fluorescencia las células transfectadas por el método descrito anteriormente, con el fin de elegir el campo adecuado en el que se realizará el experimento de medida de Ca^{2+} mitocondrial a nivel de célula única. Además, este plásmido con la GFP unida a la aecurina emitirá más fotones, por lo que facilitará la imagen de bioluminiscencia.

Las células transfectadas fueron incubadas en oscuridad durante 2 h en medio estándar MEC suplementado con $1 \mu\text{M}$ de celenteracina *n*, a temperatura ambiente. Una vez reconstituida la fotoproteína, los cubreobjetos con las células se colocaron en la platina de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert S100 TV). Las células se perfundieron continuamente con medio estándar precalentado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por un sistema de intercambio de calor (Warner Instruments) en presencia de los estímulos correspondientes. La velocidad de flujo de las soluciones de perfusión es aproximadamente de 4 ml/min y el tiempo necesario para el recambio del medio en la cámara de perfusión se ha estimado en unos pocos segundos. Al final de cada experimento se perfundió con digitonina $100 \mu\text{M}$ en MEC con 10 mM de Ca^{2+} . Las imágenes de bioluminiscencia se capturaron con una cámara contadora de fotones Hamamatsu VIM acoplada a un procesador de imagen Argus-20, y se integraron en periodos de 10 segundos. Los fotones emitidos por cada célula en cada imagen fueron cuantificados utilizando el software Aquacosmos 2.6 de Hamamatsu.

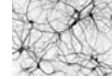


Los datos se cuantificaron como porcentaje de emisión de fotoluminiscencia entre las cuentas por segundo totales y se dividieron por el periodo de integración (L/L_{TOTAL} en s^{-1}). Los valores de emisión menores de 4 c.p.s. no fueron utilizados para los cálculos. Posteriormente un programa informático substraer el fondo (background) de los valores de luminiscencia en cada punto y los valores de emisión de fotones son convertidos en concentración de Ca^{2+} . Para ello se utilizó el algoritmo descrito por Brini (Brini *et al.*, 1995) basado en la relación existente entre la $[Ca^{2+}]$ y la proporción de luz (L) medida en cuentas por segundo (cps) registradas en un momento dado del experimento menos el fondo, frente a las que se registrarían si toda la AEQ de la célula se expusiera de repente a una $[Ca^{2+}]$ saturante ($L_{m\acute{a}x}$). Para transformar los valores del cociente $L/L_{m\acute{a}x}$ en valores de $[Ca^{2+}]$ se utilizó el siguiente algoritmo matemático:

$$[Ca^{2+}]_{(M)} = [(L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} + (L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} K_{TR} - 1] / [K_R - (L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} K_R]$$

Donde;

- K_{TR} , es la proporción de sitios en estado T frente al estado R. Cada uno de los sitios de unión al Ca^{2+} de la AEQ presenta estos dos estados: T y R. La emisión de bioluminiscencia se produce cuando todos los sitios de unión se encuentran en estado R, al cual se une el Ca^{2+} .
- K_R , es la constante de asociación a Ca^{2+} .
- n , es el número de sitios de unión a Ca^{2+} .
- λ , es la constante de velocidad de consumo de AEQ a la $[Ca^{2+}]$ saturante.

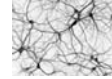


Tanto este algoritmo como los parámetros (K_{TR} , K_R , n y λ) derivan de un modelo matemático propuesto originalmente para explicar la dependencia de la luminiscencia de la AEQ respecto de la $[Ca^{2+}]$, aunque se puede utilizar como una simple transformación matemática independiente del modelo (Allen *et al.*, 1977).

1.8 Muerte celular.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada. Una forma de detectar apoptosis es por los cambios en la distribución de las proteínas de la membrana, glicoproteínas y fosfolípidos durante el proceso de apoptosis. La fosfatidilserina, localizada en células viables en la cara interna, se distribuye durante la apoptosis por la cara externa de la membrana. La Anexina V, que se utiliza conjugada a fluorocromos, es una proteína que se une a fosfolípidos de forma dependiente de calcio, con alta afinidad por la fosfatidilserina y que por tanto puede ser útil para detectar la fosfatidilserina externalizada, pudiendo así servir para estimar las células que han entrado en apoptosis.

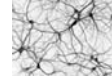
Para las medidas de apoptosis las neuronas de hipocampo fueron sembradas en cristales de 12 mm de diámetro, a una densidad de 35×10^3 células por cristal y se incubaron a $37^\circ C$ en una atmósfera con un 5 % CO_2 durante los días de cultivo deseados, en nuestro caso son 7-9 DIV. Una vez llegado el día de cultivo deseado los cristales con las neuronas sembradas se pasan a una placa Nunc nueva con medio libre Mg^{2+} (Mg0). Una vez lavados se pone el tratamiento, en esta caso oligómeros de $A\beta_{1-42}$ $2\mu M$ previamente preparados en medio Mg0, durante 1 h. Posteriormente los cristales son devueltos a las



placas Nunc originales donde está el medio original (Neurobasal) y se dejan en el incubador durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Al día siguiente se prepara la solución de Anexina V (5 µl de Anexina V por cada 100 µl de buffer de unión de la Anexina 1X). Este buffer de unión se prepara a partir del buffer de unión 10X Anexin V binding buffer: 0,1 M Hepes NaOH (pH 7,4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂.

Los cristales se lavan varias veces con tampón de unión (binding buffer) 1X para eliminar los restos de medio neurobasal. Tras el lavado las células se incuban con la solución de Anexina preparada durante 10 minutos. Pasado este tiempo las células se vuelven a lavar con el tampón de unión de Anexina 1X varias veces. Tras el lavado se capturan imágenes de campo brillantes y fluorescencia utilizando el mismo equipo de imagen descrito arriba. Para calcular el porcentaje de células en apoptosis se tienen en cuenta las células totales que se cuantifican con ayuda de la imagen de transmisión (células totales) y el número de células verdes (células apoptóticas) de la siguiente forma:

$$\% \text{ muerte (apoptosis)} = \frac{\text{Células verdes}}{\text{Células totales}} \times 100$$



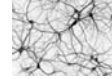
1.9 Transfección de neuronas y células HEK293.

Las neuronas de hipocampo fueron sembradas en cubreobjetos de cristal pretratados con poli-D-lisina a una densidad de 9×10^5 células/pocillo y se transfectaron con el reactivo Lipofectamine 2000 para expresar la sonda aequerina. La lipotransfección se realizó tras 6 días de cultivo (6 DIV). Las neuronas fueron tratadas con 4 μ l de lipofectamina y 3 μ g de ADN durante 90 min. Los experimentos se llevaron a cabo 24 h después de la transfección.

Las células HEK293 se sembraron un día antes de la transfección en cristales tratados con poli-L-lisina a una densidad de 2×10^4 células por cristal, de tal forma que cuando se transfecten estén entre un 50 y un 90 % de confluencia. Junto los plásmidos que expresan las diferentes subunidades del NMDA-R, las células se co-transfectan con un plásmido que expresa la proteína fluorescente verde GFP para poder identificar las células transfectadas mediante imagen de fluorescencia. Para realizar la transfección se utilizó *Lipofectamine 2000* según el protocolo recomendado por el fabricante. Las concentraciones de ADN utilizadas se describen en la **Tabla 5**:

	NR1	NR2A	NR2B	lipofectamina
NR1/ NR2A	1 μ g	3 μ g		3 μ l
NR1/ NR2B	1 μ g		4 μ g	3 μ l

Tabla 5. Concentraciones de DNA de las distintas subunidades del NMDA-R utilizadas para la transfección. Resumen de la cantidad de lipofectamina y de la concentración de DNA de las distintas subunidades del receptor NMDA necesarias para realizar la transfección en células HEK293.



1.10 Análisis estadístico y de datos.

Los datos mostrados provienen de, al menos, tres experimentos independientes. Se ha utilizado la *t de Student* para comparar medias de muestras pareadas o no. A la hora de comparar datos incluidos en dos o más grupos se ha utilizado el análisis de varianza ANOVA de dos vías y las medias obtenidas se han comparado utilizando el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas significativas. El análisis de los datos y la representación gráfica de los mismos se realizó con el programa ORIGIN 7.0.

2. Materiales y Reactivos.

Alomon labs

🐞 ω-Agatoxina

Bachem AG

🐞 Péptido A β ₁₋₄₂ trifluoroacetato

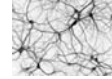
Beckton-Dickinson (BD)

🐞 Poli-D-Lisina

🐞 Anexina V

Bionova científica, S.I. GenScrip

🐞 Péptido NA7 (EVHHQKL)



Chemicon International

- 🐭 Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-A β ₁₋₄₂

Costar Corporation

- 🐭 Frascos de cultivo de 25 cm²

Covance

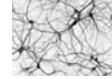
- 🐭 Anticuerpo primario monoclonal de ratón anti β -tubulina III
- 🐭 Anticuerpo secundario α -FITC de ratón

Invitrogen Corporation

- 🐭 Fura-2/AM
- 🐭 Lipofectamine[®] 2000
- 🐭 Coelenterazina
- 🐭 Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594

Gibco

- 🐭 Medio HBSS
- 🐭 Medio RPMI 1640
- 🐭 Medio Neurobasal
- 🐭 Suplemento B27
- 🐭 Suero bovino fetal (FBS)
- 🐭 Suero de caballo (HS)
- 🐭 Antibióticos: Penicilina, Estreptomina y Gentamicina
- 🐭 L-Glutamina
- 🐭 Gentamicina
- 🐭 Tripsina-EDTA



- ☛ Solución de tampón fosfato (PBS)
- ☛ DMEM F12 sin rojo fenol
- ☛ MEM

Lonza

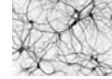
- ☛ Medio DMEM con glucosa 4500 mg/ml
- ☛ Medio DMEM con glucosa 1000 mg/ml

Merck

- ☛ Ácido acético
- ☛ Ácido clorhídrico
- ☛ Cloruro cálcico
- ☛ Cloruro de magnesio
- ☛ Cloruro potásico
- ☛ Hidróxido sódico
- ☛ Paraformaldehído
- ☛ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ☛ Dodecil sulfato sódico (SDS)
- ☛ Etanol absoluto
- ☛ Isopropanol
- ☛ Metanol
- ☛ Triton X-100
- ☛ Tris HCl

Millipore Corp.

- ☛ Filtros estériles de 0,22 μ m
- ☛ Conjugado anti biotina SP de cabra.
- ☛ Anti-Amiloide β , clon W0-2



Nunc (Labclinics)

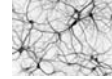
- ☞ Placas de cultivo de 4 pocillos
- ☞ Placas *petri*

Roche

- ☞ Dispasa II

Sigma Chemical Co.

- ☞ 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
- ☞ Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA)
- ☞ Putrescina
- ☞ Insulina
- ☞ Holo-transferrina
- ☞ Selenio
- ☞ Progesterona
- ☞ Tiroxina
- ☞ Tri-iodotironina
- ☞ ATP
- ☞ Fibronectina
- ☞ ADNasa I
- ☞ Poli-L-Lisina
- ☞ Paraformaldehído (PFA)
- ☞ Hepes
- ☞ Nifedipina
- ☞ MK-801
- ☞ Digitonina
- ☞ Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFAP



- 🐼 Anti-Biotina-Peroxidase producido en cabra
- 🐼 Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- 🐼 Sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- 🐼 Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Thermo

- 🐼 Pierce ECL Western Blotting Substrate

Tocris

- 🐼 Tetrodotoxina

Worthington Chemical Corporation

- 🐼 Papaína 37,1 u/mg P

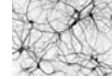
3. Tampones y Soluciones.

Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4

NaCl 136 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ 8 mM
KH₂PO₄ 1,5 mM

Medio Nutriente F12 HAM pH 7,4

DMEM en polvo 4500 mg/L glucosa
25 mM HEPES
4 mM NaHCO₃



Medio de SATO

Suero Caballo (HS) 0.5%

Insulina 5 µg/ml

BSA 100 µg/ml

Putrescina 16 µg/ml

Selenio 30 nM

Progesterona 60 ng/ml

Tiroxina 0.4 µg/ml

Tri-Iodotironina 0.3 µg/ml

Holo-transferrina 5 mg/ml

Medio externo completo (MEC) pH 7,42

NaCl 145 mM

KCl 5 mM

MgCl₂ 1 mM

HEPES 10 mM

Glucosa 10 mM

CaCl₂ 1 mM

Medio libre de Mg²⁺ (Mg0) pH 7,42

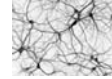
HEPES 10 mM

Glucosa 10 mM

CaCl₂ 1 mM

NaCl 146 mM

KCl 5 mM



3.1 Soluciones para Western Blot

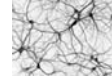
- **Solución tampón separador pH 8,8**
 - 13.63 g Tris (Trizma base)
 - 0,3 g SDS (0.3 %)
 - 100 ml agua MQ

- **Solución compactación “stacking gel buffer” pH 6.8**
 - 7,6 g Tris (Trizma base)
 - 0,5 g SDS (0.5 %)
 - 100 ml agua MQ

- **Tampón de muestra 2x**
 - Tris-HCl 62.5 M pH=6.8
 - SDS 2%
 - Glicerol 10%
 - 2-Mercaptoetanol 5%
 - Azul de bromofenol 0.05%

- **APS 10%**
 - 0.05 gr APS
 - 500 µl agua bi-destilada

- **Tampón de electroforesis 10x pH 9,3**
 - Trizma base 0.25 M
 - Glicina 192 M
 - SDS 1 %



- **Tampón de transferencia pH 8,3**

- Trizma base 25 mM
- Glicina 192 mM
- Metanol 20%

- **TBS 10X pH 7,5**

- Tris-HCl 25 mM
- NaCl 0.9%

- **TBS tween 0.1% (TTBS)**

- TBS 10X
- Tween 20 (0.1%)

- **Tampón de bloqueo**

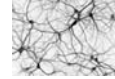
- TTBS
- Leche desnatada en polvo 5%

- **Azul de Comassie**

- Azul de Comassie 0.1%
- Metanol 40%
- Acido acético 5%
- Agua desionizada

- **Solución de desteñir**

- Metanol 30%
- Acido acético 10%
- Agua desionizada



3.2 Soluciones para medidas de apoptosis

- Tampón de unión 10X Annexin V
 - 0,1 M HEPES NaOH (pH 7.4)
 - 1.4 M NaCl
 - 25 mM CaCl₂.

IV. RESULTADOS

Si quieres resultados diferentes, no hagas siempre lo mismo.
Albert Einstein

1. Preparación de los oligómeros del péptido amiloide.

El péptido amiloide puede presentar diferentes estados de agregación (Burdick *et al.*, 1992; Jarret *et al.*, 1993). En la actualidad, se considera que la forma más tóxica del péptido, presente en la EA, son los oligómeros solubles del péptido A β ₁₋₄₂ (Hass y Selkoe, 2007; Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Inicialmente utilizamos el protocolo diseñado por Klein descrito en **Material y Métodos** (Dahlgren *et al.*, 2002; Klein, 2002) para preparar los oligómeros del péptido A β ₁₋₄₂. Según este protocolo, la oligomerización del péptido se realiza en medio DMEM F12 sin rojo fenol en el último paso. Una vez obtenidos los oligómeros de A β ₁₋₄₂ estudiamos sus efectos sobre la concentración de Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]_i en los distintos modelos neuronales de rata (granos de cerebelo y neuronas de hipocampo) mediante imagen de fluorescencia, utilizando la sonda fluorescente de Ca²⁺ fura-2/AM. Los efectos de los oligómeros sobre Ca²⁺ intracelular se testaron a una concentración de 2 μ M. Los oligómeros fueron tratados en un sonicador de baño durante 5 min antes de su utilización.

Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ preparados por el protocolo de Klein en medio DMEM F12 incrementan la [Ca²⁺]_{Cit} en granos de cerebelo (**Fig. 31A**) y en neuronas de hipocampo (**Fig. 31B**). En ambos tipos celulares los incrementos de la [Ca²⁺]_{Cit} son muy heterogéneos, mostrando respuestas con diferente latencia, magnitud y cinética. En algunas células, la [Ca²⁺]_{Cit} se mantuvo elevada aún después de lavar el péptido.

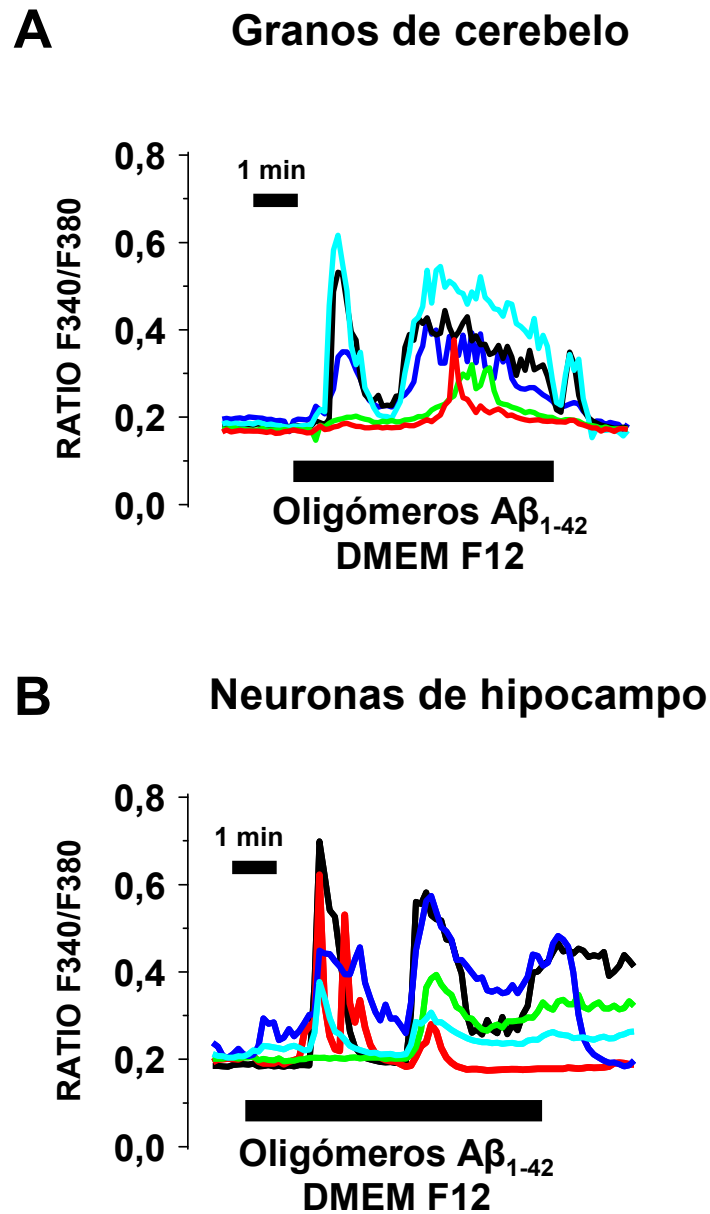


Figura 31. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ preparados por el protocolo de Klein en medio DMEM F12 inducen incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas. Las células fueron cargadas con fura-2/AM y se monitorizó la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ mediante microscopía de fluorescencia. Los registros muestran los efectos de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en 5 neuronas de hipocampo (**A**) y en 5 granos de cerebello (**B**). Los trazos muestran datos representativos de 181 y 213 células respectivamente estudiadas en 6 experimentos independientes.

Comprobamos, por tanto, que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ preparados mediante el protocolo de Klein en DMEM F12 producen incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en ambos tipos celulares. Sin embargo, tras revisar la bibliografía, encontramos evidencias de que el incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros podría estar afectado por diversos componentes del medio (DMEM F12) en el cual es oligomerizado el péptido (Zempel *et al.*, 2010). Por tanto, se llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar el efecto del medio DMEM F12 en las mismas condiciones que antes pero en ausencia de $A\beta_{1-42}$. También se utilizó otro medio DMEM y se comparó con los resultados obtenidos con DMEM F12. Los resultados muestran que el medio DMEM F12 produce, en algunas ocasiones, pequeños incrementos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$. (**Fig. 32**). Por tanto, los incrementos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$ que se preparan en medio DMEM F12 podrían ser debidos, al menos parcialmente, a algún componente del medio DMEM F12. Por el contrario, encontramos que el medio DMEM no produjo incrementos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$. Tras analizar en detalle la composición del DMEM F12 comprobamos que contiene glutamato (50 μ M) y glutamina (2.5 mM). Aunque este medio se diluye más de 40 veces en el ensayo final de Ca^{2+} la concentración final de glutamato en la disolución estaría en torno a 1.25 μ M. Esta concentración podría ser suficiente para activar receptores glutamatérgicos e inducir incrementos de Ca^{2+} citosólico.

Hemos probado los efectos de concentraciones muy bajas de glutamato (1-2 μ M) sobre Ca^{2+} intracelular en neuronas encontrando que, en general, no producían efectos o éstos eran muy pequeños. Aunque las bajas concentraciones de glutamato no explican los efectos, descritos por nosotros y otros autores, de los oligómeros sobre Ca^{2+} intracelular y muerte neuronal, sin embargo, sí que podrían

afectar a estudios farmacológicos en los que se pretenda diseccionar posibles dianas de los oligómeros.

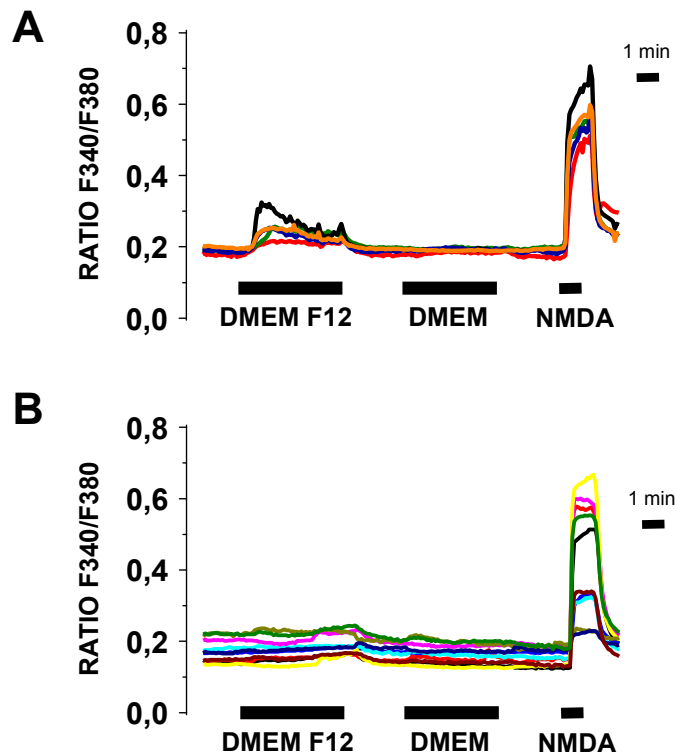


Figura 32. El medio DMEM F12 puede inducir incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas. Los medios fueron utilizados en las mismas condiciones que las soluciones de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ 2 μ M. Los trazos muestran el efecto de los distintos medios sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ y corresponden a 6 y 9 células individuales, representativos de 102 células estudiadas en 12 experimentos independientes.

Decidimos estudiar a continuación los efectos de oligómeros preparados según el protocolo de Klein pero permitiendo la oligomerización en diferentes medios incluyendo DMEM, MEM y medio salino tamponado con fosfato (PBS). Ninguno de los medios utilizados contenía glutamato o glutamina. Los efectos de estos oligómeros sobre Ca^{2+} intracelular se muestran en la **Fig. 33**.

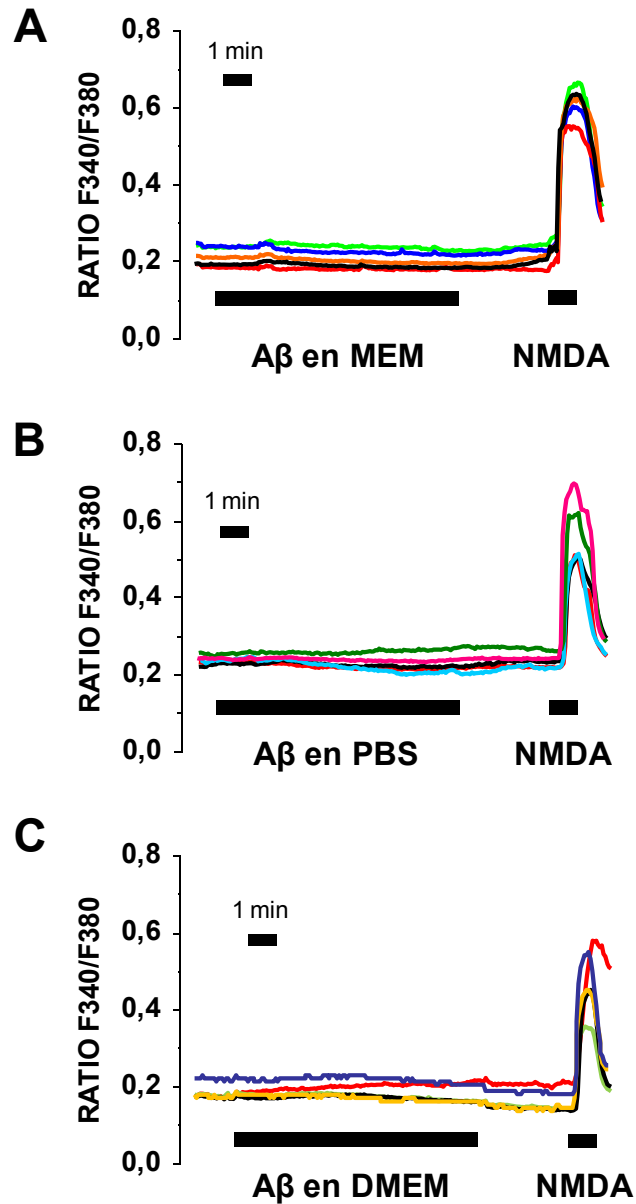


Figura 33. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ preparados por el método de Klein en el que la oligomerización ocurre en diferentes medios en lugar de DMEM F12 no producen incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas. Los trazos muestran el efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ disueltos en MEM (A), PBS (B) y DMEM (C), sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ y corresponden a 5, 6 y 5 células individuales, representativas de 52, 206 y 63 células estudiadas en 4, 17 y 5 experimentos independientes respectivamente.

Tras obtener estos resultados, decidimos buscar en la bibliografía metodologías alternativas de obtención de oligómeros encontrando dos protocolos muy similares, los descritos por Arancio (Fa M y Ottavio Arancio 2010) y Wisniewski (Itkin et al. 2011). El protocolo descrito por Ottavio Arancio es similar al de Klein en los primeros pasos, pero reduce los tiempos de disolución del péptido de tres días a un día. Según el protocolo de Wisniewski la oligomerización del péptido se realiza a 37 °C, en lugar de 4 °C. Incorporamos estas modificaciones al protocolo original de Klein, dando lugar al siguiente protocolo modificado (**Fig. 34**):

1 mg de péptido A β ₁₋₄₂ liofilizado se dejó atemperar durante 30 min y se disolvió a una concentración de 1 mM en ácido hexafluoroisopropanoico (HFIP) en el vial original. Rápidamente, el contenido del vial se alicuotó en tres tubos eppendorff no-silanizados dejándose atemperar durante 2 horas para su monomerización. Los tubos eppendorf se centrifugaron en una centrífuga de vacío (Speed Vac SPD111V) durante 15 minutos para una completa evaporación del ácido. El péptido se resuspendió en DMSO seco hasta alcanzar una concentración de 5 mM y se sonicó durante 10 minutos para su completa resuspensión en un sonicador de baño. El contenido de los tubos fue alicuotado en 9 tubos eppendorff no siliconados conteniendo cada uno 1.6 μ l de suspensión. Los tubos se conservaron a -20°C hasta su utilización para oligomerizar el péptido.

El último paso es clave ya que es en el que se produce la oligomerización. Tras revisar la bibliografía, comprobamos que se utilizaron diversos medios para la oligomerización, entre ellos MEM, DMEM (sin glutamato ni glutamina), PBS y medio externo salino con mM de Ca²⁺. Los medios MEM y DMEM se suplementaron con una baja concentración de oligoelementos como hierro (0.124 μ M), cobre

(1.5 μM) y zinc (1.5 μM) (Faller, *et al.*, 2013) para facilitar la oligomerización del péptido. Estos medios se denominaron MEM+ y DMEM+. El medio MEC (Medio externo completo) se suplementó con una concentración de Ca^{2+} de 2 mM ya que, según la bibliografía, un incremento de la concentración de Ca^{2+} podría facilitar la oligomerización del péptido amiloide (Lykin *et al.*, 2011). Tanto MEM como DMEM contienen originalmente 1 mM de Ca^{2+} . Finalmente, para la oligomerización, el péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ (1.6 μl , -20 °C) se diluyó con 98.4 μl de los diferentes medios para disponer de 100 μl de suspensión a una concentración de 80 μM y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Para los experimentos con las células, los oligómeros se diluyen 40 veces en MEC (100 μl en 4 ml de MEC) para tener una concentración final de 2 μM y se sonicán 5 minutos antes de su uso.

Los resultados muestran que ninguno de los medios preparados inducen incremento de Ca^{2+} citosólico en neuronas de hipocampo o granos de cerebelo. A continuación se testaron los efectos de los oligómeros preparados según el protocolo anterior en los diferentes medios (**Fig. 36**). Los oligómeros obtenidos a partir del nuevo protocolo producen incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ en neuronas. Aunque obtuvimos incrementos de Ca^{2+} citosólico inducido por los oligómeros disueltos en los tres medios utilizados (MEC 2mM Ca^{2+} , DMEM+ y MEM+), los mejores resultados fueron obtenidos con los oligómeros preparados en MEM+ y DMEM+.

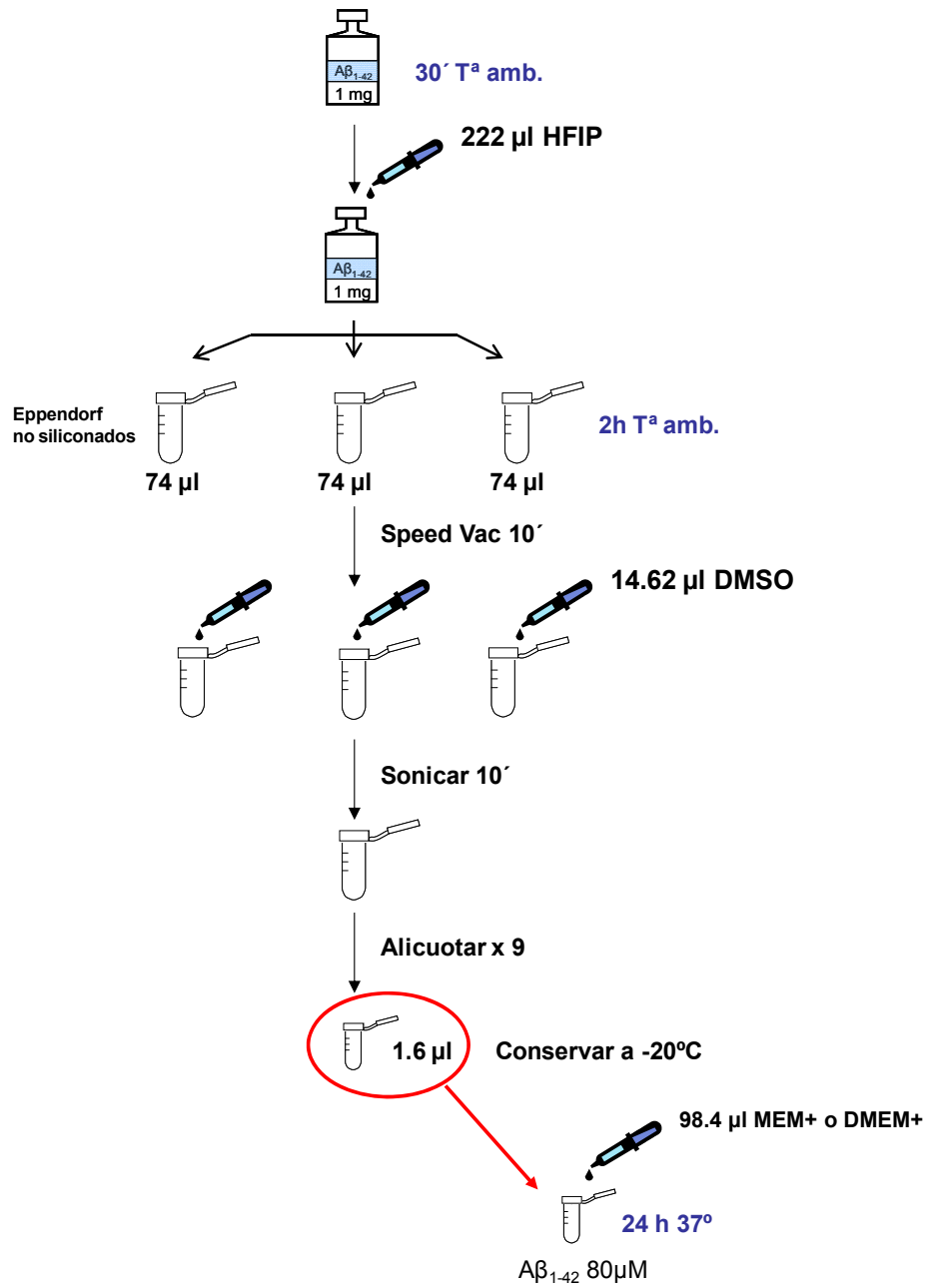


Figura 34. Protocolo optimizado para la obtención de oligómeros $A\beta_{1-42}$

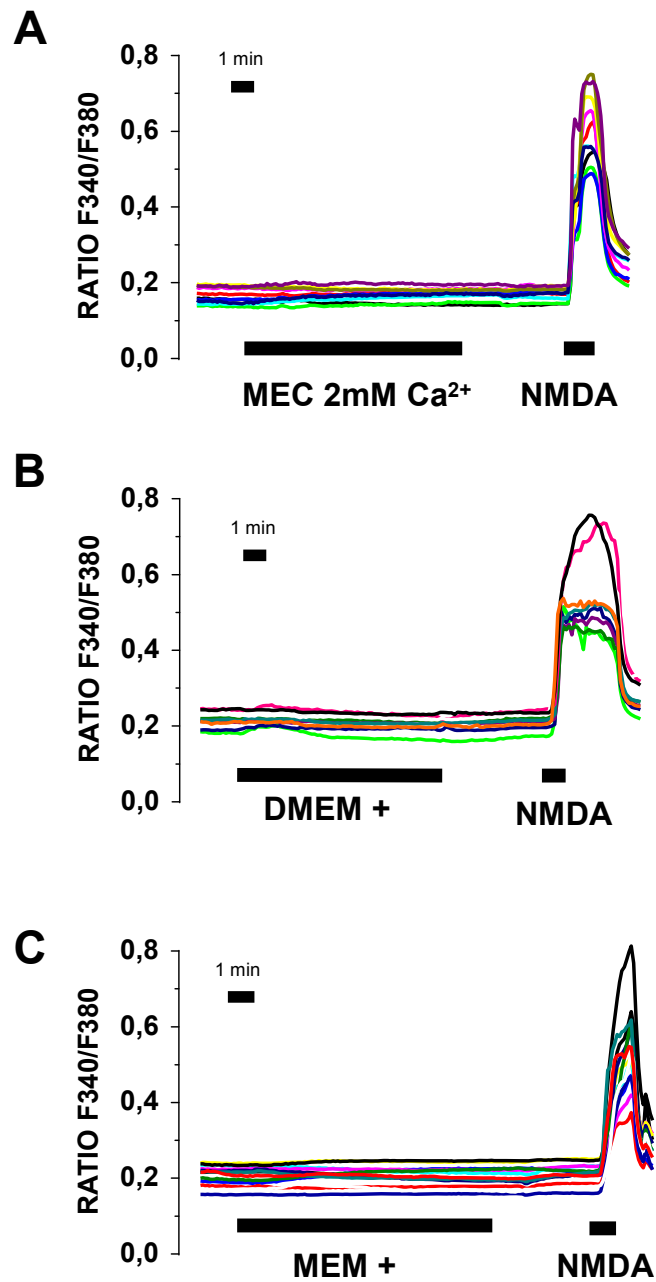


Figura 35. Los medios de oligomerización no producen incrementos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas. Los medios fueron tratados del mismo modo que los oligómeros excepto que no contenían oligómeros. Los trazos muestran el efecto de los distintos medios MEC 2 mM Ca^{2+} (A), DMEM+ (B) y MEM+ (C), sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ y corresponden a 9, 8 y 10 células individuales, representativas de 104, 96 y 108 células estudiadas en 10, 9 y 11 experimentos independientes respectivamente.

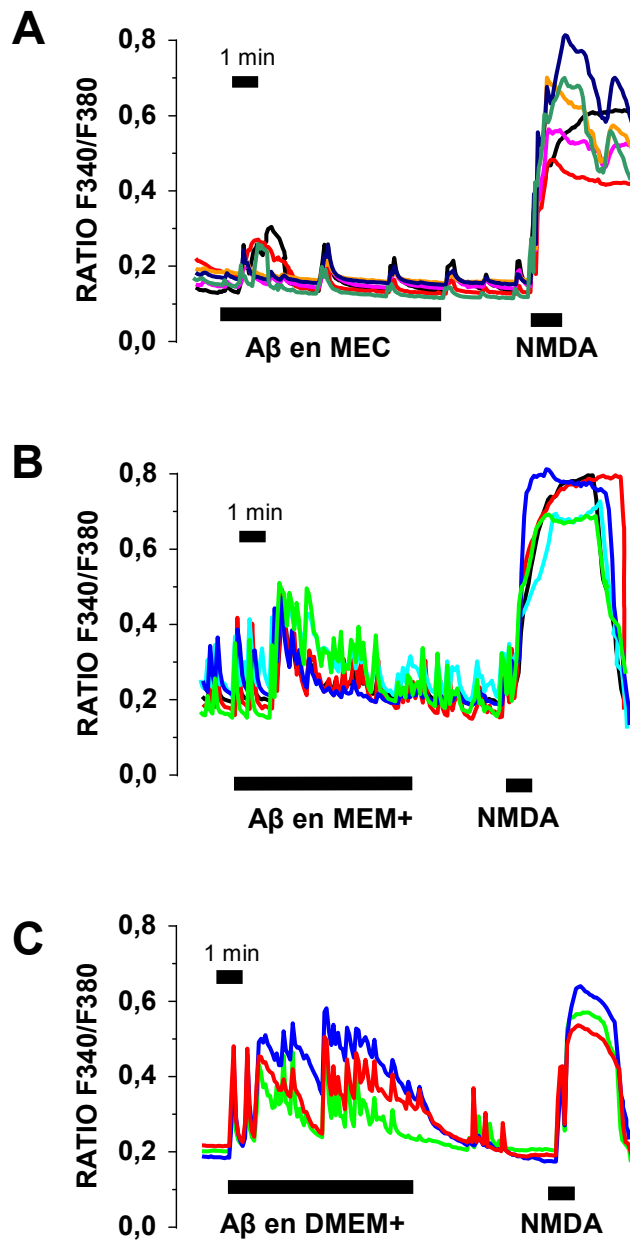


Figura 36. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ obtenidos por el nuevo protocolo preparados en diversos medios de oligomerización inducen incrementos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ ($2 \mu M$) se disolvieron en los diferentes medios de oligomerización: MEC $2mM Ca^{2+}$ (**A**), DMEM+ (**B**) y MEM+ (**C**). Los trazos muestran el efecto de los oligómeros preparados en los distintos medios sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ y se corresponden a 6, 5 y 3 células individuales, representativas de 53, 121 y 263 células estudiadas en 4, 11 y 17 experimentos independientes, respectivamente.

La cuantificación de los incrementos de Ca^{2+} intracelular inducida por oligómeros preparados en diferentes medios muestra que las respuestas fueron similares en medios MEM+ y en DMEM+ (Fig. 37).

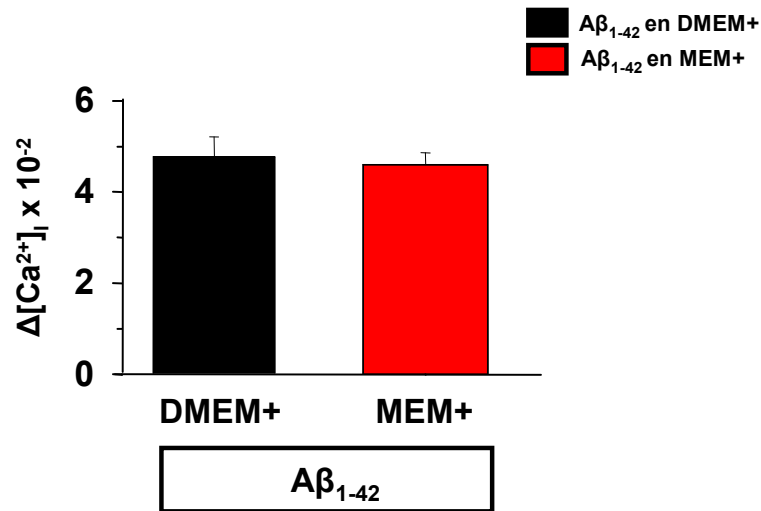


Figura 37. Los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ obtenidos por el nuevo protocolo preparados en DMEM+ y MEM+ inducen incrementos similares de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en neuronas. Se muestra el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ disueltos en DMEM+ y MEM+ en neuronas de hipocampo. Las barras son los valores medios \pm EEM de 5 y 8 experimentos independientes con un total de 121-186 células estudiadas respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que los dos medios (MEM+ y DMEM+) tienen efectos similares sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en neuronas y por tanto pueden ser utilizados indistintamente para la oligomerización del péptido amiloide.

Para comprobar que realmente se obtienen oligómeros a partir del nuevo protocolo, realizamos un análisis de proteínas o western blot separando la muestra en función de su peso molecular (Fig. 38).

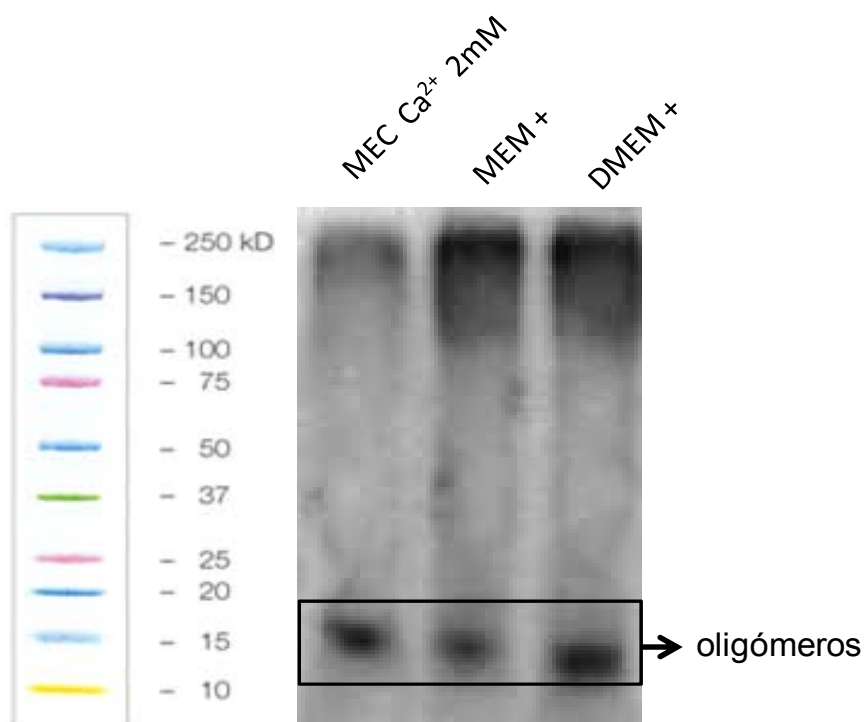


Figura 38. Caracterización de los oligómeros del péptido A β ₁₋₄₂ mediante Western blotting. Los oligómeros que se obtuvieron preparando el péptido en los distintos medios de oligomerización (MEC 2 mM Ca²⁺, MEM+ y DMEM+), tuvieron un tamaño de entre 12 -17 KDa. A la izquierda se muestra el tamaño de las bandas.

La conformación de estas especies solubles puede variar de monómeros de 4 KDa a oligómeros de más de 100 kDa, aunque la contribución más importante la aportan los oligómeros del rango de dímeros a octámeros (Funato *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 1998; McLean *et al.*, 1999; Roher *et al.*, 1996). Los resultados muestran que tras el nuevo protocolo obtenemos oligómeros de entre 12-17 KDa, disolviendo el péptido indistintamente en cualquiera de los medios elegidos (MEC 2 mM Ca²⁺, MEM+ y DMEM+).

2. Efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la Ca^{2+} y muerte neuronal.

Una vez optimizado el protocolo de preparación y caracterización de los oligómeros se estudió el efecto de éstos sobre Ca^{2+} citosólico, Ca^{2+} mitocondrial y muerte neuronal.

2.1. Los nuevos oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas.

Una vez obtenidos los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ estudiamos sus efectos sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediante microscopía de fluorescencia en diferentes modelos de células neuronales (granos de cerebelo y neuronas de hipocampo) cargadas con la sonda fluorescentes de alta afinidad por Ca^{2+} fura-2/AM. La **Fig. 39** muestra que los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$, produce incrementos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tanto en granos de cerebelo como en neuronas de hipocampo. En ambos tipos celulares los incrementos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ fueron bastante heterogéneos, mostrando respuestas de diferente magnitud y cinética similares a las obtenidas con los oligómeros preparados según el protocolo de Klein en medio DMEM F12.

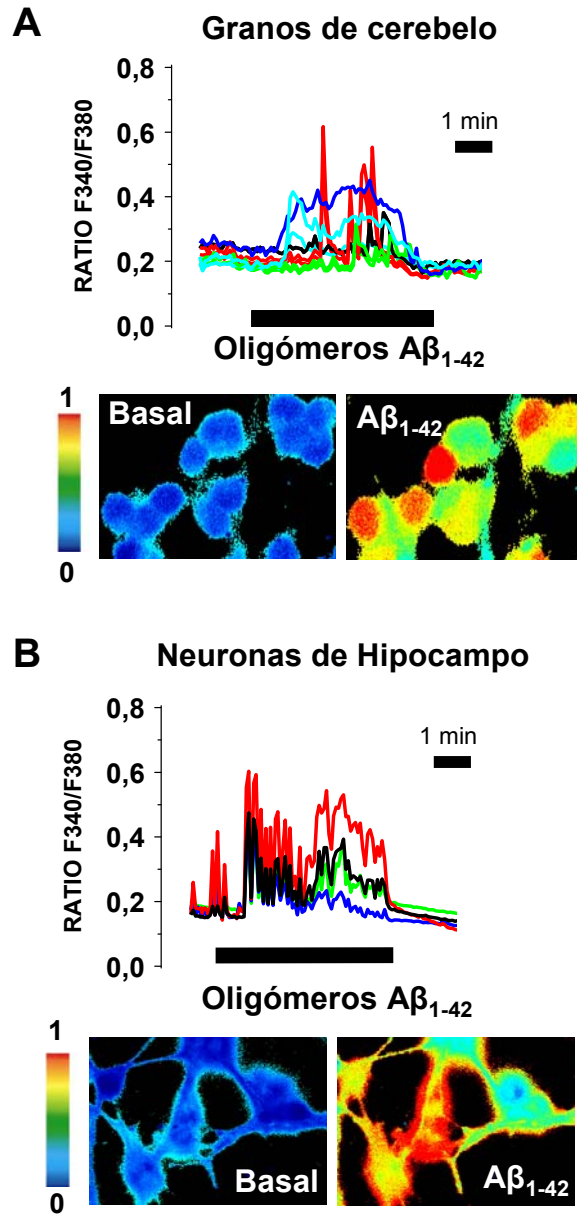


Figura 39. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ obtenidos con el nuevo protocolo inducen incrementos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, tanto en neuronas de hipocampo (A) como en granos de cerebello (B). Las células fueron cargadas con fura-2/AM y se monitorizó la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediante microscopía de fluorescencia. Los paneles inferiores muestran los cocientes de fluorescencia codificados en pseudocolor (escala 0-1) antes y después de la perfusión de las células con oligómeros $A\beta_{1-42}$ (2 μ M). Los trazos corresponden a 4 y 5 células individuales, representativas de 421 y 563 células estudiadas en 38 y 46 experimentos independientes, respectivamente.

Los cultivos celulares utilizados para los experimentos de imagen son cultivos primarios, es decir, no son cultivos puros en ningún caso, sino que son cultivos mixtos formados por neuronas y células de la glía. Por tanto es necesario identificar los tipos celulares que responden a los oligómeros con incrementos de Ca^{2+} intracelular. Para determinar qué tipo celular responde a los oligómeros (neuronas, glías o ambos tipos celulares) llevamos a cabo una serie de experimentos de doble inmunofluorescencia en las mismas células (mismo campo microscópico) utilizadas para los registros de imagen de Ca^{2+} intracelular. De este modo fuimos capaces de identificar tanto las neuronas de hipocampo como las glías presentes en el mismo campo microscópico utilizado para el experimento de imagen de Ca^{2+} . Para ello, una vez finalizado el experimento de imagen de Ca^{2+} , se fijaron las células en la propia platina del microscopio y se realizó una inmunocitoquímica doble como se ha descrito en materiales y métodos, utilizando el anticuerpo anti- β -tubulina III para identificar neuronas y el anticuerpo anti-proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) para identificar las células gliales.

La **Fig. 40** muestra un ejemplo representativo de un cultivo de células de hipocampo en el cual neuronas y glías se identificaron mediante inmunocitoquímica doble tras el experimento de imagen de Ca^{2+} . Los resultados muestran que las neuronas, pero no las glías, muestran incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica en respuesta a los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Cuando no se realiza inmunocitoquímica las neuronas de cerebelo y de hipocampo fueron fácilmente reconocibles por la imagen de transmisión. Además al final del experimento se perfunden las células con el agonista NMDA que estimula exclusivamente a las neuronas para confirmar la identificación de las neuronas.

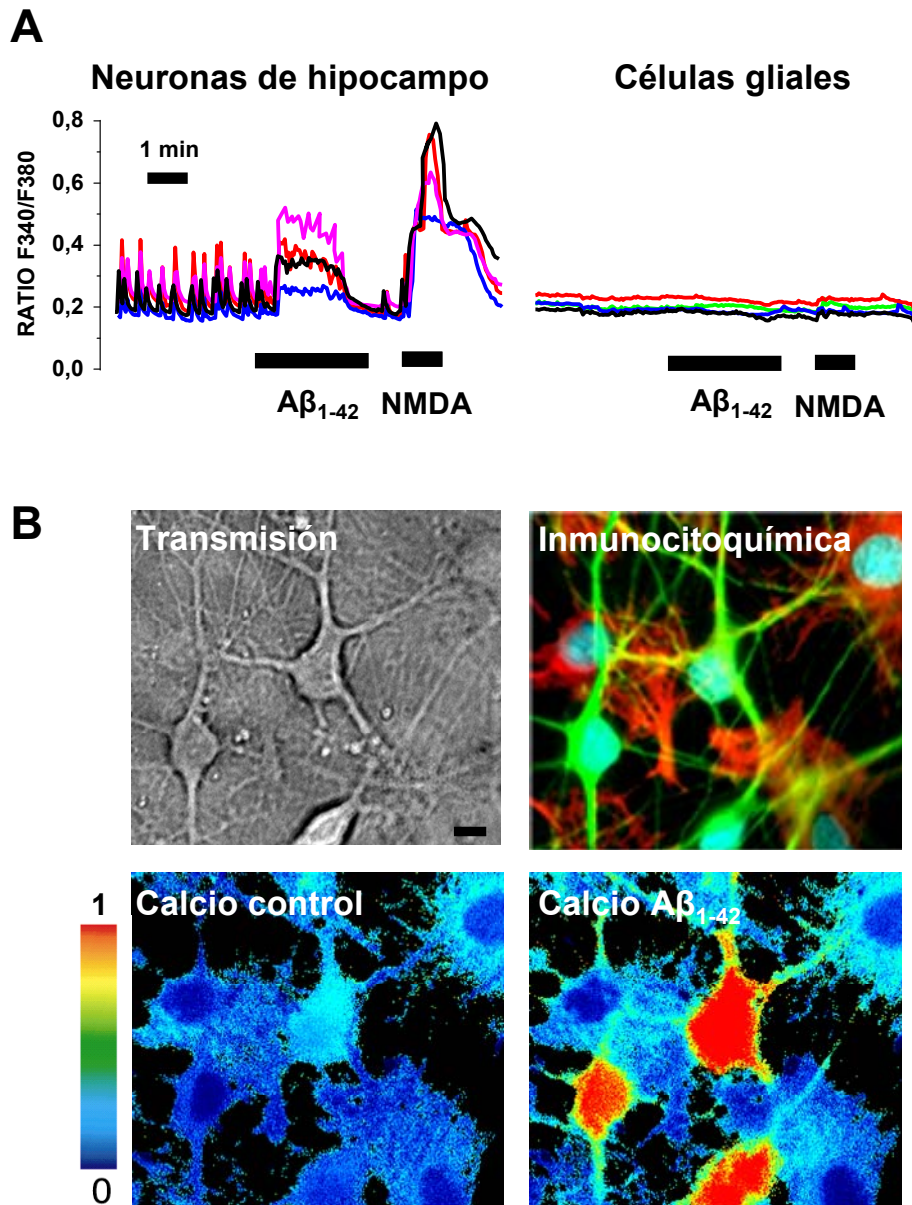


Figura 40. Las neuronas, pero no las glías, responden a los oligómeros con un aumento de Ca^{2+} citosólico. **A**, Registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ tras el estímulo con oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ ($2 \mu\text{M}$) en neuronas y en células gliales de hipocampo. Los trazos corresponden a 4 neuronas y 4 células gliales representativas de 117 células estudiadas en 3 experimentos independientes. **B**, Las células fueron identificadas a posteriori mediante inmunocitoquímica doble (neuronas, verde; glías, rojo; núcleos, azul).

2.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducen la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial.

Una vez comprobado que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducen incrementos de Ca²⁺ citosólico en neuronas, decidimos estudiar los efectos de A β ₁₋₄₂ sobre la concentración de Ca²⁺ mitocondrial ([Ca²⁺]_{mit}). Previamente se había demostrado que la [Ca²⁺]_{mit} puede aumentar de forma considerable, y que la mayor parte de las medidas de la [Ca²⁺]_{mit} han sido infravaloradas, debido a la utilización de sondas de alta afinidad por el Ca²⁺ (Montero *et al.*, 2000; Villalobos *et al.*, 2001; Villalobos *et al.*, 2002). Por ello decidimos utilizar la sonda aecurina de baja afinidad dirigida a mitocondria desarrollada previamente para monitorizar las altas [Ca²⁺] del retículo endoplásmico (Montero *et al.*, 2000). Hemos utilizado aecurina fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) para poder seleccionar las neuronas transfectadas con la sonda (Rogers *et al.*, 2005). Nuestro grupo ha descrito con anterioridad que la estimulación de neuronas simpáticas y otras células excitables que expresan aecurina de baja afinidad dirigida a mitocondria con medio con alto contenido en K⁺ (una condición que promueve la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje) libera normalmente un 5-10% de los fotones (expresado como % de cuentas totales), unos valores que, al ser calibrados, se corresponden a unos incrementos de la [Ca²⁺]_{mit} de unos 100-300 μ M. Además, estos incrementos de la [Ca²⁺]_{mit} estarían limitados a un conjunto de mitocondrias cercano a los sitios de entrada y liberación de Ca²⁺ (Villalobos *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2007).

La **Fig. 41** muestra los efectos de oligómeros sobre la [Ca²⁺]_{mit} en neuronas de hipocampo. En contraste con los resultados previos, hemos encontrado que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (**Fig. 41**) liberan de

modo masivo casi todos los fotones de la aecurina sugiriendo la entrada masiva de Ca^{2+} en todas las mitocondrias más que en una subpoblación. De forma similar a los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$, los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ fueron heterogéneos en términos de latencia, amplitud y cinética.

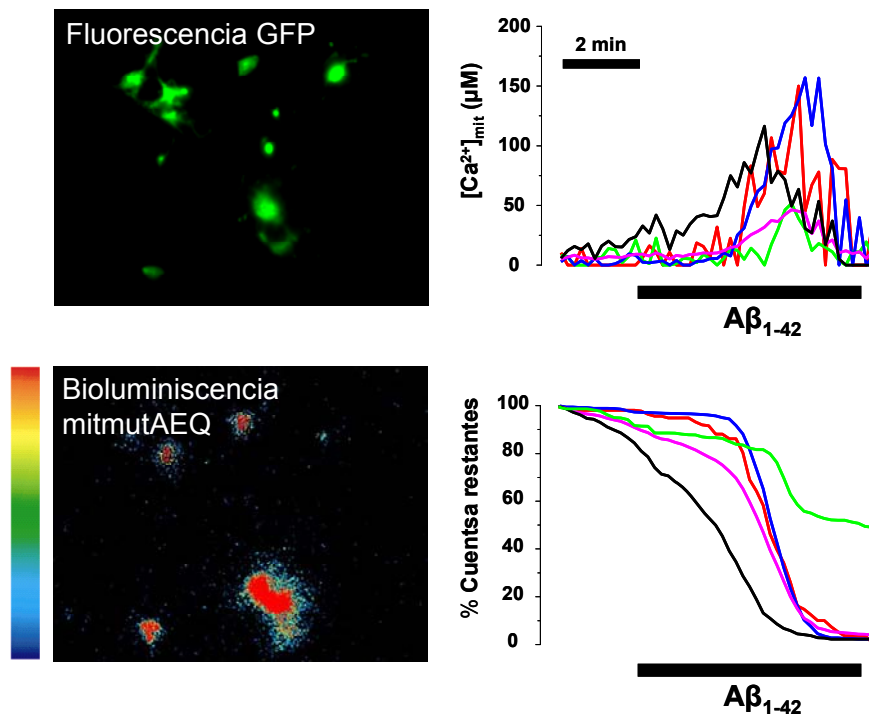


Figura 41. Los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ inducen sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo. Las neuronas de hipocampo fueron transfectadas con aecurina de baja afinidad dirigida a mitocondria y fusionada a GFP (GFP-mitAEQmut), incubados con celenterazina y estimulados con oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ para monitorizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ mediante imagen de bioluminiscencia. Las fotos de la izquierda muestran imágenes de campos microscópicos representativos de la fluorescencia debida a GFP (arriba) y las emisiones fotónicas acumuladas debidas a la aecurina (debajo). La intensidad de luminiscencia está codificada en pseudocolor (de 1 a 32 fotones por píxel). Los registros muestran los efectos de los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ (trazo superior derecha) y el % de emisiones fotónicas restantes (trazo inferior derecha) en 5 células individuales. Los datos son representativos de 17 células estudiadas en 4 experimentos independientes.

2.3. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen apoptosis.

Para caracterizar finalmente los efectos de los nuevos oligómeros preparados con el protocolo modificado se estudió si estos inducían apoptosis en neuronas de hipocampo. Es conocido que una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria puede promover la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y activar la vía intrínseca de la apoptosis (Kruman y Mattson, 1999; Norenberg y Rao, 2007). La **Fig. 42** muestra los efectos de los oligómeros sobre apoptosis medido mediante la detección de Anexina V.

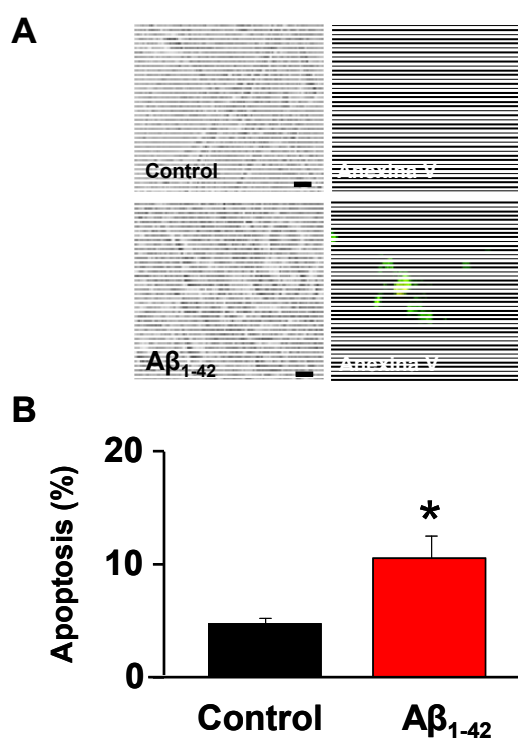


Figura 42. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen apoptosis en neuronas. **A**, Neuronas de hipocampo fueron incubadas 2 h con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ 2 μ M. Tras 24 horas se midió la apoptosis con Anexina V. Las fotos muestran imágenes de células incubadas en medio control arriba y células tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ abajo. A la derecha las imágenes muestran células apoptóticas marcadas con Anexina V. **B**, Las barras muestran el % de apoptosis en situación control y con oligómeros (media \pm EEM, n=6, 528 células en control y 635 células con $A\beta_{1-42}$; * p <0,05). Barra: 10 μ m.

Los resultados indican que los oligómeros del $A\beta_{1-42}$ inducen apoptosis en neuronas de hipocampo. Por tanto, podemos concluir que los oligómeros del péptido amiloide (pero no el medio en el que están preparados) inducen incrementos de Ca^{2+} citosólico y sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial en granos de cerebelo y neuronas de hipocampo, pero no en células gliales, lo que probablemente contribuye a la inducción de apoptosis y muerte celular. Este mecanismo podría ser relevante en la muerte neuronal característica de la enfermedad de Alzheimer por lo que nos planteamos investigar el mecanismo íntimo o las bases moleculares por las que los oligómeros del péptido amiloide inducen el incremento de Ca^{2+} citosólico en neuronas.

3. Posibles vías de entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

Para investigar el mecanismo por el que se produce el incremento de Ca^{2+} intracelular estudiamos, en primer lugar, si los efectos de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ se deben a liberación o a entrada de Ca^{2+} . Para ello estudiamos el efecto de los oligómeros en medio libre de Ca^{2+} (Ca_0). Los resultados muestran que, en estas condiciones, los oligómeros no inducen incremento alguno de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$. Sin embargo, una vez re-añadido Ca^{2+} al medio extracelular, las neuronas responden a los oligómeros con el característico incremento de la $Ca^{2+}]_{Cit}$ (**Fig. 43**) sugiriendo que el efecto de los oligómeros se debe al aumento de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

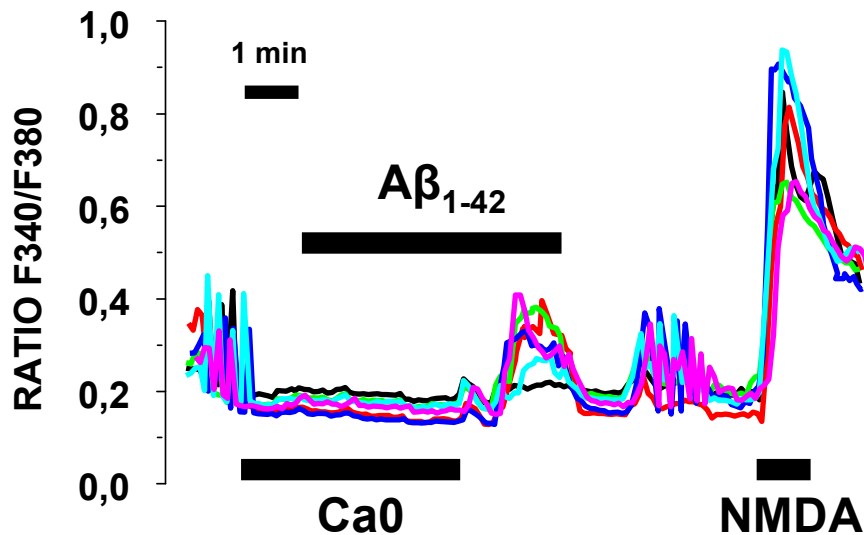


Figura 43. El aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros del péptido amiloide se debe a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. El efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ ($2 \mu M$) en neuronas no es observado en medio libre de Ca^{2+} extracelular ($Ca0$). La adición de medio con un contenido en Ca^{2+} de $1mM$ restableció la respuesta a $A\beta_{1-42}$. Los trazos corresponden a 6 células individuales representativas de 76 células estudiadas en 3 experimentos independientes.

Los resultados anteriores indican que el aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros del péptido amiloide es debido a la activación de una ruta de entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular, y no a la liberación de Ca^{2+} contenido en los depósitos intracelulares, como por ejemplo el retículo endoplásmico (RE).

Se conocen diversos canales de Ca^{2+} presentes en las neuronas, como por ejemplo, los receptores tipo NMDA o diversos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Para estudiar si alguno de estos canales podría estar implicado en la respuesta a los oligómeros estudiamos los efectos de éstos en presencia de diversos antagonistas específicos. Para ello realizamos experimentos de Ca^{2+} citosólico en granos de cerebelo y neuronas de hipocampo de rata neonatal (3-5 DIV). Para bloquear los canales NMDA utilizamos el antagonista MK801 ($10 \mu M$), para bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q utilizamos ω -agatoxina TK ($100 nM$),

para bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L utilizamos nifedipina ($2 \mu\text{M}$). La **Fig. 44** muestra el valor del incremento promedio de Ca^{2+} citosólico (ΔCa^{2+}) inducido por los oligómeros del péptido amiloide en granos de cerebelo en ausencia y presencia de los antagonistas mencionados anteriormente.

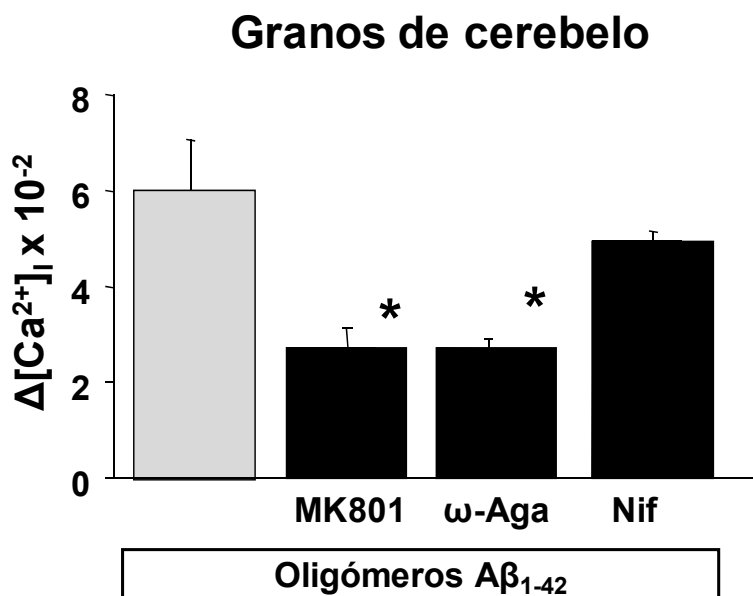


Figura 44. Efectos de los antagonistas sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos por oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ en granos de cerebelo (3-5 DIV). Representación en barra del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en respuesta a los oligómeros y en presencia de los antagonistas de canales. MK801 ($10 \mu\text{M}$), antagonista del receptor NMDA, ω -agatoxina (100 nM), antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y Nifedipina ($2 \mu\text{M}$), antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo L. Las barras son los valores medios \pm EEM de 3-5 experimentos independientes con un total de 40-55 células por experimento (* $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos muestran que en granos de cerebelo, el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ es inhibido por el antagonista del receptor NMDA (MK801) y por el antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (ω -agatoxina TK) pero no por el antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo L (Nifedipina). Resultados similares fueron obtenidos en neuronas de hipocampo. La **Fig. 45** muestra el valor del incremento promedio de Ca^{2+} citosólico

(ΔCa^{2+}) inducido por los oligómeros del péptido amiloide en neuronas de hipocampo en ausencia y presencia de los mismos antagonistas. Los resultados muestran que MK801 y ω -agatoxina pero no nifedipina inhiben los efectos de los oligómeros sugiriendo la contribución de los receptores tipo NMDA y los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (pero no L) a la entrada de Ca^{2+} inducida por oligómeros tanto en granos de cerebelo como en neuronas de hipocampo.

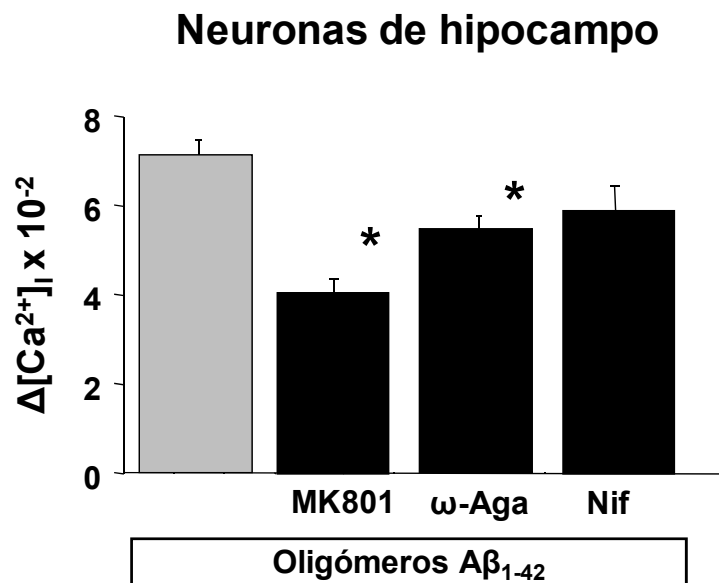


Figura 45. Efectos de los antagonistas de Ca^{2+} sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ inducidos por oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo. Representación en barra del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ en respuesta a los oligómeros y en presencia de los antagonistas de canales. MK801 (10 μM), antagonista del receptor NMDA, ω -agatoxina (100 nM), antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y Nifedipina (2 μM), antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo L. Las barras son los valores medios \pm EEM de 3-5 experimentos independientes con un total de 25-35 células por experimento (* $p < 0,05$).

4. Las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} revelan la formación de circuitos neuronales in vitro susceptibles de ser excitados por los oligómeros.

Una de las características de las neuronas en cultivo primario es que son capaces de formar circuitos neuronales a través de conexiones funcionales entre ellas incluyendo conexiones sinápticas glutamatérgicas. Ello supone que la activación de una célula puede desencadenar la activación de otras neuronas lo que produciría liberación sináptica de glutamato y activación lejana de receptores tipo NMDA u otros canales de Ca^{2+} . Anteriormente hemos descrito que los granos de cerebelo en cultivo primario son capaces de formar circuitos neuronales con conexiones sinápticas a partir de 6-7 DIV, una característica que se hace evidente por la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las neuronas presentes en el campo (Nuñez *et al.*, 1996). En concreto, en granos de cerebelo, la eliminación del catión Mg^{2+} del medio extracelular (una situación que elimina el bloqueo dependiente de voltaje del receptor tipo NMDA), induce la generación de oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Antes de los 6-7 DIV esta maniobra experimental no provoca oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. En granos de cerebelo las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se bloquearon un 96 % con tetrodotoxina (TTX), un antagonista de los canales de Na^+ dependientes de voltaje implicados en la propagación del potencial de acción. Las oscilaciones también se inhibieron en un 90% con antagonistas de receptores de glutamato tipo NMDA y con la ω -Agatoxina IVA (93%), un antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, pero no por dihidropiridinas, antagonistas específicos de los canales de Ca^{2+} tipo L. Se propuso entonces que las oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ son la expresión de la irradiación de la

actividad originada al azar en cualquiera de las neuronas del sistema a través de una red neuronal que incluye sinápsis glutamatérgicas funcionales. Las oscilaciones son debidas a la entrada sincrónica de Ca^{2+} a través de los canales asociados el receptor de tipo NMDA activados por la liberación sináptica de glutamato, la cual, a su vez requiere la entrada de Ca^{2+} a través de canales tipo P en la terminal presináptica (Nuñez *et al.* 1996).

En los resultados anteriormente mostrados se observan que las neuronas de hipocampo presentan, en ocasiones, oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ sugiriendo que éstas son capaces de formar circuitos neuronales que podrían contribuir a la respuesta a los oligómeros por lo que decidimos caracterizarlas en más detalle. En primer lugar observamos que, al contrario de lo que ocurre en los circuitos formados con granos de cerebelo, la generación de oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} no requiere la retirada del Mg^{2+} del medio extracelular (**Fig. 46**). Al igual que en cerebelo, la aparición de oscilaciones depende del tiempo de cultivo, un tiempo requerido para el establecimiento de nuevas sinápsis entre las neuronas disociadas. Hemos observado que a tiempos de cultivo temprano (1-2 DIV), las neuronas hipocámpales no muestran oscilaciones espontáneas ni tan siquiera al eliminar el Mg^{2+} del medio extracelular. Sin embargo, las oscilaciones son frecuentemente observadas a tiempos de cultivo más largos (7-8 DIV). Las oscilaciones se favorecen en condiciones especiales como, por ejemplo, el aumento de la densidad celular. Específicamente hemos observado que para que las neuronas de hipocampo formen circuitos neuronales en cultivo primario es necesario sembrar las células con una densidad de entre 70 a 90 x 10^3 células por pocillo.

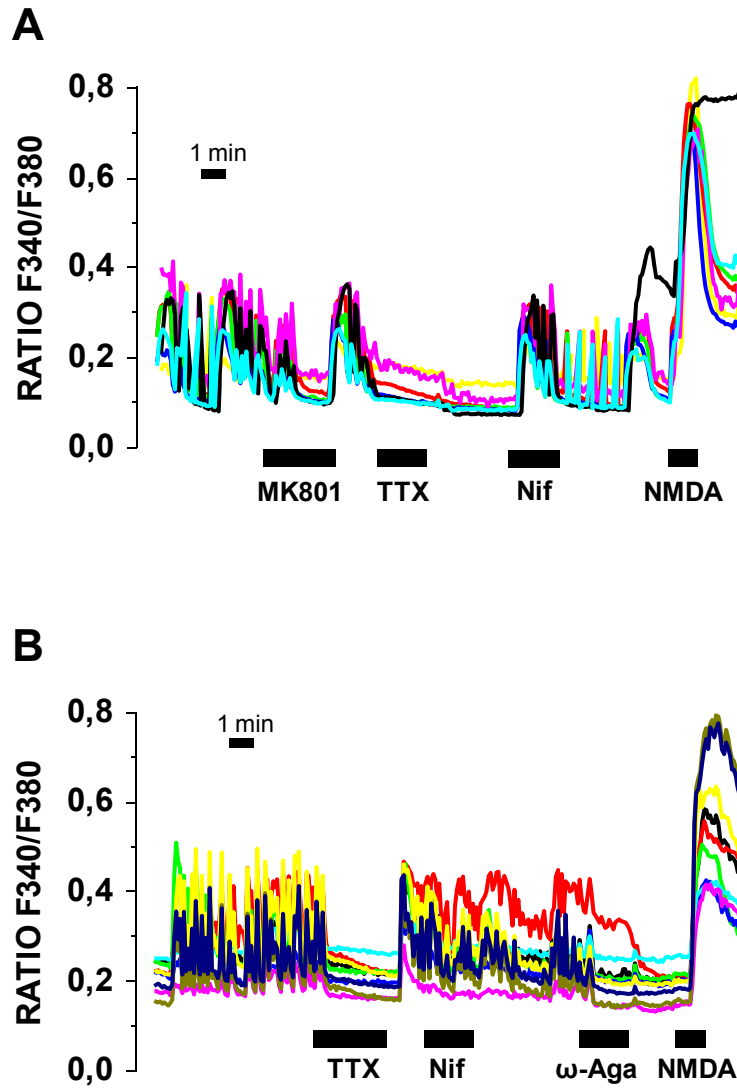


Figura 46. Efectos de antagonistas de canales de Ca^{2+} y Na^+ sobre las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} intracelular producidas por la formación del circuito en neuronas de hipocampo a 7 DIV. Los registros representan los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ en una serie de neuronas de hipocampo representativas en ausencia y presencia de distintos antagonistas de canales incluyendo MK801 (10 μM), Nifedipina (2 μM), ω -agatoxina TK (100 nM) y TTX (50 nM). Los trazos corresponden a 7-9 células individuales representativas de 60 células estudiadas en 4 experimentos independientes.

Para entender el mecanismo de la sincronización hemos estudiado los efectos de ciertos antagonistas de canales sobre la actividad sincrónica incluyendo MK801, ω -agatoxina, nifedipina y tetrodotoxina. Como muestra la **Fig. 46** las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} son inhibidas en distinta medida por MK801, TTX y ω -agatoxina IVA pero no por nifedipina. Los resultados sugieren que el receptor/canal tipo NMDA, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q (pero no los de tipo L) y los canales de Na^+ dependientes de voltaje participan en la generación de la actividad sincrónica.

Los datos fueron analizados calculando un índice de oscilaciones (Villalobos y García-Sancho, 1995). Este parámetro no es más que la longitud del registro de Ca^{2+} por unidad de tiempo, un valor que depende de la amplitud y frecuencia de las oscilaciones y por tanto se puede considerar una estimación de la "cantidad" de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular. Una vez normalizados los datos respecto a la situación control, la **Fig. 47** muestra que tanto MK801 como ω -agatoxina y TTX, pero no nifedipina, inhiben las oscilaciones.

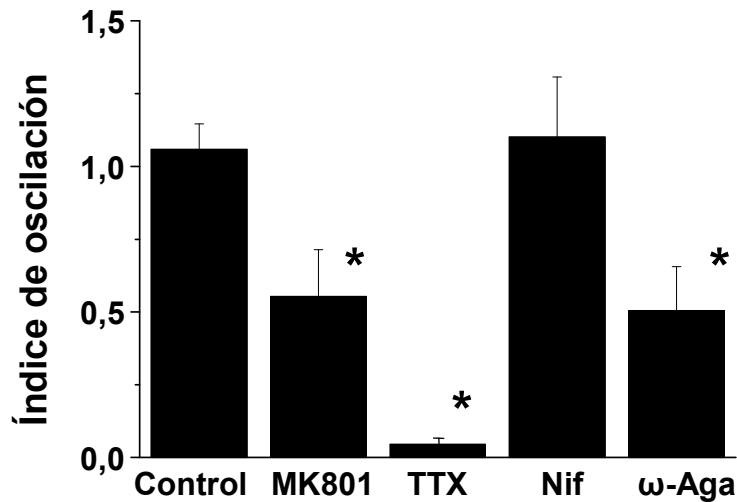


Figura 47. Efecto de los antagonistas sobre el Índice de Oscilaciones de Ca^{2+} producidas por la formación del circuito en neuronas de hipocampo a 7 DIV. Se muestra el índice de oscilación inducido por los antagonistas de canales en neuronas de hipocampo, MK801 10 μ M, TTX 50 nM, Nifedipina 2 μ M, y ω -agatoxina TK 100 nM. Las barras son los valores medios \pm EEM de 3-4 experimentos independientes, con 43, 28, 15 y 28 células estudiadas respectivamente.

Nuestros resultados indican que el antagonista del receptor NMDA, MK801 produjo una inhibición del 48.0 ± 0.2 % mientras que TTX abolió completamente las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{cit}$ ($95,7 \pm 0.3$ % respecto al control). Nifedipina, no afectó al índice mientras que la ω -Agatoxina TK, un antagonista específico de canales de Ca^{2+} tipo P/Q, inhibió un $52,4 \pm 0.6$ % las oscilaciones. Estos valores son ligeramente distintos a los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio en granos de cerebelo donde tanto MK801 como ω -Agatoxina abolen completamente las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que el receptor NMDA y los canales de Ca^{2+} tipo P/Q están implicados en la actividad sincrónica de las neuronas hipocámpales aunque en menor medida que en los circuitos formados por granos de cerebelo.

5. Contribución del circuito neuronal a la respuesta a los oligómeros.

Como se ha comentado anteriormente las neuronas en cultivo son capaces de formar circuitos o redes neuronales. Esto supone que la activación de una célula puede activar neuronas lejanas conectadas a través del circuito. Por ello decidimos investigar en más detalle la contribución del circuito a la respuesta a los oligómeros. Para ello estudiamos los efectos de los oligómeros antes y después de la formación del circuito. Con este fin estudiamos los efectos de los oligómeros en cultivos celulares antes de la formación del circuito (1 DIV) y tras la formación de circuito (≥ 7 DIV). Para determinar la formación de circuito testamos la aparición de oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} intracelular al retirar el Mg^{2+} del medio extracelular. En ausencia de circuito, esta maniobra no ocasiona cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$. Sin embargo, en cultivos en los que se ha formado circuito, la retirada del Mg^{2+} induce la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$. Realizamos experimentos en granos de cerebelo y en neuronas de hipocampo de rata, a 1 DIV y comprobamos que la retirada de Mg^{2+} del medio extracelular no induce la generación de oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} citosólico. Sin embargo, tras 7 DIV, la retirada del Mg^{2+} del medio extracelular induce en ambos tipos neuronales la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$. Los resultados obtenidos en granos de cerebelo e hipocampo se muestran en la **Fig. 48** y **Fig. 51**, respectivamente.

Granos de cerebello

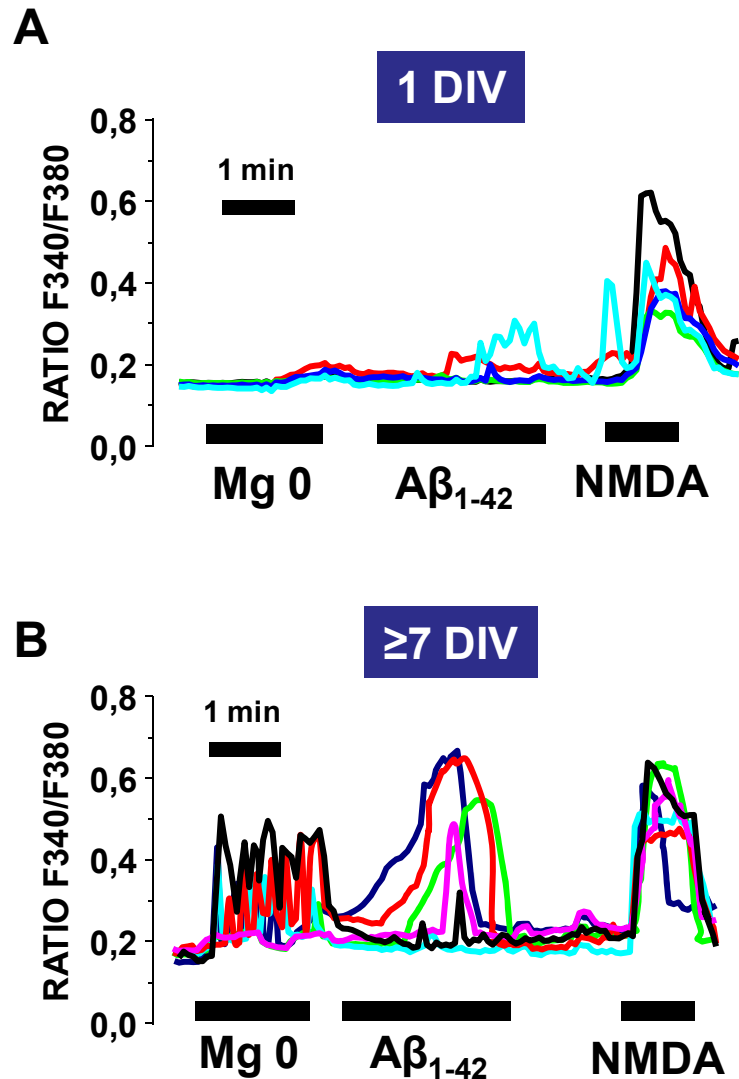


Figura 48. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ aumentan la concentración de Ca²⁺ citosólico en granos de cerebello a 1 DIV y a ≥7 DIV. Tras la retirada de Mg0 del medio extracelular podemos observar la formación (B) o no (A) del circuito por la aparición de oscilaciones sincrónicas de la [Ca²⁺]_{Cit}. En ambos casos se estimuló a las células con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (2 μM) y NMDA (100 μM), podemos observar que el incremento de Ca²⁺ inducido por los oligómeros, pero no por NMDA es menor a 1 DIV (antes de la formación del circuito) que tras la formación a 7 DIV. Los trazos corresponden a 5 y 6 células individuales representativas de 284 y 321 células estudiadas en 15 y 23 experimentos independientes.

Los resultados sugieren que el incremento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros era mucho mayor en las células tras la formación del circuito neuronal. Además, el porcentaje de células que responden a los oligómeros parecía también mayor a 7 DIV. Sin embargo, la respuesta a NMDA era aparentemente similar en ambos tipos de poblaciones (1 DIV y 7 DIV). Para llevar a cabo el análisis de los experimentos tuvimos en cuenta por un lado la fracción de células que respondían en cada caso (Respuesta celular %) así como el mayor o menor incremento de Ca^{2+} citosólico (ΔCa^{2+}) de las células que respondían tanto a los oligómeros como a NMDA. Los resultados muestran que, en granos de cerebelo, tanto el porcentaje de células que responden a los oligómeros como el ΔCa^{2+} de las células que responden fué mayor tras la formación del circuito. Sin embargo, la respuesta a NMDA fue similar en ambos casos (**Fig. 49**). Se realizaron experimentos control invirtiendo el orden de los estímulos, es decir, perfundiendo primero el agonista NMDA y luego los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados). Para cuantificar con un único parámetro la respuesta a los estímulos se calculó un índice de activación multiplicando la fracción (tanto por uno) de células que responden a cada estímulo por el incremento de ΔCa^{2+} de las células que responden:

$$\text{Activación} = \% \text{ respuesta celular} / 100 \times \text{Incremento de calcio}$$

El índice de activación indica que la respuesta a los oligómeros fue mucho mayor tras la formación del circuito. Sin embargo, el índice correspondiente a la respuesta a NMDA fue similar a 1 DIV y 7 DIV (**Fig. 50**).

Granos de cerebello

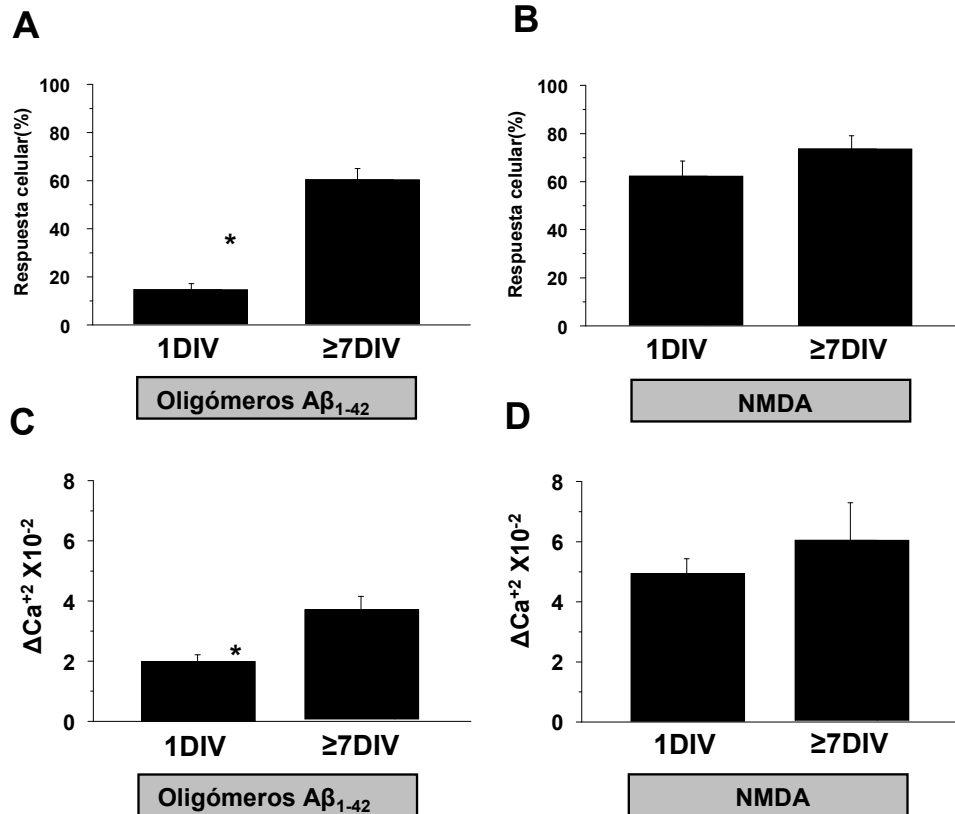


Figura 49. El porcentaje de células que responden (respuesta celular %) y el incremento de Ca²⁺ inducido por oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂, aumenta tras la formación del circuito en granos de cerebello, sin embargo la respuesta a NMDA es similar. Las barras representan el % de células que responden a los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (2 μM) (A) y de NMDA (100 μM) (B) antes (1DIV) y después (≥7 DIV) de la formación del circuito, así como los incremento de Ca²⁺ inducido por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (C) y de NMDA (D) antes (1DIV) y después (≥7 DIV) de la formación del circuito. Las barras son las medias ± EEM de 15 experimentos con 284 células estudiadas a 1 DIV y de 23 experimentos con 321 células estudiadas a ≥7 DIV; *p<0,05.

Granos de cerebelo

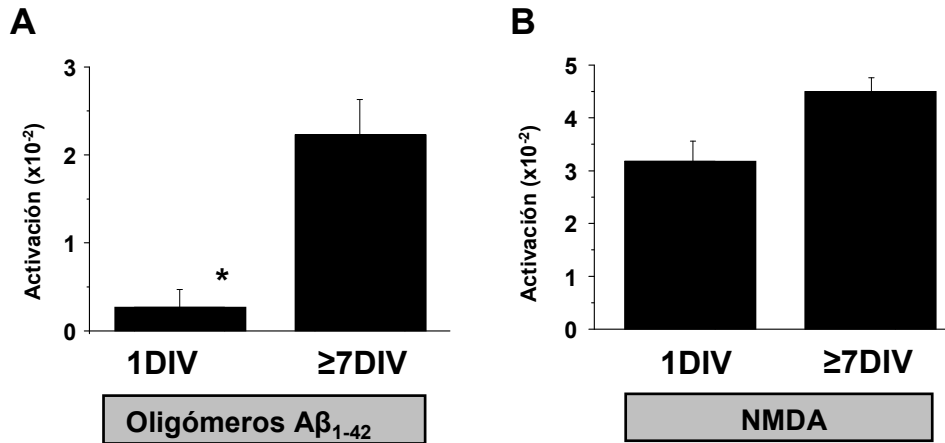


Figura 50. La activación de Ca^{2+} inducido por oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$, pero no la inducida por NMDA, es amplificada tras la formación del circuito en granos de cerebelo. Representación en barra de los datos normalizados a partir del % de respuesta celular y del incremento de Ca^{2+} inducido por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) (A) y de NMDA (100 μ M) (B) antes (1 DIV) y después (≥ 7 DIV) de la formación del circuito. Las barras son las medias \pm EEM de 15 experimentos con 284 células estudiadas a 1 DIV y de 23 experimentos con 321 células estudiadas a ≥ 7 DIV; * $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en granos de cerebelo muestran que, antes de la formación del circuito la respuesta inducida por los oligómeros es menor que la obtenida tras la formación del circuito. Esto no ocurre con la respuesta a NMDA. Por tanto la formación del circuito amplifica notablemente el número de células que responden y aumenta el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por los oligómeros sobre las células. La amplificación de la respuesta a los oligómeros no se debería al aumento de receptores NMDA ya que la respuesta a NMDA es muy similar en ambas situaciones.

A continuación llevamos a cabo experimentos similares a los descritos pero en cultivos de neuronas de hipocampo. En neuronas de hipocampo a 1 DIV comprobamos que tras la retirada del Mg^{2+} del medio extracelular no aparecen oscilaciones sincrónicas en el registro de Ca^{2+} citosólico sugiriendo la ausencia de circuito. Sin embargo, a

≥7 DIV, la retirada del Mg^{2+} del medio extracelular induce la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$. De hecho, en 7 de cada 10 experimentos, las neuronas de hipocampo a 7 DIV (pero no a 1 DIV) mostraban oscilaciones sincrónicas de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$, antes incluso de la retirada del Mg^{2+} del medio extracelular. La **Fig. 51** muestra registros representativos de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas de hipocampo a 1 y 7 DIV en presencia y ausencia de Mg^{2+} extracelular así como los efectos de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y NMDA. Los resultados muestran que los oligómeros inducen un incremento pobre de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ a 1 DIV que aumenta significativamente tras la formación circuito (7 DIV). Sin embargo, la respuesta a NMDA es bastante similar a 1 y 7 DIV.

El análisis cuantitativo de las respuestas mostró que tanto la fracción de células que respondieron a los oligómeros como el ΔCa^{2+} de las células que respondieron a los oligómeros fueron mayores tras la formación del circuito. Sin embargo, los parámetros correspondientes a la respuesta a NMDA fueron similares antes y después de la formación del circuito (**Fig. 52**). Por tanto, el índice de activación mostró que, igual que en el caso de los granos de cerebelo, la respuesta a los oligómeros aumenta considerablemente tras la formación del circuito mientras que la respuesta a NMDA es bastante similar (**Fig. 53**). Se realizaron también experimentos control cambiando el orden de los estímulos y los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).

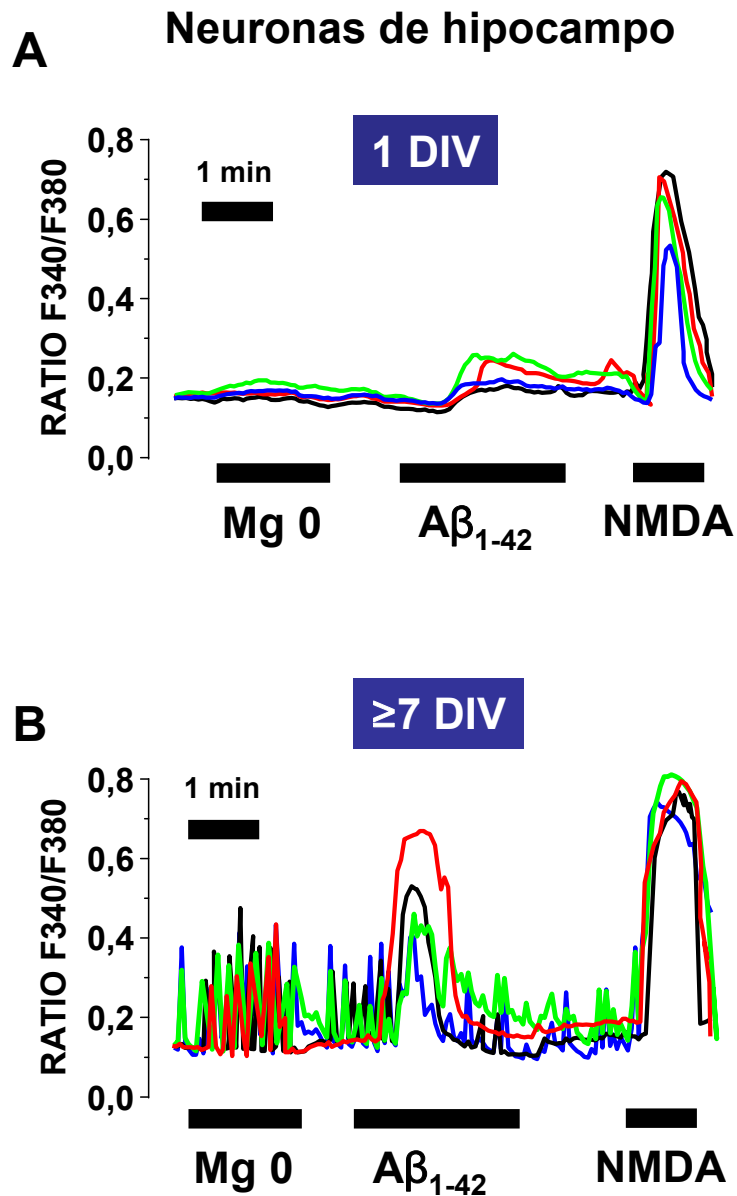


Figura 51. El péptido $A\beta_{1-42}$ aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico en neuronas de hipocampo a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Tras la retirada de Mg^{2+} del medio extracelular podemos observar la formación (B) o no (A) del circuito por la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$. En ambos casos se estimularon las células con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μM) y NMDA (100 μM), podemos observar que el incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros, pero no por NMDA, es menor a 1 que a 7 DIV. Los trazos corresponden a 4 células individuales representativas de 196 y 248 células estudiadas en 12 y 18 experimentos independientes, respectivamente.

Neuronas de hipocampo

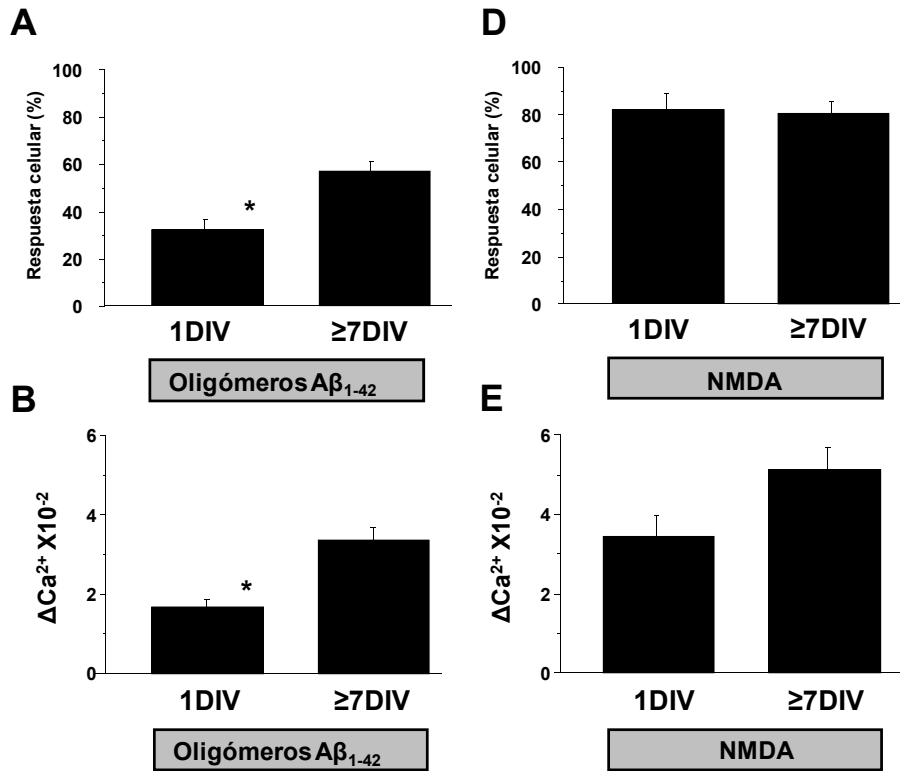


Figura 52. El porcentaje de respuesta celular y el incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$, aumenta tras la formación del circuito en neuronas de hipocampo, sin embargo la respuesta a NMDA es similar. Las barras superiores representan el % de células que responden a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) (A) y a NMDA (100 μ M) (B) antes (1DIV) y después (≥ 7 DIV) de la formación del circuito. Las barras inferiores representan los incrementos de Ca^{2+} inducidos por los oligómeros (C) y NMDA (D) antes (1DIV) y después (≥ 7 DIV) de la formación del circuito. Las barras son las medias \pm EEM de 12 experimentos con 196 células estudiadas a 1 DIV y de 18 experimentos con 248 células estudiadas a ≥ 7 DIV; * $p < 0,05$.

Neuronas de hipocampo

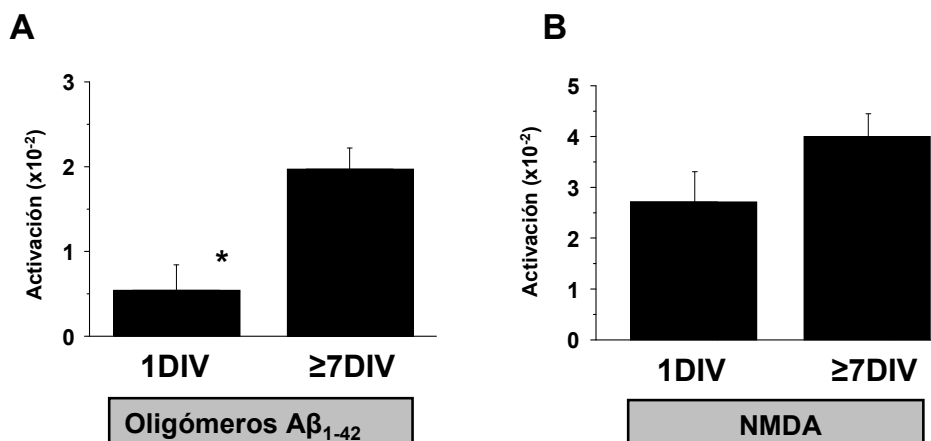


Figura 53. La activación de Ca²⁺ inducida por oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂, pero no por NMDA aumenta tras la formación del circuito en neuronas de hipocampo. Las barras representan el producto de las células que responden por el incremento de Ca²⁺ obtenido en la fracción de células que responde a los oligómeros (2 μM) (A) y NMDA (100 μM) (B) antes (1 DIV) y después (≥7 DIV) de la formación del circuito. Las barras son las medias ± EEM de 12 experimentos con 196 células estudiadas a 1 DIV y de 18 experimentos con 248 células estudiadas a ≥7 DIV; *p<0,05.

Los resultados anteriores sugieren que la formación del circuito contribuye a la respuesta a los oligómeros. Además, los resultados muestran que la respuesta a los oligómeros se puede dissociar de la respuesta a NMDA. Esto es muy claro a 1 DIV donde una pobre respuesta a los oligómeros no está asociada a una pobre respuesta a NMDA. Por tanto, aunque el receptor NMDA podría estar implicado en la respuesta a los oligómeros, los resultados sugieren que el receptor NMDA no sería el receptor primario de éstos o la vía principal de entrada de Ca²⁺ inducida por los oligómeros.

6. Efecto de los antagonistas de canales sobre la respuesta a los oligómeros en presencia y ausencia de circuito neuronal.

A continuación estudiamos si la presencia o ausencia de circuito modificaba la inhibición inducida por los antagonistas del incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros. Los estudios se realizaron tanto en granos de cerebelo como en neuronas de hipocampo. Para comparar los efectos de los antagonistas se utilizaron células antes y después de la formación de circuitos neuronales, es decir 1 DIV y ≥ 7 DIV. Los antagonistas estudiados fueron MK801, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA y NA7, un inhibidor de los posibles poros o canales amiloides formados por el $\text{A}\beta_{1-42}$, que en realidad es un fragmento del propio péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ ($\text{A}\beta_{11-17}$) compuesto por 7 aminoácidos (EVHHQKL) (Arispe, 2004; Diaz *et al.*, 2006). Adicionalmente se han estudiado los efectos de ω -agatoxina, un bloqueante de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo P/Q y tetrodotoxina (TTX), un bloqueante de canales de Na^+ que impide la propagación de la actividad eléctrica e inhiben por tanto el circuito neuronal. No se han utilizado antagonistas de los canales de Ca^{2+} tipo L ya que se ha demostrado anteriormente que no tiene efecto.

La **Fig. 54** muestra los efectos de los oligómeros del péptido amiloide en ausencia y presencia de los antagonistas referidos en granos de cerebelo a 1 DIV, es decir, antes de la formación del circuito neuronal. La **Fig. 55** muestra los efectos de oligómeros y antagonistas a 7 DIV, es decir, tras la formación de la red neuronal.

Granos de cerebello 1 DIV

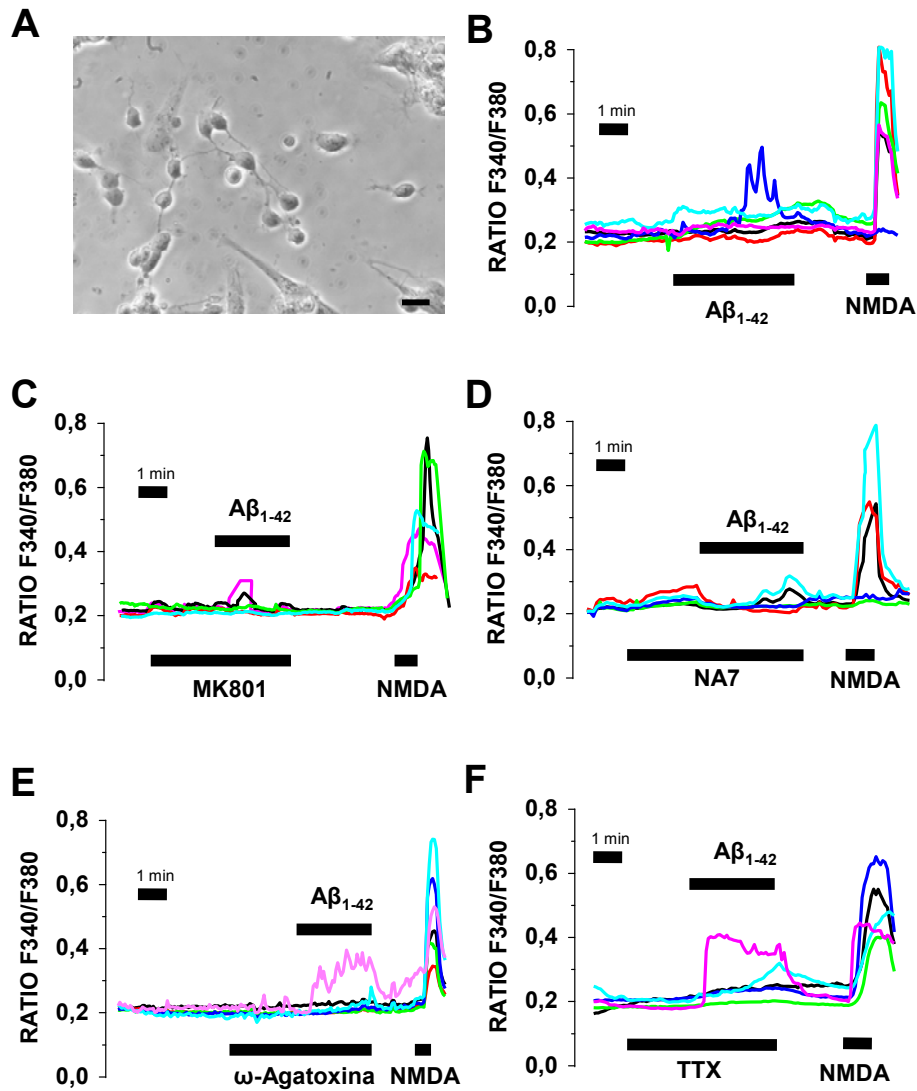


Figura 54. Efectos de antagonistas de canales sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en granos de cerebello a 1 DIV. (A) Imagen de transmisión del cultivo de granos de cerebello a 1 DIV. Los registros representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ de células estimuladas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) en ausencia (B) y en presencia de distintos antagonistas de canales, incluyendo MK801 10 μ M (C), NA7 1 μ M (D), ω -Agatoxina 100 nM (E) y TTX 500 nM (F). Los trazos corresponden a 4-6 células individuales representativas de 597, 262, 196, 189 y 160 células estudiadas en 11, 5, 7, 4 y 4 experimentos independientes, respectivamente. La barra de la fotografía representa una escala de 10 μ M.

Granos de cerebelo ≥ 7 DIV

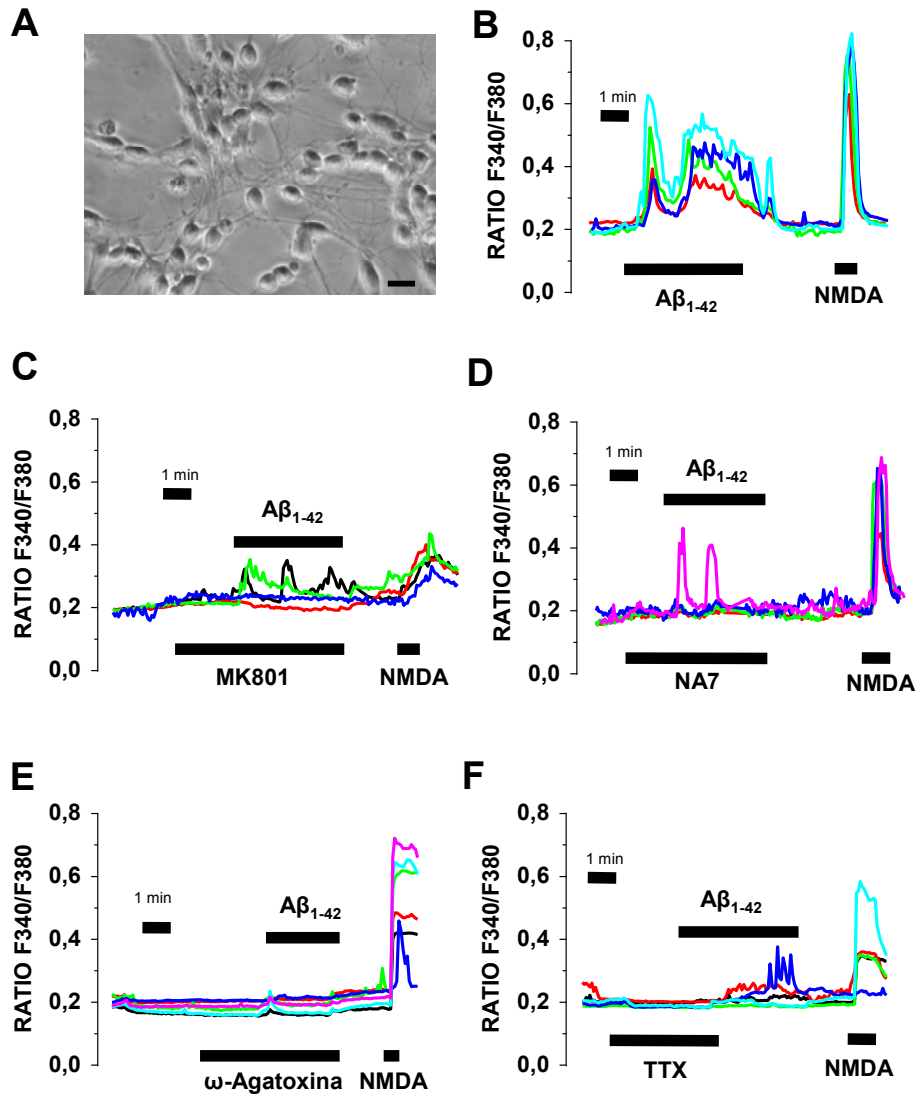


Figura 55. Efectos de los antagonistas de canales sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en granos de cerebelo a ≥ 7 DIV. (A) Imagen de transmisión del cultivo de granos de cerebelo a ≥ 7 DIV. Los registros representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{cit}$ de células estimuladas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) en ausencia (B) y en presencia de distintos antagonistas de canales, incluyendo MK801 10 μ M (C), NA7 1 μ M (D), ω -Agatoxina 100 nM (E) y TTX 500 nM (F). Los trazos corresponden a 4-6 células individuales representativas de 219, 115, 240, 140 y 95 células estudiadas en 6, 4, 9, 5 y 3 experimentos independientes. La barra de la fotografía representa una escala de 10 μ M.

Los resultados muestran que el incremento de Ca^{2+} inducido por oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ se inhibe en presencia de los diversos antagonistas utilizados, tanto antes como después de la formación del circuito. Los datos obtenidos fueron analizados mediante la estimación, por un lado, de la fracción (tanto por uno) de células que responden a los oligómeros (respuesta celular %) y por otro lado, del incremento de Ca^{2+} que presentan las células que responden (ΔCa^{2+}).

Para analizar los datos calculamos el porcentaje de activación, que resulta de la multiplicación simple de la fracción celular que responde por el delta de Ca^{2+} de las células que responden. La **Fig. 56** muestra los resultados obtenidos en granos de cerebelo antes y después de la formación del circuito. En cuanto al número de células que responden a los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ encontramos que antes de la formación del circuito tan sólo NA7 y ω -Agatoxina inhiben parcialmente el efecto de los oligómeros. Por el contrario después de la formación del circuito todos los antagonistas inhiben parcialmente el número de células que responden a los oligómeros. En cuanto al incremento de Ca^{2+} , son los antagonistas MK801 y NA7 los que inhiben parcialmente el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por los oligómeros antes de la formación del circuito, pero tras la formación de este todos los antagonistas inhiben parcialmente el aumento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros.

Granos de cerebelo

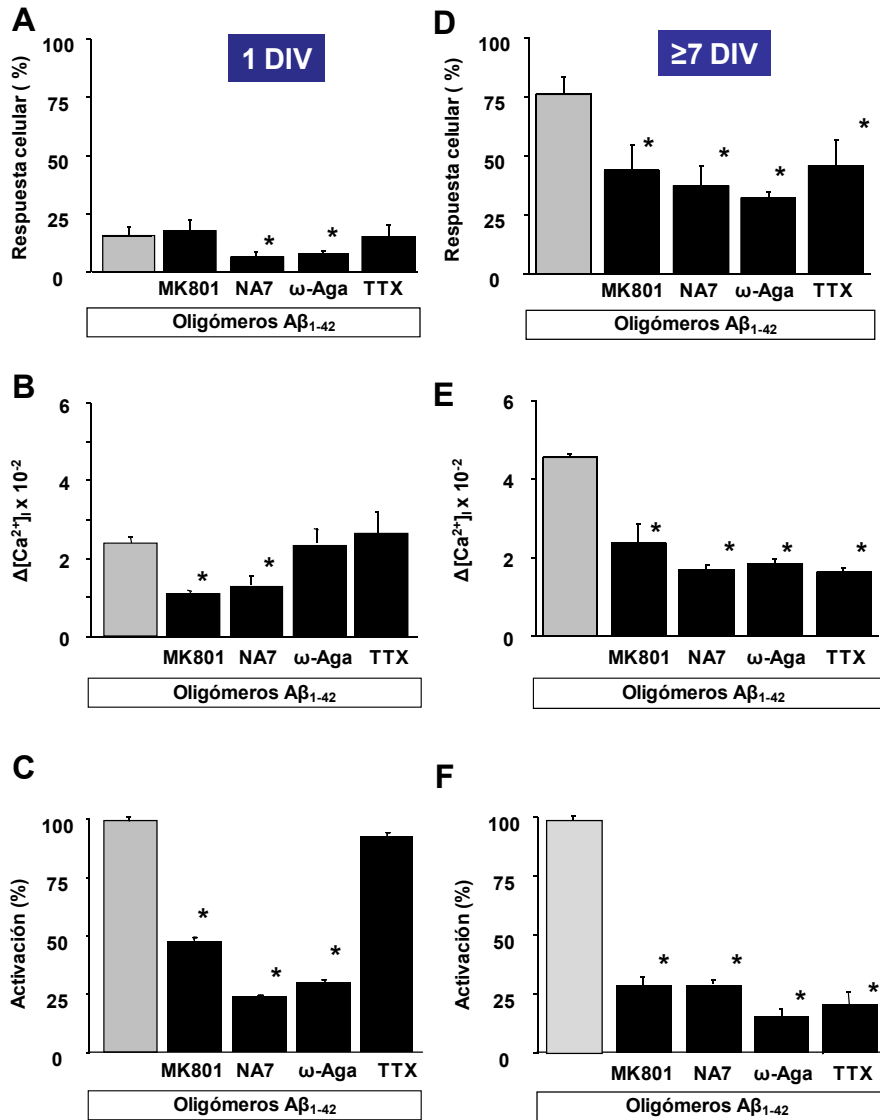


Figura 56. Efectos de los antagonistas de Ca²⁺ sobre la señal de calcio, inducida por oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en granos de cerebelo a 1 DIV y a ≥7 DIV. Las barras superiores representan el % de respuesta celular inducida por oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en ausencia y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**A**) y a ≥7 DIV (**D**). Las barras del medio representan los Δ[Ca²⁺]_{cit} inducidos por oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en ausencia y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**B**) y a ≥7 DIV (**E**). Las barras inferiores representan el % de activación inducido por oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en ausencia y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**C**) y a ≥7 DIV (**F**). Las barras son los valores medios ± EEM de los experimentos de las figuras 54 y 55; *p<0,05

A continuación se llevaron a cabo experimentos similares en células de hipocampo de rata neonatal. Los cultivos que se utilizaron para los experimentos a ≥ 7 DIV fueron del mismo cultivo que los utilizados para realizar los experimentos a 1 DIV. De este modo se aseguran las mismas características del cultivo a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Para que las neuronas de hipocampo formen circuito las células se sembraron a una densidad de unas $70-90 \times 10^3$ células por pocillo. Es necesario recordar que existen diferencias entre el circuito de granos de cerebelo y el circuito de neuronas de hipocampo, siendo una de ellas que los cultivos primarios de neuronas de hipocampo (>7 DIV) muestran frecuentemente oscilaciones sincrónicas de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en presencia de Mg^{2+} extracelular. Una vez puestas a punto las condiciones, llevamos a cabo experimentos de medida de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en respuesta a los oligómeros y posteriormente comprobamos si el efecto de los oligómeros era modulado por los diferentes antagonistas. Las **Figs. 57 y 58** muestran registros representativos llevados a cabo antes (1 DIV) y después (> 7 DIV) de la formación del circuito, respectivamente.

Los registros muestran que el incremento de Ca^{2+} inducido por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ es inhibido parcialmente en presencia de diversos antagonistas utilizados, tanto antes como después de la formación del circuito. Igual que en el caso del cerebelo, los datos obtenidos fueron analizados, calculando el porcentaje de células que responden al estímulo (respuesta celular %) y el incremento de Ca^{2+} de las células que responden (ΔCa^{2+}).

Neuronas de hipocampo 1DIV

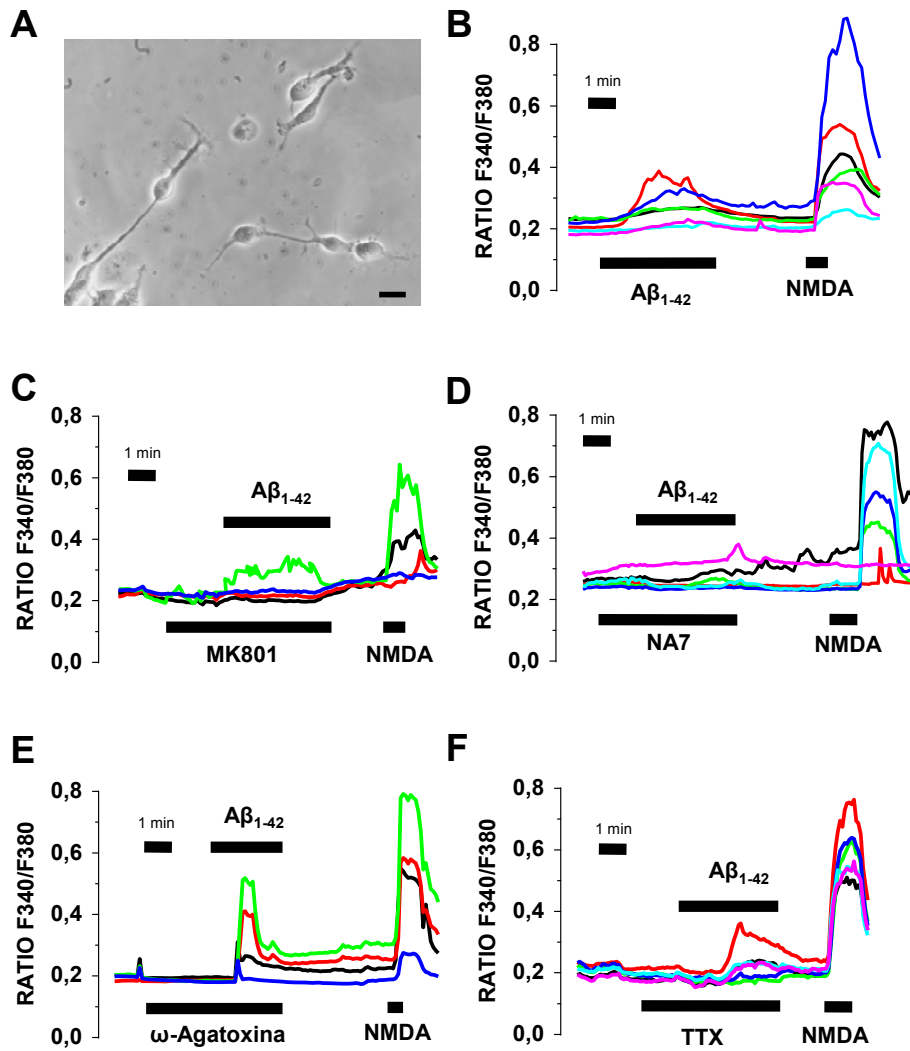


Figura 57. Efectos de los antagonistas de canales de Ca^{2+} sobre el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo a 1DIV. (A) Imagen de transmisión del cultivo de neuronas de hipocampo a 1 DIV. Los registros representan los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de células estimuladas con oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (2 μM) en ausencia (B) y en presencia de distintos antagonistas de canales, incluyendo MK801 10 μM (C), NA7 1 μM (D), ω -Agatoxina 100 nM (E) y TTX 500 nM (F). Los trazos corresponden de 4-6 células individuales representativas de 48, 30, 43, 68 y 38 células estudiadas en 6, 4, 4, 4 y 3 experimentos independientes. La barra de la fotografía representa una escala de 10 μM .

Neuronas de hipocampo ≥ 7 DIV

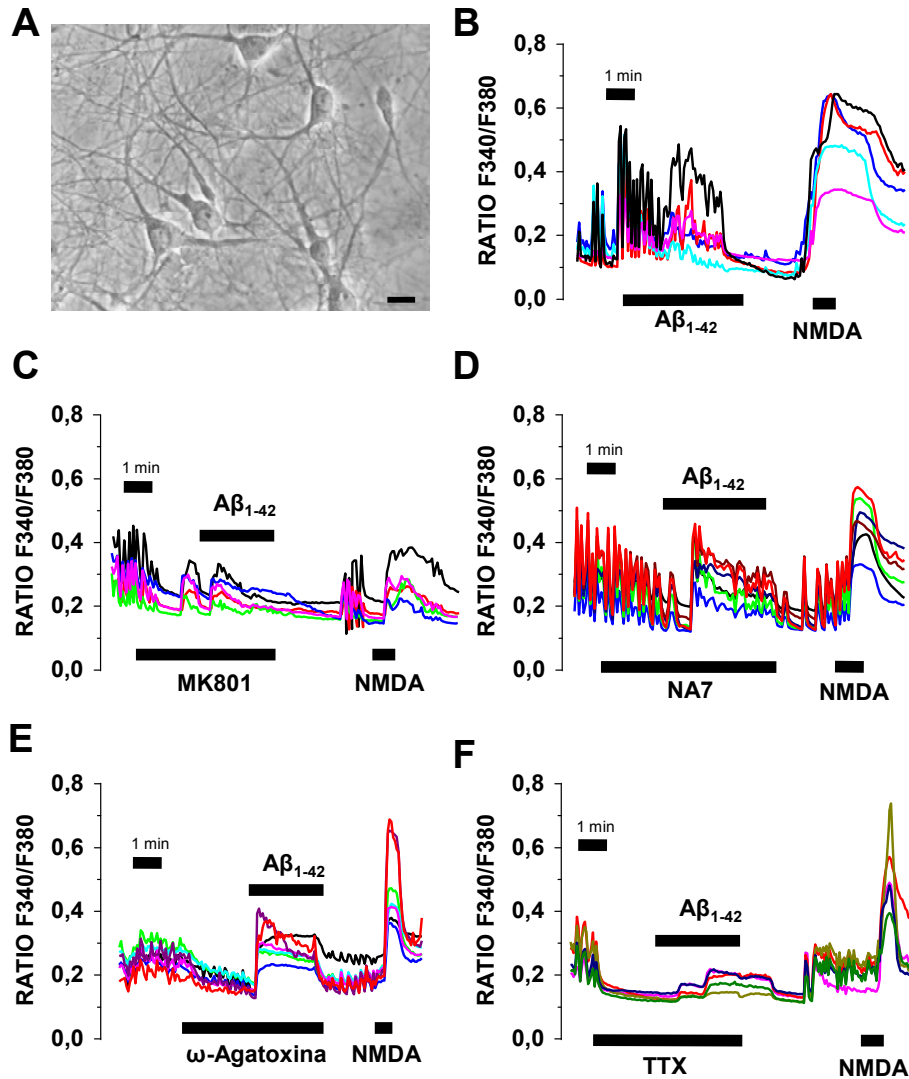


Figura 58. Efectos de los antagonistas de canales de Ca^{2+} sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo a ≥ 7 DIV. (A) Imagen de transmisión del cultivo de granos de cerebelo a ≥ 7 DIV. Los registros representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{cit}$ de células estimuladas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μM) en ausencia (B) y en presencia de distintos antagonistas de canales, incluyendo MK801 10 μM (C), NA7 1 μM (D), ω -Agatoxina 100 nM (E) y TTX 500 nM (F). Los trazos corresponden de 4-6 células individuales representativas de 73, 37, 33, 26 y 45 células estudiadas en 9, 5, 4, 3 y 5 experimentos independientes. La barra de la fotografía representa una escala de 10 μm .

Finalmente se calculó el porcentaje de activación como el producto de la fracción de células que responden por el ΔCa^{2+} de las células que responden. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 59**. Todos los antagonistas incluyendo TTX inhiben los efectos de los oligómeros tras la formación del circuito sugiriendo que los oligómeros reclutan la actividad de los circuitos neuronales. En ausencia de circuito o red neuronal, el antagonista TTX no tiene efecto alguno. Sin embargo, tanto MK801 como NA7, pero no ω -agatoxina inhiben parcialmente la respuesta a los oligómeros. Por tanto, a diferencia de los granos de cerebelo, en neuronas de hipocampo las posibles dianas primarias de los oligómeros y responsables de la entrada de Ca^{2+} serían los canales amiloides y el receptor tipo NMDA. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q también tendrían un papel pero seguramente sería un papel más secundario derivado de su función en la excitabilidad del circuito.

Por tanto, en resumen, los resultados muestran que las posibles vías de entrada de Ca^{2+} inducido por los oligómeros en granos de cerebelo serían el receptor NMDA, el posible canal amiloide y los canales de Ca^{2+} tipo P/Q a 1 DIV; ya que en estas condiciones, no existe circuito y por tanto estaríamos eliminando su contribución en la respuesta dejando al descubierto los canales que realmente estarían involucrados. En neuronas de hipocampo, las posibles vías de entrada de Ca^{2+} inducido por los oligómeros serían el receptor NMDA y el posible canal amiloide. Por tanto, sólo el canal amiloide y el receptor NMDA parecen ser receptores universales de los oligómeros.

Neuronas de hipocampo

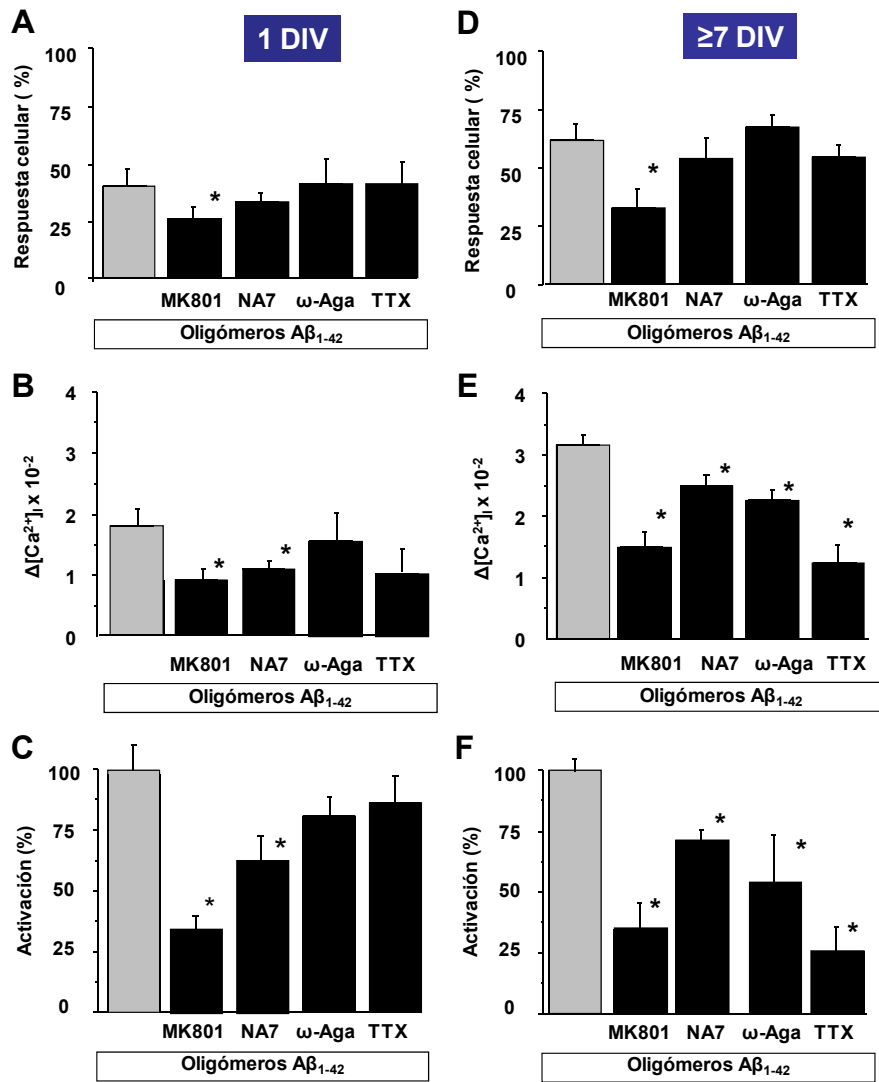


Figura 59. Efectos de los antagonistas de Ca^{2+} sobre la señal de calcio inducida por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Representación en barra del % de respuesta celular inducida por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en solitario y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**A**) y a ≥ 7 DIV (**D**). Representación en barra del $\Delta[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en solitario y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**B**) y a ≥ 7 DIV (**E**). Representación en barra del % de activación inducida por oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en solitario y en presencia de diversos antagonistas a 1 DIV (**C**) y a ≥ 7 DIV (**F**). Las barras son los valores medios \pm EEM de los experimentos de las figuras 57 y 58; * $p < 0,05$

Para descartar posibles efectos inespecíficos comprobamos que, efectivamente, MK801 inhibe completamente el incremento de Ca^{2+} inducido por NMDA. Además, comprobamos que el antagonista NA7 no inhibía en absoluto los incrementos de Ca^{2+} inducidos por NMDA o despolarización con alto K^+ (**Fig. 60**).

Quisimos determinar entonces si la combinación de ambos antagonistas podría inhibir la respuesta a los oligómeros de un modo más eficaz que cada uno de los antagonistas por separado. Los resultados obtenidos muestran que la combinación de MK801 y NA7 inhibe la respuesta a los oligómeros de un modo más eficaz que cada uno de los antagonistas añadidos por separado en granos de cerebelo (**Fig. 61**) y células de hipocampo (**Fig. 62**). El análisis cuantitativo de los resultados se muestra en las **Figs. 63** y **64** para granos de cerebelo y células de hipocampo, respectivamente.

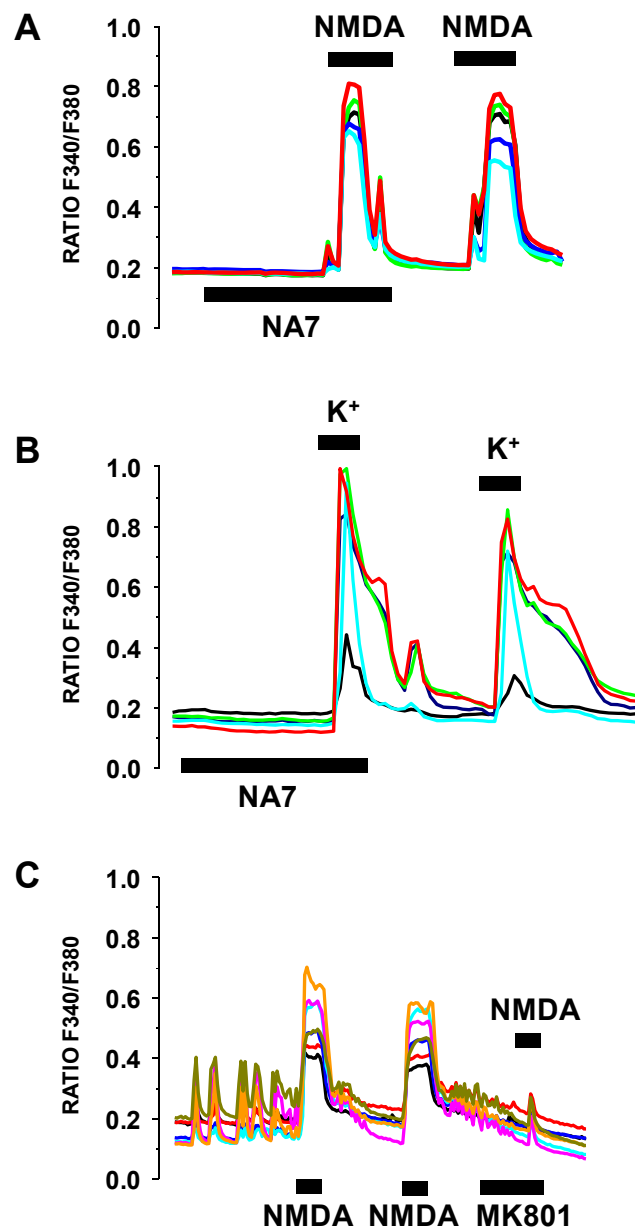


Figura 60. Efectos de los antagonistas MK801 y NA7 sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por NMDA y potasio en neuronas de hipocampo. Los trazos representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas de hipocampo estimuladas con NMDA 100 μ M (A) y K^+ 135 mM (B) en ausencia y en presencia de NA7 1 μ M, datos representativos de 34 y 18 células respectivamente en 3 experimentos independientes. (C), los trazos muestran la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en neuronas estimuladas con NMDA solo y acompañado de MK801 10 μ M, datos representativos de 36 células, 3 experimentos independientes.

Granos de cerebelo

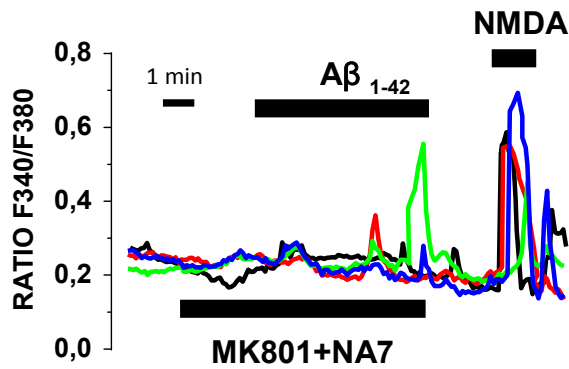


Figura 61. Efecto de la combinación de MK801 y NA7 sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en granos de cerebelo. Los trazos representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en granos de cerebelo estimulados con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μM) en presencia de la combinación de MK801 (10 μM) y NA7 (1 μM) datos representativos de 68 células en 5 experimentos independientes.

Neuronas de hipocampo

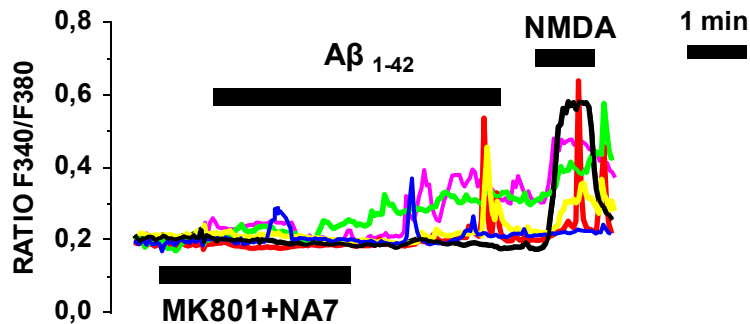


Figura 62. Efectos de la combinación de MK801 y NA7 sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo. Los trazos representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en granos de cerebelo estimulados con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μM) en presencia de la combinación de MK801 (10 μM) y NA7 (1 μM), datos representativos de 72 células en 6 experimentos independientes.

Granos de cerebelo

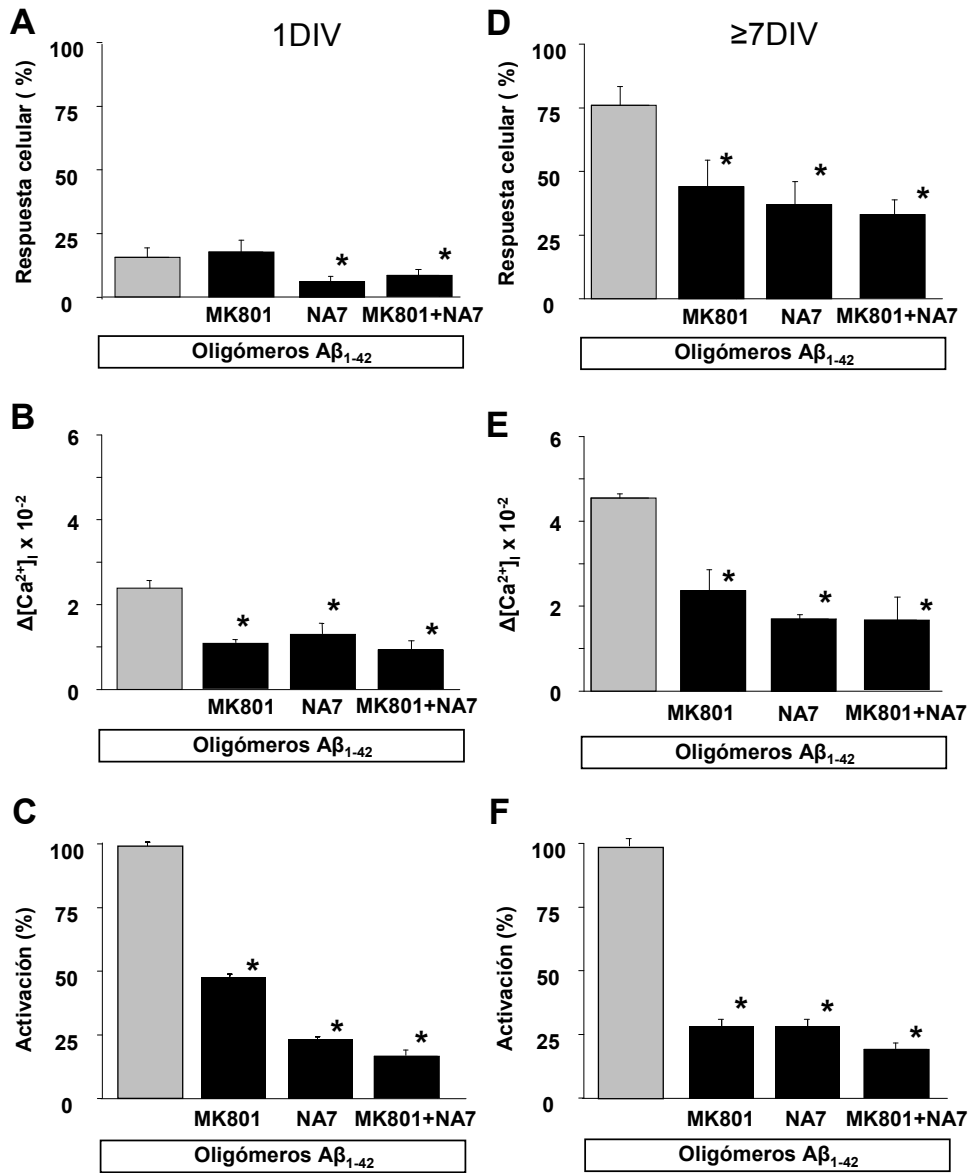


Figura 63. Efectos de la combinación de los antagonistas MK801 y NA7 sobre el incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en granos de cerebelo a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Las barras representan el % de respuesta celular (A, D), el incremento de Ca^{2+} citosólico (B, E) y la activación (C, F) inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μM) en ausencia y en presencia de MK801 (10 μM), NA7 (1 μM) y la combinación de ambos a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Las barras son los valores medios \pm EEM de 5, 7 y 5 experimentos con un total de 262, 196 y 68 células respectivamente a 1 DIV y 4, 9 y 6 experimentos con un total de 115, 240 y 72 células respectivamente a 7 DIV. * $p < 0,05$.

Neuronas de hipocampo

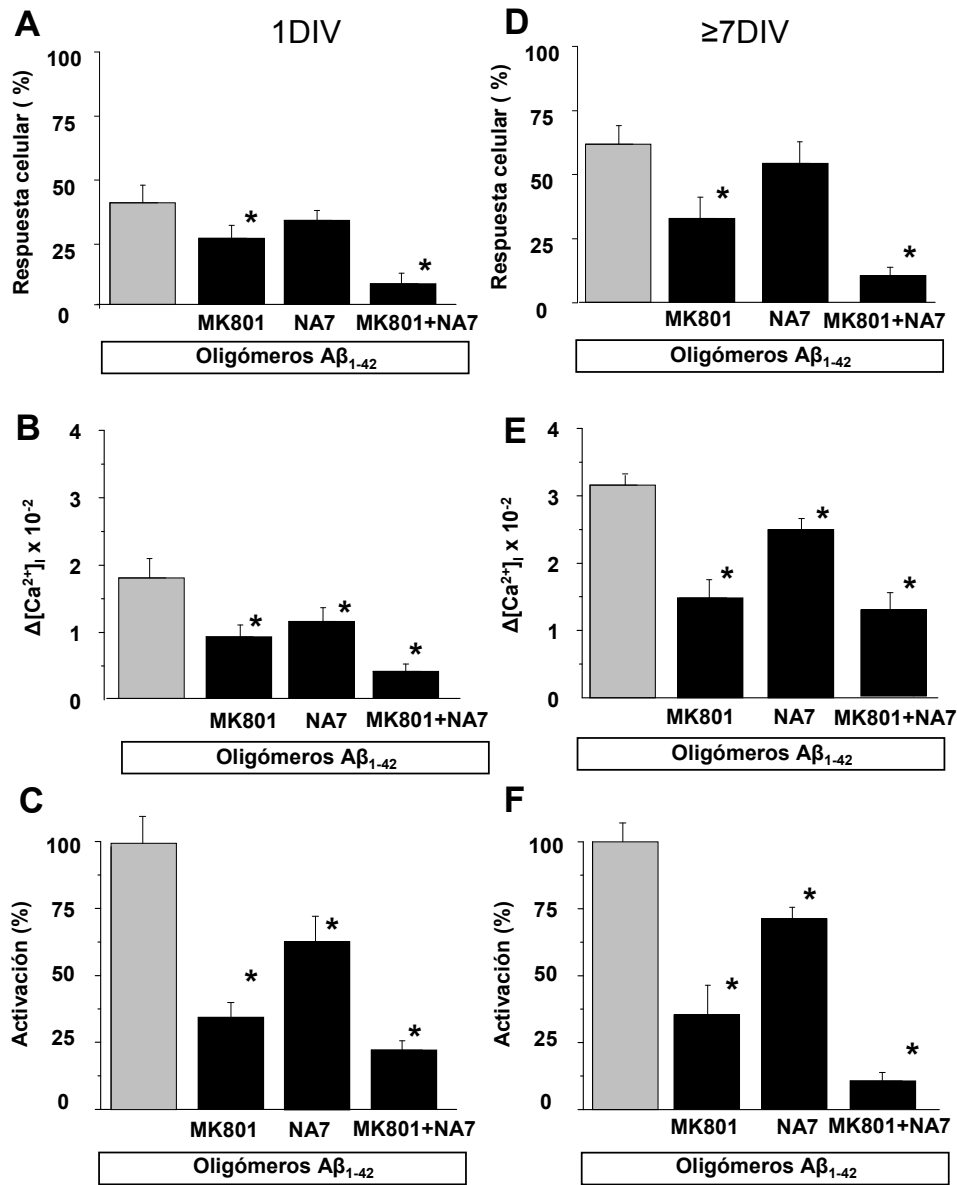


Figura 64. Efectos de la combinación de MK801 y NA7 sobre el incremento de Ca^{2+} inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Las barras representan el % de respuesta celular (A, D), el incremento de Ca^{2+} citosólico (B, E) y la activación (C, F) inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M) en ausencia y presencia de MK801 (10 μ M), NA7 (1 μ M) y la combinación de ambos a 1 DIV y a ≥ 7 DIV. Las barras son los valores medios \pm EEM de 4, 4 y 6 experimentos con un total de 30, 43 y 53 células respectivamente a 1 DIV y 5, 4 y 6 experimentos con un total de 37, 33 y 72 células respectivamente a 7 DIV. * $p < 0,05$.

Los resultados muestran que la combinación de antagonistas (MK801 y NA7) es más eficaz que cualquiera de los antagonistas usados por separado sugiriendo que éstos actúan sobre dianas diferentes. De hecho la combinación de ambos antagonistas inhibe alrededor del 80 % el efecto de los oligómeros sugiriendo que la mayor parte de la entrada de Ca^{2+} se produce a través de la formación de canales amiloides y la activación del receptor NMDA. Sin embargo, los resultados no pueden descartar que MK801 no sea un inhibidor del canal amiloide independientemente de sus efectos sobre el receptor NMDA. Por ello decidimos investigar en más detalle si la expresión del receptor NMDA era necesaria y suficiente para obtener respuesta a los oligómeros. Con este fin decidimos estudiar los efectos de los oligómeros y NMDA en una serie de líneas celulares caracterizadas por la ausencia o presencia de receptores tipo NMDA de forma endógena.

7. Efecto de los oligómeros $\text{A}\beta_{1-42}$ en líneas celulares que expresan o no expresan receptores tipo NMDA.

Se han estudiado los efectos de los oligómeros del péptido amiloide sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cit}}$ en líneas celulares que carecen de receptores tipo NMDA (células de riñón embrionario humano HEK293 y células de carcinoma de colon humano HT29) y en células que expresan receptores tipo NMDA (células adenohipofisarias y células de leucemia humana, células Jurkat). Los resultados se muestran en la **Fig. 65**.

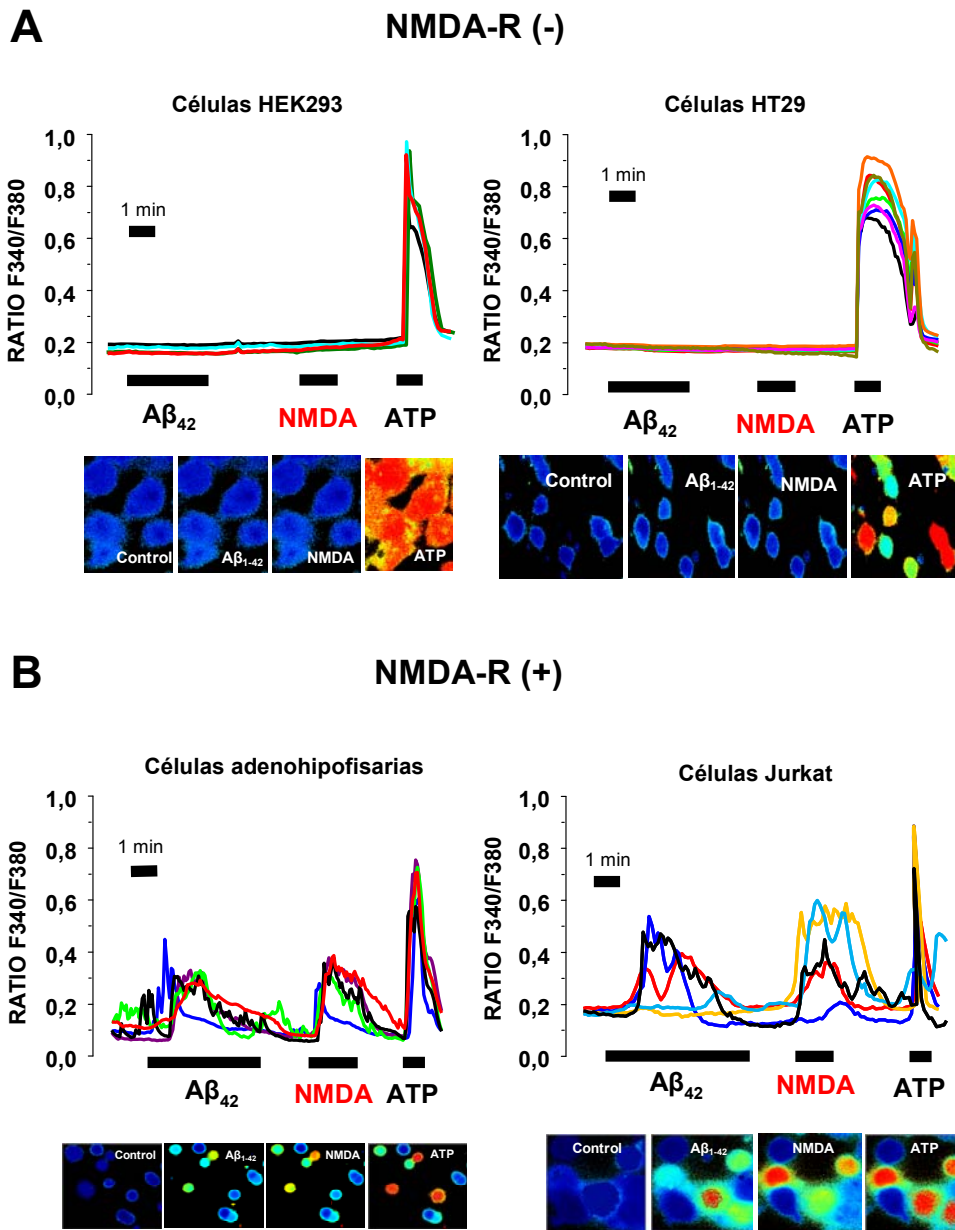


Figura 65. Efecto de los oligómeros del A β_{1-42} en diferentes líneas celulares caracterizadas por la expresión (o ausencia de expresión) de receptores tipo NMDA. Los diferentes tipos celulares (HEK293, HT29, células adenohipofisarias y células Jurkat) fueron cargados con fura-2/AM y utilizadas para registrar los efectos de distintos tratamientos sobre la $[Ca^{2+}]_{ci}$. Las células que carecen de receptor NMDA (**A**) no respondieron a los oligómeros del A β_{1-42} ni a NMDA, pero si a ATP (100 μ M). Las células que expresan receptores NMDA (**B**) responden a los oligómeros y NMDA. Los trazos muestran los registros de 4-8 células representativas de 126, 132, 147 y 98 células estudiadas en 6, 5, 5 y 4 experimentos independientes, respectivamente.

Sorprendentemente encontramos que sólo aquellas células que responden a NMDA (células Jurkat y adenohipofisarias) mostraron respuesta clara a los oligómeros mientras que aquellas células que carecen de respuesta a NMDA, y por tanto, de receptores para NMDA, no mostraron efecto alguno ante los oligómeros. Por tanto, sólo aquellas células que expresan receptores tipo NMDA presentan incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ cuando son estimuladas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, por el contrario, aquellas células que carecen de receptor NMDA parecen insensibles a ellos.

8. Efecto de los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$ en células HEK293 transfectadas con receptores tipo NMDA.

Los resultados anteriores sugieren que la expresión del receptor tipo NMDA es necesaria para la entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Por tanto decidimos estudiar si la expresión exógena del receptor/canal en células que carecen de ellos podría dotar de sensibilidad a los oligómeros. Para ello utilizamos las células HEK293 que carecen del receptor y transfectamos las diferentes subunidades del receptor NMDA. Como ya se comentó en la introducción, el receptor NMDA es bastante complejo en cuanto a su estructura, ya que está formado por diversas subunidades que dan lugar a numerosas combinaciones diferentes. Primeramente transfectamos las células con diferentes subunidades por separado (NR1, NR2A y NR2B) y realizamos experimentos de medida de Ca^{2+} citosólico (**Fig. 66**).

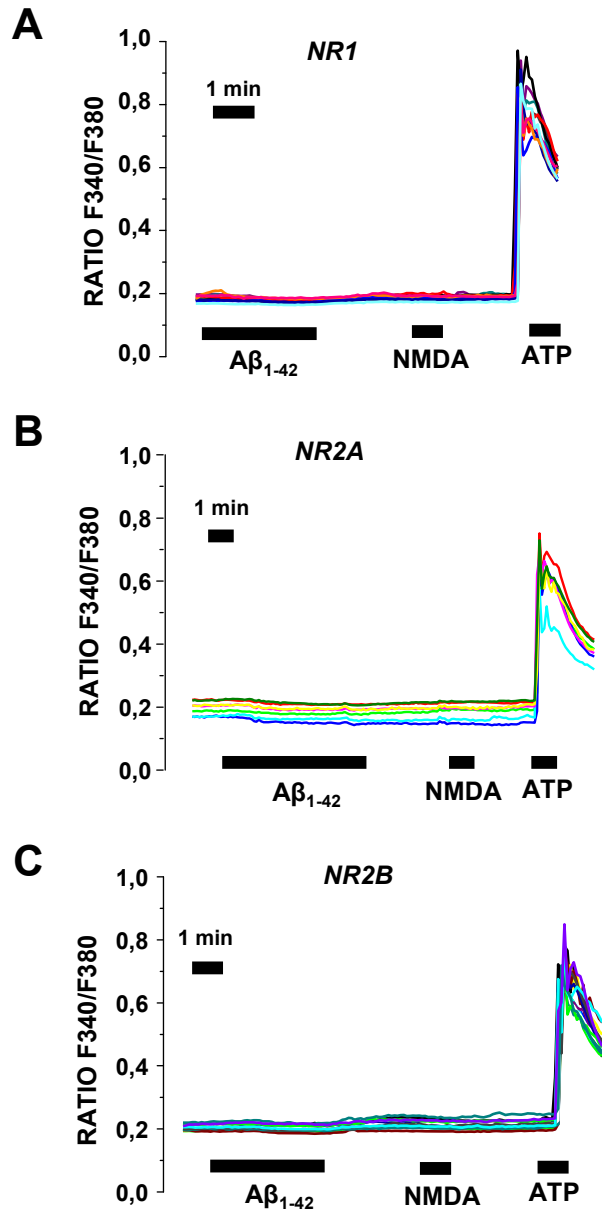


Figura 66. Efectos de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_{CIT}$ en células HEK293 transfectadas con distintas subunidades del receptor NMDA. Los trazos representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{CIT}$ en células HEK293 transfectadas con las subunidades NR1 (A), NR2A (B) y NR2B (C) del receptor NMDA, estimuladas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M), NMDA (100 μ M) y ATP (100 μ M), datos representativos de 184, 153 y 169 células estudiadas en 4 experimentos independientes.

Como ya se ha comentado para que el receptor NMDA sea funcional necesita la subunidad NR1 combinado con NR2A o NR2B. Los resultados muestran que la expresión de una única subunidad no es suficiente para que el agonista NMDA induzca entrada de Ca^{2+} . En estas condiciones los oligómeros tampoco son capaces de inducir entrada de Ca^{2+} (**Fig. 66**).

A continuación co-transfectamos las células con distintas subunidades para que se produjera la formación de un complejo funcional completo. Tanto la combinación de NR1 con NR2A como con NR2B fue capaz de generar receptores/canal funcionales ya que NMDA indujo entrada de Ca^{2+} en ambos casos (**Fig. 67**). Sin embargo, en las células que expresan estos receptores completos (que son los mayoritarios tanto en granos de cerebelo como en neuronas de hipocampo) no se pudo observar efecto alguno de los oligómeros del péptido amiloide (**Fig. 67**). Por tanto, los resultados sugieren que la expresión del receptor NMDA, aunque necesaria, podría no ser suficiente para la entrada de Ca^{2+} .

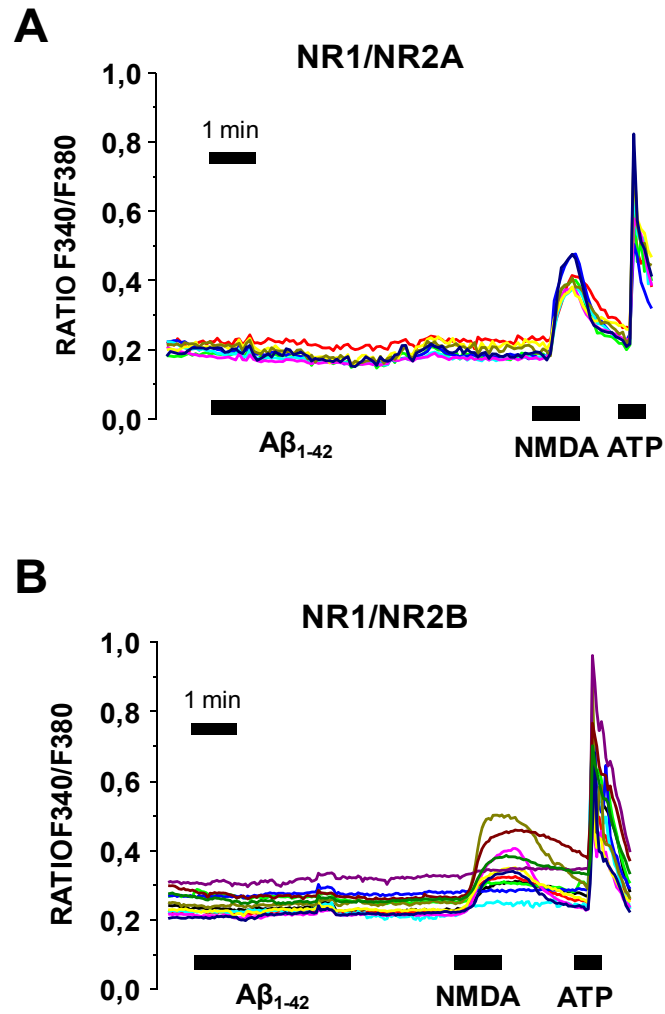


Figura 67. Efectos de los oligómeros de A β_{1-42} sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en células HEK293 transfectadas con distintas subunidades del receptor NMDA. Los trazos representan los niveles de $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en células HEK293, transfectadas con las subunidad NR1/NR2A (**A**) y NR1/NR2B (**B**) del receptor NMDA, estimuladas con oligómeros de A β_{1-42} (2 μ M), NMDA (100 μ M) y ATP (100 μ M), datos representativos de 345 y 367 células estudiadas en 8 experimentos independientes respectivamente.

9. Efecto de los oligómeros $A\beta_{1-42}$ sobre la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ en células GT1.

En base a los resultados obtenidos los cuales sugieren que el receptor NMDA es necesario, pero no suficiente para que los oligómeros induzcan incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol de las células, decidimos realizar los mismos experimentos de imagen de Ca^{2+} en una línea inmortalizada de hipotálamo de rata conocida: las células GT1-7. Estas células son de las pocas líneas inmortalizadas que hay de neuronas y expresan receptores tipo NMDA. Además estos experimentos tienen el interés añadido de que aunque las células tienen un origen neuronal, son un cultivo puro en ausencia de células gliales. La **Fig. 68** muestra que las células GT1-7 responden a NMDA y ATP pero no a los oligómeros del péptido amiloide sugiriendo, de nuevo, que el receptor NMDA no es suficiente para que los oligómeros del péptido amiloide induzcan entrada de Ca^{2+} .

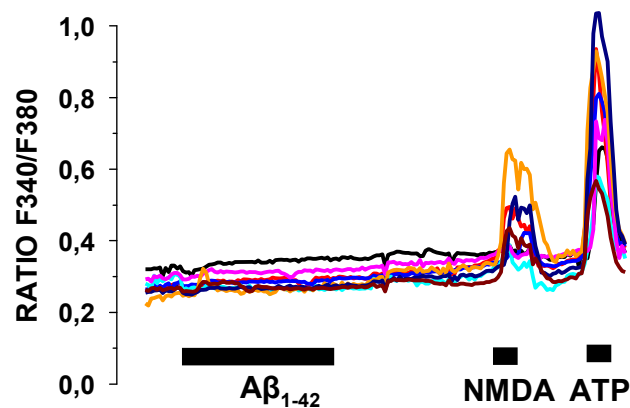


Figura 68. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no inducen incremento de Ca^{2+} citosólico en células GT1-7. Los trazos representan la $[Ca^{2+}]_{Cit}$ de células GT1-7 durante la estimulación con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (2 μ M), NMDA (100 μ M) y ATP (100 μ M). Datos representativos de 218 células estudiadas en 5 experimentos independientes.

V.DISCUSIÓN



La deliberación es trabajo de muchos, la decisión de uno solo
Charles de Gaulle

La disfunción y muerte neuronal característica de la enfermedad de Alzheimer está relacionada con cambios de origen desconocido en el metabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP) que conducen a niveles excesivos de la forma más larga del péptido amiloide, $A\beta_{1-42}$ en lugar de la forma $A\beta_{1-40}$. Aunque cuantitativamente los cambios no son muy importantes, la forma larga es mucho más hidrofóbica que la corta con lo que, a partir de un nivel crítico, la forma más larga tiende a agregar formando dímeros, tetrameros, pentámeros, etc y agregados solubles aun mayores colectivamente denominados oligómeros del péptido amiloide. Estos oligómeros son sinaptotóxicos y neurotóxicos y su toxicidad es mucho mayor que los monómeros o las fibras habiéndose encontrado correlación entre la pérdida cognitiva y la presencia de oligómeros.

Las bases de la acumulación de $A\beta_{1-42}$ son desconocidas pero ésta podría deberse al aumento de la producción del péptido o a defectos en su aclaramiento. En las formas familiares de la enfermedad, el exceso de $A\beta_{1-42}$ se asocia a mutaciones en la proteína APP o en las presenilinas que participan en la actividad γ -secretasa. En las formas esporádicas, mucho más frecuentes y tardías, no se conoce la causa. En algunos casos se cree que el exceso podría deberse más bien a defectos en el aclaramiento debido a la presencia de APoE, una isoforma relacionada con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad. Por todo lo anterior, el mecanismo de neurotoxicidad de los oligómeros del péptido amiloide es de máximo interés para comprender la etiología de la enfermedad.

Recientemente diversos grupos incluyendo el nuestro han propuesto que la neurotoxicidad de los oligómeros podría deberse a los efectos sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Demuro *et al.*, 2005; Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Nuestro grupo describió que los oligómeros preparados de acuerdo al protocolo de Klein y cols inducían una entrada mantenida de Ca^{2+} desde el medio extracelular capaz de provocar una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Datos recientes sugieren que el medio de oligomerización utilizado en la preparación de Klein utilizada por numerosos investigadores podría tener efectos sobre el Ca^{2+} intracelular al contener trazas de glutamato. Nuestros resultados preliminares confirmaron que, aunque ocasionalmente, el medio de preparación de los oligómeros puede inducir una pequeña entrada de Ca^{2+} capaz de contaminar los efectos de los propios oligómeros. Por tanto, el primer objetivo que nos planteamos fue modificar el protocolo de obtención de oligómeros para eliminar toda traza de glutamato y así evitar posibles artefactos. Para ello se hizo necesario modificar el protocolo de formación de oligómeros descrito originalmente por Klein. Partiendo de la base de los protocolos descritos por Aranzio y Wisenwski, respectivamente, hemos obtenido un protocolo híbrido entre ellos que permite obtener con buen rendimiento oligómeros del péptido amiloide de un modo reproducible. Los oligómeros formados por el nuevo protocolo estarían formados fundamentalmente por una mezcla de dímeros, trímeros y tetrámeros que serían los agregados más tempranos que se formarían *in vivo*.

Una vez obtenidos los oligómeros sin posibles contaminantes decidimos estudiar los efectos de estos sobre viabilidad y Ca^{2+} intracelular. Los resultados muestran que los oligómeros inducen el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en granos de cerebelo y neuronas de

hipocampo de rata neonatal. La doble inmunocitoquímica frente a antígenos específicos de neuronas y células de la glía llevada a cabo en las mismas células utilizadas para la imagen de Ca^{2+} confirmó que los oligómeros inducían incrementos de Ca^{2+} específicamente en neuronas pero no en células de la glía. Además, los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ eran abolidos en ausencia de Ca^{2+} extracelular indicando que se debían a la estimulación de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular y no a la liberación del catión desde depósitos intracelulares. Por otro lado, la imagen de bioluminiscencia con aequorina dirigida a mitocondrias mostró que los nuevos oligómeros inducían la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial en las neuronas. Finalmente, los nuevos oligómeros eran capaces de promover apoptosis tal y como demostraron los experimentos de anexina V. Por tanto, los resultados demuestran que los oligómeros del péptido amiloide ($\text{A}\beta_{1-42}$) obtenidos por el nuevo protocolo inducen entrada de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo, pero no en células de la glía, seguida de sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y muerte neuronal por apoptosis. Estos datos son relevantes porque permiten validar y confirmar nuestros resultados previos sugiriendo que los oligómeros inducen muerte neuronal mediante la activación de una vía de entrada de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo.

La cuestión relevante que se plantea inmediatamente es si sería posible detener la muerte neuronal y la progresión de la enfermedad mediante la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} en las neuronas. Para responder esta cuestión se hace necesario identificar la diana molecular y el mecanismo por el que los oligómeros del péptido amiloide inducen entrada de Ca^{2+} en neuronas. En los últimos años se propuso que la diana molecular podrían ser canales de Ca^{2+} , incluyendo receptores de glutamato, especialmente los del tipo NMDA (Klein et al., 2007; Pellistri et al., 2008). Sin embargo, la controversia

sobre el medio utilizado para la oligomerización ha cuestionado seriamente esta posibilidad. Nuestra preparación de oligómeros capaz de inducir sobrecarga de Ca^{2+} en ausencia de trazas de glutamato o de efectos de los medios de preparación de oligómeros nos ha permitido investigar este aspecto de un modo adecuado. Para ello hemos estudiado los efectos de una batería de antagonistas de Ca^{2+} sobre el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en neuronas de hipocampo. Los resultados indican que prácticamente todos los antagonistas utilizados inhiben en mayor o menor medida los efectos de los oligómeros. Este resultado nos lleva a dos posibles escenarios: Los oligómeros podrían interactuar y activar múltiples vías de entrada de Ca^{2+} o, alternativamente, los oligómeros inducen una única vía, pero la estimulación de neuronas conectadas entre si haría que todas se estimulasen aprovechando la maquinaria del circuito neuronal entre las neuronas. Esta segunda posibilidad se ve favorecida por la observación de que los cultivos de neuronas centrales, tanto los formados por granos de cerebelo como los de neuronas de hipocampo son capaces de formar auténticos circuitos neuronales *in vitro*. Por ejemplo, los granos de cerebelo, tras varios días en cultivo, son capaces de generar oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Núñez *et al.*, 1996). Estas oscilaciones pueden aparecer de modo espontáneo pero generalmente se generan al retirar el catión Mg^{2+} del medio extracelular. Como es sabido, el Mg^{2+} bloquea el receptor tipo NMDA de un modo dependiente de voltaje de manera que la retirada del catión favorece la activación de receptores tipo NMDA y la activación de la red. Esta posibilidad se confirma ya que las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} en granos de cerebelo son totalmente abolidas en presencia de MK801 (el antagonista de receptores NMDA), antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo P/Q (requeridos para la exocitosis de glutamato) y el antagonista de canales de Na^+ TTX

requeridos para la propagación de potenciales de acción en los circuitos neuronales (Núñez *et al.*, 1996).

La capacidad de los cultivos de hipocampo de formar redes o circuitos neuronales y sus mecanismos de sincronización son mucho menos conocidos y no han sido caracterizados en detalle. Nuestros resultados muestran que los cultivos celulares de hipocampo de rata neonatal son capaces de formar redes incluso antes que los cultivos de granos de cerebelo. Además, es frecuente observar la sincronización incluso en presencia de Mg^{2+} en el medio extracelular lo que sugiere que, o bien son más excitables que las redes de granos de cerebelo, o bien participan otros receptores excitatorios no inhibidos por Mg^{2+} . Al igual que los circuitos de granos de cerebelo, las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} también son sensibles a MK801, antagonistas de canales P/Q y TTX. Sin embargo, al contrario que en cerebelo, MK801 inhibe sólo parcialmente (50 %) estas oscilaciones, sugiriendo de nuevo que otro tipo de receptores (además de los receptores tipo NMDA) podrían jugar un papel importante en la sincronización de estas células y la formación de circuitos neuronales. Entre los posibles candidatos destacarían los receptores nicotínicos neuronales que también han sido implicados en la enfermedad de Alzheimer. Se requieren experimentos adicionales para determinar el papel de estos receptores en la sincronización neuronal y en la respuesta a los oligómeros.

Nuestros resultados muestran que tanto los cultivos primarios de granos de cerebelo como las neuronas de hipocampo muestran oscilaciones sincrónicas de la concentración de Ca^{2+} . Sin embargo, éstas no son apreciables en ningún caso los primeros días de cultivo y, a partir del 3^{er} o 4^o día *in vitro* (DIV), las oscilaciones empiezan a ser evidentes manifestándose siempre a partir de 7 DIV. Para determinar

la posible contribución de los circuitos decidimos investigar los efectos de los oligómeros en las neuronas antes (1 DIV) y después (7 DIV) de la formación de circuitos. Los resultados muestran que los oligómeros inducen el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ antes y después de la formación de circuitos neuronales. Sin embargo, tanto el número de células que responden a los oligómeros como el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (en las células que responden) es bastante mayor a 7 DIV que a 1 DIV. Este resultado es igualmente cierto tanto en granos de cerebelo como en neuronas de hipocampo. Los datos sugieren que la formación del circuito amplifica la respuesta a los oligómeros. Sin embargo, también podrían ser explicados por el cambio en la expresión de receptores para los oligómeros. Puesto que el receptor tipo NMDA ha sido propuesto como la principal diana de los oligómeros decidimos estudiar, en los mismos experimentos, si la respuesta a NMDA cambiaba de un modo paralelo a la respuesta a los oligómeros. Sin embargo, los resultados muestran que la respuesta a NMDA no se modifica sustancialmente con la formación de circuitos. En resumen, los datos sugieren que la formación de circuitos podría amplificar la respuesta a los oligómeros y, además, la respuesta a los oligómeros está disociada de la respuesta a NMDA.

Para determinar las posibles de entrada de Ca^{2+} inducidas por los oligómeros estudiamos entonces los efectos de una serie de antagonistas antes y después de la formación de circuitos neuronales. Los resultados muestran que TTX, que inhibe la propagación de potenciales de acción, es capaz de inhibir en gran medida el efecto de los oligómeros a 7 DIV pero no tiene ningún efecto a 1 DIV. Estos resultados demuestran que la formación de redes neuronales permite la amplificación de la respuesta a los oligómeros por lo que, necesariamente, cualquier antagonista de la actividad sináptica de las neuronas podría inhibir, aunque sea parcialmente, los efectos de los

oligómeros. Consistentemente, los resultados muestran que tanto el antagonista de los receptores NMDA MK-801 como el antagonista de los canales tipo P/Q ω -agatoxina inhiben el efecto de los oligómeros del mismo modo que inhiben las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} . Sin embargo, a 1 DIV, en ausencia de circuito neuronal, solo MK-801 es capaz de inhibir consistentemente en cerebelo e hipocampo el efecto de los oligómeros. Este dato sugiere que el receptor de NMDA podría actuar no solo como un amplificador de la respuesta, sino también jugar un papel más relevante como diana directa. Los canales tipo P/Q también podrían jugar este papel relevante aunque sólo en cerebelo.

Otra de las posibles dianas de los oligómeros son los llamados canales amiloides que podrían formar los propios oligómeros al insertarse y formar poros selectivos (canales) en la membrana plasmática de algunos tipos celulares. Recientemente, los autores de esta idea original desarrollaron una serie de péptidos capaces de inhibir la actividad de los canales amiloides. Hemos utilizado el más efectivo de estos péptidos, el llamado NA7, para determinar la posible implicación de la formación de canales amiloides en la entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros. NA7 fue capaz de inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros a 7 DIV y este efecto no se debió a la inhibición de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o receptores NMDA. Además NA7 fue capaz de inhibir el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por los oligómeros incluso en ausencia de circuito neuronal.

Los resultados anteriores sugieren, por tanto, que los oligómeros podrían formar canales amiloides y activar neuronas de hipocampo. Esta activación podría propagarse y amplificarse a través de la red neuronal. Estos resultados plantean una serie de preguntas relevantes:

¿Cuál es entonces la diana primaria responsable de la entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros?

¿Es el receptor tipo NMDA o la formación de canales amiloides?

¿Existe algún receptor adicional a estos dos actores principales?

Para contestar a la última de estas preguntas estudiamos los efectos de la combinación de ambos antagonistas NA7 y MK801 sobre los incrementos de Ca^{2+} inducidos por los oligómeros. Los resultados muestran que la combinación de los dos antagonistas tiene efectos aditivos sugiriendo que actuarían por mecanismos distintos. Además, existe un pequeño componente de entre un 10-20% resistente a la combinación de antagonistas, sugiriendo la posibilidad de una posible tercera diana que, en todo caso, tendría un papel minoritario. La **Fig. 69** muestra las posibles rutas de entrada de Ca^{2+} activadas por los oligómeros del péptido amiloide.

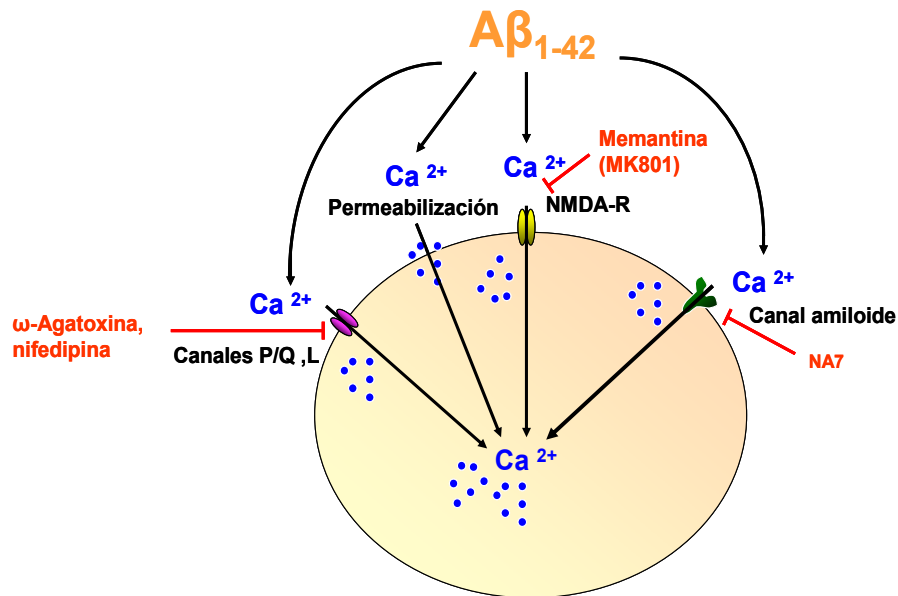


Figura 69. Posibles vías de entrada de Ca^{2+} activadas por los oligómeros del péptido amiloide $\text{A}\beta_{1-42}$. Esquema que representa las posibles vías de Ca^{2+} activadas por los oligómeros. Se ha propuesto que los oligómeros podrían inducir impermeabilización inespecífica de la membrana, activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q y L, activación de receptores tipo NMDA y formación de canales amiloides. Nuestros resultados sugieren que los oligómeros del péptido amiloide inducen primariamente la formación de canales amiloides lo que requiere apareamiento amiloides. Una de ellas nos dice que el propio oligómero produce la permeabilización de la membrana plasmática dejando libre el paso de calcio al interior celular. Otra posible vía de entrada de calcio es a través de canales de calcio dependientes de voltaje como son los de tipo P/Q. Otra posibilidad es que el calcio entre al interior celular a través de canales de tipo NMDA y por último puede que el propio péptido al entrar en contacto con la membrana forme un canal llamado canal amiloide perforando la membrana permitiendo así el paso de calcio.

Finalmente quisimos determinar la relevancia del receptor NMDA en la respuesta a los oligómeros. Para ello utilizamos diversas aproximaciones. En primer lugar estudiamos los efectos de los oligómeros en líneas celulares neuronales y no neuronales caracterizadas por la expresión (o ausencia de expresión) de receptores tipo NMDA. Finalmente estudiamos si la expresión ectópica del receptor NMDA inducía adquisición de respuesta a oligómeros en células carentes de ella.

Los resultados muestran que sólo aquellas líneas celulares que expresan receptores tipo NMDA responden (con un incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$) a los oligómeros indicando que el receptor NMDA es necesario para la respuesta. Finalmente, estudiamos si en células HEK293T que carecen de respuesta a NMDA y no muestran entrada de Ca^{2+} inducida por oligómeros es posible expresar el receptor NMDA y así inducir ganancia de respuesta a los oligómeros. Para ello hemos transfectado estas células con la subunidad NR1 en combinación con las subunidades NR2A y NR2B. La expresión de una única subunidad no permitía la formación de receptores funcionales ya que en estas células NMDA no inducía incremento alguno de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Sin embargo, en aquellas células transfectadas con las dos subunidades era posible obtener respuestas claras a la estimulación con NMDA. Sin embargo, los oligómeros del péptido amiloide no inducían entrada de Ca^{2+} en las células transfectadas. Por lo tanto, el receptor NMDA, aunque pueda ser necesario no sería suficiente para la inducción de entrada de Ca^{2+} por los oligómeros del péptido amiloide. Este extremo fue confirmado en células GT1, una línea neuronal hipotalámica. Estas células que responden a NMDA carecen de respuesta a los oligómeros.

En resumen, proponemos que el mecanismo primario inducido por los oligómeros en neuronas de hipocampo sería la formación de canales amiloides, un proceso que podría requerir la expresión de receptores tipo NMDA. Podría existir un componente adicional no identificado responsable de, al menos, un 25% de la entrada de Ca^{2+} inducida por los oligómeros. La estimulación de la entrada de Ca^{2+} en unas pocas neuronas formando una red neuronal induciría la activación de todas las neuronas conectadas mediante la maquinaria que participa en la red neuronal incluyendo despolarización de neuronas presinápticas, propagación del potencial de acción, activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo P/Q, excitación de neurotransmisores excitatorios, fundamentalmente glutamato, activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y actividad sincrónica de toda la red.

Por tanto, el receptor NMDA y los canales amiloides parecen ser protagonistas principales, dianas primarias en la activación de una entrada de calcio letal para las neuronas. Queda por aclarar la controvertida relación entre los receptores tipo NMDA y la formación de canales amiloides. También queda por aclarar la naturaleza del componente adicional diferente a los canales amiloides y los receptores NMDA que podrían ser responsable de un 20% de la entrada de Ca^{2+} .

VI. CONCLUSIONES

En el fondo de la vida no hay nada más que lo que allí metemos
Ana Sofia Soymonoff de Swetchine

1. El método de formación de oligómeros modificado a partir de los protocolos descritos por Arancio y Wisniewski produce especies solubles del péptido A β ₁₋₄₂ de entre 12 y 17 KDa que aumentan la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en granos de cerebelo y células de hipocampo de rata neonatal.
2. El incremento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por los oligómeros se debe al aumento de la permeabilidad a Ca^{2+} en neuronas, pero no en células de la glía. Esta entrada mantenida promueve la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y la muerte neuronal por apoptosis.
3. Diversos antagonistas de vías de entrada de Ca^{2+} y Na^+ inhiben el incremento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por los oligómeros sugiriendo la participación de múltiples tipos de canales y/o la existencia de un mecanismo de amplificación.
4. Los granos de cerebelo y neuronas de hipocampo de rata neonatal son capaces de formar, tras varios días en cultivo, redes neuronales que se evidencian por la generación de oscilaciones sincrónicas de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediadas por la propagación de la actividad eléctrica, canales de Ca^{2+} tipo P/Q y receptores glutamatérgicos tipo NMDA.
5. El incremento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por los oligómero aumenta dramáticamente con el tiempo de cultivo coincidiendo con la formación de circuitos neuronales. Sin embargo, la respuesta a NMDA no se modifica sustancialmente. Los datos sugieren que los circuitos neuronales amplifican la respuesta a los oligómeros.

6. El efecto de los antagonistas depende de la formación de circuitos neuronales. En ausencia de circuito, sólo los antagonistas del receptor NMDA y el canal amiloide inhiben la entrada de Ca^{2+} inducida por oligómeros en neuronas de hipocampo.
7. Los oligómeros del péptido amiloide inducen entrada de Ca^{2+} sólo en aquellas líneas celulares que expresan receptores tipo NMDA sugiriendo que el receptor NMDA es necesario para la respuesta.
8. La expresión del receptor tipo NMDA en células HEK293 induce la adquisición de respuesta a NMDA pero no a los oligómeros del péptido amiloide. Del mismo modo, las células GT1 responden a NMDA, carecen de respuesta a los oligómeros, sugiriendo que la expresión del receptor de NMDA es necesaria pero no suficiente para la respuesta a los oligómeros.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Independiente siempre, aislado nunca
Hesíodo

- Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchen, M. R.** (2003). Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* 23(12): 5088-95.
- Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchen, M. R.** (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1742(1-3): 81-7.
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G. D., Ruff, E. and Slutsky, I.** (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12(12): 1567-76.
- Adrain, C. and Martin, S. J.** (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26(6): 390-7.
- Akbari, Y., Hitt, B. D., Murphy, M. P., Dagher, N. N., Tseng, B. P., Green, K. N., Golde, T. E. and LaFerla, F. M.** (2004). Presenilin regulates capacitative calcium entry dependently and independently of gamma-secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 322(4): 1145-52.
- Alberca, R y López-Pousa.** (2010). Alzheimer y otras demencias. Ed. Panamericana. 4ª Edición.
- Allen, D. G., Blinks, J. R. and Prendergast, F. G.** (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science* 195(4282): 996-8.
- Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J., Montero, M. and Alvarez, J.** (1999). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144(2): 241-54.
- Alvarez, J. and Montero, M.** (2002). Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium* 32(5-6): 251-60.
- Arispe, N.** (2004). Architecture of the Alzheimer's A beta P ion channel pore. *J Membr Biol* 197(1): 33-48.

- Arispe, N., Diaz, J. C. and Simakova, O.** (2007). Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers. *Biochim Biophys Acta* 1768(8): 1952-65.
- Arispe, N., Pollard, H. B. and Rojas, E.** (1994). The ability of amyloid beta-protein [A beta P (1-40)] to form Ca²⁺ channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747: 256-66.
- Arispe, N., Rojas, E. and Pollard, H. B.** (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 567-71.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. and Hyman, B. T.** (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42(3 Pt 1): 631-9.
- Arriagada, P. V., Marzloff, K. and Hyman, B. T.** (1992). Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42(9): 1681-8.
- Babcock, D. F. and Hille, B.** (1998). Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol* 8(3): 398-404.
- Bacci, A., Verderio, C., Pravettoni, E. and Matteoli, M.** (1999). Synaptic and intrinsic mechanisms shape synchronous oscillations in hippocampal neurons in culture. *Eur J Neurosci* 11(2): 389-97.
- Bacsikai, B. J., Wallen, P., Lev-Ram, V., Grillner, S. and Tsien, R. Y.** (1995). Activity-related calcium dynamics in lamprey motoneurons as revealed by video-rate confocal microscopy. *Neuron* 14(1): 19-28.
- Badminton, M. N., Campbell, A. K. and Rembold, C. M.** (1996). Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺ in HeLa cells. *J Biol Chem* 271(49): 31210-4.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., 3rd, Beer, B. and Lippa, A. S.** (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558): 408-14.

- Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P. and Brulet, P.** (2000). Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7260-5.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., Kotliansky, V. and Mootha, V.K.** (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 341-5.
- Benaim, G. and Romero, P. J.** (1990). A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta* 1027(1): 79-84.
- Bernstein, S. L., Dupuis, N. F., Lazo, N. D., Wyttenbach, T., Condron, M. M., Bitan, G., Teplow, D. B., Shea, J. E., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V. and Bowers, M. T.** (2009). Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* 1(4): 326-31.
- Berridge, M. J.** Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch* 459(3): 441-9.
- Berridge, M. J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410): 315-25.
- Bezprozvanny, I. and Mattson, M. P.** (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 31(9): 454-63.
- Bezprozvanny, I., Scheller, R. H. and Tsien, R. W.** (1995). Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378(6557): 623-6.
- Bezprozvanny, I. and Tsien, R. W.** (1995). Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol Pharmacol* 48(3): 540-9.
- Bezprozvanny, I. B.** Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae* 2(1): 72-82.

- Bierer, L. M., Hof, P. R., Purohit, D. P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K. L. and Perl, D. P.** (1995). Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52(1): 81-8.
- Bird, T. D., Lampe, T. H., Nemens, E. J., Sumi, S. M., Nochlin, D., Schellenberg, G. D. and Wijsman, E. M.** (1989). Characteristics of familial Alzheimer's disease in nine kindreds of Volga German ancestry. *Prog Clin Biol Res* 317: 229-34.
- Blesa, E., Alino, M., Barat, J. M., Grau, R., Toldra, F. and Pagan, M. J.** (2008). Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Sci* 78(1-2): 135-42.
- Blesa, J. R., Hegde, A. A. and Hernandez-Yago, J.** (2008). In vitro methylation of nuclear respiratory factor-2 binding sites suppresses the promoter activity of the human TOMM70 gene. *Gene* 427(1-2): 58-64.
- Blesa, R.** (2000). Galantamine: therapeutic effects beyond cognition. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11 Suppl 1: 28-34.
- Blesa, S., Vernia, S., Garcia-Garcia, A. B., Martinez-Hervas, S., Ivorra, C., Gonzalez-Albert, V., Ascaso, J. F., Martin-Escudero, J. C., Real, J. T., Carmena, R., Casado, M. and Chaves, F. J.** (2008). A new PCSK9 gene promoter variant affects gene expression and causes autosomal dominant hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3577-83.
- Blinks, J. R.** (1978). Applications of calcium-sensitive photoproteins in experimental biology. *Photochem Photobiol* 27(4): 423-32.
- Blinks, J. R., Prendergast, F. G. and Allen, D. G.** (1976). Photoproteins as biological calcium indicators. *Pharmacol Rev* 28(1): 1-93.
- Bojarski, L., Herms, J. and Kuznicki, J.** (2008). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 52(4-5): 621-33.
- Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., McClure, D. B., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G.,**

- Wolfe, R. and Wu, R.** (1979). The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol* 58: 94-109.
- Braak, H. and Braak, E.** (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4): 239-59.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. and Price, P. J.** (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35(5): 567-76.
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$). A critical evaluation. *J Biol Chem* 270(17): 9896-903.
- Brini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (1993). Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *Embo J* 12(12): 4813-9.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C. and Glabe, C.** (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267(1): 546-54.
- Busche, M. A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A. and Garaschuk, O.** (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321(5896): 1686-9.
- Buxbaum, J. D., Ruefli, A. A., Parker, C. A., Cypess, A. M. and Greengard, P.** (1994). Calcium regulates processing of the Alzheimer amyloid protein precursor in a protein kinase C-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4489-93.
- Camandola, S. and Mattson, M. P.** Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 965-73.
- Campos-Esparza, M. R., Sanchez-Gomez, M. V. and Matute, C.** (2009). Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium* 45(4): 358-68.

- Canevari, L., Abramov, A. Y. and Duchen, M. R.** (2004). Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res* 29(3): 637-50.
- Carafoli, E.** (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1115-22.
- Carafoli, E., Garcia-Martin, E. and Guerini, D.** (1996). The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia* 52(12): 1091-100.
- Carrera, I., Etcheverria, I., Fernandez-Novoa, L., Lombardi, V., Cacabelos, R. and Vigo, C.** Vaccine Development to Treat Alzheimer's Disease Neuropathology in APP/PS1 Transgenic Mice. *Int J Alzheimers Dis* 2012: 376138.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J. W., Xu, H. W., Stern, D., McKhann, G. and Yan, S. D.** (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *Faseb J* 19(14): 2040-1.
- Catterall, W. A.** (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-55.
- Caughey, B. and Lansbury, P. T.** (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26: 267-98.
- Chamero, P., Villalobos, C., Alonso, M. T. and Garcia-Sancho, J.** (2002). Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem* 277(52): 50226-9.
- Chan, S. L., Fu, W., Zhang, P., Cheng, A., Lee, J., Kokame, K. and Mattson, M. P.** (2004). Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279(27): 28733-43.
- Chan, S. L., Mayne, M., Holden, C. P., Geiger, J. D. and Mattson, M. P.** (2000). Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* 275(24): 18195-200.

- Chance, B. and Bonner, W. D.** (1965). Kinetics of Cytochrome Oxidation in Skunk Cabbage Mitochondria. *Plant Physiol* 40(6): 1198-204.
- Changeux, J. P., Devillers-Thiery, A. and Chemouilli, P.** (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225(4668): 1335-45.
- Cheung, K. H., Shineman, D., Muller, M., Cardenas, C., Mei, L., Yang, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Lee, V. M. and Foscett, J. K.** (2008). Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* 58(6): 871-83.
- Chinopoulos, C. and Adam-Vizi, V.** (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *Febs J* 273(3): 433-50.
- Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S. and Holtzman, D. M.** (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58(1): 42-51.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., Schoepp, D. D., Paul, S. M., Mennerick, S. and Holtzman, D. M.** (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48(6): 913-22.
- Clapham, D. E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* 131(6): 1047-58.
- Cobbold, P. H.** (1980). Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. *Nature* 285(5765): 441-6.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. and Tsien, R. Y.** (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20(11): 448-55.
- Cummings, J. L.** (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351(1): 56-67.
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A. and LaDu, M. J.** (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277(35): 32046-53.

- de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L. and Hyman, B. T.** Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464(7292): 1201-4.
- de Calignon, A., Spires-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A. and Hyman, B. T.** (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(7): 757-61.
- De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T. and Klein, W. L.** (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282(15): 11590-601.
- de Pedro-Cuesta, J., Virues-Ortega, J., Vega, S., Seijo-Martinez, M., Saz, P., Rodriguez, F., Rodriguez-Laso, A., Rene, R., de las Heras, S. P., Mateos, R., Martinez-Martin, P., Manubens, J. M., Mahillo-Fernandez, I., Lopez-Pousa, S., Lobo, A., Regla, J. L., Gascon, J., Garcia, F. J., Fernandez-Martinez, M., Boix, R., Bermejo-Pareja, F., Bergareche, A., Benito-Leon, J., de Arce, A. and del Barrio, J. L.** (2009). Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: a reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurol* 9: 55.
- DeKosky, S. T. and Marek, K.** (2003). Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 302(5646): 830-4.
- 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(5): 457-64.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I. and Glabe, C. G.** (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280(17): 17294-300.
- Demuro, A., Parker, I. and Stutzmann, G. E.** Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285(17): 12463-8.
- Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C. and Busciglio, J.** (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by

distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* 26(22): 6011-8.

Deshpande, J. K., Siesjo, B. K. and Wieloch, T. (1987). Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7(1): 89-95.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. and Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 336-40.

Diaz, J. C., Linnehan, J., Pollard, H. and Arispe, N. (2006). Histidines 13 and 14 in the Abeta sequence are targets for inhibition of Alzheimer's disease Abeta ion channel and cytotoxicity. *Biol Res* 39(3): 447-60.

Dobson, P. R. and Brown, B. L. (1985). The preparation, culture, and incubation of rat anterior pituitary cells for static and dynamic studies of secretion. *Methods Enzymol* 109: 293-8.

Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 Pt 1: 57-68.

Dupuy, A. M., Mas, E., Ritchie, K., Descomps, B., Badiou, S., Cristol, J. P. and Touchon, J. (2001). The relationship between apolipoprotein E4 and lipid metabolism is impaired in Alzheimer's disease. *Gerontology* 47(4): 213-8.

Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F. and Tsien, R. W. (1995). Ca^{2+} channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca^{2+} interactions. *Neuron* 15(5): 1121-32.

Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M. and Rydel, R. E. (1997). Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 17(20): 7736-45.

Fa, M., Orozco, I. J., Francis, Y. I., Saeed, F., Gong, Y. and Arancio, O. Preparation of oligomeric beta-amyloid₁₋₄₂ and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices. *J Vis Exp*(41).

- Fadeel, B., Ottosson, A. and Pervaiz, S.** (2008). Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ* 15(3): 443-52.
- Ferri, K. F. and Kroemer, G.** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3(11): E255-63.
- Fraser, S. P., Suh, Y. H. and Djamgoz, M. B.** (1997). Ionic effects of the Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci* 20(2): 67-72.
- Friedlander, R. M.** (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 348(14): 1365-75.
- Funato, H., Enya, M., Yoshimura, M., Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y.** (1999). Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation. *Am J Pathol* 155(1): 23-8.
- Garcia, J. M. and Martin, J. L.** (2002). Genetic testing for familial Alzheimer's must be debated. *Bmj* 325(7363): 549.
- Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S., Clarke, E. E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L. H., Ruffolo, S. C., Thornberry, N. A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R. J., Roy, S. and Nicholson, D. W.** (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97(3): 395-406.
- Gervais, J., Soghomonian, J. J., Richard, D. and Rouillard, C.** (1999). Dopamine and serotonin interactions in the modulation of the expression of the immediate-early transcription factor, nerve growth factor-inducible B, in the striatum. *Neuroscience* 91(3): 1045-54.
- Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M. and Yankner, B. A.** (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4(7): 827-31.
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E. and**

- Copani, A.** (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29(34): 10582-7.
- Glabe, C. C.** (2005). Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar A β . *Subcell Biochem* 38: 167-77.
- Glennner, 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(3): 885-90.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E. and Hyman, B. T.** (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41(1): 17-24.
- Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H. and Hyman, B. T.** (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(14): 4491-500.
- Goodman, Y. and Mattson, M. P.** (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 128(1): 1-12.
- Gotz, J., Ittner, L. M., Schonrock, N. and Cappai, R.** (2008). An update on the toxicity of A β in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4(6): 1033-42.
- Green, K. N. and LaFerla, F. M.** (2008). Linking calcium to A β and Alzheimer's disease. *Neuron* 59(2): 190-4.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6): 3440-50.
- Haass, C., Hung, A. Y. and Selkoe, D. J.** (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 11(12): 3783-93.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. and et al.** (1992). Amyloid beta-

peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359(6393): 322-5.

Haass, C. and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 101-12.

Hansen, R. A., Gartlehner, G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G. and Jonas, D. E. (2008). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging* 3(2): 211-25.

Hardy, J. (2002). Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging* 23(6): 1073-4.

Hartmann, H., Eckert, A. and Muller, W. E. (1993). beta-Amyloid protein amplifies calcium signalling in central neurons from the adult mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 194(3): 1216-20.

Hendrie, H. C., Osuntokun, B. O., Hall, K. S., Ogunniyi, A. O., Hui, S. L., Unverzagt, F. W., Gureje, O., Rodenberg, C. A., Baiyewu, O. and Musick, B. S. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. *Am J Psychiatry* 152(10): 1485-92.

Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A. and Butterfield, D. A. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3270-4.

Hjelmfelt, A. and Ross, J. (1994). Pattern recognition, chaos, and multiplicity in neural networks of excitable systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1): 63-7.

Ho, C. C., Rideout, H. J., Ribe, E., Troy, C. M. and Dauer, W. T. (2009). The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J Neurosci* 29(4): 1011-6.

Hollenbeck, P. J. and Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411-9.

- in t' Veld, B. A., Ruitenbergh, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., Breteler, M. M. and Stricker, B. H.** (2001). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 345(21): 1515-21.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., Albert, M. S., Hyman, B. T. and Irizarry, M. C.** (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62(6): 925-31.
- Itkin, A., Dupres, V., Dufrene, Y. F., Bechinger, B., Ruyschaert, J. M. and Raussens, V.** Calcium ions promote formation of amyloid beta-peptide₍₁₋₄₀₎ oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One* 6(3): e18250.
- Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T. J., McPhie, D. L., Tofel-Grehl, B., Gibson, G. E. and Alkon, D. L.** (1994). Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 534-8.
- Janciauskiene, S., Wright, H. T. and Lindgren, S.** (1999). Fibrillar Alzheimer's amyloid peptide Abeta(1-42) stimulates low density lipoprotein binding and cell association, free radical production and cell cytotoxicity in PC12 cells. *Neuropeptides* 33(6): 510-6.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T., Jr.** (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32(18): 4693-7.
- Joachim, C., Games, D., Morris, J., Ward, P., Frenkel, D. and Selkoe, D.** (1991). Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques. *Am J Pathol* 138(2): 373-84.
- Jorm, A. F., Korten, A. E. and Henderson, A. S.** (1987). The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand* 76(5): 465-79.
- Kagan, B. L., Azimov, R. and Azimova, R.** (2004). Amyloid peptide channels. *J Membr Biol* 202(1): 1-10.
- Kamal, A. and Goldstein, L. S.** (2000). Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 12(4): 503-8.

- Kawahara, M. and Kuroda, Y.** (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull* 53(4): 389-97.
- Kawahara, M., Kuroda, Y., Arispe, N. and Rojas, E.** (2000). Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem* 275(19): 14077-83.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W. and Glabe, C. G.** (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-9.
- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J. and Glabe, C.** (2009). Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem* 284(7): 4230-7.
- Keizer, J., Li, Y. X., Stojilkovic, S. and Rinzel, J.** (1995). InsP₃-induced Ca²⁺ excitability of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 6(8): 945-51.
- Keller, J. N., Pang, Z., Geddes, J. W., Begley, J. G., Germeyer, A., Waeg, G. and Mattson, M. P.** (1997). Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 69(1): 273-84.
- Kelly, B. L. and Ferreira, A.** (2006). beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281(38): 28079-89.
- Kendall, J. M., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. L. and Campbell, A. K.** (1992). Engineering the CA(2+)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 187(2): 1091-7.
- Khachaturian, Z. S.** (1987). Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol Aging* 8(4): 345-6.

- Khachaturian, Z. S.** (1994). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747: 1-11.
- Kim, Y. M., Talanian, R. V. and Billiar, T. R.** (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272(49): 31138-48.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J.** (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6382-7.
- Kitamura, H., Shimizu, A., Masuda, Y., Ishizaki, M., Sugisaki, Y. and Yamanaka, N.** (1998). Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp Nephrol* 6(4): 328-36.
- Klein, T., Magerl, W., Nickel, U., Hopf, H. C., Sandkuhler, J. and Treede, R. D.** (2007). Effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine on perceptual correlates of long-term potentiation within the nociceptive system. *Neuropharmacology* 52(2): 655-61.
- Klein, W. L.** (2002). Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5): 345-52.
- Klein, W. L., Krafft, G. A. and Finch, C. E.** (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24(4): 219-24.
- Klein, W. L., Stine, W. B., Jr. and Teplow, D. B.** (2004). Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25(5): 569-80.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K. D., Smith, S. J., Kim, M. L., Lee, V. M., Hyman, B. T. and Spire-Jones, T. L.** (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(10): 4012-7.
- Korde, A. S., Pettigrew, L. C., Craddock, S. D. and Maragos, W. F.** (2005). The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol

attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 94(6): 1676-84.

Kruman, Il and Mattson, M. P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 72(2): 529-40.

Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H. Y., Hyman, B. T. and Bacskai, B. J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59(2): 214-25.

Kumar, S., Rezaei-Ghaleh, N., Terwel, D., Thal, D. R., Richard, M., Hoch, M., Mc Donald, J. M., Wullner, U., Glebov, K., Heneka, M. T., Walsh, D. M., Zweckstetter, M. and Walter, J. Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Embo J* 30(11): 2255-65.

Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24(45): 10191-200.

LaFerla, F. M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3(11): 862-72.

LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8(7): 499-509.

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-53.

Larner, A. J. (1997). The cerebellum in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8(4): 203-9.

- Lawrie, A. M., Graham, M. E., Thorn, P., Gallacher, D. V. and Burgoyne, R. D.** (1993). Synchronous calcium oscillations in cerebellar granule cells in culture mediated by NMDA receptors. *Neuroreport* 4(5): 539-42.
- Lecoeur, H., Chauvier, D., Langonne, A., Rebouillat, D., Brugg, B., Mariani, J., Edelman, L. and Jacotot, E.** (2004). Dynamic analysis of apoptosis in primary cortical neurons by fixed- and real-time cytofluorometry. *Apoptosis* 9(2): 157-69.
- Leissring, M. A., Parker, I. and LaFerla, F. M.** (1999). Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J Biol Chem* 274(46): 32535-8.
- Lobo, A., Launer, L. J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M. M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., Soininen, H. and Hofman, A.** (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54(11 Suppl 5): S4-9.
- Lucassen, P. J., Tilders, F. J., Salehi, A. and Swaab, D. F.** (1997). Neuropeptides vasopressin (AVP), oxytocin (OXT) and corticotropin-releasing hormone (CRH) in the human hypothalamus: activity changes in aging, Alzheimer's disease and depression. *Aging (Milano)* 9(4 Suppl): 48-50.
- Ludin, B. and Matus, A.** "GFP in motion." from <http://forward.library.wisconsin.edu/catalog/ocm40762178>.
- Malaplate-Armand, C., Florent-Bechard, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J. L., Oster, T. and Pillot, T.** (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23(1): 178-89.
- 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(9): 1437-49.

- Mantyh, P. W., Ghilardi, J. R., Rogers, S., DeMaster, E., Allen, C. J., Stimson, E. R. and Maggio, J. E.** (1993). Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem* 61(3): 1171-4.
- Marx, J.** (2007). Alzheimer's disease. Fresh evidence points to an old suspect: calcium. *Science* 318(5849): 384-5.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K.** (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12): 4245-9.
- Mattson, M. P.** (1994). Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mistreatment, free radicals, and metabolic compromise. *Ann N Y Acad Sci* 747: 50-76.
- Mattson, M. P.** (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6(3): 337-50.
- Mattson, M. P.** (2007). Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem Res* 32(4-5): 707-15.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E.** (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12(2): 376-89.
- Mattson, M. P., Engle, M. G. and Rychlik, B.** (1991). Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol* 15(2): 117-42.
- Mattson, M. P., Rydel, R. E., Lieberburg, I. and Smith-Swintosky, V. L.** (1993). Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. *Ann N Y Acad Sci* 679: 1-21.
- Matute, C.** Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. *Cell Calcium* 47(2): 150-7.
- 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(6): 860-6.

Meyer, M. (1990). [Importance of the interaction of surface receptors with the cytoskeleton for platelet function]. *Acta Histochem Suppl* 39: 319-25.

Mironov, S. L., Ivannikov, M. V. and Johansson, M. (2005). [Ca^{2+}]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 280(1): 715-21.

Mitchell, K. J., Pinton, P., Varadi, A., Tacchetti, C., Ainscow, E. K., Pozzan, T., Rizzuto, R. and Rutter, G. A. (2001). Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca^{2+} store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol* 155(1): 41-51.

Mitchell, P. and Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213(5072): 137-9.

Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2(2): 57-61.

Mucke, L. (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* 461(7266): 895-7.

Murphy, T. H., Worley, P. F., Nakabeppu, Y., Christy, B., Gastel, J. and Baraban, J. M. (1991). Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57(6): 1862-72.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457(7232): 981-9.

Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362(6415): 75-9.

- Norenberg, M. D. and Rao, K. V.** (2007). The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* 50(7-8): 983-97.
- Nunez, L., Sanchez, A., Fonteriz, R. I. and Garcia-Sancho, J.** (1996). Mechanisms for synchronous calcium oscillations in cultured rat cerebellar neurons. *Eur J Neurosci* 8(1): 192-201.
- Nunez, L., Senovilla, L., Sanz-Blasco, S., Chamero, P., Alonso, M. T., Villalobos, C. and Garcia-Sancho, J.** (2007). Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons. *J Physiol* 580(Pt. 2): 385-95.
- Orth, M. and Schapira, A. H.** (2001). Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 106(1): 27-36.
- Palmer, A. M. and Burns, M. A.** (1994). Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res* 645(1-2): 338-42.
- Pearson, H. E., Sonstein, W. J. and Stoffler, D. J.** (1991). Selectivity of kainic acid as a neurotoxin within the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat: a model for transneuronal retrograde degeneration. *J Neurocytol* 20(5): 376-86.
- Pellistri, F., Bucciantini, M., Relini, A., Nosi, D., Gliozzi, A., Robello, M. and Stefani, M.** (2008). Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca²⁺ increase in primary neuronal cells. *J Biol Chem* 283(44): 29950-60.
- Pendlebury, W. W. and Solomon, P. R.** (1996). Alzheimer's disease. *Clin Symp* 48(3): 2-32.
- Pereira, C., Ferreiro, E., Cardoso, S. M. and de Oliveira, C. R.** (2004). Cell degeneration induced by amyloid-beta peptides: implications for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23(1-2): 97-104.
- Perez-Otano, I., McMillian, M. K., Chen, J., Bing, G., Hong, J. S. and Pennypacker, K. R.** (1996). Induction of NF- κ B-like transcription factors in brain areas susceptible to kainate toxicity. *Glia* 16(4): 306-15.

- Philipson, L.** (2002). Functional modules of the brain. *J Theor Biol* 215(1): 109-19.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W.** (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13(4): 1676-87.
- Podlisny, M. B., Tolan, D. R. and Selkoe, D. J.** (1991). Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138(6): 1423-35.
- Poirier, J.** (2005). Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26(3): 355-61.
- Polydoro, M., Acker, C. M., Duff, K., Castillo, P. E. and Davies, P.** (2009). Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci* 29(34): 10741-9.
- Portela Romero, M., Pombo Romero, J., Bugarin Gonzalez, R., Tasende Souto, M. and Represa Veiga, S.** (2005). [Use of acetylcholinesterase inhibitors and memantine in Alzheimer-type dementia]. *Rev Esp Salud Publica* 79(6): 665-72.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J. and Lal, R.** (2005). Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10427-32.
- Rajkumar, S., Kumar, S. and Thara, R.** (1997). Prevalence of dementia in a rural setting: A report from India. *Int J Geriatr Psychiatry* 12(7): 702-7.
- Randall, A. and Tsien, R. W.** (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15(4): 2995-3012.
- Reddy, P. H. and Beal, M. F.** (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14(2): 45-53.

- Ribe, E. M., Perez, M., Puig, B., Gich, I., Lim, F., Cuadrado, M., Sesma, T., Catena, S., Sanchez, B., Nieto, M., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Cabodevilla, F., Samaranch, L., Ortiz, L., Perez, A., Ferrer, I., Avila, J. and Gomez-Isla, T.** (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 20(3): 814-22.
- Ridgway, E. B. and Ashley, C. C.** (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 29(2): 229-34.
- Rizzuto, R.** (2001). Intracellular Ca^{2+} pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 306-11.
- Rizzuto, R., Bernardi, P. and Pozzan, T.** (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1: 37-47.
- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. and Pozzan, T.** (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358(6384): 325-7.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S. and McConlogue, L.** (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10(12): 1317-24.
- Rogers, K. L., Stinnakre, J., Agulhon, C., Jublot, D., Shorte, S. L., Kremer, E. J. and Brulet, P.** (2005). Visualization of local Ca^{2+} dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur J Neurosci* 21(3): 597-610.
- Ross, C. A., Meldolesi, J., Milner, T. A., Satoh, T., Supattapone, S. and Snyder, S. H.** (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 339(6224): 468-70.
- Rossi, L., Squitti, R., Pasqualetti, P., Marchese, E., Cassetta, E., Forastiere, E., Rotilio, G., Rossini, P. M. and Finazzi-Agro, A.** (2002). Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase

activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett* 329(2): 137-40.

Roth, K. A. and D'Sa, C. (2001). Apoptosis and brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(4): 261-6.

Santiago, A. R., Carvalho, C. M., Carvalho, A. P. and Ambrosio, A. F. (2008). Differential contribution of L-, N-, and P/Q-type calcium channels to $[Ca^{2+}]_i$ changes evoked by kainate in hippocampal neurons. *Neurochem Res* 33(8): 1501-8.

Sanz-Blasco, S., Valero, R. A., Rodriguez-Crespo, I., Villalobos, C. and Nunez, L. (2008). Mitochondrial Ca^{2+} overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS One* 3(7): e2718.

Selkoe, D. J. (1991). Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature* 354(6353): 432-3.

Selkoe, D. J. (1991). Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* 265(5): 68-71, 74-6, 78.

Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6(4): 487-98.

Selkoe, D. J. (2007). Developing preventive therapies for chronic diseases: lessons learned from Alzheimer's disease. *Nutr Rev* 65(12 Pt 2): S239-43.

Sepulveda, F. J., Bustos, F. J., Inostroza, E., Zuniga, F. A., Neve, R. L., Montecino, M. and van Zundert, B. Differential roles of NMDA Receptor Subtypes NR2A and NR2B in dendritic branch development and requirement of RasGRF1. *J Neurophysiol* 103(4): 1758-70.

Sepulveda, F. J., Parodi, J., Peoples, R. W., Opazo, C. and Aguayo, L. G. Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* 5(7): e11820.

Shastry, B. S. and Giblin, F. J. (1999). Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 48(2): 121-7.

Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent

protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39.

Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. and et al. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258(5079): 126-9.

Simakova, O. and Arispe, N. J. (2006). Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's Abeta result from the initial formation and function of Abeta ion channels. *Biochemistry* 45(18): 5907-15.

Simpson, P. B. (2000). The local control of cytosolic Ca²⁺ as a propagator of CNS communication--integration of mitochondrial transport mechanisms and cellular responses. *J Bioenerg Biomembr* 32(1): 5-13.

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K. and Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8): 1051-8.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S. and Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* 24(20): 3624-34.

Sokolov, Y., Kozak, J. A., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C. and Hall, J. E. (2006). Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *J Gen Physiol* 128(6): 637-47.

Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E. and Katzav, T. (1996). Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 452-5.

Solomon, P. R., Knapp, M. J., Gracon, S. I., Groccia, M. and Pendlebury, W. W. (1996). Long-term tacrine treatment in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 348(9022): 275-6.

Spires, T. L., Orne, J. D., SantaCruz, K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Ashe, K. H. and Hyman, B. T. (2006). Region-specific

dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 168(5): 1598-607.

Spires-Jones, T. L., de Calignon, A., Matsui, T., Zehr, C., Pitstick, R., Wu, H. Y., Osetek, J. D., Jones, P. B., Bacskai, B. J., Feany, M. B., Carlson, G. A., Ashe, K. H., Lewis, J. and Hyman, B. T. (2008). In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons. *J Neurosci* 28(4): 862-7.

Stokin, G. B., Lillo, C., Falzone, T. L., Brusch, R. G., Rockenstein, E., Mount, S. L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D. S. and Goldstein, L. S. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307(5713): 1282-8.

Stutzmann, G. E. (2007). The pathogenesis of Alzheimer's disease is it a lifelong "calciumopathy" *Neuroscientist* 13(5): 546-59.

Stutzmann, G. E., Caccamo, A., LaFerla, F. M. and Parker, I. (2004). Dysregulated IP₃ signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J Neurosci* 24(2): 508-13.

Su, J. H., Anderson, A. J., Cummings, B. J. and Cotman, C. W. (1994). Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5(18): 2529-33.

Supattapone, S., Danoff, S. K., Theibert, A., Joseph, S. K., Steiner, J. and Snyder, S. H. (1988). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22): 8747-50.

Supattapone, S., Worley, P. F., Baraban, J. M. and Snyder, S. H. (1988). Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 263(3): 1530-4.

Supnet, C. and Bezprozvanny, I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium* 47(2): 183-189.

Takenaka, H., Zhang, K., Diaz-Sanchez, D., Tsien, A. and Saxon, A. (1995). Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects

on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 95(1 Pt 1): 103-15.

- Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M. and Danni, O.** (2003). Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 35(1): 45-58.
- Tanzi, R. E.** (2005). The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 8(8): 977-9.
- Taylor, C. W., da Fonseca, P. C. and Morris, E. P.** (2004). IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci* 29(4): 210-9.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A. and Katzman, R.** (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30(4): 572-80.
- Thinakaran, G. and Koo, E. H.** (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283(44): 29615-9.
- Townsend, K. P. and Pratico, D.** (2005). Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Faseb J* 19(12): 1592-601.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D., Bley, K. and Fox, A.** (1995). Reflections on Ca⁽²⁺⁾-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18(2): 52-4.
- Tsien, R. W. and Tsien, R. Y.** (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 6: 715-60.
- Tsien, R. Y.** (1988). Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci* 11(10): 419-24.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S. F., Hao, Y. H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G. and Bezprozvanny, I.** (2006). Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126(5): 981-93.

- Villalobos, C. and Garcia-Sancho, J.** (1995). Capacitative Ca^{2+} entry contributes to the Ca^{2+} influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Pflugers Arch* 430(6): 923-35.
- Villalobos, C., Nunez, L., Chamero, P., Alonso, M. T. and Garcia-Sancho, J.** (2001). Mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations driven by local high $[\text{Ca}^{2+}]$ domains generated by spontaneous electric activity. *J Biol Chem* 276(43): 40293-7.
- Villalobos, C., Nunez, L., Montero, M., Garcia, A. G., Alonso, M. T., Chamero, P., Alvarez, J. and Garcia-Sancho, J.** (2002). Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *Faseb J* 16(3): 343-53.
- Virues-Ortega, J., Rodriguez-Blazquez, C., Micheli, F., Carod-Artal, F. J., Serrano-Duenas, M. and Martinez-Martin, P.** Cross-cultural evaluation of the modified Parkinson Psychosis Rating Scale across disease stages. *Mov Disord* 25(10): 1391-8.
- Walsh, D. M. and Selkoe, D. J.** (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101(5): 1172-84.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. and Selkoe, D. J.** (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39(35): 10831-9.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B. and Zheng, H.** (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25(5): 1219-25.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z. and Zheng, H.** (2009). Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci* 29(35): 10788-801.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E. and Koo, E. H.** (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414(6860): 212-6.

- Wei, W., Nguyen, L. N., Kessels, H. W., Hagiwara, H., Sisodia, S. and Malinow, R.** Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13(2): 190-6.
- Wheeler, D. B., Randall, A., Sather, W. A. and Tsien, R. W.** (1995). Neuronal calcium channels encoded by the alpha 1A subunit and their contribution to excitatory synaptic transmission in the CNS. *Prog Brain Res* 105: 65-78.
- Wisniewski, M. L., Hwang, J. and Bahr, B. A.** Submicromolar A β_{42} reduces hippocampal glutamate receptors and presynaptic markers in an aggregation-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* 1812(12): 1664-74.
- Yano, K., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V.** (2004). Dual sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic Ca $^{2+}$ -ATPase to cytosolic and endoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ as a mechanism of modulating cytosolic Ca $^{2+}$ oscillations. *Biochem J* 383(Pt 2): 353-60.
- Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J. and Selkoe, D. J.** (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 27(52): 14459-69.
- Yuste, R. and Denk, W.** (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375(6533): 682-4.
- Zaidan, E. and Sims, N. R.** (1994). The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Neurochem* 63(5): 1812-9.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M.** A β oligomers cause localized Ca $^{2+}$ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30(36): 11938-50.
- Zhang, J. T.** (1993). [Altered calcium homeostasis in brain aging and senile dementia, new approach to treat Alzheimer's disease]. *Yao Xue Xue Bao* 28(9): 641-6.
- Zhu, Y. J., Lin, H. and Lal, R.** (2000). Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged

human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity. *Faseb J* 14(9): 1244-54.