

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
y Genética



**Estudio de la neuroprotección por trímeros de
N-alquilglicina frente a excitotoxicidad y
neurodegeneración mediada por la proteína
amiloidea: mecanismos de acción**

Memoria de Tesis Doctoral presentada
por D^a Elvira Valera Martín para optar
al grado de Doctor

Badajoz, 2006

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



**Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular y Genética
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias**

Avda de Elvas s/n
06080 – Badajoz
Teléfono/Fax: 924 289419
Correo electrónico: jmmerino@unex.es

JAIME MARÍA MERINO FERNÁNDEZ, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “Estudio de la neuroprotección por trómeros de N-alquilglicina frente a excitotoxicidad y neurodegeneración mediada por la proteína amiloidea: mecanismos de acción”, del que es autora D^a Elvira Valera Martín, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, y que una vez revisada la memoria presentada, como Director del trabajo considero que posee las condiciones requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral. Por todo ello,

AUTORIZA:

Su presentación y defensa frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 778/1998 de 30 de abril.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Badajoz, a dieciséis de enero de dos mil seis.

Fdo.: Jaime María Merino Fernández

Agradecimientos

Elvira Valera Martín ha sido beneficiaria de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (Resolución de 10 de abril de 2001, BOE nº 105).



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con proyectos de la Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Extremadura (IPR99C018, 2PR04A061), de la Universidad de Extremadura (Programa Propio A.II.1) y Fundación La Caixa (01/05-00).



Las N-alquilglicinas empleadas en este trabajo han sido suministradas por el Dr. Ángel Messeguer (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales, CSIC, Barcelona) y por DiverDrugs S.L.



Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido posible también gracias a la estimable ayuda (material de laboratorio, reactivos, uso de aparatos, sugerencias) de otros investigadores que a continuación relacionamos:

Dr. Antonio Ferrer Montiel (Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández)

Dr. Pedro María Fernández Salguero (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Extremadura)

Dra. Ilda Casimiro Felicio, Dr. Pedro Casero Linares y Dr. Gervasio Martín Partido (Departamento de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal, Universidad de Extremadura)

Dr. Manuel Ramírez Fernández (Departamento de Microbiología, Universidad de Extremadura)

Esta Tesis Doctoral es el fruto de varios años de esfuerzo y dedicación exclusiva, que no habrían sido posibles sin la entrega y apoyo de muchos amigos y compañeros.

En primer lugar he de agradecer a mis maestros, por enseñarme y guiarme en este largo proceso: a mi director de Tesis, Jaime Merino, que me ha ayudado a convertirme en una investigadora y a apasionarme por mi trabajo. Siempre te estaré agradecida.

Tampoco puedo olvidarme de Pedro Fernández, Antonio Ferrer, Pedro Macias, M^a Carmen Pinto... magníficos investigadores y excelentes personas. Cada uno de ellos me ha aportado una visión diferente de la Ciencia, y son modelos a los que intentaré imitar de ahora en adelante.

A mis compañeros de profesión, con los que he compartido buenos y malos momentos, conocimientos científicos y enseñanzas personales. Los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, que me han tratado con cariño, comprensión y respeto, siempre tendrán un lugar en mi corazón: gracias Chary, Sonia, Laly... y tantos otros que vienen y se van, como Dixan.

Gracias a los miembros del grupo de investigación de Antonio Ferrer, de la Universidad Miguel Hernández, que durante 4 meses se convirtieron en compañeros, amigos y familia: siempre os recuerdo, y añoro aquellos días más de lo que podría imaginar.

Gracias Mamen, por ser mi gran apoyo y desahogo en los momentos difíciles. Gracias Luis, por no olvidar nunca nuestra amistad, a pesar de todo. Gracias María, por no darme por perdida cuando me encierro en el laboratorio, y por esas fiestas maravillosas; mucho ánimo en los momentos difíciles.

Gracias a mi madre, por todo.

	Índice
	<i>Página</i>
Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	IX
Abreviaturas	X
1. Introducción	1
- Las enfermedades neurodegenerativas: uno de los retos clínicos del siglo XXI	2
- La enfermedad de Alzheimer: características moleculares	2
- Hipótesis sobre la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer	6
- Neurotransmisión glutamatérgica en enfermedades neurodegenerativas	9
- Receptores de NMDA: implicación en la excitotoxicidad de glutamato	10
- Relación entre la neurotoxicidad del péptido β A y excitotoxicidad	15
- La formación hipocámpica y su implicación en enfermedades neurodegenerativas	18
- Avances farmacológicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	21
- Desarrollo de nuevos fármacos mediante química combinatoria	23
2. Objetivos	26
3. Resultados	28
1. Cribado de una librería de trímeros de N-alkilglicina: identificación de los radicales con actividad bloqueadora de los receptores NMDA	29
2. Puesta a punto y caracterización del cultivo de neuronas de hipocampo de cerebro de rata	33
2.1. Morfología neuronal en función de los días <i>in vitro</i>	33
2.2. Maduración de cultivo en función de los días <i>in vitro</i> : medida de actividades deshidrogenasa por reducción de MTT	34

2.3. Niveles proteicos de las principales subunidades de los receptores NMDA a lo largo de los DIV del cultivo de neuronas de hipocampo	35
3. Caracterización de la muerte neuronal inducida por glutamato y N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos primarios de hipocampo	37
3.1. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a glutamato y NMDA en función de los DIV	37
3.2. Determinación de la EC ₅₀ de glutamato, NMDA, glicina y Ca ²⁺ en la inducción de muerte neuronal a 14 DIV	40
3.3. Análisis de la secuencia temporal de muerte inducida por NMDA a 14 DIV: tinción con trypan blue	42
3.4. Morfología nuclear de neuronas de hipocampo: tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	46
3.5. Generación de especies reactivas del oxígeno inducida por NMDA	47
3.6. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a incubaciones de larga duración con NMDA	50
3.6.1. Incubaciones de 24 horas con NMDA en cultivos de neuronas de hipocampo	52
3.6.2. Determinación de la EC ₅₀ de NMDA en incubaciones de 24 horas a 14 DIV	53
3.6.3. Efecto neuroprotector de las incubaciones de larga duración con NMDA	54
3.7. Estimulación de la vía de señalización de CREB	56
3.7.1. Protección por rolipram frente a excitotoxicidad	56
3.7.2. Efecto de NMDA sobre la fosforilación de CREB	57
4. Caracterización de la neuroprotección por N-alkilglicinas frente a muerte neuronal inducida por glutamato y N-metil-D-aspartato (NMDA)	60
4.1. Neuroprotección de N-alkilglicinas frente a excitotoxicidad mediada por NMDA a 14 DIV	60
4.2. Neuroprotección de N-alkilglicinas frente a excitotoxicidad mediada por glutamato a 21 DIV	61
4.3. Neuroprotección de N-alkilglicinas frente a incubaciones de 24 horas con NMDA a 14 DIV	62
4.4. Titulación de la capacidad neuroprotectora de N20C frente a excitotoxicidad por NMDA	63
4.5. Protección de N20C frente a la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por NMDA a 14 DIV	65

4.6. Mecanismo protector de N-alquilglicinas frente a toxicidad mediada por NMDA: bloqueo de corrientes en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> que expresan receptores NMDA y AMPA	66
4.7. N20C inhibe las variaciones en la fosforilación de CREB inducidas por NMDA	67
5. Caracterización de la muerte neuronal inducida por péptido β-amiloide humano en el cultivo primario de neuronas de hipocampo	69
5.1. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a incubaciones con péptido β -amiloide 1-40 humano	69
5.2. Comparación de la toxicidad de las variantes 1-40 y 1-42 de péptido β -amiloide	70
5.3. Generación de especies reactivas del oxígeno inducida por péptido β -amiloide 1-40 humano	72
5.4. Visualización de la cromatina nuclear tras la incubación con péptido β -amiloide 1-40 humano	73
6. Caracterización de la neuroprotección por N-alquilglicinas frente a muerte neuronal inducida por péptido β-amiloide humano	75
6.1. Neuroprotección de N-alquilglicinas frente a incubaciones de 24 horas con péptido β -amiloide 1-40 o 1-42	75
6.2. Titulación de la capacidad neuroprotectora de N612C frente a neurodegeneración inducida por péptido β -amiloide 1-40	76
6.3. N612C no previene significativamente la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por el péptido β -amiloide 1-40 humano	77
6.4. N612C inhibe las variaciones en la fosforilación de CREB inducidas por NMDA	78
7. Implicación de p75 y de Zn^{2+} en la muerte neuronal inducida por NMDA y péptido β-amiloide humano	80
7.1. La sensibilidad del cultivo primario de neuronas de hipocampo a péptido β -amiloide humano no está determinada por los niveles celulares de p75	80
7.2. Una elevada concentración de Zn^{2+} es tóxica para neuronas de hipocampo	82
7.3. Zn^{2+} induce la expresión de p75 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, sin afectar los niveles de subunidades del receptor NMDA	84
4. Discusión	86
5. Conclusiones	106

6. Materiales	110
7. Métodos	117
1. Cultivo de neuronas de hipocampo de embriones de rata	118
2. Medida de la viabilidad neuronal	120
3. Tratamientos de excitotoxicidad en cultivos neuronales	123
4. Tratamiento de despolarización con K^+ 90 mM	125
5. Tratamiento con péptido β -amiloide	126
6. Tripsinización de las células en cultivo para su almacenamiento	128
7. Análisis mediante inmunodetección de proteínas (<i>western-blotting</i>)	129
8. Análisis de expresión de genes mediante RT-PCR	133
9. Voltage clamp en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> que expresan subunidades de los receptores de glutamato	135
10. Sondas fluorescentes	137
11. Tratamientos con Zn^{2+}	140
8. Apéndices	141
- Composición de tampones y soluciones	142
- Composición del medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle	144
- Composición de medios de cultivo suplementados	145
9. Bibliografía	146

Índice de Figuras

	<i>Página</i>
1. Introducción	
Figura 1.1. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora de β -amiloide (PPA)	4
Figura 1.2. Hipótesis del amiloide	8
Figura 1.3. Receptores de glutamato: clasificación y subunidades	10
Figura 1.4. Estructura química de los agonistas más relevantes de los receptores de glutamato	11
Figura 1.5. Esquema de los receptores no-NMDA y NMDA	12
Figura 1.6. Posibles interacciones entre las cascadas moleculares que median la toxicidad de β A y de glutamato	16
Figura 1.7. Esquema de la formación hipocámpica	18
Figura 1.8. Fórmula general de los trímeros de N-alquilglicina	25
3. Resultados	
Figura 3.1. Cribado de la librería de trímeros de N-alquilglicina	30
Figura 3.2. Capacidad de bloqueo de la N-alquilglicina N20C frente a la corriente inducida por glutamato en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> que expresan el receptor NMDA funcional de rata (NR1/NR2A)	31
Figura 3.3. Desarrollo morfológico, axonal y dendrítico de neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo hasta 14 DIV	33
Figura 3.4. Medida de la reducción de MTT a formazán por las neuronas de hipocampo a diferentes días <i>in vitro</i> en cultivo	35
Figura 3.5. Niveles de las subunidades NR1, NR2A y NR2B a diferentes días <i>in vitro</i> en el cultivo de neuronas de hipocampo	36
Figura 3.6. Muerte neuronal inducida por glutamato y NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7, 14 y 21 DIV	38
Figura 3.7. Protección por antagonistas frente a la muerte inducida por glutamato en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 21 DIV	40
Figura 3.8. Efecto de la concentración de glutamato, NMDA y Ca^{2+} sobre la muerte inducida en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV	41

Figura 3.9. Medida de la viabilidad/muerte neuronal por el método de exclusión del colorante trypan blue	43
Figura 3.10. Secuencia temporal de la muerte neuronal inducida por NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 14 DIV	44
Figura 3.11. Muerte neuronal inducida por alta concentración de K ⁺ en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 14 DIV	46
Figura 3.12. Observación de la cromatina nuclear mediante tinción con DAPI a 14 DIV	47
Figura 3.13. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a choque excitotóxico mediante incubación con NMDA	49
Figura 3.14. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a choque excitotóxico mediante incubación con NMDA 3 horas	50
Figura 3.15. Muerte neuronal inducida por incubaciones de larga duración con NMDA	53
Figura 3.16. Efecto de la concentración de NMDA sobre la muerte inducida en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV	54
Figura 3.17. Efecto de la preincubación con NMDA sobre la muerte inducida por choque excitotóxico en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV	55
Figura 3.18. Efecto de la concentración y el tiempo de incubación de rolipram sobre la muerte neuronal inducida por NMDA a 14 DIV	57
Figura 3.19. Niveles de pCREB tras la exposición de neuronas de hipocampo a diferentes concentraciones de NMDA	58
Figura 3.20. Efecto de H89 y rolipram sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo	59
Figura 3.21. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por NMDA 20 minutos a 14 DIV	60
Figura 3.22. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por glutamato 20 minutos a 21 DIV	61
Figura 3.23. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por NMDA 24 horas a 14 DIV	63
Figura 3.24. Efecto de la concentración de N20C sobre la muerte neuronal inducida por NMDA 20 minutos a 14 DIV	64
Figura 3.25. Protección de la generación de especies reactivas del oxígeno por N20C	65
Figura 3.26. Capacidad de bloqueo de las N-alquilglicinas N20C y N612C de la corriente inducida por glutamato en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> que expresan el receptor NMDA	67

Figura 3.27. Efecto de N20C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo	68
Figura 3.28. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con β A desde 7 y 14 DIV	70
Figura 3.29. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) y (1-42) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con β A 24 horas a 14 DIV	71
Figura 3.30. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-42) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con β A desde 7 y 14 DIV	72
Figura 3.31. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano	73
Figura 3.32. Observación de la cromatina nuclear mediante tinción con DAPI tras incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano	74
Figura 3.33. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide (1-40) 24 horas a 14 DIV	75
Figura 3.34. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide (1-40) o (1-42) 24 horas a 14 DIV	76
Figura 3.35. Efecto de la concentración de N612C sobre la muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) 24 horas a 14 DIV	77
Figura 3.36. Generación de especies reactivas del oxígeno tras incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano y N612C	78
Figura 3.37. Efecto de N612C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo	79
Figura 3.38. Niveles de p75 a lo largo de los días de cultivo <i>in vitro</i> en neuronas de hipocampo de rata	81
Figura 3.39. Niveles de p75 tras el tratamiento con péptido β -amiloide en neuronas de hipocampo de rata	82
Figura 3.40. Muerte neuronal inducida por Zn^{2+} en neuronas de hipocampo de cerebro de rata a 14 DIV	83
Figura 3.41. Protección por MK-801 de la muerte neuronal inducida por Zn^{2+} en neuronas de hipocampo de cerebro de rata a 14 DIV	84
Figura 3.42. Niveles de p75 y subunidades del receptor NMDA tras la exposición de neuronas de hipocampo a diferentes concentraciones de Zn^{2+}	85

4. Discusión

- Figura 4.1.** Muerte neuronal inducida por NMDA o péptido β -amiloide humano (1-40) 24 horas en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7 y 14 DIV 97
- Figura 4.2.** Esquema del posible mecanismo de actuación de las N-alkilglicinas N20C y N612C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA 103

6. Materiales

- Figura 6.1.** Fórmulas de los radicales empleados en la síntesis de la librería de N-alkilglicinas 115
- Figura 6.2.** Estructura de las N-alkilglicinas empleadas 116
- Figura 6.3.** Estructura de N612C y sus derivados 116

7. Métodos

- Figura 7.1.** Medida de la reducción de MTT a formazán por las neuronas de hipocampo a diferentes tiempos de incubación 121
- Figura 7.2.** Sensibilidad del cultivo primario de neuronas de hipocampo a DMSO 127
- Figura 7.3.** Estructura química de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 137
- Figura 7.4.** Estructura química de 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFD) 138

Índice de Tablas*Página***1. Introducción**

Tabla 1.1. Comparación farmacológica entre los fármacos actualmente aprobados en EA	22
--	----

3. Resultados

Tabla 3.1. Caída de densidad durante la incubación con NMDA durante varios días en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7, 10 y 14 DIV	52
---	----

4. Discusión

Tabla 4.1. Valores de IC ₅₀ y porcentajes máximos de neuroprotección de las N-alkilglicinas N20C y N612C y de antagonistas conocidos del receptor NMDA	101
--	-----

7. Métodos

Tabla 7.1. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunodetección	131
---	-----

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina.

AChE: Acetilcolinesterasa.

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilisooxazol-4-propionato.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

β A: Beta-amiloide.

BACE: Actividad β -secretasa.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

β -ME: Beta-mercaptoetanol.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BSS: Solución básica salina.

c-jun: Factor de transcripción c-jun.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico.

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol.

DCFD: 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DIV: Días *in vitro*.

dNTPs: Desoxi-nucleótidos trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTT: Ditiotreitól

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EC₅₀: Concentración a la cual se produce el 50% de una activación.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético.

EGTA: Ácido etilen-glicol-bis-(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

EP: Enfermedad de Parkinson.

FUDR: 5-fluoro-2'-desoxiuridina.

GluR: Subunidad de los receptores de AMPA/kainato.

GMPc: Guanidín monofosfato cíclico.

GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 β .

HNE: 4-hidroxinonenal.

IC₅₀: Concentración a la cual se produce el 50 % de una inhibición.

JNK: Quinasa N-terminal de c-jun.

KA: Kainato; Subunidad del receptor de kainato.

kDa: Kilodalton.

LTD: Long term depression; depresión a largo plazo.

LTP: Long term potentiation; potenciación a largo plazo.

MAP: Proteína activada por mitógeno.

MEM: Medio esencial mínimo.

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato.

MK-801: [5R,10S]-[+]-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina o dizolcipina.

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.

NF- κ B: Factor nuclear kappa-B

NGF: Nerve growth factor; factor de crecimiento neural.

n_H: Coeficiente de Hill.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NR: Subunidad del receptor de NMDA.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

NTR: Neurotrophin receptor; receptor de neurotrofinas.

p75^{NTR}: Receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Polimerase chain reaction; reacción en cadena de la polimerasa.

PKA: Proteína quinasa A.

PPA: Proteína precursora de β -amiloide.

PS: Presenilina.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAm: RNA mensajero.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

SNC: Sistema nervioso central.

pCREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico en su forma activa (fosforilada en Ser-133).

α -PPAs: Fragmento de PPA generado por la actividad α -secretasa.

β -PPAs: Fragmento de PPA generado por la actividad β -secretasa.

RT: Transcripción reversa.

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA.

TBS: Tampón Tris salino.

TBST: Tampón Tris salino con Tween-20.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino.

TM: Segmento transmembranal.

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.

1. Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas: uno de los retos clínicos del siglo XXI

Uno de los principales problemas sociales y sanitarios que afrontamos en la actualidad es el aumento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, como consecuencia del envejecimiento progresivo de la población. La mayor esperanza de vida que ahora disfrutamos es debida a los avances médicos y a una mejor alimentación. Como contrapartida, han aumentado los trastornos mentales, pues el riesgo de padecerlos se incrementa con la edad (Kleinman y Cohen, 1997). De entre estos trastornos, las enfermedades neurodegenerativas son uno de los más importantes debido a sus devastadores efectos sobre el paciente y el entorno social y familiar.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales; por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha observado una depleción de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y ciertas áreas corticales, mientras en la enfermedad de Parkinson (EP) son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales las afectadas, y en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se reduce la población de motoneuronas. La pérdida neuronal se refleja clínicamente en la aparición de sintomatologías específicas, como alteración en los procesos de memoria y lenguaje en la EA, modificación en el control y la coordinación del movimiento en la EP, o debilidad progresiva en la ELA (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998).

La enfermedad de Alzheimer: características moleculares

La EA es la causa más común de declive cognitivo en la población anciana. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo caracterizado, entre otros aspectos, por una pérdida progresiva de memoria asociada a lesiones en las regiones

cerebrales implicadas en su almacenamiento (hipocampo, ciertas áreas de la corteza cerebral, etc.). Alois Alzheimer describió originalmente la EA como una rara enfermedad que afectaba a pacientes de mediana edad (Alzheimer y cols., 1995), pero estudios posteriores demostraron que la EA descrita por Alzheimer era bastante similar a la demencia senil común en individuos ancianos (Burns y cols., 1997). La base celular y molecular de la enfermedad consiste en la muerte y disfunción de ciertas neuronas y sinapsis, en particular de aquellas involucradas en la transmisión colinérgica (Davies y Maloney, 1976). Sin embargo la EA no se encuentra limitada a la degeneración de las neuronas colinérgicas, sino que también afecta a neuronas que pertenecen a varios grupos de neurotransmisores (Bartus y cols., 1982), como por ejemplo a las neuronas glutamatérgicas del hipocampo. A pesar de que se ha producido un progreso considerable en el conocimiento de los componentes moleculares de las lesiones cerebrales, los mecanismos de degeneración neuronal en la EA todavía no están del todo clarificados.

Las principales lesiones patológicas descritas por Alzheimer en el cerebro de los pacientes de EA incluían las placas seniles y las marañas neurofibrilares. Las placas seniles están compuestas por el péptido β -amiloide (β A), de unos 40-43 aminoácidos (Selkoe, 1989; Selkoe, 1998). El péptido β A es originado por el procesamiento proteolítico de una glicoproteína integral de membrana, llamada proteína precursora de β -amiloide (PPA), que está codificada por un gen localizado en el cromosoma 21 (Selkoe, 1996) (*Figura 1.1*). Tres importantes enzimas, denominadas en conjunto secretasas, participan en el procesamiento de la PPA. La actividad α -secretasa corta dentro de la secuencia del péptido β A y provoca la liberación de un fragmento denominado α -PPAs, con función trófica y neuroprotectora. La posterior acción de γ -secretasa genera fragmentos no amiloidogénicos (p3 y p7). Las actividades β -secretasa y γ -secretasa, por su parte, digieren a la proteína precursora secuencialmente a ambos extremos del péptido β A y conducen así a su liberación al medio extracelular (Haass y De Strooper, 1999). La

deposición de β A soluble produce la agregación del péptido en forma de fibrillas, que muestran neurotoxicidad *in vitro* (Yankner, 1996) e *in vivo* (Giovannelli y cols., 1998; Stephan y cols., 2001).

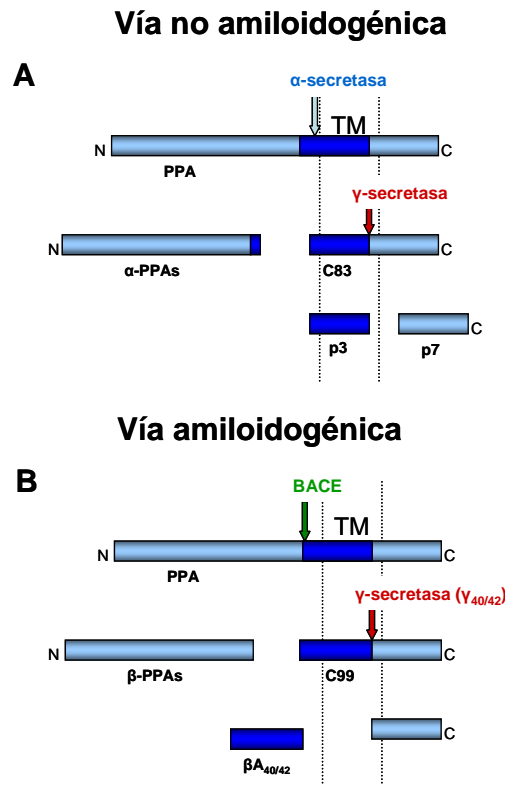


Figura 1.1. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora de β -amiloide (PPA). (A) En la vía no amiloidogénica, la actividad α -secretasa corta dentro de la secuencia del péptido β -amiloide (azul oscuro) de la PPA (azul claro) para liberar α -PPA soluble, impidiendo la formación de β A. El producto C-terminal es sustrato de γ -secretasas, que generan fragmentos no amiloidogénicos (p3 y p7). (B) En la vía amiloidogénica, la actividad β -secretasa (BACE) corta cerca del extremo N-terminal del dominio β A y genera β -PPA soluble. El fragmento C-terminal, que contiene la secuencia β A completa, es digerido por γ -secretasas que liberan péptido β A, de 40 o 42 aminoácidos (Verdile y cols., 2004).

Otra lesión histopatológica que caracteriza a la EA son las marañas de neurofibrillas, que consisten en acumulaciones anormales de proteínas del citoesqueleto, con propiedades químicas y antigénicas únicas que permiten su tinción selectiva (Selkoe, 1989). Los filamentos que constituyen los agregados contienen principalmente a la proteína asociada a los microtúbulos tau (Yankner, 1996). Tanto las placas como los agregados contribuyen a la disfunción neuronal y a la demencia, ya que los ratones transgénicos que desarrollan sólo el fenotipo de

placas o el de marañas de neurofibrillas muestran en cualquier caso alteraciones en su comportamiento (Hsiao y cols., 1996; Lewis y cols., 2000).

Los estudios realizados en cultivos celulares han mostrado que los péptidos β A (1-40, 1-42 y 25-35) pueden ser directa o indirectamente neurotóxicos, y que la potencia tóxica del péptido está relacionada con su capacidad para formar agregados (Yankner y cols., 1990a; Pike y cols., 1991; Busciglio y cols., 1992; Mattson y cols., 1993a; Mattson y cols., 1993b). Esto es debido a que los péptidos β A muestran distintas propiedades físicas y, en concreto, presentan comportamientos de agregación que pueden variar de acuerdo a su longitud (Burdick y cols., 1992). Además se ha observado que la neurotoxicidad de β A requiere su ensamblaje en forma de oligómeros y/o fibrillas, mientras que los agregados amorfos no fibrilares de β A no serían neurotóxicos (Lorenzo y Yankner, 1994; Busciglio y cols., 1995; Howlett y cols., 1995; Hardy y Selkoe, 2002). De hecho la sensibilidad neuronal a los agregados protofibrilares de β A se corresponde bastante con el patrón de degeneración observado en la EA (Kim y cols., 2003).

Los resultados de Yankner y cols. pusieron de manifiesto que los péptidos β A eran directamente tóxicos para neuronas diferenciadas de hipocampo de rata y que la actividad neurotóxica corresponde a la secuencia de aminoácidos 25-35 del péptido β A (Yankner y cols., 1990b). Por otra parte, otros estudios mostraron que el péptido β A por sí sólo no era neurotóxico en cultivos de neuronas corticales de ratón, pero hacía a las neuronas más vulnerables a la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios (Koh y cols., 1990). También existen poblaciones neuronales bastante resistentes a la neurotoxicidad de β A, como las células granulares de cerebelo. De estos resultados se deduce que debe existir una gran variabilidad en cuanto a la susceptibilidad a β A que muestran diversos tipos celulares neuronales y diferentes organismos.

Hipótesis sobre la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad existe gran controversia en cuanto al mecanismo desencadenante de la neurodegeneración que se observa en la histopatología de la EA. Mientras que numerosos autores defienden la denominada hipótesis del amiloide, otros apuestan por tau como el principal artífice de la muerte neuronal.

Los defensores de la hipótesis del amiloide postulan que es el procesamiento anormal de la PPA y la acumulación de péptidos βA en forma de placas el mecanismo inicial de muerte neuronal en la EA (Sommer, 2002; Wirths y cols., 2004; Verdile y cols., 2004). Según esta teoría, los agregados de péptido βA pueden desencadenar la muerte neuronal y provocar la formación de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas (*Figura 1.2*). Por tanto, la formación de agregados de tau sería un evento secundario y consecuencia de la presencia de agregados de amiloide en el entorno celular. Confirma esta hipótesis el hecho de que existen variantes genéticas de EA asociadas a la superproducción de βA (Hardy y Allsop, 1991). Los péptidos βA bloquean la recaptación de glutamato por los astrocitos, provocan estrés oxidativo y peroxidación de la membrana lipídica, activan a la microglía e inducen la activación de varias quinasas, incluyendo a MAP quinasas y a JNK (Jun N-terminal Kinase) (Suh y Checler, 2002). Entre estas quinasas también se encuentra GSK-3 β , enzima implicada en la hiperfosforilación de tau, que impide el correcto funcionamiento de esta proteína e induce su agregación (Lucas y cols., 2001; Garrido y cols., 2002). Por otra parte la activación de la microglía provoca un cuadro de inflamación localizado que daña a las neuronas circundantes, agravando el efecto directo de los agregados. El hecho de que la administración de antiinflamatorios no esteroideos disminuya la probabilidad de sufrir EA confirma la implicación de los procesos inflamatorios en esta enfermedad (Monsonogo y Weiner, 2003; Qiu y Gruol, 2003).

Por otra parte, hay grupos de investigación que apoyan la hipótesis de que es la formación de agregados intraneuronales de tau el evento principal en la patología de la EA (Rissman y cols., 2004; Dickson, 2004). De hecho, la distribución de ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes se corresponde con el patrón de neurodegeneración, mientras que las placas seniles se distribuyen de manera casi uniforme, tanto en el cerebro de enfermos de EA como en individuos ancianos sanos.

Finalmente se han postulado otras hipótesis que tratan de conciliar ambos extremos. En el cerebro de los pacientes de EA se observa un nivel elevado de apoptosis neuronal, asociada a la generación de especies reactivas del oxígeno. Algunos autores postulan que el estrés oxidativo es el que induce el procesamiento proteolítico anormal de la PPA y la formación de agregados aberrantes de tau (Imaizumi y cols., 2001; Katayama y cols., 2004). También se apunta a anomalías en la vía de *Wnt* como la causa primitiva de ambas anomalías histopatológicas (Mudher y Lovestone, 2002; Alvarez y cols., 2004).

En conclusión, hay que destacar que la variante esporádica de EA no está determinada por una alteración genética y que existe una gran gama de factores que influyen en su aparición. Lo que sí ha sido confirmado es que los péptidos β A producen muerte neuronal *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, aquellos fármacos capaces de frenar esta neurodegeneración al menos disminuirán la pérdida neuronal que se produce en EA.

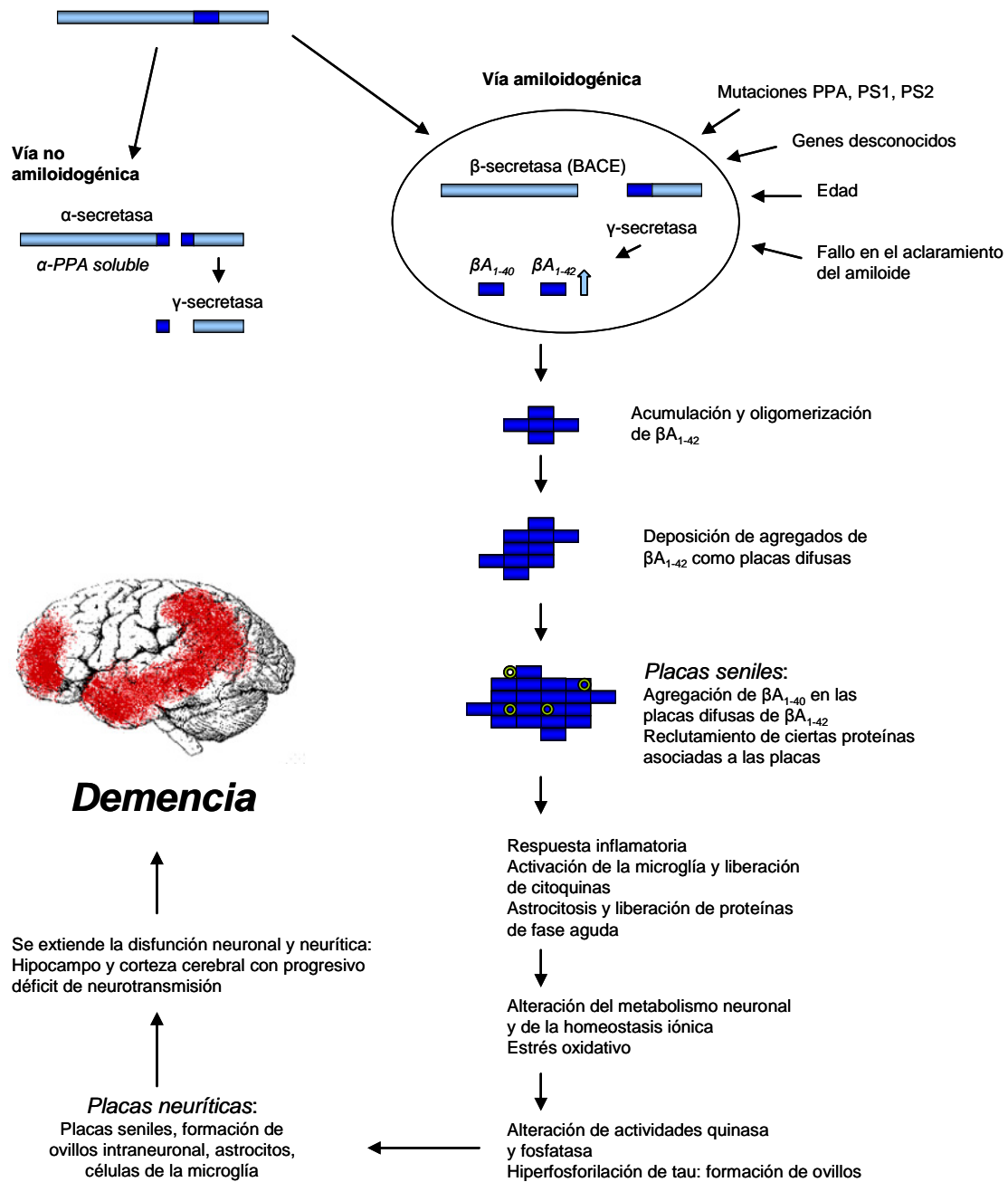


Figura 1.2. Hipótesis del amiloide. La hipótesis del amiloide está basada en la sobreproducción de βA como la principal causa de disfunción y muerte neuronal que conduce a la demencia en EA. Influencias genéticas y medioambientales (p. ej. Mutaciones de PPA, PS1, y PS2; alelo apoE4) provocan una disregulación en el procesamiento de PPA, que conduce a una sobreproducción y acumulación de βA 1-42 en placas difusas. El reclutamiento de otras proteínas, como βA 1-40 y proteínas del complemento, produce la deposición de placas seniles. La formación de esas placas provoca la activación de astrocitos y microglía, daño oxidativo y agregación de tau. Finalmente la cascada culmina en la pérdida neuronal, que conduce a la demencia (Verdile y cols., 2004).

Neurotransmisión glutamatérgica en enfermedades neurodegenerativas

Un factor común a todas las enfermedades neurodegenerativas es la alteración de uno o más sistemas de neurotransmisión. Dentro de este grupo de sistemas susceptibles de alteración se encuentra el sistema glutamatérgico. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia, ya que participa en el 70% de las sinapsis excitatorias. Aunque desempeña importantes funciones fisiológicas en el SNC, la activación excesiva de sus receptores, bajo ciertas condiciones, es neurotóxica, y se ha relacionado con procesos neurodegenerativos, tanto agudos como crónicos (Choi, 1988). En la neurotoxicidad aguda (p. ej., la isquemia cerebral), el déficit energético celular conlleva una disminución en la recaptación de glutamato del espacio sináptico, con el consecuente aumento en su concentración y un incremento de la sensibilidad de las neuronas al glutamato. La sobreactivación de los receptores en esta situación tiene como resultado una alteración en el balance iónico de Na^+ y Cl^- , que genera la entrada masiva de agua e induce la lisis osmótica de la neurona. Hasta la fecha, el glutamato permanece como el marcador bioquímico más potente de deterioro neurológico precoz tras el ictus (Castillo y cols., 1997). Por otro lado, la neurotoxicidad crónica se encuentra mediada por mecanismos dependientes de la entrada de Ca^{2+} y se implica en enfermedades como la ELA, la demencia asociada al SIDA, la EP, la enfermedad de Huntington (EH) y la EA (Lipton y Rosenberg, 1994; Muir y Lees, 1995).

Desde hace tiempo se sabe que los aminoácidos excitatorios están implicados en el desarrollo de numerosas patologías y desórdenes neurodegenerativos, como la isquemia cerebral, la EH y la EA (Choi, 1988). En concreto, hay que destacar que muchas de las alteraciones del citoesqueleto que se observan en la EA pueden reproducirse experimentalmente mediante el empleo de glutamato en cultivos de hipocampo de rata (Mattson, 1990), lo que apunta hacia una posible relación entre la excitotoxicidad mediada por este aminoácido y la neurodegeneración mediada por

β A. Además el grado de demencia en la EA se relaciona bastante bien con la magnitud de muerte neuronal provocada por excitotoxicidad en las etapas avanzadas de esta enfermedad.

Receptores de NMDA: implicación en la excitotoxicidad de glutamato

A partir de estudios electrofisiológicos y farmacológicos se han clasificado los receptores de glutamato en dos grupos distintos (*Figura 1.3*): los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos (mGluRs) (Monaghan y cols., 1989; Watkins y cols., 1990; Young y Fagg, 1990).

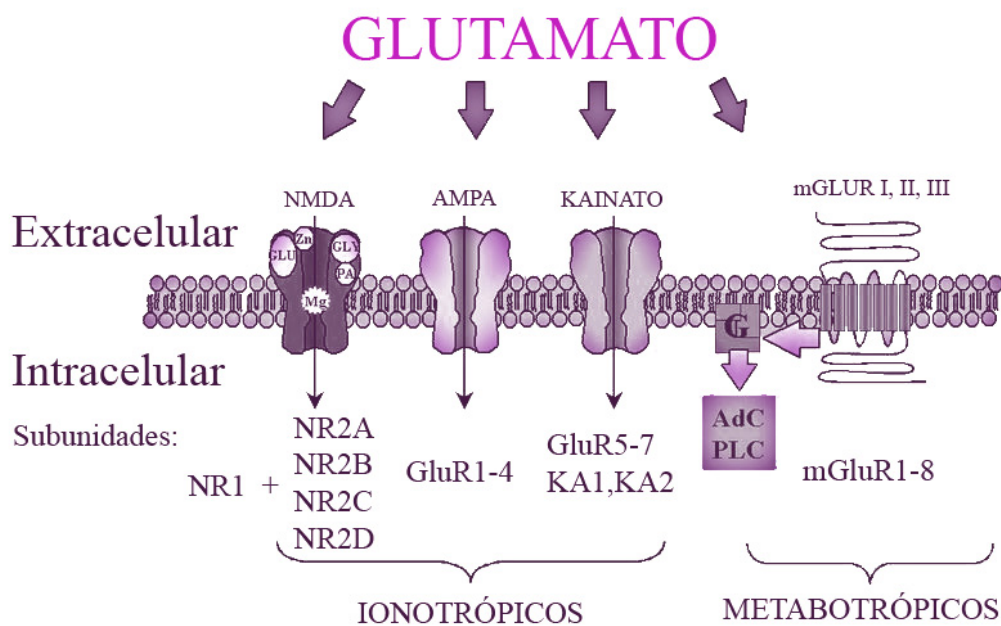


Figura 1.3. Receptores de glutamato: clasificación y subunidades. Modificado de Lerma, 1997.

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos selectivamente permeables a distintos cationes, y están a su vez subdivididos en tres subgrupos diferentes de acuerdo a sus agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-

5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), y kainato (Monaghan y cols., 1989) (*Figura 1.4*). Generalmente se engloban los dos últimos en una categoría común, denominada receptores no-NMDA. Por otro lado, los receptores metabotrópicos se encuentran acoplados a segundos mensajeros intracelulares vía proteínas G, y pertenecen a una categoría completamente diferente a la de los receptores ionotrópicos (Monaghan y cols., 1989; Schoepp y Conn, 1993).

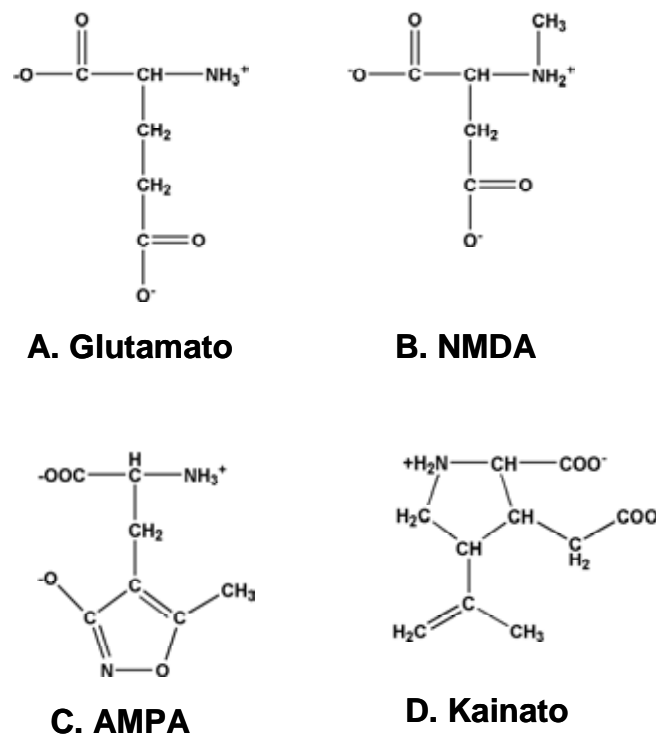


Figura 1.4. Estructura química de los agonistas más relevantes de los receptores de glutamato. (A) Glutamato. (B) N-metil-D-aspartato, NMDA. (C) α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato, AMPA. (D) Kainato.

Los receptores NMDA constituyen el principal objeto de nuestro estudio. Estos receptores se encuentran implicados en la transmisión sináptica excitatoria en la médula espinal, corteza cerebral e hipocampo, siendo su ligando endógeno el neurotransmisor L-glutamato. La región CA₁ del hipocampo es la zona del SNC que cuenta con la mayor densidad de receptores NMDA (Monaghan y Cotman, 1985; Murphy y cols., 1987; Wong y cols., 1988).

Los receptores NMDA constan de cinco subunidades diferentes. La subunidad NR1 (103 kDa) es la responsable de conferir al receptor varias de las propiedades características de los receptores NMDA: bloqueo por Mg^{2+} de forma dependiente del voltaje, alta permeabilidad a Ca^{2+} , potenciación por bajas concentraciones de glicina, respuestas específicas a varios agonistas y antagonistas de los receptores NMDA, inhibición por Zn^{2+} , y activación por poliaminas (*Figura 1.5*) (Moriyoshi y cols., 1991; Yamazaki y cols., 1992; Karp y cols., 1993). A diferencia de NR1, ninguna de las otras cuatro subunidades, denominadas NR2A, NR2B, NR2C y NR2D (133-163 kDa), muestran actividad como canal en forma homomérica o heteromérica entre ellas. Sin embargo, la expresión combinada de subunidades NR2 con NR1 potencia fuertemente las respuestas a NMDA o glutamato y es la responsable de la variabilidad en las propiedades de los receptores NMDA (Monyer y cols., 1992; Kutsuwada y cols., 1992; Ishii y cols., 1993).

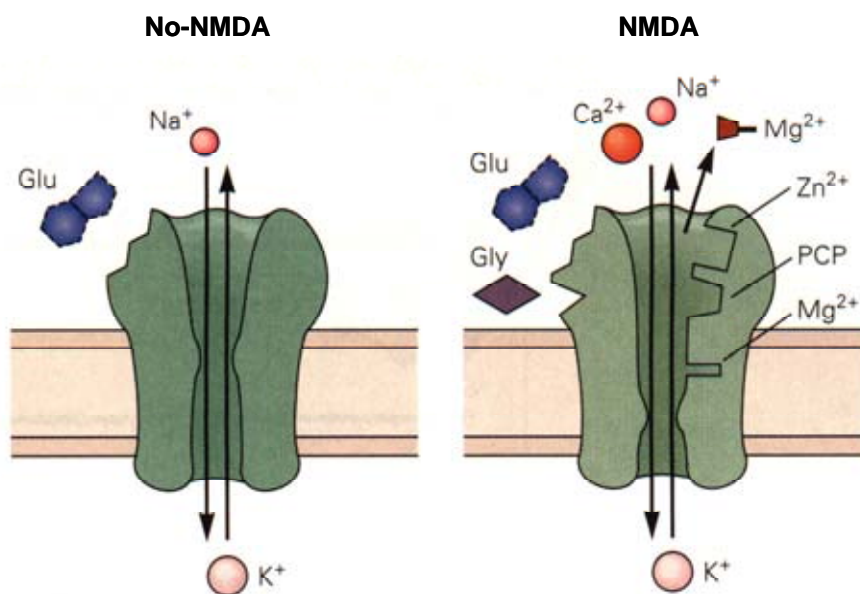


Figura 1.5. Esquema de los receptores no-NMDA y NMDA. Se muestran los sitios de unión de ligandos, antagonistas y la permeabilidad a diferentes cationes (Kandel y Siegelbaum, 2000).

La sobreactivación de los receptores de glutamato es uno de los principales procesos responsables de muerte neuronal que tiene lugar en distintos problemas

clínicos, tales como traumatismos cerebrales, ataques epilépticos o isquemia cerebral (Choi, 1994). La hipótesis tradicional de Ca^{2+} (Siesjo, 1981) asume que el daño celular es desencadenado por el incremento en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , aumento inducido durante el estrés metabólico o en condiciones en las que se produce una liberación masiva de glutamato. Esta toxicidad, al estar mediada por el exceso de un neurotransmisor excitador, recibe el nombre de excitotoxicidad (Olney, 1969).

Tradicionalmente se ha asumido que la toxicidad del glutamato está mediada principalmente por la activación de los receptores NMDA, que son muy permeables al ión Ca^{2+} (Choi, 1994). La reducción del influjo de Ca^{2+} o la quelación del ión Ca^{2+} intracelular previene este proceso, lo que sugiere que la muerte neuronal mediada por los receptores NMDA está desencadenada por la sobrecarga neuronal de Ca^{2+} (Choi, 1987; Tymianski y cols., 1993). Sin embargo, la importancia de los diversos eventos que siguen a la sobrecarga neuronal de Ca^{2+} (activación de diversas enzimas, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, etc.) es bastante controvertida.

Se ha observado que los niveles muy altos de Ca^{2+} citoplasmáticos no son necesariamente tóxicos para las neuronas corticales, lo que indicaría que es necesaria la captación de Ca^{2+} dentro de la mitocondria para desencadenar la muerte neuronal mediante la sobreestimulación de los receptores NMDA (Stout y cols., 1998). La sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} puede provocar la muerte neuronal mediante al menos tres mecanismos conocidos: (1) la depleción energética, (2) la liberación de factores pro-apoptóticos, y (3) el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). La depleción energética se produce cuando los receptores de glutamato se sobreactivan de forma aguda, lo que conduce a una profunda alteración en la homeostasis iónica neuronal y, por tanto, a la muerte celular por necrosis (Ankarcrona y cols., 1995). Sin embargo, la sobreactivación transitoria de los receptores de glutamato, que es lo que ocurre en la zona de penumbra isquémica,

puede conducir a la recuperación del estado energético mitocondrial y a una muerte neuronal retardada, mediante apoptosis (Ankarcrona y cols., 1995). La sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} puede desencadenar la apoptosis neuronal debido a la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol (Schinder y cols., 1996; White y Reynolds, 1996). En concreto, la liberación de citocromo *c* es capaz de activar a una familia de cisteín-proteasas, las caspasas, que son necesarias para la mayoría de cambios bioquímicos y morfológicos que conducen a la apoptosis (Marzo y cols., 1998; Jordan y cols., 2003). Finalmente, la disfunción mitocondrial que provoca el ión Ca^{2+} puede conducir al aumento en la producción de ROS. De hecho, se ha encontrado que la mitocondria genera superóxido y ROS relacionadas tras la sobreactivación de los receptores de glutamato y que la inhibición de la formación de superóxido reduce la muerte neuronal por excitotoxicidad (Patel y cols., 1996).

El glutamato puede inducir tanto necrosis temprana como apoptosis retardada en cultivos de células granulares de cerebelo (Ankarcrona y cols., 1995). Durante, y poco después de, la exposición a glutamato, una subpoblación de células muere por necrosis. En estas células el potencial de membrana mitocondrial se colapsa, los núcleos se disgregan, y el contenido intracelular se dispersa por el medio de incubación. Las neuronas que sobreviven a esta fase necrótica temprana recuperan el potencial mitocondrial y los niveles energéticos. Más tarde, ciertas subpoblaciones neuronales pueden morir vía apoptosis tras la activación de un programa endógeno de muerte celular, como se comprueba por la formación de núcleos apoptóticos y por la degradación de la cromatina en fragmentos de alto y bajo peso molecular. De esto se deduce que la función mitocondrial es un factor crítico que determina el tipo de muerte neuronal por excitotoxicidad (Ankarcrona y cols., 1995).

La necrosis y la apoptosis son dos tipos diferentes de muerte celular que tienen diferentes implicaciones para el tejido circundante. La necrosis es un proceso pasivo, caracterizado por la rotura de la célula y de sus orgánulos, y la dispersión de

su contenido al medio extracelular. El resultado de este proceso es normalmente una reacción inflamatoria que produce infiltración celular local, daño vascular, edema, daño al tejido circundante y, a veces, fibrosis. En cambio, la apoptosis está caracterizada por lisis celular, relocalización y compactación de los orgánulos, y producción de partículas rodeadas por membrana que contienen material intracelular, conocidas como cuerpos apoptóticos. *In vivo*, las células fagocíticas normalmente capturan a las células apoptóticas, evitando la inflamación y el daño al tejido circundante (Kerr y cols., 1972). De cualquier manera, la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} es un evento crítico en la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis (Kruman y Mattson, 1999).

Relación entre la neurotoxicidad del péptido βA y excitotoxicidad

Existen numerosos aspectos comunes entre la neurodegeneración inducida por el péptido βA y la muerte neuronal inducida por el exceso de glutamato (*Figura 1.6*). La adición de βA y otros péptidos amiloidogénicos a cultivos primarios de neuronas provoca un aumento lento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, y se ha propuesto que este aumento es el que media la neurotoxicidad (Mattson y cols., 1992; Mattson y Goodman, 1995). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que βA puede potenciar los efectos tóxicos de otros insultos neuronales, como por ejemplo la privación de glucosa (Copani y cols., 1991) y el estrés oxidativo (Lockhart y cols., 1994), en los que el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} también juega un papel importante. Finalmente, los altos niveles de Ca^{2+} intracelular podrían tener un papel en el procesamiento proteolítico anormal de la PPA, provocando un aumento en la generación de péptido βA , ya que la exposición de las células en cultivo a agentes que inducen el influjo de Ca^{2+} provocan un aumento en la producción de βA (Querfurth y Selkoe, 1994; Sennvik y cols., 2001).

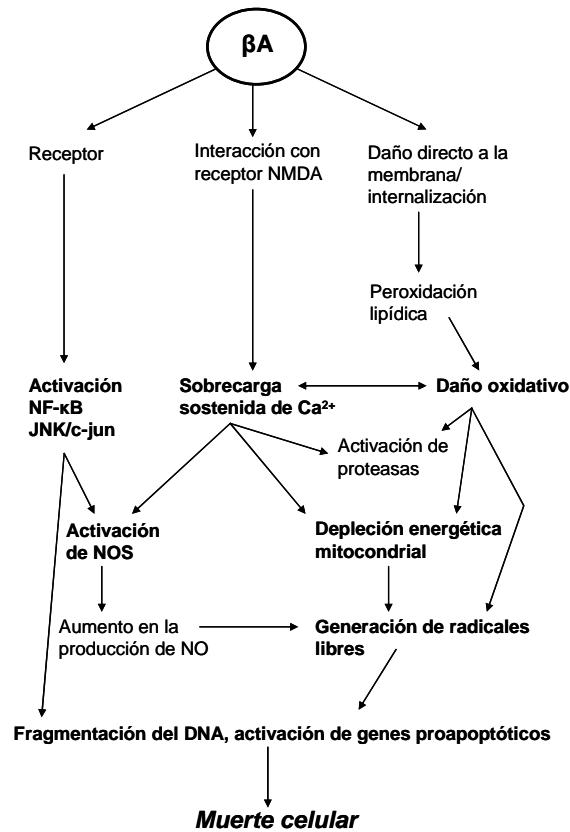


Figura 1.6. Posibles interacciones entre las cascadas moleculares que median la toxicidad de βA y de glutamato. Modificado de Harkany y cols., 1999.

Otro hecho relevante es que la toxicidad del péptido βA cursa, al menos parcialmente, con el aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Behl y cols., 1994; Goodman y Mattson, 1994). Cuando el péptido βA se encuentra en su forma agregada induce la peroxidación lipídica de la membrana mediante la generación de ROS (Koppal y cols., 1998; Mark y cols., 1999), y los productos de esta reacción oxidativa están involucrados en la modificación de las proteínas mediante enlaces covalentes. 4-hidroxinonenal (HNE), un producto aldehídico de la peroxidación lipídica de la membrana (Esterbauer y cols., 1991) generado tras la exposición de las membranas neuronales al péptido βA (Mark y cols., 1997; Keller y cols., 1997), se une directamente a tau, inhibiendo su defosforilación (Mattson y cols., 1997). Las concentraciones de HNE generadas en respuesta a βA están dentro del intervalo en el que este compuesto es capaz de alterar la homeostasis iónica y provocar la degeneración neuronal. Se ha mostrado que HNE

puede dañar y matar a las neuronas primarias de hipocampo (Mark y cols., 1997). También puede aumentar la vulnerabilidad de los cultivos de neuronas de hipocampo frente a la excitotoxicidad, así como alterar diferentes funciones, tales como el transporte de glucosa o glutamato (Mark y cols., 1997; Keller y cols., 1997). Los antagonistas de los receptores NMDA protegen a las neuronas frente a la excitotoxicidad de HNE, lo que sugiere que HNE induce la liberación de glutamato y/o la activación de los receptores NMDA por el nivel basal de glutamato en el medio.

La formación hipocámpica y su implicación en enfermedades neurodegenerativas

La formación hipocámpica es una invaginación del giro parahipocámpal en el cuerno inferior (temporal) del ventrículo lateral y consta de tres regiones: hipocampo, giro dentado y subículo (*Figura 1.7*). El giro dentado ocupa el intervalo entre el hipocampo y el giro parahipocámpal. El subículo es la parte del giro parahipocámpal que está en continuidad directa con el hipocampo. De los tres componentes, el hipocampo es el más grande y más estudiado. Aparece como una estructura con forma de C que sobresale en el cuerno inferior del ventrículo lateral. Está muy relacionado con el giro dentado adyacente, con el que forma una estructura en forma de S.

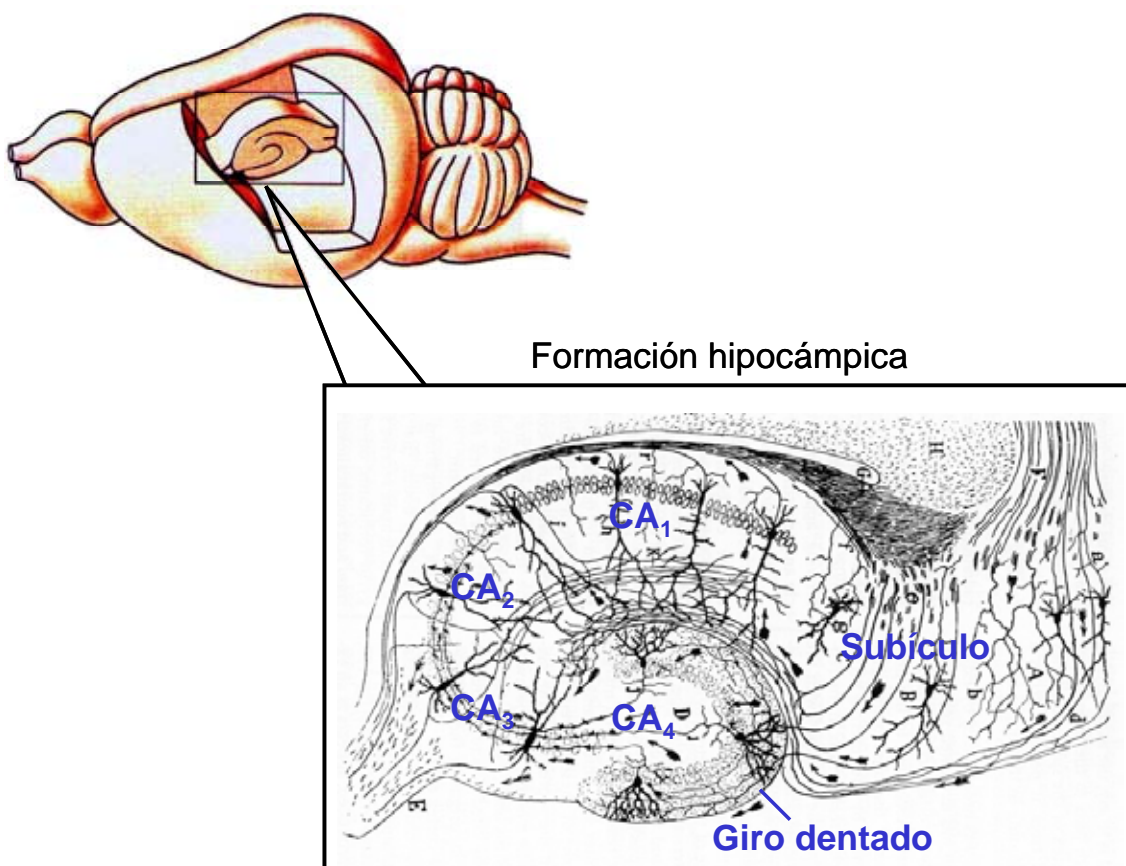


Figura 1.7. Esquema de la formación hipocámpica. Grabado modificado de Ramón y Cajal, 1901.

El hipocampo se subdivide en campos designados como CA₁, CA₂, CA₃ y CA₄, en función de la morfología celular, el desarrollo relativo de las diferentes regiones corticales y en las vías que siguen los distintos sistemas de fibras. El CA₁ es el campo hipocámpico más grande en los seres humanos y se localiza en la división superior, en la interfaz entre el hipocampo y el subículo. CA₂ y CA₃ están en la división inferior dentro del hipocampo. El CA₄ constituye la zona de transición entre el hipocampo y el giro dentado. El campo CA₁ (también conocido como sector de Sommer y sector vulnerable) es de interés para los neuropatólogos porque sus neuronas piramidales son muy sensibles a la anoxia e isquemia y porque es la zona en que se desencadenan algunas formas de epilepsia del lóbulo temporal (Afifi y Bergman, 1999).

Hay dos tipos de neuronas en el hipocampo: las principales o piramidales y las intrínsecas (polimórficas y de canasta). Las neuronas piramidales son las únicas con axones que contribuyen al tracto eferente del hipocampo. Varían en tamaño y densidad en diferentes regiones del hipocampo. Las neuronas intrínsecas, por su parte, tienen axones que permanecen dentro del hipocampo, y causa de la irregularidad de su soma y dendritas se denominan neuronas polimórficas. Son inhibitorias (GABAérgicas) para la actividad de las piramidales, y son menos numerosas que éstas. Se calcula que una célula de canasta se relaciona con unas 200-500 células piramidales.

La gran mayoría de las vías aferentes extrínsecas hacia el hipocampo proceden del área entorrinal (área 28 de Brodmann) del giro parahipocámpal, y en menor medida del área septal. Las vías eferentes de la formación hipocámpica consisten en los axones de las neuronas piramidales del hipocampo y subículo, que se proyectan a la corteza entorrinal. Ambos contribuyen con fibras para el fórnix, el tracto eferente de la formación hipocámpica (Afifi y Bergman, 1999).

Los estudios con seres humanos con lesiones cerebrales indican que el hipocampo es importante para el aprendizaje y la memoria de acontecimientos,

objetos y palabras (lo que se denomina la memoria declarativa o explícita o de base de datos). Es necesario el sistema colinérgico para el mantenimiento de la memoria explícita. El bloqueo colinérgico central (como el que se produce en la EA) produce alteración de la función del sistema de proyección colinérgico a la neocorteza e hipocampo y causa importante reducción en la adquisición del conocimiento explícito o declarativo.

Avances farmacológicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

La primera gran teoría sobre la causa de la EA fue la “teoría colinérgica” (Hardy y Allsop, 1991). Hasta la fecha ha constituido la base de la mayoría de los tratamientos, dirigidos a aumentar la síntesis de acetilcolina (ACh) incrementando la disponibilidad de sus precursores (colina, lecitina), o a inhibir su degradación, interfiriendo en la acción de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima encargada de destruir la acetilcolina después de haber ejercido su efecto sobre las neuronas (Scarpini y cols., 2003). Los anticolinesterásicos aprobados en la actualidad son tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina (*Tabla 1.1*) (Sonkusare y cols., 2005). Otra estrategia en esta dirección es estimular directamente los receptores muscarínicos de las neuronas corticales, para recuperar la función colinérgica perdida por la falta de acetilcolina (Greenlee y cols., 2001).

Este abordaje terapéutico sólo ha cosechado resultados moderados. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa sólo mejoran la memoria en EA moderada, pero no pueden detener la neurodegeneración que se produce en etapas más avanzadas. De hecho, la efectividad de estos agentes desciende a medida que progresa la enfermedad (Standridge, 2004). Por ello, se supone que en la EA, aunque puede ser importante la disminución de la neurotransmisión colinérgica, deben darse otras causas y mecanismos de degeneración de las neuronas. En los últimos años ha cobrado notable interés desde un punto de vista clínico otro sistema de neurotransmisión, también dañado en la EA: el sistema glutamatérgico. Los niveles de glutamato se encuentran elevados con respecto a los niveles normales en algún o algunos períodos del curso clínico de la enfermedad; provocan un fenómeno de excitotoxicidad, que acarrea la degeneración de determinadas neuronas, lo que repercute en el deterioro de las funciones cognitivas (Hynd y cols., 2004).

Debido a que los péptidos β A aumentan las neurotoxicidades de glutamato y NMDA en cultivos de neuronas corticales humanas (Mattson y cols., 1992), cabe

esperar que esta degeneración neuronal podría prevenirse mediante antagonistas apropiados de los receptores de glutamato. De hecho, una serie de compuestos de uso clínico para otros desórdenes diferentes a la EA pueden suprimir las elevaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} y proteger a las neuronas contra el insulto excitotóxico (Standridge, 2004); entre ellos se encuentran varios antagonistas de los receptores glutamato, como memantina (Muller y cols., 1995; Sonkusare y cols., 2005).

Fármaco	Mecanismo	Efectos adversos	Comentarios
Tacrina	Inhibidor no selectivo de colinesterasa, mayor afinidad hacia la forma sináptica G4	Hepatotoxicidad y síntomas gastrointestinales: náuseas, anorexia, diarrea	Requiere monitorizar los niveles de transaminasas; también inhibe débilmente los canales de K^+
Donepezilo	Inhibidor selectivo de AChE; la afinidad hacia G1 y G4 varía según la región	Diarrea, náuseas, anorexia, vómitos, calambres musculares, fatiga en algunos casos	Inhibidor reversible, alta biodisponibilidad oral y no hepatotoxicidad
Rivastigmina	Inhibidor no selectivo de colinesterasas, tiene mayor afinidad por la forma G1 citoplasmática de AChE	Náuseas, vómitos y diarrea	Inhibidor pseudo-irreversible inactivado por digestión enzimática en el sitio activo de la enzima y no por el metabolismo
Galantamina	Inhibidor específico de AChE	Náuseas, vómitos, anorexia, pérdida drástica de peso a altas dosis	También se une a receptores nicotínicos presinápticos, estimulando la liberación de ACh
Memantina	Inhibidor no competitivo de receptores NMDA, moderada afinidad	Moderados y poco frecuentes, estreñimiento, confusión, dolor de cabeza, mareo, cansancio	Inhibe el funcionamiento patológico pero no fisiológico de los receptores NMDA, también tiene acción antioxidante y aumenta la producción de BDNF

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro; G1, G4: isoformas de AChE, G1 es citoplasmática mientras que G4 es sináptica

Tabla 1.1. Comparación farmacológica entre los fármacos actualmente aprobados en EA. (Sonkusare y cols., 2005).

Memantina es un inhibidor no competitivo del receptor NMDA, de moderada afinidad, que inhibe la actividad patológica de este receptor sin afectar a los procesos fisiológicos de aprendizaje y memoria. Actúa bloqueando a los receptores activos cuando hay una liberación sostenida de glutamato. Cuando hay una liberación elevada y transitoria de glutamato, como ocurre en los procesos de aprendizaje, el bloqueo se pierde y la señal es reconocida y procesada. Por todo ello, memantina es el único fármaco que ha sido aprobado para el tratamiento de las etapas más avanzadas de EA (Sonkusare y cols., 2005). En la actualidad se estudia la administración conjunta de memantina con el tratamiento clásico de anticolinesterásicos para establecer una posible sinergia entre ambos (Wenk y cols., 2000; Enz y Gentsch, 2004).

Sin embargo, es probable que el tratamiento a largo plazo con antagonistas de receptores de glutamato pueda provocar efectos secundarios no deseados. Es decir, todas las neuronas en el SNC, así como algunos tipos de células no neuronales, poseen receptores de glutamato, por tanto el normal funcionamiento de esas células podría verse comprometido por los antagonistas. Sería necesario desarrollar una batería más amplia de fármacos que, como memantina, bloqueen la sobreactivación de los receptores NMDA sin afectar a su actividad fisiológica. También sería interesante el desarrollo de compuestos que frenasen las cascadas de neurodegeneración, potenciando vías de supervivencia neuronal endógenas.

Desarrollo de nuevos fármacos mediante química combinatoria

A lo largo del pasado siglo, la investigación farmacológica ha sido el aspecto científico que más ha contribuido al progreso de la medicina. Por otro lado, la biología molecular y los avances genómicos han tenido un gran impacto en el descubrimiento de nuevos fármacos. Mediante química combinatoria pueden sintetizarse un gran número de moléculas que sirven para realizar barridos

aleatorios. Estas colecciones de moléculas reciben el nombre de librerías combinatorias o quimiotecas, y pueden permitir la generación de nuevos agonistas y antagonistas de receptores neuronales, que tras un proceso de optimización estructural pueden convertirse en fármacos clínicamente útiles (Drews y Ryser, 1997; Hogan, Jr., 1997).

Con la estrategia combinatoria se complementa la vía tradicional en química medicinal de cribado de extractos vegetales que constituyen quimiotecas naturales compuestas de miles de moléculas, y que han contribuido decisivamente a generar principios activos o fitofármacos. La ventaja más importante de la estrategia combinatoria es la posibilidad de cribar millones de moléculas de forma eficiente, siempre que se disponga de un ensayo de cribado biológico de alto rendimiento (Houghten y cols., 2000). Claramente, el aumento significativo de la diversidad química cribada incrementa notablemente la probabilidad de identificar moléculas con la actividad biológica deseada. Con la tecnología disponible, la química combinatoria permite diseñar y sintetizar quimiotecas de péptidos caracterizadas por una diversidad estructural muy alta (Bevan y cols., 1995). Estas quimiotecas se han utilizado para identificar moléculas con actividad biológica que incluye opiáceos, antimicrobianos, inhibidores de proteasas y secuencias aminoacídicas con actividad neuroprotectora (Ferrer-Montiel y cols., 1998a). Una limitación sería del uso terapéutico de los péptidos, principalmente aquellos formados con aminoácidos L, es su baja biodisponibilidad, su inestabilidad metabólica y su pobre permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Para superar estos inconvenientes, se han diseñado y sintetizado quimiotecas basadas en aminoácidos D y no naturales, pseudopéptidos (peptoides), y moléculas orgánicas de peso molecular medio (Hogan, Jr., 1997). Estas quimiotecas permiten el aislamiento de moléculas activas de mayor índice terapéutico que conducen rápidamente a la obtención de moléculas cabeza de serie ('leads'), altamente atractivas para las empresas farmacéuticas por su potencial desarrollo en fármacos.

Siguiendo este procedimiento de química combinatoria, nuestro grupo ha generado una librería de trímeros de N-alquilglicina, que son unas moléculas cuya fórmula general se muestra en la *Figura 1.8*.

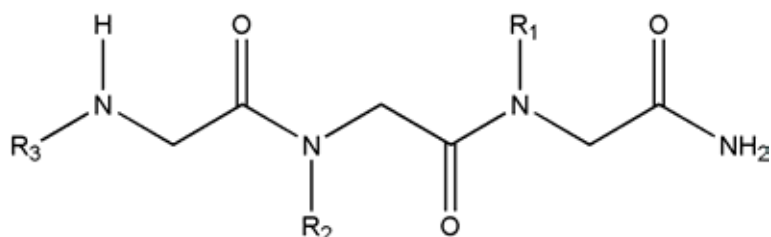


Figura 1.8. Fórmula general de los trímeros de N-alquilglicina.

R₁, R₂ y R₃ aportan la diversidad a la molécula y son iguales o diferentes, de manera independiente, y entre 22 radicales posibles (ver apartado de Materiales). La librería se basa en las 3 diferentes posiciones, y en cada mezcla se fija una posición con uno de los 22 posibles radicales (en total 66 mezclas diferentes) y las otras 2 posiciones tienen una mezcla equimolecular de todos los radicales. Cada mezcla contiene, por tanto, 484 trímeros individuales, y la librería en total 10.648 trímeros.

2. Objetivos

Objetivos

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es la determinación de la actividad neuroprotectora y el mecanismo de acción de trímeros de N-alquilglicina frente a estímulos neurotóxicos en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

Pretendemos abordar este objetivo general con los siguientes **objetivos parciales**:

1. Puesta a punto de un cultivo primario de neuronas de hipocampo como sistema modelo adecuado para estudiar la toxicidad de diferentes estímulos neurotóxicos.
2. Caracterización del cultivo de neuronas de hipocampo frente a estímulos excitotóxicos y degeneración neuronal inducida por péptido β -amiloide.
3. Estudio de la capacidad neuroprotectora y mecanismo de acción de N-alquilglicinas frente a choque excitotóxico por NMDA en cultivos de neuronas de hipocampo.
4. Estudio de la capacidad neuroprotectora y mecanismo de acción de N-alquilglicinas frente a neurodegeneración mediada por péptidos β -amiloideos en cultivos de neuronas de hipocampo.

3. Resultados

1. Cribado de una librería de trímeros de N-alquilglicina: identificación de los radicales con actividad bloqueadora de los receptores NMDA

Con el objetivo de buscar nuevos bloqueadores del receptor de NMDA que nos sirvan de base estructural para el diseño de futuros fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, hemos empleado la química combinatoria como fuente de moléculas activas en distintos ensayos.

Dado que estudios previos han puesto de manifiesto que estructuras peptídicas son bloqueadoras del receptor NMDA (Ferrer-Montiel y cols., 1998a), decidimos buscar nuevos bloqueadores entre moléculas peptoides. En concreto, hemos realizado el cribado de una quimioteca de trímeros de N-alquilglicina o peptoides, para identificar bloqueadores del receptor de NMDA. Esta librería está basada en 3 posiciones variables de la molécula de N-alquilglicina (*Figura 3.1 A*), donde se fija una de las posiciones con uno de los 22 radicales posibles (ver apartado de Materiales) que aportan variabilidad a la molécula, un total de 66 mezclas, y las otras dos posiciones restantes tienen una mezcla equimolecular de estos radicales. Cada una de las 66 mezclas contiene, por tanto, 484 moléculas diferentes (22×22), y la librería comprende en total 10648 trímeros ($22 \times 22 \times 22$). El set de 22 radicales incluye grupos alifáticos y aromáticos para mejorar la biodisponibilidad y permeación a través de la barrera hematoencefálica. También se emplearon radicales con un grupo amino terciario, debido a que el receptor NMDA muestra preferencia a la carga positiva (Ferrer-Montiel y cols., 1998a).

El cribado inicial de esta librería combinatoria, para determinar el grado de relevancia de cada uno de los radicales R_1 , R_2 y R_3 de los trímeros, se realizó midiendo la capacidad de bloqueo de corrientes del receptor NMDA. Las subunidades NR1 y NR2A del receptor de NMDA humano se expresaron en ovocitos de *Xenopus laevis* y, mediante el registro de corrientes por la técnica de voltage-clamp, se analizó la capacidad de bloqueo de corrientes inducidas por glutamato de

cada una de las 66 mezclas que componen esta librería. Como muestra la *Figura 3.1 B*, existe un bloqueo basal que oscila entre un 20 y un 30 %. Se seleccionaron para cada posición aquellos radicales que bloquearon más de un 50 %, y se sintetizaron trímeros individuales con las 3 posiciones definidas.

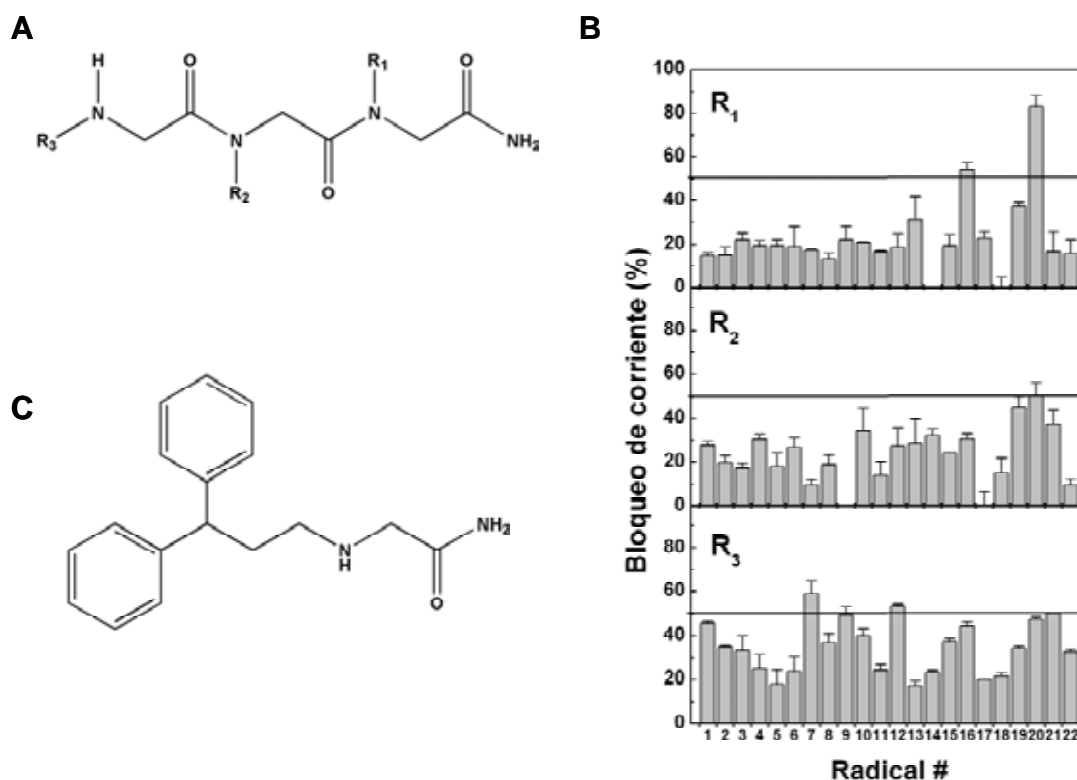


Figura 3.1. Cribado de la librería de trímeros de N-alkilglicina. (A) Estructura general de los trímeros de N-alkilglicina. (B) Caracterización de la capacidad de bloqueo de una librería de N-alkilglicinas de corrientes inducidas por glutamato en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor de NMDA (NR1/NR2A) humano. (C) Estructura del monómero N20C.

Con los datos derivados del cribado se sintetizó una familia de trímeros de N-alkilglicina con las 3 posiciones definidas por los radicales más activos. Varios derivados de estos trímeros fueron el resultado de un proceso de acortamiento de las moléculas iniciales, buscando una mayor eficacia en el bloqueo. De la información obtenida en el cribado se deriva que el grupo 3,3-difenilpropilamino (radical nº 20) en la posición N-terminal aumenta considerablemente la capacidad de bloqueo, lo que sugiere que este grupo químico es relevante para la función de los trímeros de N-alkilglicina. Como el grupo 3,3-difenilpropilamino parece jugar un papel

principal, y una reducción en el tamaño de los bloqueadores mejoraría la capacidad de bloqueo, se sintetizaron los correspondientes dímeros y el monómero N20C (*Figura 3.1 C*). Los dímeros de N-alkilglicina eran químicamente inestables, dando lugar a las correspondientes moléculas de 1,4-dicetopiperacinas, que no bloquean significativamente el paso de corriente a través del receptor NMDA (datos no mostrados). En cambio la N-alkilglicina N20C es químicamente estable, por lo que sí se empleó en los ensayos posteriores (Planells-Cases y cols., 2002).

La capacidad de bloqueo del receptor NMDA por parte de las N-alkilglicinas sintetizadas se determina mediante registros de voltage-clamp en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan las subunidades NR1/NR2A. Como se aprecia en la *Figura 3.2*, la aplicación de un pulso de glutamato 100 μM conduce al registro de una corriente iónica de entrada de cinética rápida, que alcanza su máximo valor a los pocos msec y se mantiene estable mientras continúa la aplicación del agonista.

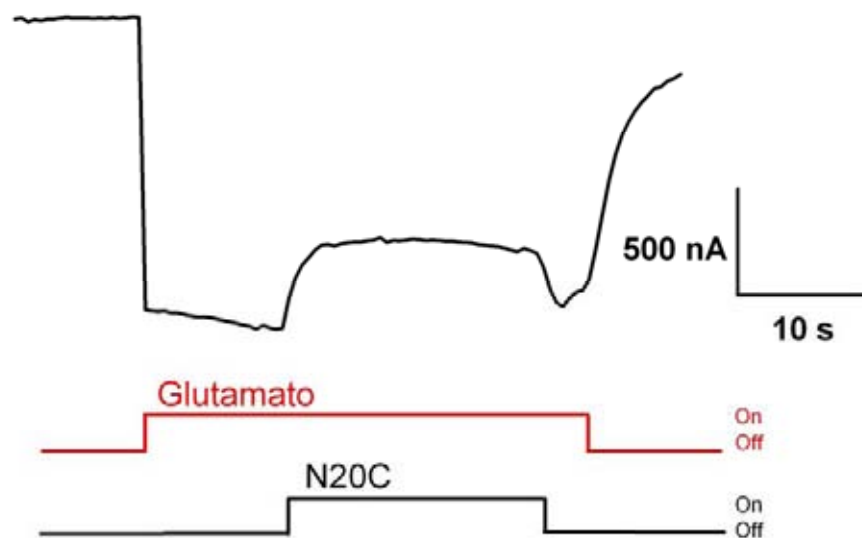


Figura 3.2. Capacidad de bloqueo de la N-alkilglicina N20C frente a la corriente inducida por glutamato en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor NMDA funcional de rata (NR1/NR2A). Registro tipo de la corriente inducida por glutamato 100 μM /glicina 10 μM y el bloqueo por N20C 10 μM . Las líneas inferiores indican el inicio (On) y finalización (Off) de los pulsos de glutamato 100 μM /glicina 10 μM (glutamato) y de glutamato 100 μM /glicina 10 μM /N20C 10 μM (N20C).

La adición de N20C, u otra N-alquilglicina con capacidad de bloqueo, produce una disminución en la corriente, cuya magnitud depende de la concentración de antagonista en la solución. Este bloqueo es reversible, ya que cuando se retira la N-alquilglicina la corriente recupera los valores previos a la adición. La corriente registrada disminuye rápidamente tras el lavado de la solución de glutamato, volviendo en pocos segundos a los valores iniciales.

El primer paso para la caracterización de estas moléculas como futuros fármacos de uso terapéutico es el estudio de su capacidad neuroprotectora *in vitro*, con un cultivo celular adecuado. Para llevar a cabo ensayos de excitotoxicidad y evaluar la capacidad protectora de las N-alquilglicinas, hemos puesto a punto y caracterizado un cultivo primario de neuronas de hipocampo de cerebro de rata, cuya descripción pasamos a realizar.

2. Puesta a punto y caracterización del cultivo de neuronas de hipocampo de cerebro de rata

2.1. Morfología neuronal en función de los días *in vitro*

Los hipocampos se obtienen a partir de embriones de rata y las neuronas muestran un grado de maduración y desarrollo axonal y dendrítico casi nulo. Tras llevar a cabo la siembra de las células en las placas de cultivo, se inicia un proceso de maduración de las neuronas que se puede seguir visualmente y se traduce en el desarrollo de dendritas y axones en forma de un complejo entramado.

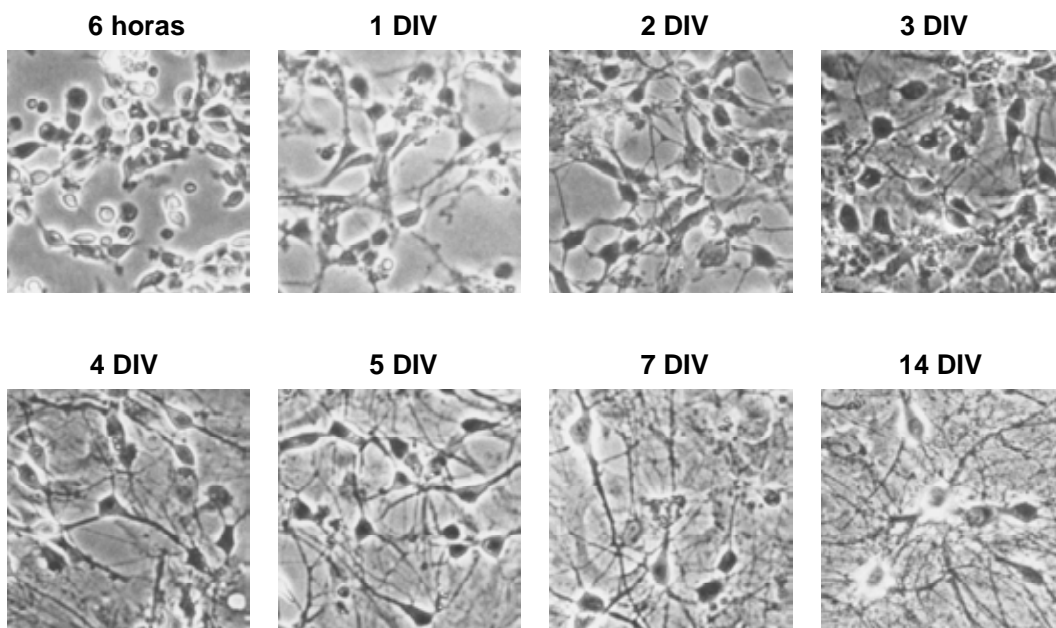


Figura 3.3. Desarrollo morfológico, axonal y dendrítico de neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo hasta 14 DIV. Los tiempos indicados se consideran tras la siembra de las neuronas.

Como se muestra en la *Figura 3.3*, a las pocas horas de la siembra, las neuronas aparecen redondeadas, sin prácticamente ninguna conexión entre ellas. A partir del primer día *in vitro* (DIV 1) se inicia el desarrollo de dendritas y axones, cuyo número aumenta de manera gradual según aumenta el tiempo del cultivo. Este

aumento del número de conexiones va acompañado del aumento del tamaño de las somas de las neuronas. La diferencia principal existente entre 7 y 14 DIV desde un punto de vista morfológico reside, fundamentalmente, en el grado de complejidad del entramado dendrítico y axónico que existe entre las neuronas, que es mayor a 14 DIV.

2.2. Maduración de cultivo en función de los días *in vitro*: medida de actividades deshidrogenasa por reducción de MTT

Hemos medido las actividades deshidrogenasa por reducción del MTT a formazán a diferentes DIV. Como muestra la *Figura 3.4*, en la que se representa la diferencia de absorción a 495 y a 650 nm frente a DIV, se produce un incremento de esta diferencia desde el DIV 1 hasta el DIV 7, aproximadamente, lo que implica un aumento en la actividad deshidrogenasa total de la célula, reflejando el crecimiento o maduración celular. Desde el DIV 7 hasta el DIV 14 el valor de diferencia de absorción a 495 y a 650 nm se estabiliza. Esta maduración no se altera por la adición de FUDR al medio (realizada a los 4 y 11 DIV), por lo que la contribución de las células de la glía no es significativa, como cabe esperar por el bajo porcentaje existente en este cultivo. El aumento en la actividad mitocondrial se debe, por tanto, de manera fundamental al aumento de crecimiento y maduración de las células neuronales. La medida de la densidad neuronal del cultivo a lo largo de los DIV indica que no hay pérdida de viabilidad entre 7 y 14 DIV (datos no mostrados). Esto es consistente con la estabilización de la actividad mitocondrial que refleja la situación del cultivo entre 7 y 14 DIV, donde sólo aumenta el entramado axonal/dendrítico (*Figura 3.3*).

La mayoría de los estudios realizados en el presente trabajo se han llevado a cabo principalmente a 14 DIV, tiempo del cultivo en el cual se observa una

estabilización tanto en el aspecto morfológico de las neuronas como en la reducción de MTT a formazán por las actividades deshidrogenasas mitocondriales.

Los cultivos pueden mantenerse hasta 3 semanas *in vitro*, momento a partir del cual se inicia un descenso pronunciado de la viabilidad.

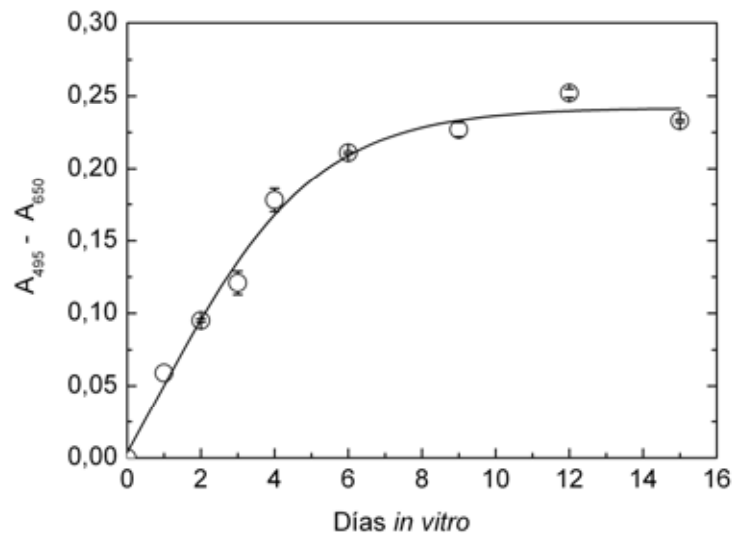


Figura 3.4. Medida de la reducción de MTT a formazán por las neuronas de hipocampo a diferentes días *in vitro* en cultivo. Las células se incubaron a los diferentes días *in vitro* con solución salina a la que se añadió MTT 150 $\mu\text{g/ml}$, manteniéndolas a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. El parámetro que se mide es la diferencia de absorción a 495 y 650 nm.

2.3. Niveles proteicos de las principales subunidades de los receptores NMDA a lo largo de los DIV del cultivo de neuronas de hipocampo

Como ya se ha mencionado en el apartado de Introducción, el hipocampo es la región del SNC que cuenta con la mayor densidad de receptores NMDA. Hemos realizado un análisis de inmunodetección de las principales subunidades de estos receptores a lo largo de los días *in vitro*. Se emplearon anticuerpos frente a las subunidades NR1, NR2A y NR2B; de esta forma, además de detectar su presencia, podemos analizar de manera semicuantitativa las variaciones en los niveles de estas proteínas a lo largo del desarrollo del cultivo primario.

Como se observa en la *Figura 3.5*, los niveles de la subunidad NR1 se mantienen constantes a lo largo de los días de cultivo *in vitro*. Tanto NR2A como NR2B están presentes principalmente los primeros días tras la siembra de las neuronas de hipocampo; posteriormente su cantidad disminuye, sin desaparecer por completo. La cantidad de proteína NR2A aumenta durante los primeros DIV, alcanzando un máximo a los 7 días tras la siembra de las neuronas (*Figura 3.5 A*). Posteriormente estos niveles disminuyen, alcanzando los niveles iniciales a 14 DIV, y disminuyendo aún más hasta 21 DIV.

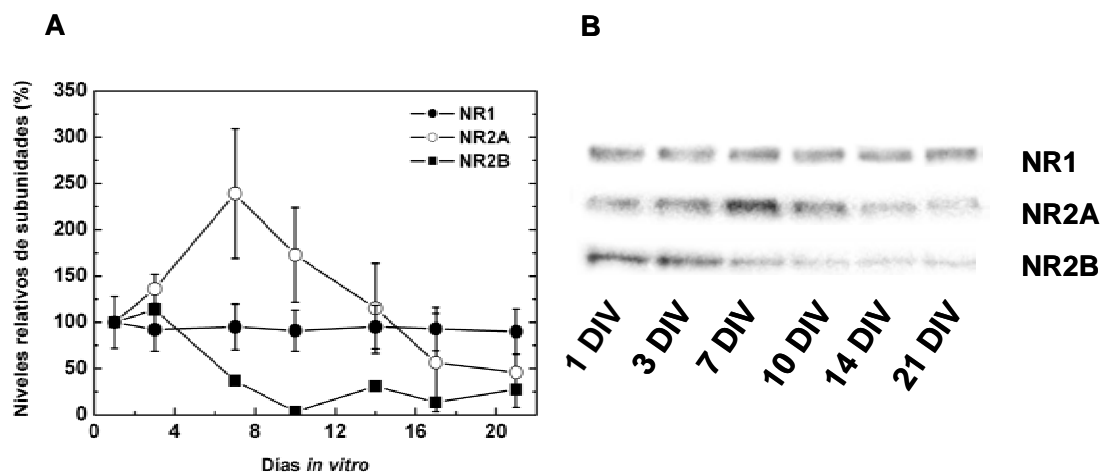


Figura 3.5. Niveles de las subunidades NR1, NR2A y NR2B a diferentes días *in vitro* en el cultivo de neuronas de hipocampo. (A) Cuantificación de los niveles de las distintas subunidades a lo largo de los días de cultivo *in vitro*. Se muestran los valores relativos al DIV 1. (B) Imágenes representativas de los ensayos de inmunodetección de las subunidades NR1, NR2A y NR2B a lo largo de los días de cultivo *in vitro*.

Los niveles de NR2B, en cambio, no aumentan tras la siembra de las neuronas, sino que disminuyen paulatinamente del DIV 1 al DIV 7. A partir de este momento sus niveles se mantienen bajos pero estables (*Figura 3.5 A*).

3. Caracterización de la muerte neuronal inducida por glutamato y N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos primarios de hipocampo

3.1. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a glutamato y NMDA en función de los DIV

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación es la puesta a punto de ensayos *in vitro* de excitotoxicidad que permitan, por un lado, el estudio del proceso de muerte neuronal, y por otro la caracterización de posibles dianas terapéuticas sobre las que dirigir nuevos fármacos de uso clínico. Los receptores de glutamato del subtipo NMDA constituyen un elemento importante en el proceso de muerte neuronal, debido a su alta permeabilidad a Ca^{2+} . Hemos realizado la caracterización de la muerte neuronal hasta los 21 DIV, para evaluar la evolución de la excitotoxicidad mediada por glutamato y NMDA a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro*.

Hemos caracterizado la sensibilidad de las neuronas de hipocampo de rata a incubaciones con glutamato y NMDA inferiores a 1 hora. La adición de glutamato durante 20 minutos a una concentración saturante de 200 μM en presencia de glicina 100 μM como coagonista de los receptores tipo NMDA, y Ca^{2+} 2 mM, tras una semana después de la siembra de las neuronas, no produce una muerte neuronal diferente de la que se observa en neuronas control, a las que se ha expuesto únicamente a Ca^{2+} (*Figura 3.6*). Este mismo nivel de muerte neuronal se observa en neuronas a las que no se ha expuesto a ninguna sustancia o catión. Como es previsible, el nivel de muerte no varía cuando además de glutamato, glicina y Ca^{2+} , se añade el antagonista específico de receptores tipo NMDA MK-801. El mismo patrón de resultados se obtiene si se emplea como agonista NMDA en lugar de glutamato.

Por el contrario, a 14 DIV la incubación con glutamato 200 μM durante 20 minutos en presencia de glicina 100 μM y Ca^{2+} 2 mM provoca la muerte del $40,4 \pm$

6,5 % de las neuronas del cultivo. En este caso, la muerte de las neuronas expuestas únicamente a Ca^{2+} 2 mM es sólo del $3,4 \pm 3,1$ % , y la muerte de neuronas no expuestas a ninguna solución es del $2,7 \pm 1,8$ %. MK-801 10 μM protege el 100 % de la muerte neuronal ($2,8 \pm 1,7$ %). Resultados similares se obtienen con NMDA, que provoca la muerte del $38,7 \pm 9,3$ % de las neuronas del cultivo, muerte que es también totalmente protegida por MK-801, como cabe esperar de un antagonista específico. Estos resultados sugieren que la muerte inducida por glutamato a 14 DIV tiene lugar a través de receptores NMDA.

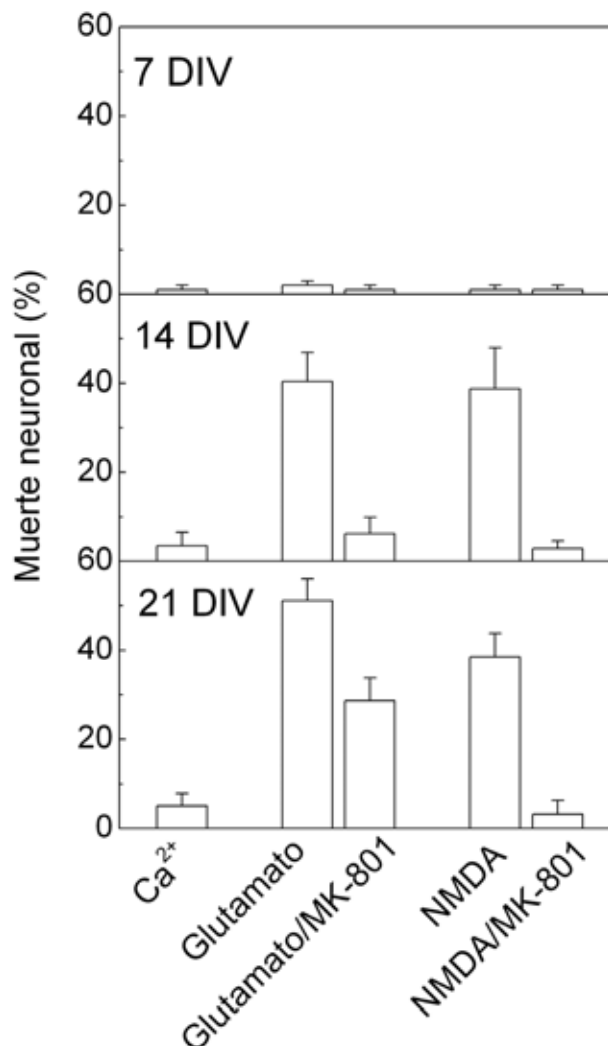


Figura 3.6. Muerte neuronal inducida por glutamato y NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7, 14 y 21 DIV. Las neuronas se incubaron durante 20 minutos con solución básica salina (BSS) a la que se añadieron los agonistas/antagonista indicados.

A 21 DIV no se observa ningún cambio en cuanto a la muerte provocada por NMDA y la protección obtenida por MK-801, que son $38,5 \pm 5,3$ % y $3,2 \pm 3,1$ % respectivamente. Por el contrario, se produce un aumento de un 10 % en la muerte neuronal provocada por glutamato con respecto a 14 DIV, alcanzándose un $51,1 \pm 4,9$ % de neurodegeneración. Además esta muerte no es protegida totalmente por MK-801, produciéndose bajo esta condición un $28,7 \pm 5,1$ % de muerte neuronal inducida por glutamato. Este resultado sugiere que el grado de expresión de receptores tipo NMDA en la membrana se ha estabilizado desde los 14 hasta los 21 DIV, y glutamato debe inducir muerte neuronal vía receptores no-NMDA.

Para abordar este último punto, planteamos la siguiente hipótesis: si la muerte provocada por glutamato a 21 DIV se produce a través de distintos subtipos de receptores, NMDA y no-NMDA, sería posible bloquearla por completo si se incuban las neuronas con un cóctel de varios antagonistas. En este caso hemos empleado una mezcla de MK-801 $10 \mu\text{M}$ y CNQX $10 \mu\text{M}$. CNQX es un antagonista específico de receptores no-NMDA. En la *Figura 3.7* se muestra el resultado obtenido. Como se indicó anteriormente, la muerte inducida por glutamato es aproximadamente un 50 % y la protección por MK-801 es incompleta, con un 28 % de muerte neuronal. La mezcla de MK-801 y CNQX protege totalmente frente a glutamato, con valores de muerte similares a la condición control. La implicación de diferentes receptores de glutamato en el proceso de muerte neuronal será discutida más adelante.

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo es diseñar ensayos de excitotoxicidad para evaluar la capacidad protectora de diferentes moléculas, los resultados obtenidos con neuronas de hipocampo nos sugieren emplear cultivos a 14 DIV para ensayar compuestos frente a NMDA, y cultivos a 21 DIV para compuestos protectores frente a glutamato.

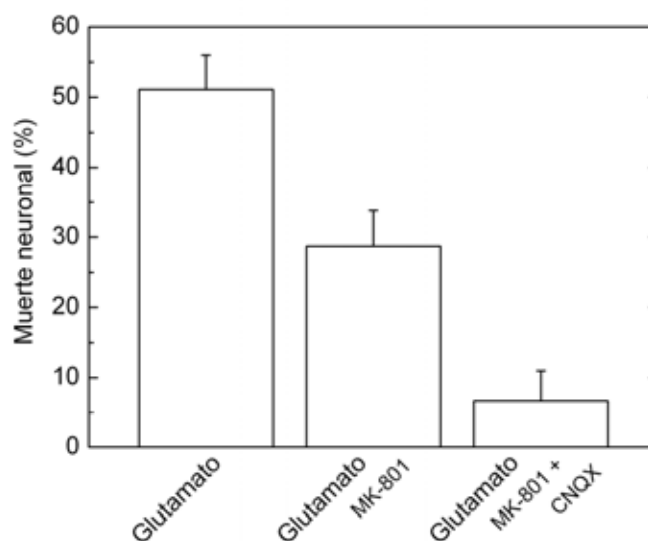


Figura 3.7. Protección por antagonistas frente a la muerte inducida por glutamato en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 21 DIV. Las neuronas de hipocampo a 21 DIV fueron sometidas a incubación durante 20 minutos en solución básica salina (BSS) en presencia de glutamato y los antagonistas indicados. A efectos comparativos se ha incluido la muerte inducida por glutamato en ausencia de antagonistas.

3.2. Determinación de la EC₅₀ de glutamato, NMDA, glicina y Ca²⁺ en la inducción de muerte neuronal a 14 DIV

Para conocer más a fondo el proceso de excitotoxicidad ejercido por glutamato y NMDA en el cultivo neuronal de hipocampo, hemos titulado en el intervalo de concentración 10⁻⁸ a 10⁻³ M con glutamato, NMDA y glicina, pues el efecto que provocan los agonistas sobre las neuronas de hipocampo es dependiente de la concentración de los mismos en la solución externa. Esto nos permitirá calcular la EC₅₀ para cada uno de los agonistas, definida como la concentración a la cual ejercen el 50 % de su efecto. El ajuste de los datos de dosis-respuesta se ha realizado según se indica en Materiales. Los valores de EC₅₀ obtenidos se observan en la *Tabla* adjunta (*Figura 3.8*). El valor de EC₅₀ es similar para glutamato y NMDA, en el mismo orden de magnitud (24 ± 3 μM para glutamato y 17 ± 8 μM para NMDA), lo que es consistente con que a 14 DIV provocan muerte neuronal a través del mismo

subtipo de receptores (ver *Figura 3.6*). El valor de EC_{50} de glutamato es ligeramente superior al de NMDA. Esto tiene sentido, pues la especificidad del agonista NMDA para el receptor NMDA es superior a la de glutamato. Por otro lado, estos valores son muy similares o del mismo orden de magnitud que los publicados previamente para cultivos neuronales de hipocampo, así como para otros cultivos primarios de neuronas distintos de los de hipocampo (Blevins y cols., 1997; Fontana y cols., 1997; Weaver, Jr. y cols., 1998).

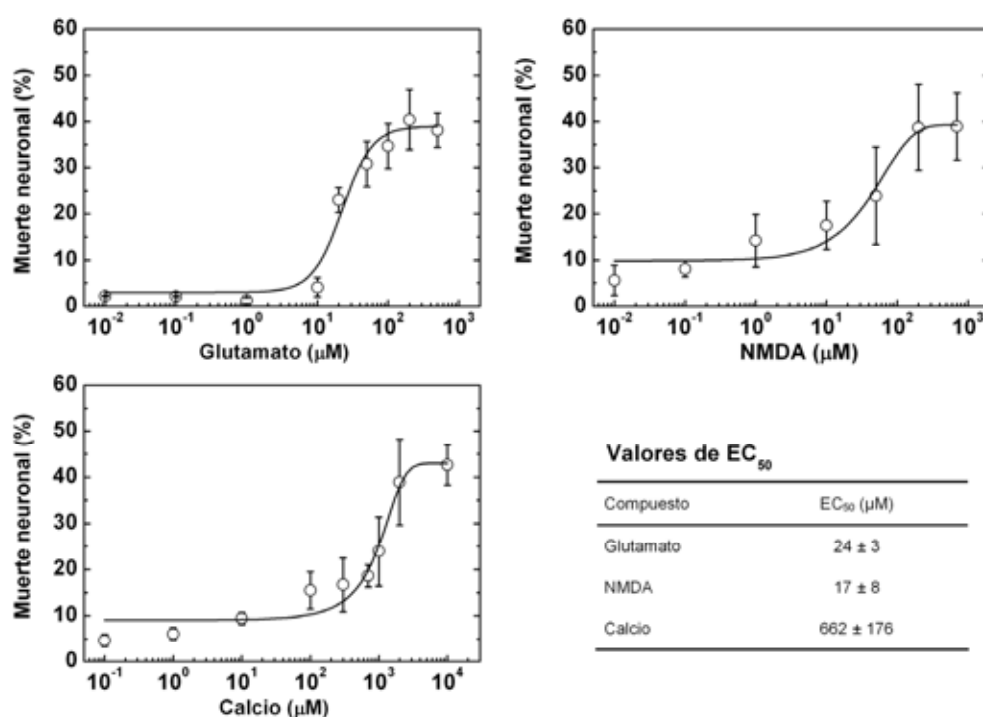


Figura 3.8. Efecto de la concentración de glutamato, NMDA y Ca^{2+} sobre la muerte inducida en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación durante 20 minutos en solución básica salina en presencia de diferentes concentraciones de glutamato, NMDA o Ca^{2+} , respectivamente. El ajuste del valor de EC_{50} se obtuvo con la curva dosis respuesta logístico del programa de gráficos Origin 7.0 de MicroCal.

A partir de las curvas de saturación del efecto de inducción de muerte por agonistas, además de la EC_{50} , obtenemos el valor de la pendiente, que es el valor del coeficiente de Hill (n_H). Este valor puede considerarse como el número de sitios de unión funcionales de la molécula de agonista. Para NMDA este valor es de $0,7 \pm 0,2$ mientras que para glutamato es de $1,7 \pm 0,2$. La diferencia existente entre el valor del

coeficiente de Hill para NMDA y glutamato es un reflejo de la diferente afinidad, mayor para NMDA, en la interacción con los canales oligoméricos presentes en la superficie de las neuronas. Por tanto, mientras para la activación de estos canales por glutamato se necesitarían dos moléculas, para NMDA sería suficiente con sólo una.

También hemos titulado la concentración de glicina, coagonista de los receptores NMDA, en el intervalo 10^{-9} a 10^{-3} M, con una concentración saturante de NMDA (datos no mostrados). En este caso el porcentaje de muerte neuronal es siempre el mismo, aproximadamente un 38-40 %, lo que no nos permite obtener una curva de dosis-respuesta. La razón más plausible al hecho de que en nuestras condiciones no podamos calcular una EC_{50} para glicina es que la incubación con NMDA $200 \mu\text{M}$ supone una despolarización que provoca la salida de suficiente glicina endógena que alcance una concentración superior a la EC_{50} .

El ión Ca^{2+} está profundamente implicado en el proceso de muerte neuronal, siendo dicho proceso de neurodegeneración dependiente de la concentración de Ca^{2+} en el medio, que permea a través del canal de los receptores NMDA. Se ha empleado NMDA a saturación como agonista en el choque excitotóxico, y la EC_{50} que se obtiene para Ca^{2+} es $662 \pm 176 \mu\text{M}$.

3.3. Análisis de la secuencia temporal de muerte inducida por NMDA a 14 DIV: tinción con trypan blue

La muerte neuronal ha sido determinada mediante la tinción de trypan blue. Las neuronas positivas para este colorante se contabilizan como muertas, pues la entrada del colorante indica que la membrana celular ha perdido su integridad. Las neuronas negativas para el colorante son células vivas, pues mantienen su membrana intacta y no permiten la entrada de trypan blue.

Como puede observarse en las imágenes de la *Figura 3.9*, si las neuronas de hipocampo se incuban en solución básica salina suplementada con calcio, no se tiñen

por trypan blue y aparecen brillantes al microscopio óptico. En cambio, si se incuban en la solución anterior suplementada con una concentración elevada de glutamato, un cierto porcentaje de ellas pierden el brillo y se tiñen de azul por el colorante. Lo mismo ocurre si en vez de glutamato se emplea NMDA como agonista. Si se incuban con NMDA y MK-801, las neuronas tienen el mismo aspecto que las neuronas control, demostrando el efecto protector de antagonista específico de los receptores NMDA.

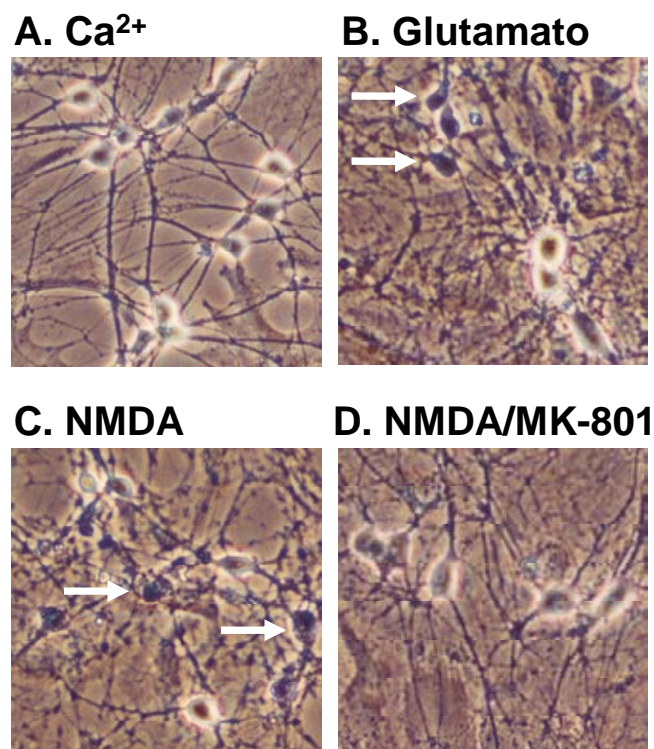


Figura 3.9. Medida de la viabilidad/muerte neuronal por el método de exclusión del colorante trypan blue. Las neuronas a 14 DIV fueron sometidas a tratamiento de excitotoxicidad durante 20 minutos. A las 24 horas se tiñeron con trypan blue al 0.2% y se observaron al microscopio. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Nikon Diaphot 300. Las flechas blancas señalan células muertas teñidas de trypan blue.

Las medidas de viabilidad mediante tinción con trypan blue se realizaron 18-24 horas después del choque excitotóxico, para asegurarnos que la muerte neuronal inducida por este insulto haya alcanzado su máximo valor estable. Durante todo este tiempo de incubación posterior al choque las neuronas se mantienen con medio de

cultivo suplementado con MK-801, para evitar muerte neuronal adicional consecuencia de la liberación de glutamato por las células muertas en el choque excitotóxico de varios minutos.

Es interesante conocer la secuencia temporal de inducción de muerte, para definir mejor el proceso de excitotoxicidad. Como se observa en la *Figura 3.10 A*, la muerte neuronal inducida por un insulto con NMDA de 20 minutos a 14 DIV es ya de un 25 % después de 1 hora, y aumenta progresivamente hasta su máximo valor 6 horas tras el choque. Este nivel de muerte se estabiliza, y a las 24 horas tras el insulto aún permanece estable, sin aumentar significativamente. Esta cinética tan rápida de muerte neuronal sugiere un tipo de muerte necrótica, ya que la muerte celular apoptótica sigue una secuencia temporal mucho más lenta.

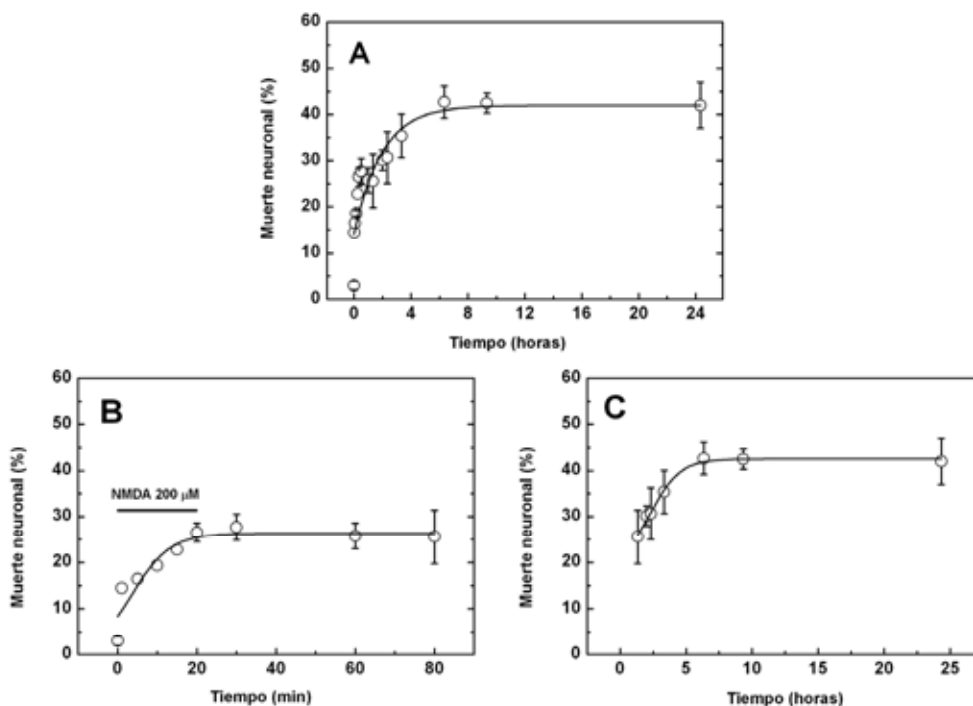


Figura 3.10. Secuencia temporal de la muerte neuronal inducida por NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 20 minutos con solución básica salina con Ca^{2+} 2 mM en presencia de NMDA 200 μM /glicina 100 μM . Se determinó la viabilidad neuronal a los tiempos indicados tras el choque. (A) Secuencia temporal completa. (B) Secuencia temporal inicial correspondiente a los primeros 80 min. (C) Secuencia temporal correspondiente a las siguientes 2-24 h.

Si se profundiza en esta secuencia temporal, se observan 2 componentes: un componente rápido, que se estabiliza en el 25 % de muerte neuronal aproximadamente, el 65 % de la muerte total (*Figura 3.10 B*); y un componente posterior mucho más lento, que va del 25 % al 40 % de muerte neuronal (*Figura 3.10 C*), es decir, el 35 % restante de la muerte total. Durante la incubación con NMDA el porcentaje de muerte neuronal aumenta rápidamente, pasando de 0 a 25 % en un corto espacio de tiempo. El valor de $t_{1/2}$ de este primer componente es de aproximadamente 2,2 min (*Figura 3.10 B*). Una vez finalizado el primer proceso, la muerte neuronal aumenta más lentamente, siguiendo una cinética con un $t_{1/2}$ de 2 horas (*Figura 3.10 C*). 6 horas después del choque excitotóxico de 20 min la muerte neuronal ha alcanzado su máximo valor, y este porcentaje se mantiene estable hasta 24 horas tras el insulto.

Durante el tiempo de incubación con NMDA, los receptores de NMDA de las neuronas de hipocampo se encuentran activados por la unión de su agonista específico. Esta estimulación de los receptores provoca la despolarización celular, debido al flujo iónico que se produce a través del canal del receptor NMDA. El desbalance iónico producido podría ser el responsable del primer componente de muerte neuronal que hemos observado. Para comprobar esta hipótesis, hemos sometido a las neuronas de hipocampo a incubación con una concentración elevada de K^+ (90 mM) durante 20 min, y transcurrido ese tiempo hemos determinado la muerte neuronal. Si se incuban las neuronas con una alta concentración de K^+ en el exterior celular se genera un desequilibrio iónico que provoca la despolarización brusca de la célula. Esta despolarización sostenida durante 20 min provoca la muerte de un 30 % de las neuronas del cultivo (*Figura 3.11*). Una vez que cesa el choque la muerte neuronal se estabiliza, y 24 horas después se mantiene en el mismo valor, sin componente adicional posterior (datos no mostrados). Nimodipina 3 μ M, así como verapamil 10 μ M, protegen en un 50 % de la muerte inducida por alta concentración de K^+ . Ambos compuestos son bloqueadores de canales de Ca^{2+} dependientes de

voltaje tipo L, lo que indica que la muerte inducida por alta concentración de K^+ depende, al menos en parte, de la entrada masiva de Ca^{2+} debida a la despolarización sostenida. MK-801 no protege de la muerte inducida por alto K^+ (Figura 3.11).

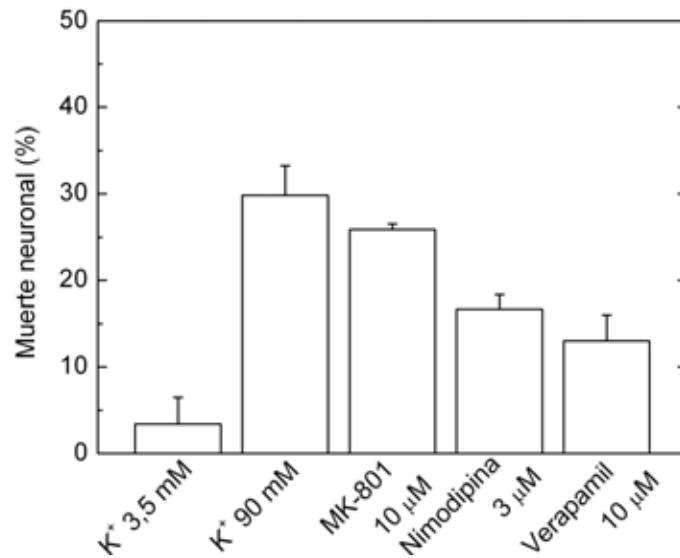


Figura 3.11. Muerte neuronal inducida por alta concentración de K^+ en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 20 minutos con solución básica salina (BSS) con baja (3,5 mM) o alta concentración de K^+ (90 mM), a la que se añadieron los fármacos indicados. La muerte neuronal se determinó inmediatamente tras el choque.

3.4. Morfología nuclear de neuronas de hipocampo: tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

La tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de las neuronas de hipocampo nos permite observar la morfología nuclear, ya que este compuesto es un colorante fluorescente para ácidos nucleicos. Como se observa en las imágenes (Figura 3.12), los núcleos aparecen redondeados y con una tinción clara, si las neuronas no son tratadas o si se incuban en solución básica salina con Ca^{2+} . Por el contrario, cuando se adiciona NMDA la cromatina se condensa en un determinado porcentaje de las neuronas (picnosis), disminuye el tamaño del núcleo y aumenta su brillo (Figura 3.12 C). Esta morfología es característica de la muerte necrótica. No

hemos observado en ninguna ocasión núcleos fragmentados o con forma lobular, típicamente apoptóticos, como los que se observan cuando se tratan las neuronas con estaurosporina, que induce muerte celular apoptótica (*Figura 3.12 E*).

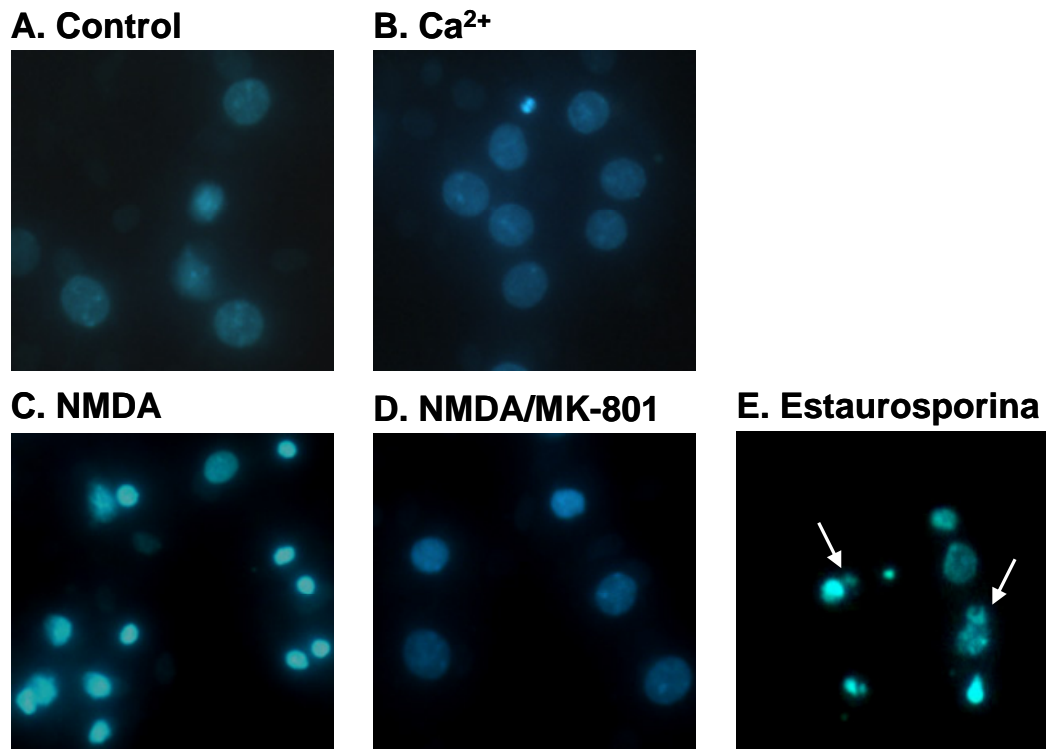


Figura 3.12. Observación de la cromatina nuclear mediante tinción con DAPI a 14 DIV. Las neuronas fueron sometidas a tratamientos control o de excitotoxicidad durante 20 minutos. A las 24 horas se tiñeron con DAPI 2 μM y se observaron al microscopio de fluorescencia. A efectos comparativos se muestra una imagen de neuronas en apoptosis tras tratamiento con estaurosporina 30 nM 24 h.

3.5. Generación de especies reactivas del oxígeno inducida por NMDA

La muerte neuronal inducida por NMDA en nuestras condiciones de ensayo es fundamentalmente de tipo necrótico, como acabamos de mostrar. Uno de los aspectos clave en el proceso de muerte neuronal es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para medir este proceso hemos empleado la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), que muestra fluorescencia a 525 nm cuando se oxida. El grupo diacetato permite la entrada en las

neuronas para, una vez dentro y por acción de esterasas inespecíficas, quedar con carga en el interior celular.

Para llevar a cabo estos experimentos se sembraron las neuronas sobre cubreobjetos de vidrio, para obtener mejores imágenes de fluorescencia. Los cultivos a 14 DIV fueron sometidos a choque excitotóxico inducido por NMDA en las mismas condiciones descritas anteriormente. La incubación en presencia de Ca^{2+} y Ca^{2+} /NMDA se considera como tiempo 0. Se toman imágenes de las neuronas a los tiempos adecuados bajo cada una de las condiciones ensayadas, tras la incubación con 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato a una concentración $1 \mu\text{M}$ durante 15 minutos.

En una serie de imágenes de distintos campos del cultivo se contabilizaron las neuronas con y sin fluorescencia. Como se muestra en la *Figura 3.13 A*, el porcentaje de neuronas con fluorescencia aumenta progresivamente con el tiempo cuando fueron incubadas con Ca^{2+} /NMDA, pasando de un 18-20 % 1 hora después de la incubación con agonista, a un 38-40 % 3 horas después del choque excitotóxico. Por el contrario, el porcentaje de neuronas fluorescentes cuando el cultivo fue sometido a incubación únicamente con Ca^{2+} , 8-10 %, no varió en el periodo de tiempo estudiado (datos no mostrados).

Transcurrido este periodo de aumento casi lineal en la generación de ROS, el porcentaje de neuronas fluorescentes disminuye aproximadamente un 50 %, de forma que 6 horas tras el choque excitotóxico el porcentaje de neuronas que mantienen fluorescencia es de un 18-20 %. Este porcentaje se mantiene estable trascurridas 24 horas tras el choque (*Figura 3.13 A*).

La fluorescencia de 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína en neuronas sometidas a choque excitotóxico inducido por NMDA puede observarse en el soma y a lo largo de todas las conexiones dendríticas y axonales que existen entre las células, hasta las 3 horas tras el choque (*Figura 3.13 B*). A partir de las 6 horas tras el choque,

la fluorescencia va desapareciendo en primer lugar del soma, manteniéndose durante más tiempo en las prolongaciones neuronales.

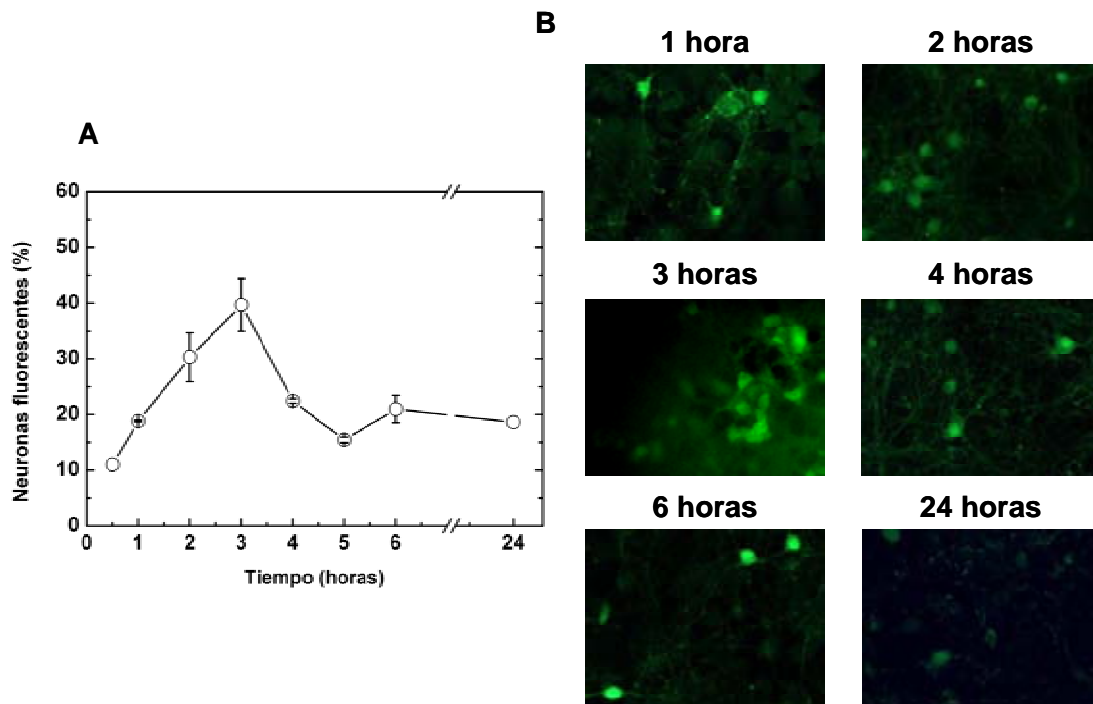


Figura 3.13. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a choque excitotóxico mediante incubación con NMDA. (A) Medida del porcentaje de neuronas fluorescentes en función del tiempo tras ser sometidas a choque excitotóxico mediante incubación con NMDA. Las neuronas sembradas sobre vidrio y con 14 DIV fueron tratadas con Ca^{2+} /NMDA durante 20 minutos. 15 minutos antes de cada tiempo indicado se añadió a las placas la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato a una concentración 1 μM . Al tiempo indicado se observaron al microscopio y se tomaron varias imágenes a partir de las cuales se hizo el conteo de células con y sin fluorescencia. **(B)** Imágenes de neuronas sometidas a incubación durante varias horas con NMDA y tratadas con la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína. El experimento se llevó a cabo en al menos 3 cultivos diferentes y el total de neuronas contabilizadas para cada condición es ≥ 2.000 .

Hemos demostrado anteriormente que MK-801 bloquea selectivamente la muerte inducida por NMDA en neuronas mantenidas en cultivo 14 DIV. Cabe esperar por tanto que MK-801 bloquee igualmente la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por incubación con NMDA. En la *Figura 3.14 A* se muestran los porcentajes de neuronas con fluorescencia en cada una de las condiciones estudiadas, a las 3 horas de someterlas a choque excitotóxico. Las neuronas no muestran una fluorescencia significativa cuando se incuban con NMDA

y MK-801, de manera similar a las neuronas únicamente incubadas con Ca^{2+} (*Figura 3.14 B*). Estos valores son comparables a los mostrados en la *Figura 3.6*, donde se contabiliza la muerte por el método de exclusión por trypan blue.

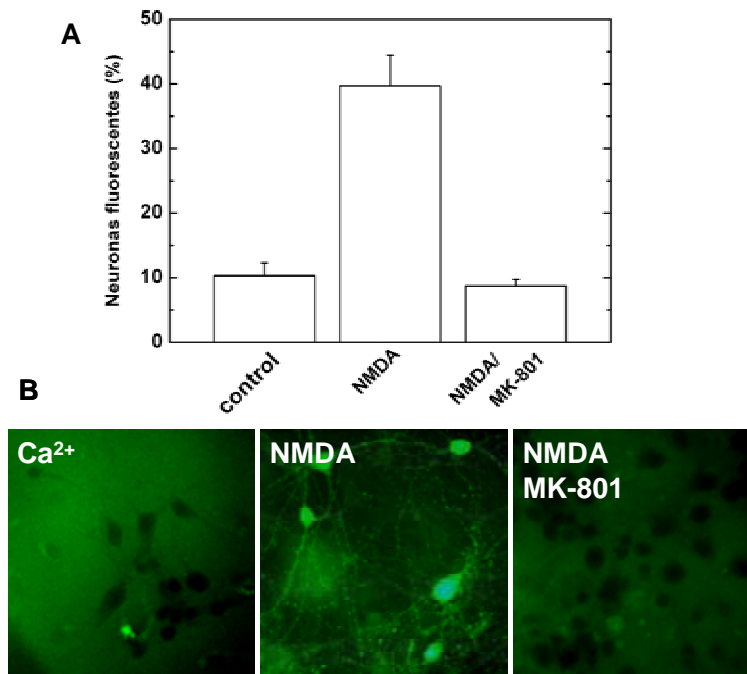


Figura 3.14. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a choque excitotóxico mediante incubación con NMDA 3 horas. (A) Porcentaje de neuronas con fluorescencia de 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína 3 horas después de someterse a incubación bajo diferentes condiciones. (B) Imágenes de neuronas 3 horas después de ser sometidas a incubación con distintas soluciones y tratadas con la sonda fluorescente 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína. El experimento se llevó a cabo en al menos 3 cultivos diferentes y el total de neuronas contabilizadas para cada condición es superior a 2.000.

3.6. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a incubaciones de larga duración con NMDA

Una vez estudiada la sensibilidad a incubaciones de corta duración con NMDA a concentración saturante, se procedió a caracterizar la muerte neuronal inducida por incubaciones de mayor duración, que oscilan entre 1 y 6 días. Este método experimental nos permite analizar la muerte neuronal en choques excitotóxicos de larga duración, para estudiar la estabilidad junto con el efecto

protector de diferentes moléculas. Adicionalmente, el efecto del péptido β -amiloide se produce tras incubaciones de larga duración, y una posible correlación de este proceso con la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato precisa este análisis previo.

Hemos sometido a las neuronas de hipocampo a incubaciones con NMDA 100 μ M a partir de 7, 10 y 14 DIV. Cuando la incubación comienza a los 7 DIV, la muerte neuronal a las 24 horas es de un $11,3 \pm 4,4$ %, aumentando hasta un $18,3 \pm 5,3$ % a las 48 horas. La muerte neuronal se estabiliza en un 15-20 %, y no varía de manera significativa durante los días posteriores. Cuando la incubación comienza a los 10 DIV, la muerte neuronal es de un $29,3 \pm 5,5$ % a las 24 horas, y este valor se mantiene prácticamente constante hasta los 16 DIV.

Si se repite el mismo procedimiento a 14 DIV se observa un porcentaje de muerte mucho más elevado, lo que concuerda con el perfil de sensibilidad obtenido previamente en incubaciones de 20 minutos. A las 24 horas la muerte es de un $79,6 \pm 5,1$ %, aumentando hasta un $87,2 \pm 0,7$ % a las 48 horas. A tiempos mayores de incubación la muerte se mantiene en un valor aproximado del 90 % de las neuronas del cultivo.

Una de las consecuencias de la incubación de larga duración con NMDA es la caída de densidad en los pocillos, debido a que las neuronas muertas van despegándose de la placa y por tanto no son contabilizadas mediante el método de exclusión de trypan blue. Este descenso en la densidad neuronal se ha cuantificado y se muestra en la *Tabla 3.1*.

Cuando la incubación comienza a los 7 DIV la disminución de densidad es de un 40 % de las neuronas en el DIV 13. Si la incubación comienza a los 10 DIV, la caída es de un 60 %, y si empieza a los 14 DIV es casi de un 70 %. Por tanto, a medida que aumentan los DIV la sensibilidad neuronal a NMDA va también incrementándose y las neuronas se despegan de la superficie de los pocillos, rasgo típico de la muerte celular necrótica.

Desde día <i>in vitro</i>	1 día	6 días
	Total (%)	Total (%)
7 DIV	100	60,2 ± 14,6
10 DIV	100	39,9 ± 7,4
14 DIV	100	32,4 ± 7

Tabla 3.1. Caída de densidad durante la incubación con NMDA durante varios días en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7, 10 y 14 DIV. Se muestra la densidad neuronal normalizada correspondiente al total de neuronas antes y después del tratamiento de excitotoxicidad.

3.6.1. Incubaciones de 24 horas con NMDA en cultivos de neuronas de hipocampo

Tras estos tratamientos de varios días de duración, se realizaron incubaciones de 24 horas a diversos DIV, desde 7 a 21 DIV. Se observa que la muerte neuronal aumenta de forma lineal con el tiempo de comienzo de la incubación, pasando de un $11,3 \pm 4,4$ % a los 7 DIV, hasta un $95,8 \pm 0,1$ % a los 18 DIV (*Figura 3.15 A*). Este incremento indica un aumento en la sensibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad de NMDA con los DIV, y por tanto debe estar relacionado con la maduración de los receptores NMDA en neuronas de hipocampo de rata cultivadas *in vitro*. Ese máximo valor de muerte neuronal, que se aproxima al 100 %, se mantiene desde el DIV 18 al 21.

Para poder comparar estos valores con los obtenidos en incubaciones de varios días de duración, es necesario sumarles los porcentajes de caída de densidad que se producen en este último caso. Se obtiene entonces una figura similar (*Figura 3.15 B*), lo que confirma que las neuronas muertas en incubaciones de varios días se despegan y no son contabilizadas por trypan blue.

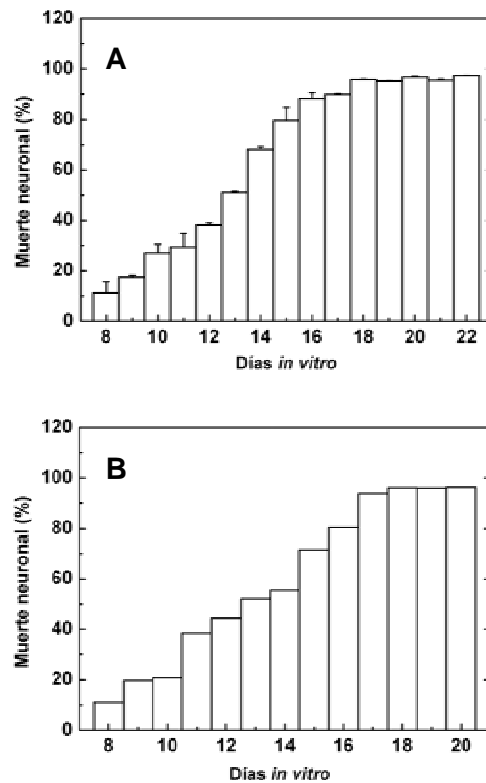


Figura 3.15. Muerte neuronal inducida por incubaciones de larga duración con NMDA. (A) Muerte neuronal inducida por NMDA 24 horas en neuronas de hipocampo de cerebro de rata a varios DIV. Las neuronas se incubaron durante 24 horas a 37 °C con medio al que se añadió NMDA 100 μ M. (B) Muerte neuronal acumulada inducida por NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo a varios DIV. Se representa el porcentaje de neuronas muertas a cada DIV más el porcentaje correspondiente a la caída de densidad por pocillo a cada DIV con respecto a la densidad inicial

3.6.2. Determinación de la EC_{50} de NMDA en incubaciones de 24 horas a 14 DIV

Como la mayor parte de ensayos de neuroprotección se llevarán a cabo a 14 DIV, decidimos caracterizar en mayor profundidad el efecto de la incubación con NMDA durante 24 horas en este momento del desarrollo del cultivo. Para ello realizamos una titulación de la concentración de NMDA, incubando con este compuesto a concentraciones crecientes de 14 a 15 DIV (*Figura 3.16*).

El efecto de NMDA durante 24 horas en la viabilidad es modesto hasta una concentración de 1 μ M, aumentando progresivamente a concentraciones superiores.

NMDA 100 μM 24 horas, como ya se ha comentado antes, provoca la muerte de un 75-80% de las neuronas de hipocampo a 14 DIV. A concentraciones superiores, la degeneración neuronal afecta casi a la totalidad de las neuronas del cultivo. El valor de EC_{50} para este choque es de $23,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$, similar al obtenido en incubaciones de 20 minutos a 14 DIV. Este resultado es coherente con el hecho de que, en ambos casos, la muerte neuronal se debe exclusivamente a la sobreestimulación del receptor NMDA.

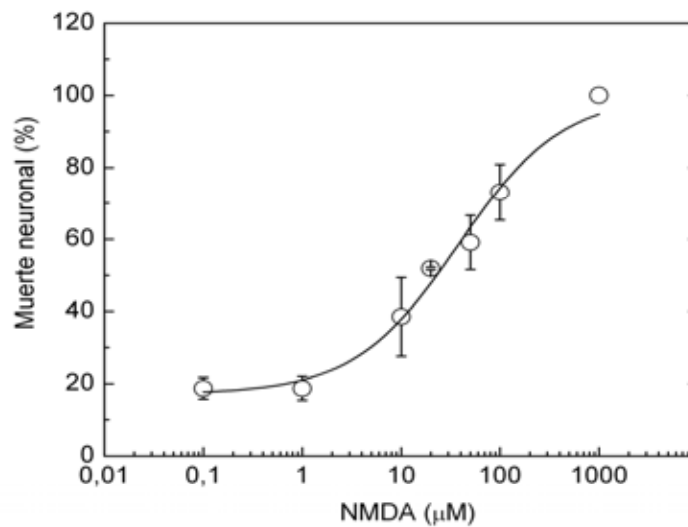


Figura 3.16. Efecto de la concentración de NMDA sobre la muerte inducida en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación durante 24 horas a diferentes concentraciones de NMDA disuelto en el medio de cultivo.

3.6.3. Efecto neuroprotector de las incubaciones de larga duración con NMDA

Las neuronas que sobreviven a la incubación con NMDA durante 6 días de 7 a 14 DIV, muestran una elevada resistencia al insulto posterior con NMDA 20 minutos a 14 DIV (*Figura 3.17 A*). Hay que recordar que en este tipo de preincubación se produce una importante caída de densidad, aproximadamente del 40 % de las neuronas (*Tabla 3.1*). Por tanto la resistencia que muestran las neuronas que

sobreviven al choque es probablemente debida al proceso de selección que se ha ido produciendo del DIV 7 al 14.

Para evitar esta caída de densidad, se incubaron las neuronas de hipocampo durante 24 horas de 13 a 14 DIV con concentraciones crecientes de NMDA, y transcurrida esta preincubación se sometieron a choque excitotóxico por NMDA durante 20 minutos. Como se observa en la *Figura 3.17 B*, si se preincuba a las neuronas con NMDA 0,1 μM no se observa ningún efecto neuroprotector frente al choque de 20 minutos. En cambio si se realiza la preincubación con NMDA 1 μM o 10 μM se aprecia una disminución significativa en la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad.

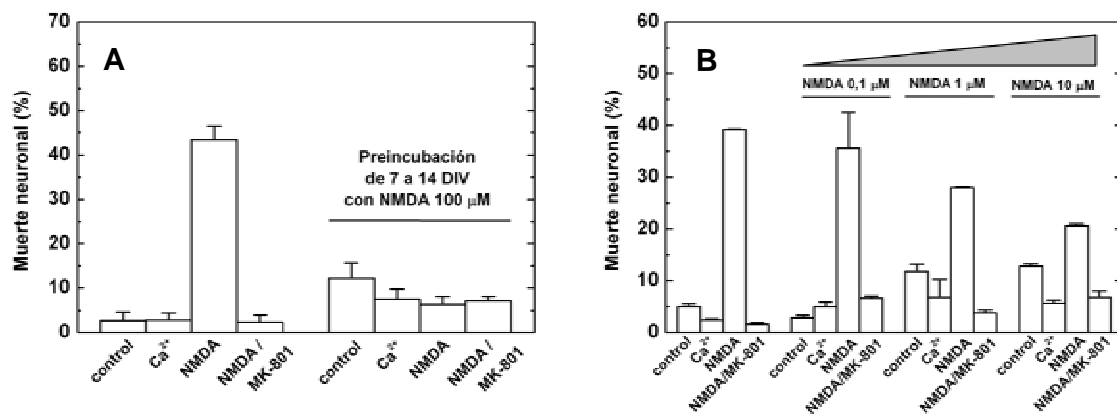


Figura 3.17. Efecto de la preincubación con NMDA sobre la muerte inducida por choque excitotóxico en neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación durante 6 días (A) o 24 horas (B) a diferentes concentraciones de NMDA disuelto en el medio de cultivo. Posteriormente se realizó choque excitotóxico con NMDA 200 μM durante 20 minutos.

3.7. Estimulación de la vía de señalización de CREB

3.7.1. Protección por rolipram frente a excitotoxicidad

Una de las vías de supervivencia celular activa de forma constitutiva en neuronas es la que implica al factor de transcripción CREB (cyclic AMP-response element binding protein). Otros grupos de investigación han detectado que una concentración subtóxica de NMDA provoca la activación de esta vía de forma transitoria, lo que explicaría el efecto neuroprotector detectado por nosotros. En la bibliografía también se menciona que el péptido β -amiloide provoca una disminución en la activación de la vía de CREB, mediante una bajada en su fosforilación. Basándonos en esta información decidimos analizar la implicación de esta vía de señalización en la excitotoxicidad inducida por NMDA.

En primer lugar se abordó el estudio de la vía de señalización de CREB de forma indirecta. Empleamos rolipram, inhibidor de la actividad fosfodiesterasa V, que impide la degradación del AMPc y, por tanto, favorece su acumulación en el interior celular. El aumento en la concentración intracelular de AMPc se sabe que produce un aumento en los niveles de pCREB (forma activa de CREB, fosforilado en Ser-133), a través de la vía de señalización mediada por PKA.

Cuando añadimos rolipram a la solución de excitotoxicidad, y al medio de incubación posterior, se observa que el aumento de AMPc protege de la excitotoxicidad mediada por NMDA (*Figura 3.18 A*). Para ello es necesaria una concentración 10 μ M de rolipram, ya que 3 μ M es insuficiente para disminuir la muerte inducida por NMDA a ninguno de los tiempos de incubación empleados.

También hemos realizado una titulación de la concentración de rolipram en choques excitotóxicos con NMDA de 20 minutos de duración (*Figura 3.18 B*). El valor de IC₅₀ que se obtuvo en este caso fue de $7,1 \pm 3,3 \mu$ M, lo que concuerda con la información obtenida en la gráfica anterior.

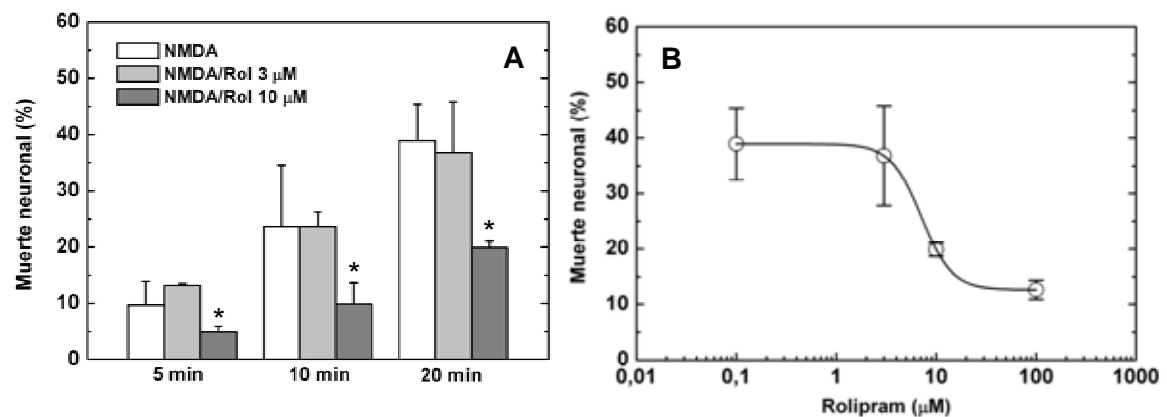


Figura 3.18. Efecto de la concentración y el tiempo de incubación de rolipram sobre la muerte neuronal inducida por NMDA a 14 DIV. **(A)** Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación con NMDA 100 μM en solución básica salina en presencia de diferentes concentraciones de rolipram durante diversos tiempos. La misma concentración de rolipram se añadió al medio 10/MK-801 empleado las 24 horas siguientes. **(B)** Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación con NMDA 200 μM durante 20 minutos en solución básica salina en presencia de diferentes concentraciones de rolipram. La misma concentración de rolipram se añadió al medio 10/MK-801 empleado las 24 horas siguientes. (*) $p < 0,05$.

3.7.2. Efecto de NMDA sobre la fosforilación de CREB

Tras comprobar que un aumento en la concentración intracelular de AMPc tiene efecto neuroprotector frente a excitotoxicidad, decidimos estudiar los niveles de pCREB tras la estimulación subtóxica (10 μM) o tóxica (200 μM) de los receptores NMDA en nuestro cultivo de neuronas de hipocampo (*Figura 3.19*). Para ello es necesario el pretratamiento de las neuronas con tetrodotoxina (TTX), inhibidor de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. TTX previene de la despolarización neuronal, que es la principal responsable de mantener elevados los niveles de pCREB (supervivencia neuronal dependiente de la actividad sináptica). La cantidad de pCREB residual tras la inhibición por TTX 2 μM 12-15 h se toma como valor de referencia para la cuantificación.

Mediante análisis de inmunodetección se observa que una concentración 10 μM de NMDA, añadido directamente al medio de cultivo, provoca una elevación

de los niveles de pCREB que alcanza el 50 % tras 20 min de incubación. Estos niveles van disminuyendo progresivamente, de manera que tras 2 horas de incubación se recuperan los niveles basales de pCREB, e incluso disminuyen un 50 % (*Figura 3.19*).

Por el contrario, una concentración excitotóxica de NMDA desencadena una estimulación aguda de la fosforilación de CREB, que alcanza su máximo unos pocos min tras la adición de NMDA al medio, y recupera rápidamente los niveles basales. Tras 20 min de incubación con NMDA 200 μM la cantidad de CREB fosforilado ya es inferior a los niveles iniciales (*Figura 3.19*).

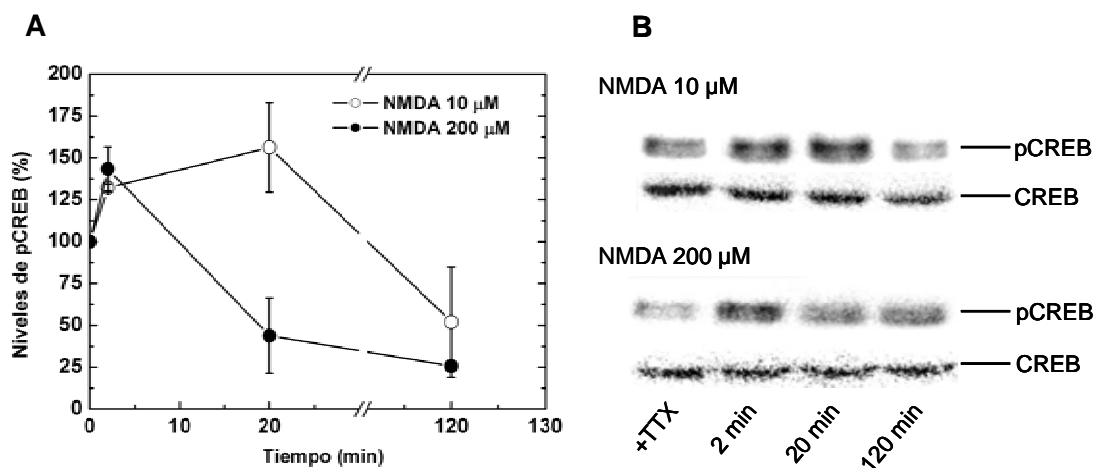


Figura 3.19. Niveles de pCREB tras la exposición de neuronas de hipocampo a diferentes concentraciones de NMDA. Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV fueron sometidas a incubación de duración variable a concentraciones subtóxicas (10 μM) o tóxicas (200 μM) de NMDA en medio de cultivo. Las neuronas fueron preincubadas con TTX 2 μM 12-15 horas antes de la adición de NMDA. **(A)** Niveles relativos de pCREB. **(B)** Imágenes representativas de los ensayos de inmunodetección de pCREB y CREB total.

En ambos casos 2 horas de estimulación de receptores NMDA provoca la disminución de pCREB por debajo de los niveles de referencia, lo que sugiere la posible activación de fosfatasas que inactiven este factor de transcripción. En cualquier caso, MK-801 inhibe las variaciones en la fosforilación de CREB inducidas por NMDA (datos no mostrados), lo que confirma que éstas se producen a través de la estimulación de receptores NMDA. Los niveles totales de CREB (fosforilado y no fosforilado) no varían con el tratamiento con NMDA (*Figura 3.19 B*), por tanto las

variaciones en los niveles de pCREB son debidas exclusivamente a variaciones en su estado de fosforilación.

También es interesante observar que rolipram 10 μM incubado simultáneamente a TTX durante 12-15 horas previene de la desfosforilación de CREB que se produce tras 20 min de incubación con NMDA 200 μM (Figura 3.20). Por su parte, H89, inhibidor de PKA, inhibe la fosforilación de CREB inducida por una concentración subtóxica de NMDA. Además este inhibidor es capaz de prevenir la capacidad neuroprotectora de una concentración subtóxica de NMDA, comentada anteriormente (datos no mostrados). De estos resultados puede concluirse que la neuroprotección por niveles subtóxicos de NMDA se produce, al menos en parte, por la estimulación de la fosforilación de CREB vía PKA. Rolipram estimula esta vía de supervivencia neuronal, lo que contribuye a su capacidad neuroprotectora frente a NMDA.

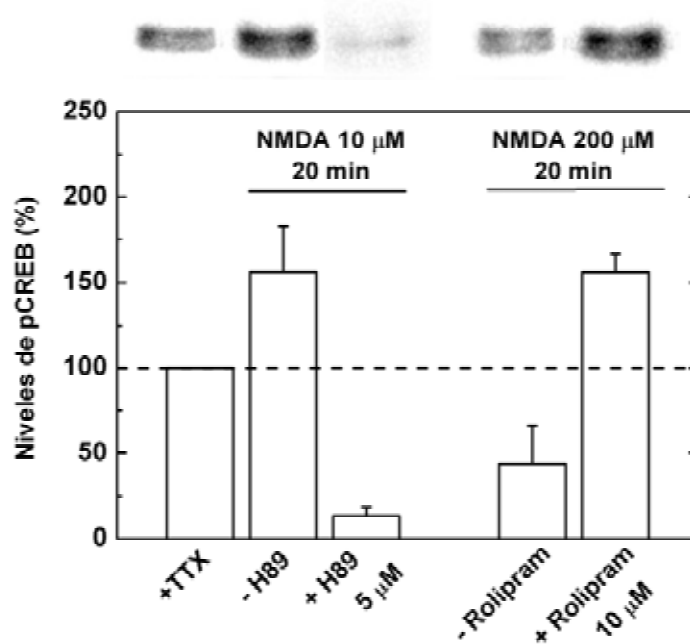


Figura 3.20. Efecto de H89 y rolipram sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo. Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV fueron sometidas a incubación de 20 min con NMDA en medio de cultivo. Las neuronas fueron preincubadas con TTX 2 μM 12-15 horas antes de la adición de NMDA. H89 fue adicionado 2 h antes de la incubación con NMDA y rolipram fue adicionado simultáneamente a TTX. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los ensayos de inmunodetección de pCREB en las condiciones indicadas en la gráfica.

4. Caracterización de la neuroprotección por N-alquilglicinas frente a muerte neuronal inducida por glutamato y N-metil-D-aspartato (NMDA)

4.1. Neuroprotección de N-alquilglicinas frente a excitotoxicidad mediada por NMDA a 14 DIV

Una vez caracterizada la muerte neuronal inducida por glutamato y NMDA en neuronas de hipocampo de cerebro de rata, pasamos a analizar la capacidad de protección de las N-alquilglicinas seleccionadas frente a ensayos de excitotoxicidad para cada uno de los dos agonistas. Como ha quedado de manifiesto en el apartado anterior, para ensayar las N-alquilglicinas frente a muerte inducida por NMDA emplearemos neuronas de hipocampo a 14 DIV. Por el contrario, para ensayar la posible protección frente a muerte inducida por glutamato, las neuronas habrán estado en cultivo hasta el DIV 21.

En primer lugar, se realizaron incubaciones de 20 minutos de duración con NMDA 200 μM en presencia o ausencia de varias N-alquilglicinas diferentes a una concentración de 10 μM (*Figura 3.21*).

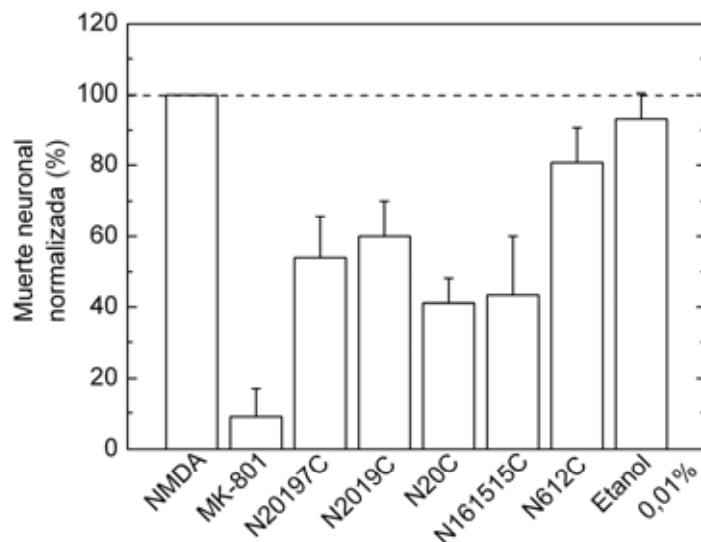


Figura 3.21. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por NMDA 20 minutos a 14 DIV. Las neuronas fueron sometidas a choque excitotóxico por NMDA 200 μM . Las N-alquilglicinas se emplearon a una concentración de 10 μM . Para todas las N-alquilglicinas, $p < 0,05$.

Como algunas N-alquilglicinas están disueltas en etanol, y el etanol es un bloqueador del receptor de NMDA, hemos ensayado este compuesto a la concentración que quedaría en el medio de ensayo, y como se puede observar, no produce una protección significativa ($93,2 \pm 7,0$ %, frente a 100 % de NMDA). El grado de protección obtenido con N-alquilglicinas oscila entre un 20% (N612C) y un 60 % (N20C, N161515C). El resto de las N-alquilglicinas muestran una protección de un 40-50 %. La más potente de todas, N20C, ha sido también ensayada a una concentración superior de 100 μ M, pero el efecto ya está saturado a 10 μ M.

4.2. Neuroprotección de N-alquilglicinas frente a excitotoxicidad mediada por glutamato a 21 DIV

Por lo que se refiere a protección frente a excitotoxicidad mediada por glutamato, los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 3.22*.

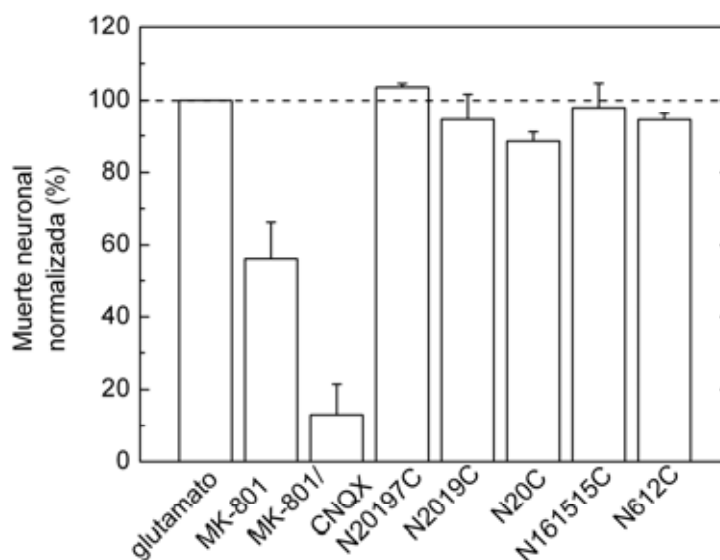


Figura 3.22. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por glutamato 20 minutos a 21 DIV. Las neuronas fueron sometidas a choque excitotóxico por glutamato 200 μ M. Las N-alquilglicinas se emplearon a una concentración de 10 μ M. Para ninguna de las N-alquilglicinas $p \leq 0,05$.

El experimento se llevó a cabo de igual manera que con NMDA, ensayando las N-alquilglicinas a una concentración de 10 μM a 21 DIV. En este caso sin embargo, el grado de protección mostrado por los compuestos es casi nulo, oscilando los valores de muerte neuronal por glutamato en presencia de las N-alquilglicinas entre un 94 y un 108 %. El único compuesto que muestra algún efecto es de nuevo N20C, con un 12 % de protección, pero esta diferencia no es significativa. Se puede concluir, por tanto, que las N-alquilglicinas muestran una alta especificidad por los receptores tipo NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo.

4.3. Neuroprotección de N-alquilglicinas frente a incubaciones de 24 horas con NMDA a 14 DIV

Posteriormente se realizaron incubaciones de 24 horas con NMDA 100 μM en presencia o ausencia de algunas de las N-alquilglicinas a una concentración de 10 o 100 μM . Estos compuestos no ejercen ninguna protección a una concentración de 10 μM cuando la incubación es de 24 horas (datos no mostrados), pero sí tienen efecto a 100 μM . Los resultados para este tratamiento se muestran en la *Figura 3.23*. También se ensayó el compuesto N161515C, pero no se encuentra representado ya que mostró una elevada toxicidad en incubaciones de larga duración a alta concentración.

Los datos muestran que todas las N-alquilglicinas ensayadas ejercen una leve protección frente a la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA. El grado de protección oscila entre un 5 % (la que menos protege, N612C) y un 20 % (la que más protege, N20C). Si se comparan estos porcentajes de protección con los obtenidos en incubaciones de 20 minutos se observa que el grado de protección siempre es mayor en este último caso, a pesar de que se ha empleado una concentración de N-alquilglicinas 10 veces menor. En ambos ensayos se consigue una protección total de la muerte neuronal cuando se emplea el antagonista de los receptores NMDA MK-801.

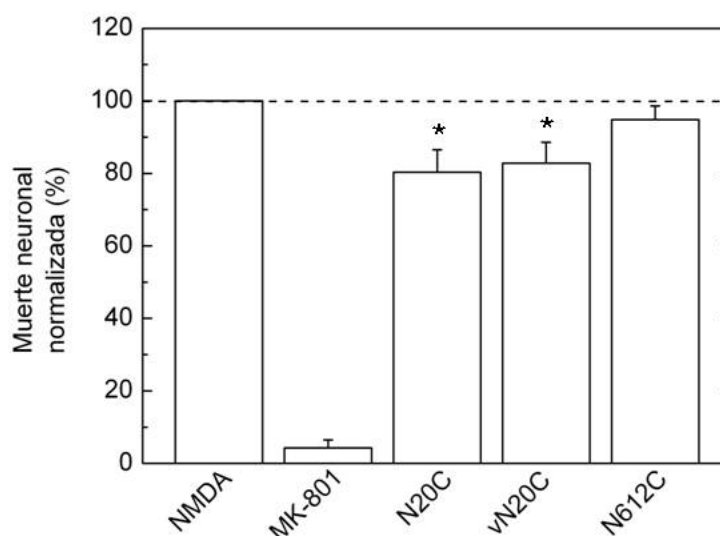


Figura 3.23. Neuroprotección de N-alkilglicinas de muerte neuronal inducida por NMDA 24 horas a 14 DIV. Las neuronas fueron sometidas a choque excitotóxico de 24 horas con NMDA 100 μM . Las N-alkilglicinas se emplearon a una concentración de 100 μM . (*) $p < 0,05$.

4.4. Titulación de la capacidad neuroprotectora de N20C frente a excitotoxicidad por NMDA

Llegados a este punto decidimos centrarnos en la N-alkilglicina más activa frente a NMDA, N20C, para caracterizar con mayor profundidad su mecanismo de acción. En primer lugar realizamos una titulación de la concentración de N20C frente a la excitotoxicidad provocada por NMDA 20 minutos a 14 DIV (*Figura 3.24*). Se observa que la capacidad neuroprotectora de N20C disminuye de forma casi lineal, siendo mínima a una concentración de 0,1 μM , y alcanzando un máximo del 60 % de neuroprotección a 10 μM . A concentraciones superiores el efecto ya se ha estabilizado. La IC_{50} para N20C frente a excitotoxicidad por NMDA tiene un valor de $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$, siendo $n_H = 2$. Este valor está en el mismo intervalo que el calculado para la entrada de Ca^{2+} en neuronas de cerebelo inducida por NMDA ($\approx 2 \mu\text{M}$), y para la formación de GMPc inducida por NMDA ($\approx 0,9 \mu\text{M}$) (Planells-Cases y cols., 2002).

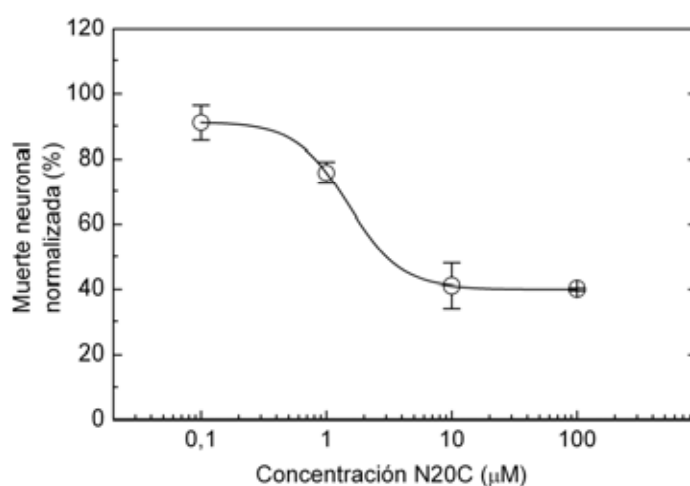


Figura 3.24. Efecto de la concentración de N20C sobre la muerte neuronal inducida por NMDA 20 minutos a 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV fueron sometidas a incubación con NMDA 200 μM durante 20 minutos en solución básica salina en presencia de diferentes concentraciones de N20C.

Además se realizó la misma titulación sin la adición de glicina al medio de incubación (datos no mostrados). Glicina es coagonista junto con glutamato de los receptores NMDA. Si N20C compitiera con glicina por el sitio de unión a dichos receptores la curva de titulación se vería modificada, aumentando teóricamente su efecto neuroprotector en ausencia de glicina exógena. Pero la titulación de concentraciones permaneció sin cambios, lo que nos indica que el sitio de acción de N20C no debe coincidir con el sitio de acción de glicina.

También hemos realizado la titulación de la concentración del radical número 20 (3,3'-difenilpropilamina) frente a NMDA, y ambas curvas coinciden totalmente (datos no mostrados). Esto indicaría que la porción activa de la molécula de N20C es la correspondiente al radical sustituyente.

4.5. Protección de N20C frente a la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por NMDA a 14 DIV

Adicionalmente hemos comprobado si N20C es capaz de bloquear la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por choque excitotóxico con NMDA, de la misma manera que lo hace MK-801. Como muestra la *Figura 3.25* el efecto de N20C 10 μ M, aproximadamente un 60 %, es similar al nivel de neuroprotección que ejerce a la misma concentración frente a dicho choque. Este bloqueo en la generación de ROS es compatible con su actuación como bloqueador del receptor NMDA.

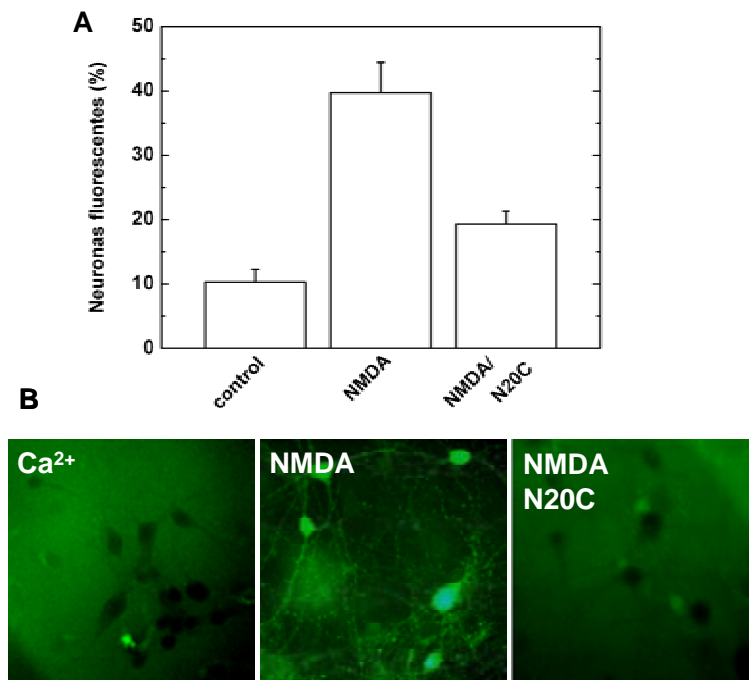


Figura 3.25. Protección de la generación de especies reactivas del oxígeno por N20C. (A) Porcentaje de neuronas con fluorescencia de 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína 3 horas después de someterse a incubación bajo las condiciones indicadas. (B) Imágenes de neuronas 3 horas después de ser sometidas a incubación con distintas soluciones y tratadas con la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína. El experimento se llevó a cabo en al menos 3 cultivos diferentes y el total de neuronas contabilizadas para cada condición es superior a 2.000.

4.6. Mecanismo protector de N-alkilglicinas frente a toxicidad mediada por NMDA: bloqueo de corrientes en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan receptores NMDA y AMPA

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de las N-alkilglicinas ensayadas frente a toxicidad mediada por NMDA, hemos caracterizado la capacidad de estos compuestos para bloquear corrientes iónicas mediante el empleo de voltage-clamp y ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan distintas subunidades de receptores de glutamato.

Como se muestra en la *Figura 3.26 A y C*, cuando se emplean ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor NMDA de rata funcional (subunidades NR1/NR2A), se produce un bloqueo de la corriente provocada por glutamato en un $46,5 \pm 8,1$ %, a $10 \mu\text{M}$ de N20C, y en un 100 % a $100 \mu\text{M}$. Tanto la cinética de bloqueo como la de desbloqueo son rápidas, como demuestra la recuperación total de la corriente cuando N20C es lavado. La IC_{50} de N20C es de $13,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$, y su n_{H} es de $1,2 \pm 0,3$. En cambio, N20C $50 \mu\text{M}$ reduce la actividad del receptor GluR1 solamente en un 5 ± 2 % (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que N20C bloquea de forma específica el receptor NMDA, y no actúa sobre el receptor AMPA.

Por su parte, N612C no bloquea significativamente la corriente iónica inducida por glutamato en ovocitos que expresan el receptor NMDA de rata (25 ± 10 % a $100 \mu\text{M}$) (*Figura 3.26 B, D*) o el receptor AMPA (datos no mostrados). Esta ausencia de bloqueo es consecuente con su bajo nivel de protección frente a excitotoxicidad en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

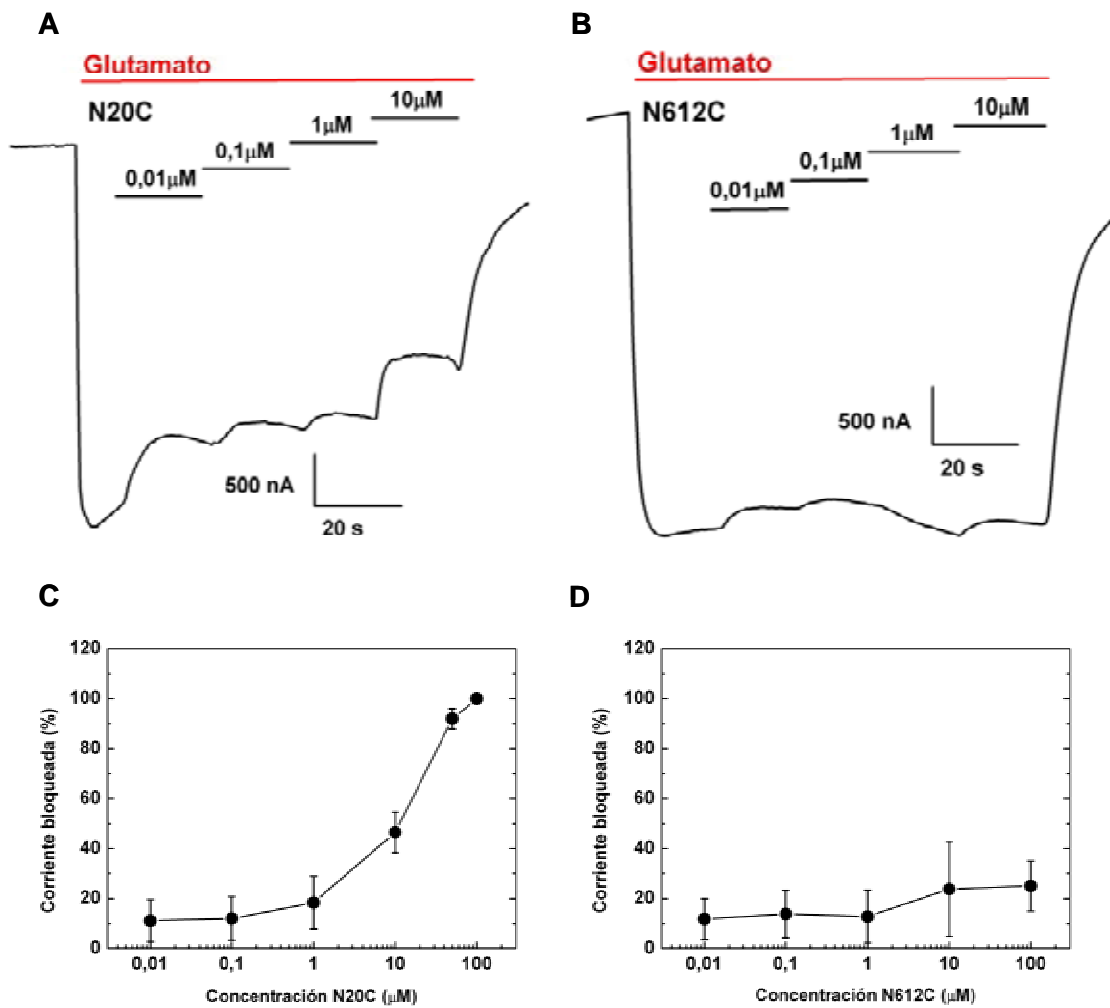


Figura 3.26. Capacidad de bloqueo de las N-alkilglicinas N20C y N612C de la corriente inducida por glutamato en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor NMDA. Se emplearon ovocitos que coexpresan las subunidades NR1/NR2A del receptor NMDA de rata, que fueron estimulados por glutamato 100 μM/glicina 10 μM (C) Titulación de la capacidad de bloqueo de N20C y (D) N612C. También se muestra un registro representativo de ambas titulaciones (A, B).

4.7. N20C inhibe las variaciones en la fosforilación de CREB inducidas por NMDA

Además de su capacidad de bloqueo del receptor NMDA, nos interesaba conocer si N20C era capaz de inhibir otra de las variaciones moleculares producida por NMDA: la variación en los niveles de pCREB. Para ello se incubaron a las neuronas de hipocampo con una concentración de NMDA subtóxica (10 μM) o

tóxica (200 μM) durante 20 min (*Figura 3.27 A, B*). Como ya se mostró anteriormente (*Figura 3.19*), estos estímulos provocan cambios en los niveles de pCREB. En el caso de NMDA 10 μM , los niveles de pCREB se mantienen elevados tras 20 min de incubación (*Figura 3.27 A*). En cambio, si se emplea una concentración tóxica (200 μM), un aumento inicial en los niveles de pCREB es seguido de un descenso brusco, por debajo de los valores basales. Tras 20 min de incubación, la cantidad de CREB fosforilado en Ser-133 ha descendido un 50 %, como también se muestra en la *Figura 3.27 B*.

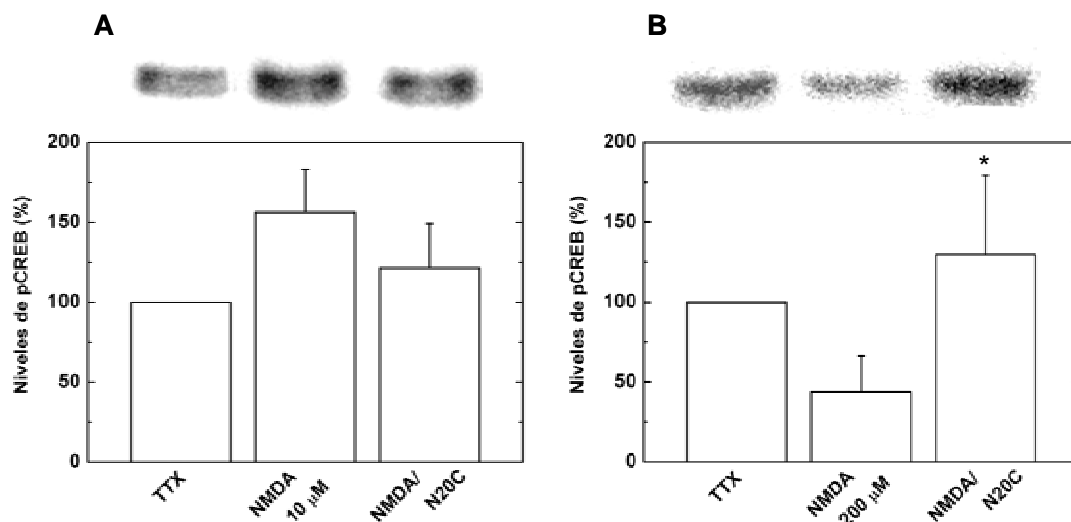


Figura 3.27. Efecto de N20C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo. Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV fueron sometidas a incubación de 20 min con una concentración 10 μM (A) o 200 μM (B) de NMDA en medio de cultivo. Las neuronas fueron preincubadas con TTX 2 μM 12-15 horas antes de la adición de NMDA. N20C se empleó de forma simultánea a NMDA y la concentración utilizada fue 100 μM . En la parte superior se muestra una imagen representativa de los ensayos de inmunodetección de pCREB en las condiciones indicadas en la gráfica. (*) $p < 0,01$.

En ambos casos N20C 100 μM inhibe las variaciones de pCREB inducidas por NMDA, manteniéndolo en los niveles previos al tratamiento. En este sentido se comporta de la misma forma que MK-801, lo que es consecuencia de su capacidad de bloqueo de receptores NMDA. De todas formas, no se descarta su posible actuación a otros niveles en la cascada molecular que conduce a la fosforilación de CREB.

5. Caracterización de la muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano en el cultivo primario de neuronas de hipocampo

5.1. Sensibilidad de las neuronas de hipocampo a incubaciones con péptido β -amiloide 1-40 humano

Otro de los objetivos de nuestro estudio es poner a punto un protocolo experimental para analizar la muerte inducida por el péptido β -amiloide humano en cultivos de neuronas de hipocampo de rata. Debido a que la neurotoxicidad de este compuesto se produce de forma progresiva, ligada probablemente al grado de agregación que se alcance en el medio, hemos procedido a caracterizar la muerte inducida por periodos de incubación largos.

Cuando se comienza el tratamiento con péptido β A 1-40 10 μ M a los 7 DIV (*Figura 3.28*), no se observa muerte significativa hasta que no han transcurrido 3 días de incubación (DIV 10) con el péptido. En este momento la muerte neuronal comienza a aumentar de forma progresiva hasta alcanzar un valor de $20 \pm 2,2$ % a los 5 días (DIV 12), y a partir de este momento se estabiliza. Si se realiza el mismo ensayo con DMSO 1 %, la concentración final máxima del solvente en que se ha disuelto el péptido, la muerte neuronal tras 6 días de incubación (DIV 13) es sólo de un $2,9 \pm 0,8$ %.

Si el tratamiento comienza a los 14 DIV (*Figura 3.28*) el patrón de neurodegeneración es diferente. A las 24 horas de incubación la muerte neuronal es de un $28,7 \pm 6,3$ %, y este porcentaje de muerte se mantiene estable hasta 4 días de incubación con el péptido, lo que corresponde a 18 DIV tras la siembra. DMSO 1 % solo produce la muerte neuronal de un porcentaje de neuronas de un $7,1 \pm 0,8$ % tras 6 días de incubación (DIV 20). A partir del día 18 *in vitro* se produce una caída en la muerte neuronal, paralela a una disminución en la densidad neuronal del cultivo.

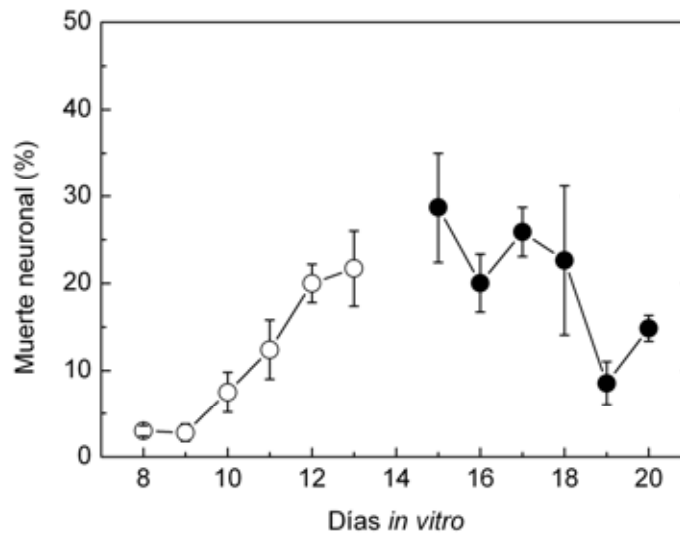


Figura 3.28. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con β A desde 7 y 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 1-6 días a 37 °C con medio al que se añadió péptido β -amiloide 1-40 10 μ M.

5.2. Comparación de la toxicidad de las variantes 1-40 y 1-42 de péptido β -amiloide

El péptido β A tiene distintas formas que varían en el número de aminoácidos. La longitud del péptido procesado por las secretasas en la célula puede ser también de 42 aminoácidos. Este péptido de mayor longitud posee también una mayor capacidad neurotóxica, debido a que los 2 aminoácidos extra en la molécula aumentan de alguna forma su capacidad de agregación. Si la capacidad neurotóxica del péptido se encuentra relacionada con su grado de agregación en el medio, la variante del péptido que forme más cantidad de agregados produciría, por tanto, una muerte neuronal más elevada.

En incubaciones de 24 horas a 14 DIV puede observarse que la toxicidad de ambos péptidos en cultivos de hipocampo es bastante similar, a las concentraciones empleadas en el ensayo, entre 0,1 y 10 μ M (*Figura 3.29*). Esto puede deberse a que la capacidad de agregación se ve disminuida al estar disueltos inicialmente en DMSO,

solvente orgánico que impide la unión entre las moléculas de péptido. También podría deberse a que es necesaria una concentración superior a 10 μM o un tiempo superior a 24 horas para desencadenar la agregación de los péptidos βA .

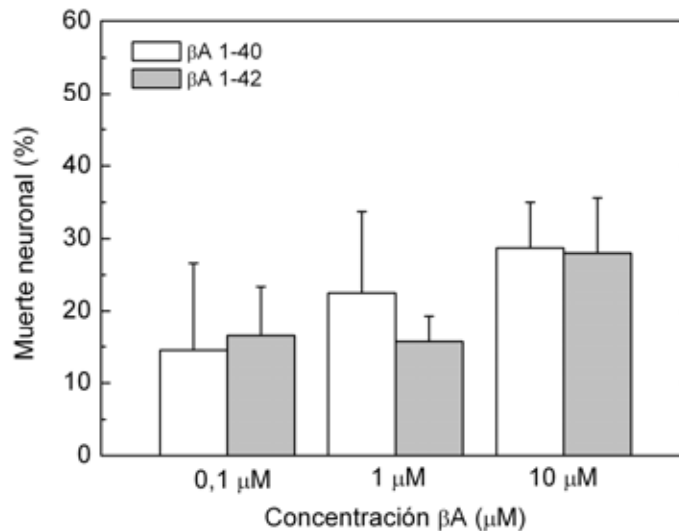


Figura 3.29. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) y (1-42) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con βA 24 horas a 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV se incubaron durante 24 horas a 37 °C con medio al que se añadió péptido β -amiloide 1-40 o 1-42 a diferentes concentraciones.

En incubaciones de varios días de duración, a partir de 7 DIV o de 14 DIV, la toxicidad de βA 1-42 es ligeramente superior a la de βA 1-40, aunque no de forma muy significativa, según aumentan los días de incubación (*Figura 3.30*). De hecho, en esta figura también se observa que la incubación de las neuronas de hipocampo con βA durante 24 horas a 14 DIV provoca la misma muerte neuronal, sea cual sea la variante del péptido empleada. De estos resultados puede deducirse que, o bien no se produce agregación del péptido βA , o bien ésta no afecta a la neurodegeneración en nuestro sistema modelo. En el resto de ensayos de neurodegeneración, emplearemos la variante 1-40.

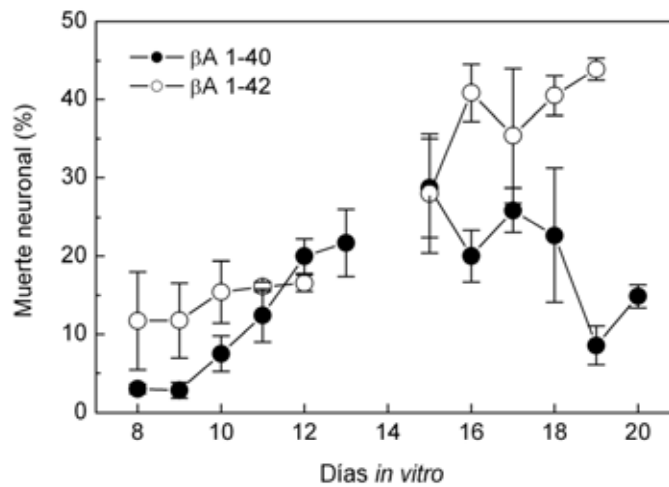


Figura 3.30. Muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-42) en neuronas de hipocampo de cerebro de rata incubadas con β A desde 7 y 14 DIV. Las neuronas de hipocampo a 14 DIV se incubaron durante 1-6 días a 37 °C con medio al que se añadió péptido β -amiloide 1-42 10 μ M. A efectos comparativos se ha representado también la muerte que provoca la variante 1-40 en las mismas condiciones de ensayo.

5.3. Generación de especies reactivas del oxígeno inducida por péptido β -amiloide 1-40 humano

La incubación de las neuronas con péptido β -amiloide 1-40 es un estímulo que aumenta significativamente la producción de especies reactivas del oxígeno, como ya se indicó en el apartado de Introducción (*Figura 1.6*). Mediante el empleo de la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína hemos observado el aumento en la generación de ROS que se produce a lo largo de la incubación con péptido β -amiloide 1-40 10 μ M en el cultivo primario de neuronas de hipocampo.

Como puede observarse en la *Figura 3.31*, transcurridas 3 horas de incubación se observan neuronas fluorescentes, por generación de ROS, al microscopio de fluorescencia. Este aumento se mantiene estable incluso cuando han transcurrido 6 horas de incubación con el péptido. Tras 24 horas de incubación el número de neuronas fluorescentes ha disminuido a los niveles iniciales.

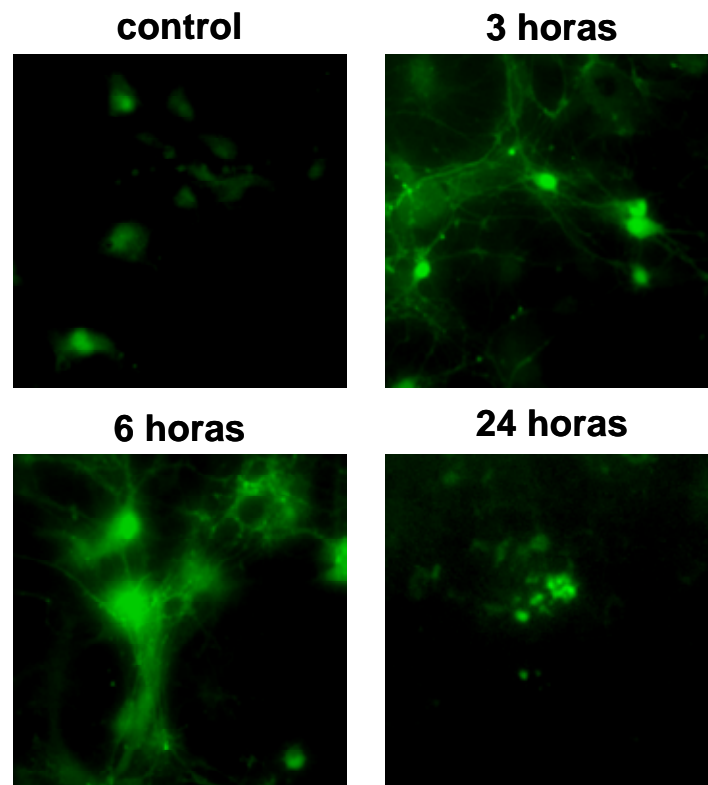


Figura 3.31. Neuronas fluorescentes, por generación de ROS, tras ser sometidas a incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano. Imágenes de neuronas sometidas a incubación durante las horas indicadas con péptido β -amiloide (1-40) humano a 37 °C y tratadas con la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína 1 μ M durante 15 min.

5.4. Visualización de la cromatina nuclear tras la incubación con péptido β -amiloide 1-40 humano

La tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) nos permite observar la morfología nuclear a lo largo de la incubación con péptido β -amiloide 1-40 10 μ M en el cultivo primario de neuronas de hipocampo. Como se observa en las imágenes (*Figura 3.32*), tras 3 horas de incubación con el péptido la cromatina se condensa en un determinado porcentaje de las neuronas, disminuye el tamaño del núcleo y aumenta su brillo. Esta morfología es característica de la muerte necrótica, como ya observamos en la *Figura 3.12*. Estos núcleos condensados se observan también tras 6

y 24 horas de incubación con β A. No hemos observado en ninguna ocasión un porcentaje elevado de núcleos típicamente apoptóticos.

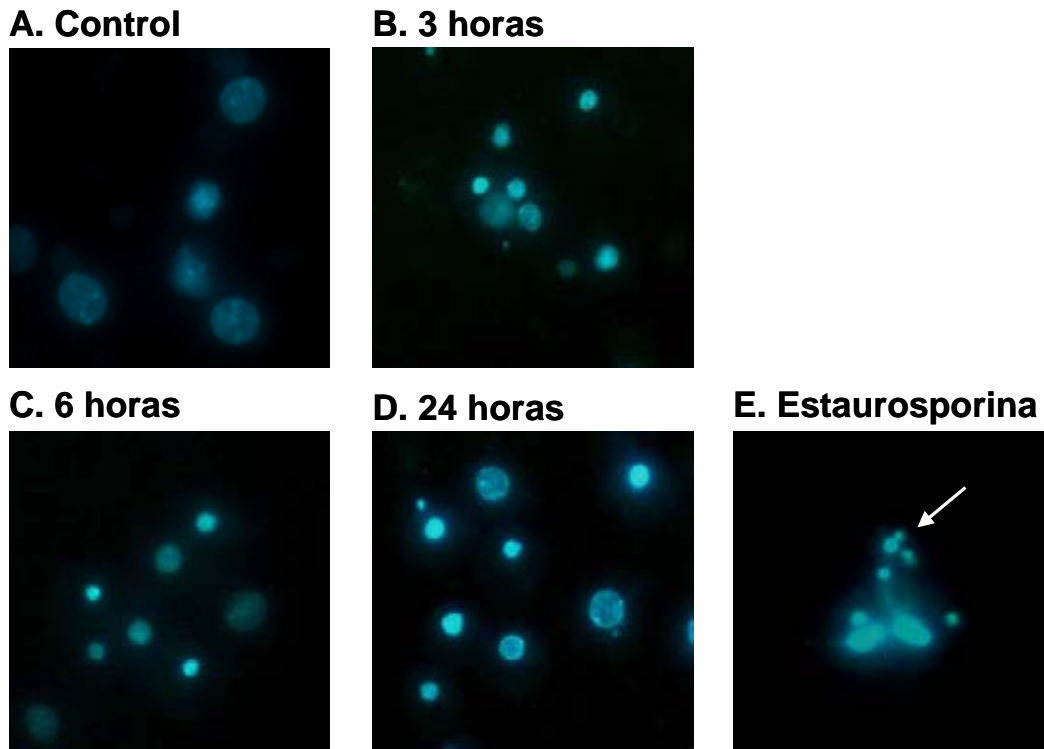


Figura 3.32. Observación de la cromatina nuclear mediante tinción con DAPI tras incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano. Las neuronas fueron sometidas a tras incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano durante varias horas. Trascurrido el tiempo indicado se tiñeron con DAPI 2 μ M y se observaron al microscopio de fluorescencia. A efectos comparativos se muestra una imagen de una neurona en apoptosis tras tratamiento con estaurosporina 30 nM 24h.

6. Caracterización de la neuroprotección por N-alquilglicinas frente a muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano

6.1. Neuroprotección de N-alquilglicinas frente a incubaciones de 24 horas con péptido β -amiloide 1-40 o 1-42

De la misma forma que se realizaron ensayos de neuroprotección frente a excitotoxicidad por NMDA 24 horas, también se emplearon las mismas N-alquilglicinas para ensayarlas frente a péptido β A, a una concentración de 10 μ M y de 100 μ M.

En el caso del tratamiento con β A 1-40 10 μ M (*Figura 3.33*), el grado de protección oscila desde un 27 % si se emplea N20C (sin significación estadística), hasta un 54 % si se emplea N612C, a una concentración 100 μ M. MK-801, por su parte, no ejerce protección significativa frente a la muerte inducida por β A durante 24 horas. En ambos casos, la neuroprotección que ejercen estas N-alquilglicinas a una concentración de 10 μ M en incubaciones de 24 horas no es significativa.

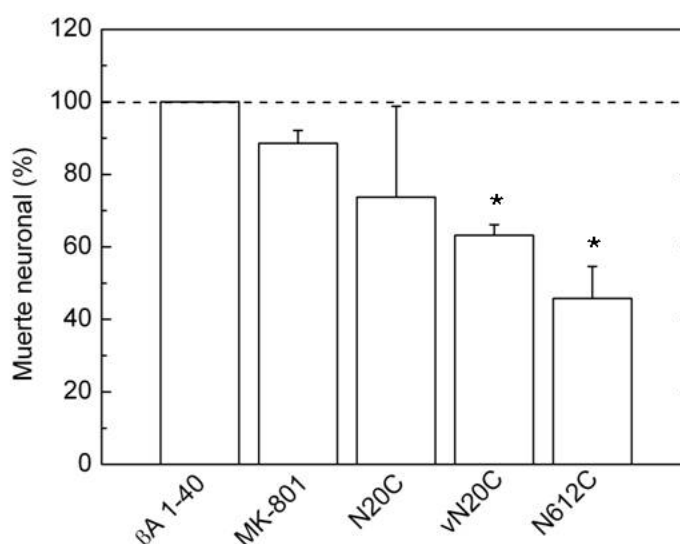


Figura 3.33. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide (1-40) 24 horas a 14 DIV. Las neuronas fueron sometidas a choque citotóxico de 24 horas con péptido β -amiloide 1-40 10 μ M. Las N-alquilglicinas se emplearon a una concentración de 100 μ M. MK-801 se empleó a una concentración de 10 μ M. (*) $p < 0,01$.

Posteriormente se realizó un análisis comparativo de la capacidad neuroprotectora frente a β A 1-40 y 1-42. Se empleó para ello la N-alquilglicina más activa, N612C, y varios de sus derivados sintéticos. En comparación con β A 1-40 (Figura 3.34 A), cuando se realiza el mismo tratamiento con β A 1-42 (Figura 3.34 B), se observa protección por los trímeros de N-alquilglicina tanto a 10 μ M como a 100 μ M. Su actividad neuroprotectora es superior a 100 μ M que a 10 μ M, salvo en el caso de N612C, cuya actividad neuroprotectora es ya prácticamente total a 10 μ M.

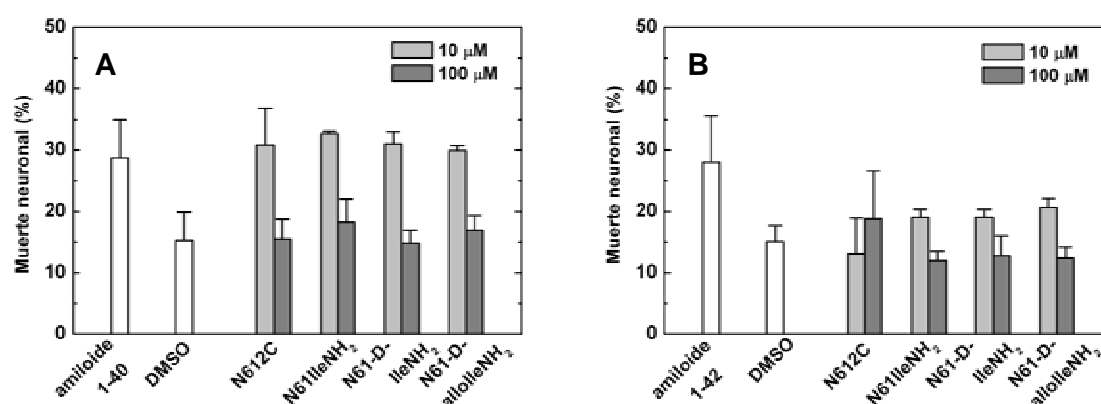


Figura 3.34. Neuroprotección de N-alquilglicinas de muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide (1-40) o (1-42) 24 horas a 14 DIV. Las neuronas fueron sometidas a choque citotóxico de 24 horas con péptido β -amiloide 1-40 (A) o 1-42 (B) 10 μ M. Las N-alquilglicinas se emplearon a una concentración de 10 o 100 μ M.

6.2. Titulación de la capacidad neuroprotectora de N612C frente a neurodegeneración inducida por péptido β -amiloide 1-40

De la misma forma que con N20C frente a NMDA, nos propusimos titular la concentración de N612C frente a la neurodegeneración inducida por péptido β A 1-40 10 μ M. N612C no tiene efecto neuroprotector a baja concentración, hasta 25 μ M, y a concentraciones superiores su capacidad neuroprotectora aumenta hasta alcanzar un máximo del 50 % de bloqueo de la muerte neuronal a 100 μ M (Figura 3.35). La IC₅₀ de N612C frente a β A 1-40 es de $52,4 \pm 8,4$ μ M.

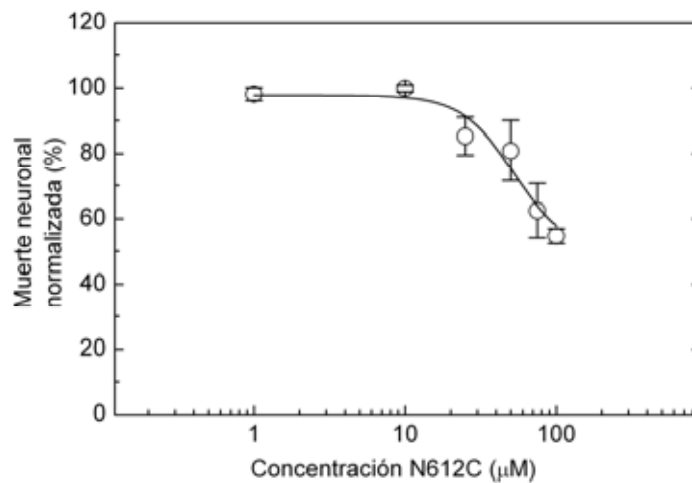


Figura 3.35. Efecto de la concentración de N612C sobre la muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide humano (1-40) 24 horas a 14 DIV. Se incubó a las neuronas de hipocampo a 14 DIV con péptido β -amiloide humano (1-40) 10 μM y concentraciones crecientes de N612C. Se determinó la muerte neuronal tras 24 horas de incubación.

6.3. N612C no previene significativamente la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por el péptido β -amiloide 1-40 humano

Hemos comprobado si N612C es capaz de bloquear la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por péptido β -amiloide, ya que el bloqueo en la generación de ROS podría ser uno de sus mecanismos de acción. Como muestra la *Figura 3.36*, N612C 100 μM no disminuye de manera significativa el número de neuronas fluorescentes por generación de ROS tras 3 ó 6 horas de incubación con péptido β -amiloide 10 μM . Por tanto su punto de actuación debe ser otro no asociado a la generación de especies reactivas del oxígeno.

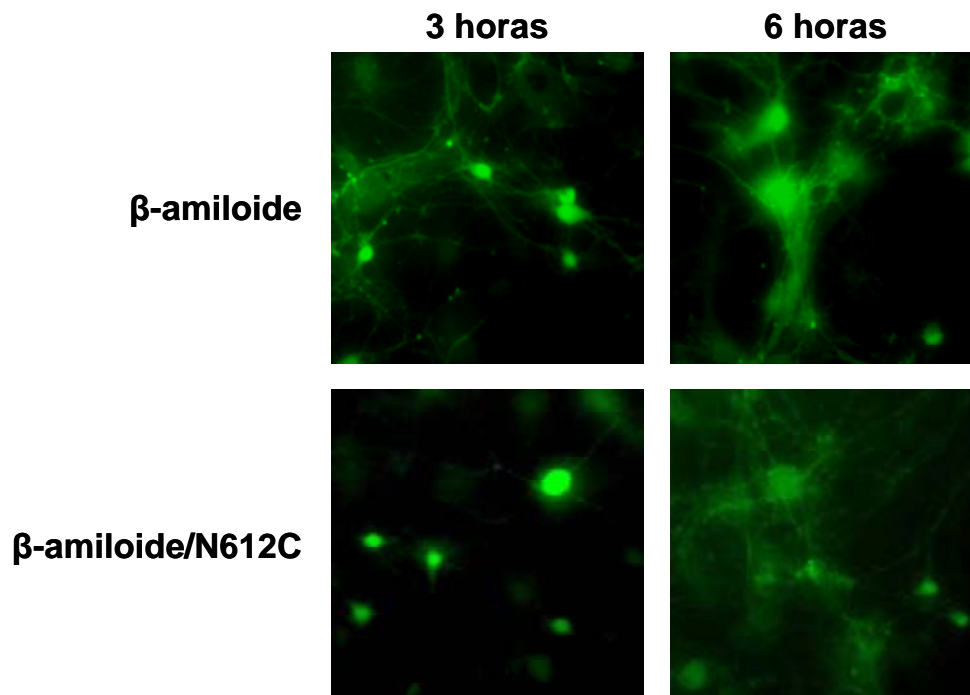


Figura 3.36. Generación de especies reactivas del oxígeno tras incubación con péptido β -amiloide (1-40) humano y N612C. Imágenes de neuronas sometidas a incubación con péptido β -amiloide (1-40)/N612C 10 μ M durante varias horas y tratadas con la sonda fluorescente 5-(γ -6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína 1 μ M 15 min. A efectos comparativos se muestran también las imágenes de neuronas sometidas a incubación con péptido β -amiloide 1-40 sólo.

6.4. N612C inhibe las variaciones en la fosforilación de CREB inducidas por NMDA

Siguiendo el mismo esquema que con N20C, decidimos analizar si N612C tiene algún efecto sobre los niveles de pCREB, tras inducir cambios en la fosforilación de este factor mediante una incubación de 20 min con una concentración subtóxica o tóxica de NMDA. Para ello se incubaron a las neuronas de hipocampo con una concentración 10 μ M o 200 μ M de NMDA durante 20 min (*Figura 3.37*). Como ya se mostró anteriormente (*Figura 3.19*), NMDA 10 μ M provoca un aumento sostenido en los niveles de pCREB. Tras 20 min de incubación, sus niveles han aumentado un 56 %. N612C 100 μ M inhibe parcialmente la fosforilación de CREB inducida por concentraciones subtóxicas de NMDA (diferencia no significativa: $p = 0,12$).

NMDA 200 μM provoca un aumento transitorio en los niveles de pCREB y, tras 20 min de incubación, sus niveles ya han descendido un 50 % por debajo de los valores basales iniciales. Sorprendentemente, N612C 100 μM sí es capaz de inhibir este descenso en la fosforilación de CREB inducida por concentraciones tóxicas de NMDA (*Figura 3.37 B*). Esta capacidad no es debida a su efecto directo sobre el receptor NMDA, ya que este compuesto no bloquea significativamente la corriente iónica que se produce a través del receptor.

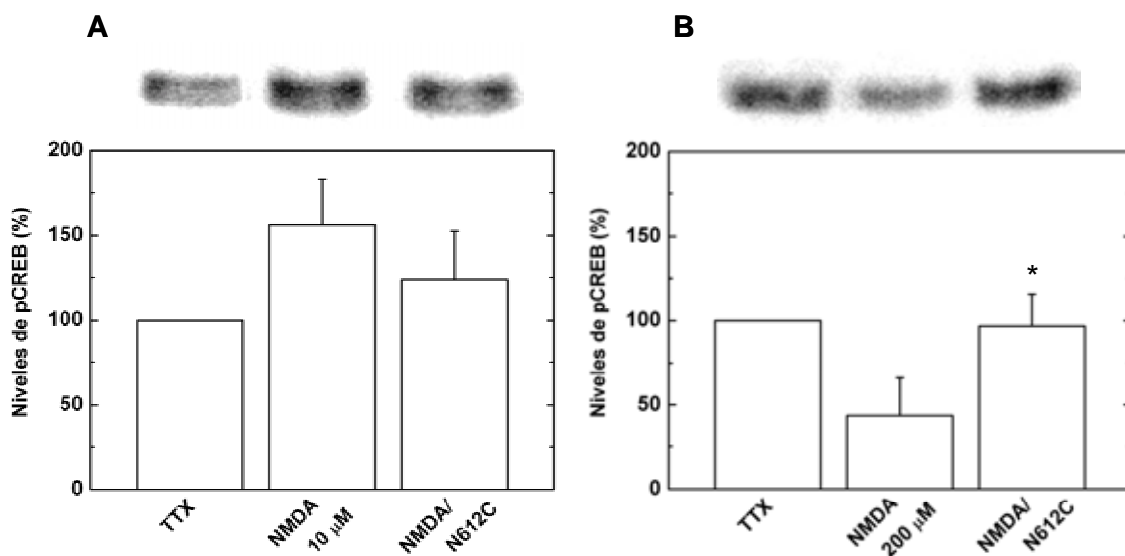


Figura 3.37. Efecto de N612C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA en el cultivo de neuronas de hipocampo. Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV fueron sometidas a incubación de 20 min con una concentración 10 μM (A) o 200 μM (B) de NMDA en medio de cultivo. Las neuronas fueron preincubadas con TTX 2 μM 12-15 horas antes de la adición de NMDA. N612C se empleó de forma simultánea a NMDA y la concentración utilizada fue 100 μM . En la parte superior se muestra una imagen representativa de los ensayos de inmunodetección de pCREB en las condiciones indicadas en la gráfica. (*) $p < 0,05$.

De estos resultados se deduce que uno de los posibles puntos de actuación de N612C se encuentra o afecta a la vía de supervivencia mediada por pCREB: potenciando su activación y/o inhibiendo su desactivación.

7. Implicación de p75 y de Zn²⁺ en la muerte neuronal inducida por NMDA y péptido β -amiloide humano

7.1. La sensibilidad del cultivo primario de neuronas de hipocampo a péptido β -amiloide humano no está determinada por los niveles celulares de p75

Numerosos autores han propuesto como receptor neuronal de superficie para β -amiloide a la proteína p75 o p75^{NTR} (NTR: Neurotrophin Receptor). Esta proteína es un receptor de baja afinidad para neurotrofinas, y pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Se encuentra fisiológicamente relacionado con mecanismos de supervivencia y apoptosis en respuesta a factores de crecimiento.

En primer lugar hemos analizado los niveles de p75 a lo largo de los DIV en nuestro sistema modelo de neuronas de hipocampo. Ya que se produce un cambio en la sensibilidad a β A a lo largo de la maduración del cultivo, este cambio podría estar debido a cambios en la expresión del receptor de superficie de β A.

Como se aprecia en la *Figura 3.38 B*, se observa un leve aumento en los niveles de proteína p75 (medidos por ensayo de inmunodetección) a lo largo de los DIV. En cambio se observa una leve disminución en los niveles de expresión de su gen por RT-PCR (*Figura 3.38 A*), aunque esta disminución no es estadísticamente significativa.

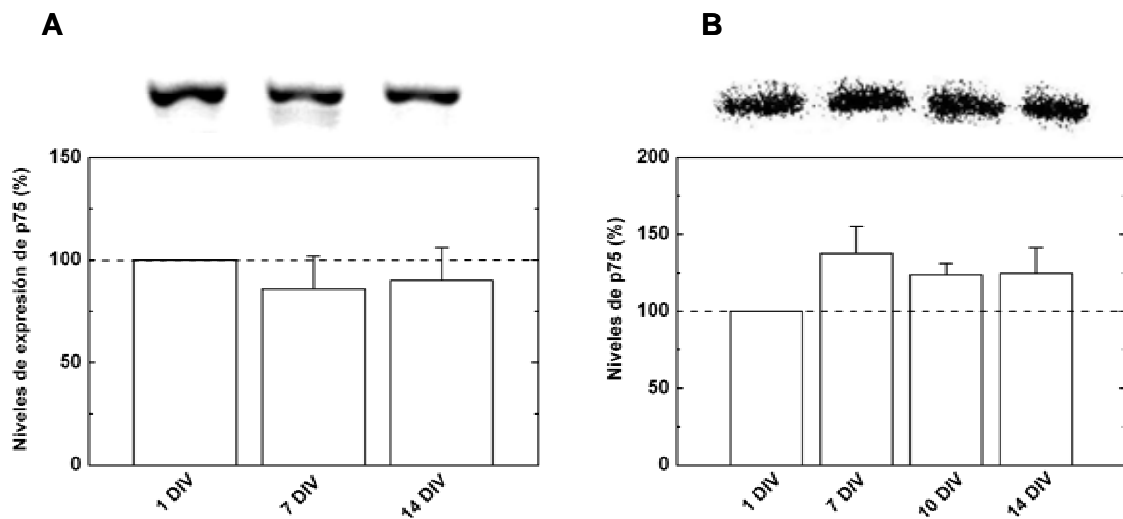


Figura 3.38. Niveles de p75 a lo largo de los días de cultivo *in vitro* en neuronas de hipocampo de rata. Se extrajo el RNA (A) o la fracción proteica (B) de neuronas de hipocampo a diferentes DIV y se analizaron los niveles de RNA mensajero o de proteína p75 mediante RT-PCR e inmunodetección, respectivamente. Se muestra la cuantificación relativa al DIV 1. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los ensayos de inmunodetección y de RT-PCR de p75 en las condiciones indicadas en las gráficas. En ningún caso $p \leq 0,05$.

Por tanto la hipótesis a comprobar ahora fue si la incubación con péptido βA es la que hace variar los niveles de p75 en el cultivo. Otros autores han detectado un aumento en la expresión de p75 al tratar con βA en cultivos de neuronas de corteza cerebral. Este aumento en los niveles de receptor inducido por su ligando sería un candidato ideal a mecanismo inicial de la cascada de neurotoxicidad inducida por βA .

Como se observa en la *Figura 3.39*, los cambios producidos en los niveles de proteína p75 o de expresión de su gen tras el tratamiento con diferentes concentraciones de βA tampoco son significativos. El tratamiento no induce cambios en los niveles de p75 a ninguna de las concentraciones empleadas, a ninguno de los tiempos de incubación. Tampoco se producen variaciones entre las dos variantes de péptidos βA (1-40 y 1-42). Por tanto, en nuestras condiciones experimentales y concentraciones empleadas, el péptido βA no produce variaciones en los niveles de su supuesto receptor, p75, que expliquen su capacidad neurotóxica.

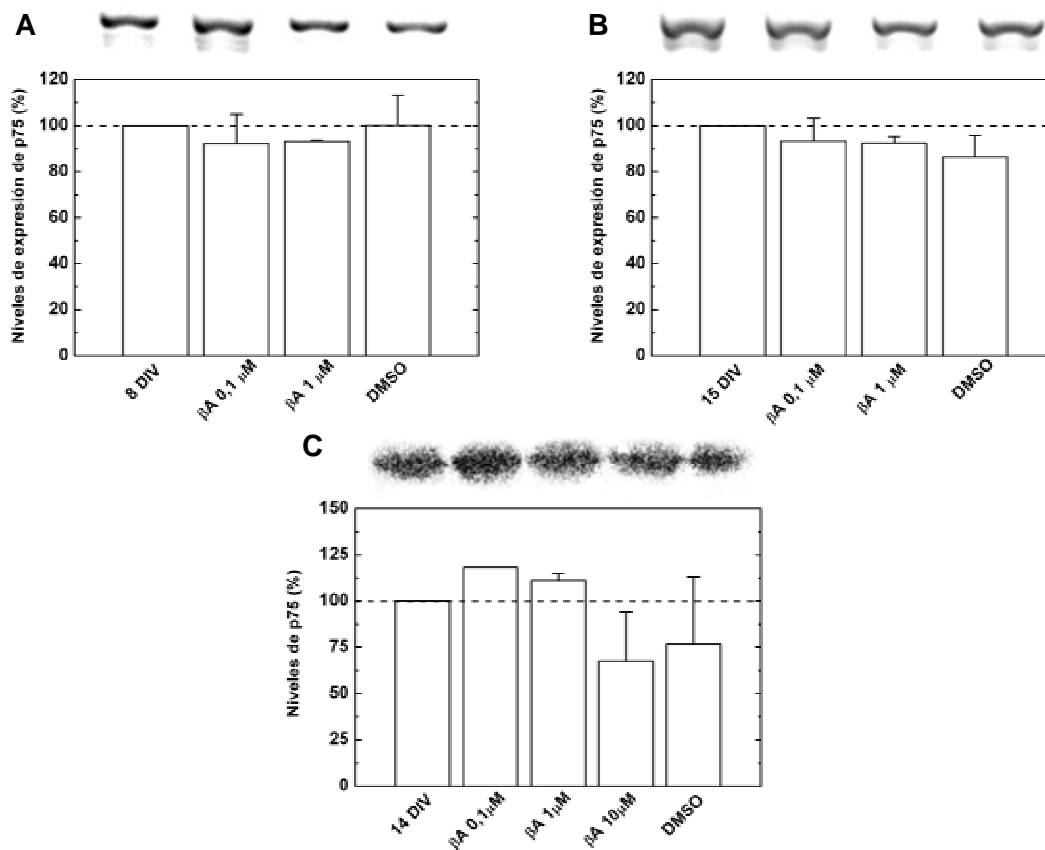


Figura 3.39. Niveles de p75 tras el tratamiento con péptido β -amiloide en neuronas de hipocampo de rata. Se extrajo el RNA (A, B) o la fracción proteica (C) de neuronas de hipocampo sometidas a tratamiento durante 48 h con péptido β A 1-40 o 1-42, y se analizaron los niveles de proteína o de RNA mensajero de p75 mediante inmunodetección y RT-PCR. Se muestra la cuantificación relativa a la condición control. En la parte superior de cada gráfica se muestra una imagen representativa de los ensayos de RT-PCR y de inmunodetección de p75 en las condiciones indicadas en el eje de ordenadas. En ningún caso $p \leq 0,05$.

7.2. Una elevada concentración de Zn^{2+} es tóxica para neuronas de hipocampo

El ion Zn^{2+} es un bloqueador del receptor NMDA a baja concentración, pero es tóxico a altas concentraciones ya que permea a través del canal del receptor. Zn^{2+} está implicado en la muerte neuronal inducida por péptido β -amiloide, y también se ha observado que es capaz de inducir la expresión de p75. Por todos estos motivos es

interesante analizar sus efectos en nuestro sistema modelo, ya que podría constituir un vínculo entre la excitotoxicidad por NMDA y la neurotoxicidad por β A.

En cuanto a su capacidad neurotóxica, Zn^{2+} no es muy tóxico para las neuronas de hipocampo hasta 200 μ M en incubaciones de 15 minutos a 14 DIV (*Figura 3.40*). En cambio cuando se supera esta concentración, la muerte aumenta rápidamente hasta llegar casi al 60 % a 500 μ M (*Figura 3.40*).

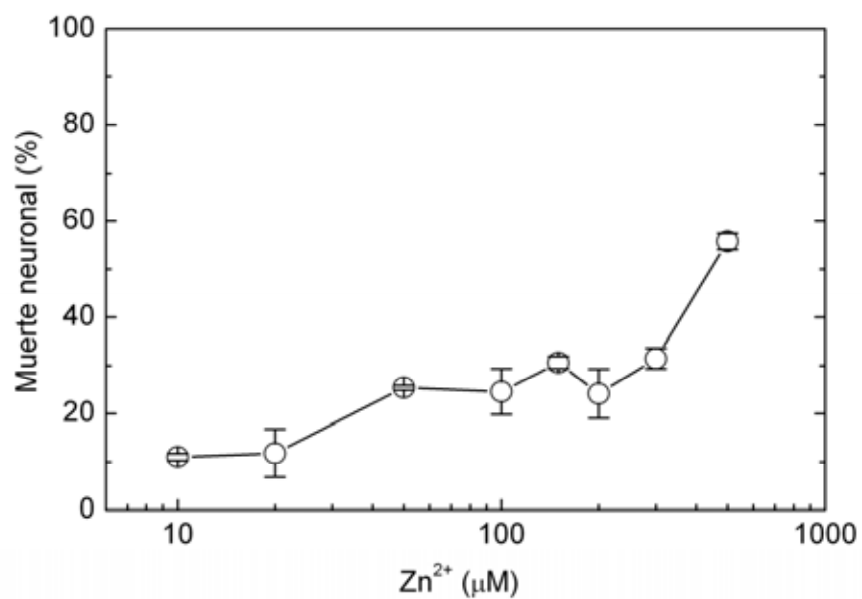


Figura 3.40. Muerte neuronal inducida por Zn^{2+} en neuronas de hipocampo de cerebro de rata a 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 15 minutos a 25 °C con solución básica salina a la que se añadió Ca^{2+} 1,8 mM, Mg^{2+} 0,813 mM y Zn^{2+} a las concentraciones finales indicadas. La muerte neuronal se determinó 24 h tras el estímulo citotóxico.

Esta muerte neuronal inducida por Zn^{2+} es parcialmente inhibida por MK-801, tanto si se emplea una concentración 200 μ M como 500 μ M (*Figura 3.41*), lo que indica que se produce en parte a través de la actividad del receptor NMDA.

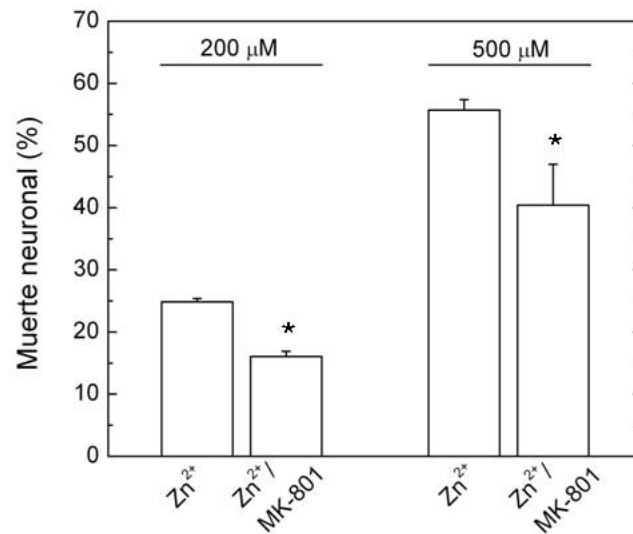


Figura 3.41. Protección por MK-801 de la muerte neuronal inducida por Zn²⁺ en neuronas de hipocampo de cerebro de rata a 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 15 minutos a 25 °C con solución básica salina al que se añadió Ca²⁺ 1,8 mM, Mg²⁺ 0,813 mM y Zn²⁺ a las concentraciones finales indicadas y MK-801 10 μM. La muerte neuronal se determinó 24 h tras el estímulo citotóxico. (*) $p < 0,05$.

7.3. Zn²⁺ induce la expresión de p75 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, sin afectar los niveles de subunidades del receptor NMDA

Se ha observado que la exposición de cultivos de neuronas de corteza cerebral a Zn²⁺ induce la expresión de p75 y de otro cofactor necesario para inducir muerte neuronal a través de este receptor. El significado funcional de esta inducción es desconocido por el momento. También se ha observado *in vivo* la inducción de p75 en neuronas de hipocampo tras episodios agudos de isquemia o epilepsia, situaciones en la que también Zn²⁺ juega un papel importante.

Decidimos determinar si Zn²⁺ inducía la expresión de p75 en nuestro cultivo primario de neuronas de hipocampo. A 14 DIV, un pulso de Zn²⁺ 100 μM induce un aumento en los niveles de p75 del 50 % medido 4 horas después (*Figura 3.42 A*). Este aumento en los niveles de proteína depende de la concentración de Zn²⁺ empleada,

ya que una concentración superior (300 μM) no produce dicho aumento, e incluso provoca una pequeña disminución de los niveles de p75.

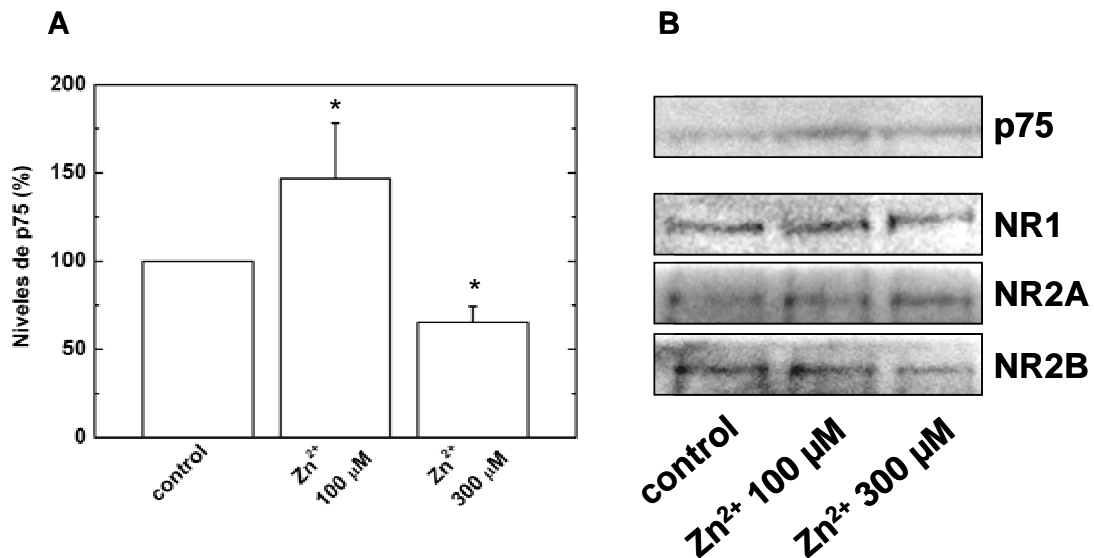


Figura 3.42. Niveles de p75 y subunidades del receptor NMDA tras la exposición de neuronas de hipocampo a diferentes concentraciones de Zn^{2+} . Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo 14 DIV fueron sometidas a incubación de 15 min a Zn^{2+} 100 μM o 300 μM en tampón BSS al que se añadió Ca^{2+} 1,8 mM, Mg^{2+} 0,813 mM. Los niveles de p75 se determinaron 4 horas tras el tratamiento. **(A)** Niveles relativos de p75. **(B)** Imágenes representativas de los ensayos de inmunodetección de p75 y subunidades del receptor NMDA. (*) $p < 0,05$.

Al alterar Zn^{2+} los niveles de p75, influye así en la cascada de señalización de muerte neuronal inducida por β -amiloide, supuestamente mediada por esta proteína. Por tanto decidimos determinar si Zn^{2+} también influía de la misma forma en los procesos de excitotoxicidad. Mediante análisis de inmunodetección analizamos los niveles de NR1, NR2A y NR2B en las mismas condiciones utilizadas para la inducción de p75. Sin embargo, en las condiciones empleadas, Zn^{2+} no altera de forma significativa la expresión de ninguna de las subunidades del receptor NMDA estudiadas (*Figura 3.42 B*).

Se encuentran en marcha estudios encaminados a determinar en más profundidad la implicación de Zn^{2+} en el proceso de neurodegeneración inducido por péptido β -amiloide, y cómo N612C puede estar interfiriendo o protegiendo frente a este proceso.

4. Discusión

En los últimos años una de las prioridades en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas ha sido el desarrollo de nuevos fármacos para su utilización clínica. En la actualidad, la farmacología desarrolla dos líneas de actuación: una que tiene como objetivo detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones celulares ya afectadas; y otra línea que busca prevenir o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores (Segura y cols., 2003).

Durante la última década se ha empleado la química combinatoria como fuente de nuevos fármacos bloqueadores de receptores implicados en procesos neurodegenerativos. En concreto, se ha empleado una quimioteca de péptidos para buscar bloqueadores del receptor NMDA (Ferrer-Montiel y cols., 1998a). Éstos bloqueadores son hexapéptidos ricos en arginina, que protegen efectivamente a las neuronas de hipocampo frente a estímulos de excitotoxicidad, con una potencia similar a memantina. Los ensayos *in vitro* en cultivos neuronales permitieron un cribado más específico de los péptidos neuroprotectores, tras la selección inicial mediante técnicas electrofisiológicas de bloqueo de corriente en ovocitos de *Xenopus*.

Para mejorar la eficacia de los péptidos, en estudios posteriores se sintetizó una quimioteca de trímeros de N-alquilglicina (Bradley y cols., 1997; Kirshenbaum y cols., 1998). El tamaño de estas moléculas es menor que el de los hexapéptidos, lo que les permite atravesar mejor la barrera hematoencefálica, y mejora sus características farmacológicas. Esta quimioteca debía ser cribada para identificar, de los 10.648 trímeros iniciales, aquellos potencialmente susceptibles de ser efectivas moléculas neuroprotectoras.

El primer cribado se realizó, de nuevo, mediante técnicas de electrofisiología, midiendo la capacidad de las distintas mezclas para bloquear las corrientes inducidas

por glutamato en ovocitos que expresan el receptor NMDA humano (Planells-Cases y cols., 2002). A partir de este cribado se identificaron los radicales más potentes como bloqueadores del receptor NMDA y, por tanto, de los mecanismos de excitotoxicidad.

En esta quimioteca también se han identificado moléculas neuroprotectoras que, paradójicamente, no son buenos bloqueadores del receptor NMDA (Montoliu y cols., 2002). Estos trímeros son capaces de proteger de la muerte neuronal que se produce *in vivo* en animales modelos de excitotoxicidad (intoxicación por amonio, isquemia cerebral). En concreto, se determinó que los péptidos N612C y N6110C presentan una elevada capacidad neuroprotectora en modelos animales (Montoliu y cols., 2002; Sanchez-Perez y cols., 2003).

Por tanto, unos de los objetivos que nos planteamos fue poner a punto un modelo neuronal experimental que nos permitiera determinar la capacidad bloqueadora y neuroprotectora de los péptidos más activos y sus derivados. El modelo más adecuado para este tipo de ensayos es el cultivo primario neuronal. El cultivo de neuronas *in vitro* es un sistema que se asemeja más a la situación *in vivo* que las líneas celulares inmortalizadas, nos permite realizar ensayos de neurotoxicidad y neuroprotección, y carece de los inconvenientes del manejo de animales modelo. De cualquier forma, los resultados obtenidos en estos sistemas de cultivos primarios deben ser posteriormente respaldados por ensayos más detallados en sistemas más complejos.

En nuestro caso nos centramos en el cultivo primario de neuronas de hipocampo. El hipocampo, como se ha mencionado en el apartado de Introducción, es una estructura del sistema límbico relacionada con procesos de memoria y aprendizaje. Las neuronas de esta región cerebral se encuentran afectadas en ciertas enfermedades que cursan con amnesia y desorientación espacial, como la EA. Además, estas neuronas son bastante sensibles a episodios de isquemia y ciertos tipos

de epilepsia, debido a que expresan en alta cantidad receptores de glutamato del tipo NMDA, altamente permeables a Ca^{2+} . Por tanto, el cultivo primario de estas neuronas es particularmente interesante, debido a su implicación en excitotoxicidad y neurodegeneración.

La función fisiológica de los receptores NMDA en neuronas de hipocampo adultas se encuentra relacionada con procesos de LTP (Long Term Potentiation) y LTD (Long Term Depression). Además, durante el desarrollo, se hayan implicados en procesos de apoptosis y supervivencia neuronal. En cambio, en situaciones patológicas, su elevada permeabilidad a Ca^{2+} les implica en procesos de muerte por hiperestimulación (excitotoxicidad) (Olney, 1969). En nuestro cultivo primario la excitotoxicidad puede ser imitada *in vitro* exponiendo a las neuronas a una concentración elevada de glutamato o de NMDA (su agonista sintético específico). La capacidad neurotóxica de este tipo de estímulos depende del grado de expresión de las subunidades de los receptores NMDA y de su función.

Hemos determinado la sensibilidad del cultivo primario de neuronas de hipocampo a estímulos excitotóxicos a lo largo de los DIV, y determinado los niveles proteicos de las principales subunidades del receptor NMDA (NR1, NR2A y NR2B). A partir de estos resultados hemos determinado que el momento adecuado para la realización de experimentos enfocados sobre el receptor NMDA sería a 14 DIV, ya que en este momento alcanza su máximo funcionamiento. A 14 DIV la expresión de NR2A y NR2B ha descendido con respecto a niveles previos, pero NMDA es capaz de desencadenar un 40 % de muerte neuronal. En estudios previos de hibridación *in situ* en cerebro de rata (Monyer y cols., 1994), donde se emplearon como sondas RNAm de las diferentes subunidades del receptor NMDA, se observó que el gen NR1 se expresa en todas las neuronas, en todos los momentos del desarrollo del SNC. En el hipocampo embrionario se expresa NR2B, y su expresión va disminuyendo progresivamente a lo largo de los primeros días postparto. La expresión de NR2A, en cambio, va aumentando progresivamente tras el nacimiento. En el cultivo primario

de neuronas de hipocampo se observa el mismo patrón de expresión para NR1 y NR2B. Pero no sucede lo mismo con NR2A, que aumenta inicialmente su expresión pero desciende a partir de 7 DIV; este comportamiento podría ser debido a diferencias propias entre sistemas *in vitro* e *in vivo*. De nuestros resultados se deduce que no existe una correlación aparente entre los niveles de expresión de las subunidades del receptor NMDA y su maduración funcional. Ensayos de colocalización subcelular de las subunidades clarificarían este proceso de maduración. En cualquier caso es interesante destacar que la relación NR2A/NR2B sí que varía a lo largo de los DIV, lo que podría tener importantes consecuencias funcionales. Además, todo estímulo capaz de variar la expresión de subunidades del receptor NMDA afectaría a la sensibilidad de las neuronas a excitotoxicidad (Clayton y Browning, 2001).

Los ensayos orientados a estudiar la muerte neuronal inducida por glutamato deberán ser realizados a 21 DIV, ya que es en este momento cuando el cultivo de neuronas de hipocampo alcanza su mayor sensibilidad a éste agonista. A 21 DIV la muerte neuronal inducida por glutamato no se produce únicamente vía receptores NMDA, sino que también implica a receptores no-NMDA. Entre éstos últimos pueden encontrarse subtipos de receptores AMPA o de receptores de kainato de alta permeabilidad a Ca^{2+} (Weiss y Sensi, 2000). Estos receptores también muestran elevada permeabilidad a Zn^{2+} , que puede resultar neurotóxico a alta concentración.

El ión Ca^{2+} se encuentra profundamente implicado en los procesos neurodegenerativos (Paschen, 1999). La elevada permeabilidad a Ca^{2+} de los receptores NMDA es la que les hace ser protagonistas de los procesos de excitotoxicidad. También se han encontrado desequilibrios en la homeostasis de Ca^{2+} en otras situaciones patológicas que cursan con neurodegeneración, como la EA. Como muestran nuestros resultados, es necesaria la presencia de Ca^{2+} exógeno para que se produzca muerte neuronal inducida por NMDA. Por el contrario, la adición

de glicina no es necesaria, lo que indica que las neuronas sintetizan y secretan a la sinapsis la concentración necesaria de este coagonista de los receptores NMDA.

Una vez determinado el momento de desarrollo del cultivo para cada uno de los ensayos de excitotoxicidad, procedimos a estudiar más detalladamente este proceso. A microscopía óptica las células muertas por un choque excitotóxico adquieren un aspecto típicamente necrótico, lo que concuerda con los resultados obtenidos con el colorante fluorescente DAPI (núcleos picnóticos). Esporádicamente se observan núcleos de morfología apoptótica, que no se tiñen con el colorante trypan blue y que no constituyen un porcentaje significativo. No es de extrañar la predominancia de la muerte necrótica, teniendo en cuenta la intensidad de la exposición a NMDA o glutamato.

Otro dato en este sentido se obtiene a partir de la cinética de muerte inducida por una breve exposición a NMDA. Tras 20 minutos de incubación con una concentración excitotóxica de NMDA ya se ha producido un 25 % de muerte neuronal (62,5 % del total); debido a la rapidez de la neurodegeneración, es probable que ésta sea debida al efecto que la apertura de los canales del receptor NMDA tiene sobre la homeostasis iónica de la célula. Si se compara con la muerte neuronal inducida por un estímulo de despolarización (alta concentración extracelular de K^+), ambos porcentajes son bastante similares. La muerte neuronal inducida por un estímulo agudo de despolarización sostenida es en parte debida a la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, lo que se deduce del parcial efecto protector de nimodipina y verapamil, bloqueadores de estos canales. Esto explicaría por qué la excitotoxicidad de NMDA es dependiente de la concentración de Ca^{2+} en el medio de incubación, ya que el simple desbalance de Na^+ y K^+ que se produce por la apertura masiva de los receptores NMDA no tiene por sí sólo efectos tóxicos.

Una vez que se ha producido esta muerte neuronal rápida en presencia de una elevada concentración de NMDA, y que se ha retirado el agonista del medio de incubación, las neuronas siguen muriendo, pero a un ritmo más lento que el inicial.

Trascurridas 6 horas tras el choque, el porcentaje de muerte ha alcanzado un valor estable, que se mantiene hasta 24 horas después. Esta cinética rápida de muerte neuronal no se ajusta al típico proceso de muerte apoptótica, que se extiende más en el tiempo (Smyth y Berman, 2002). Numerosos autores han detectado muerte apoptótica inducida por NMDA, a bajas concentraciones y largo tiempo de exposición, situación similar a la de las neuronas en la penumbra isquémica (Martin y cols., 1998). Aunque este tipo de muerte retardada no ha sido objeto de nuestro estudio, sería interesante estudiar el efecto de las N-alquilglicinas frente a ella.

Las incubaciones con NMDA durante 24 h también provocan muerte necrótica en nuestro cultivo, debido a que se ha empleado una elevada concentración del agonista. Es interesante destacar que ambas titulaciones con NMDA (20 min y 24 h) nos muestran una EC_{50} similar, lo que es coherente teniendo en cuenta que ambas se producen a través del mismo tipo de receptores. También es interesante señalar que ambos estímulos alcanzan un punto estable a partir de 14-18 DIV, por lo que los resultados de ambos ensayos son complementarios. Como era de esperar, se encuentran diferencias entre las incubaciones con NMDA de 20 minutos y de 24 horas a 14 DIV. Esto no puede ser consecuencia del grado de maduración de los receptores, que en ambos casos es la misma. En este caso la sensibilidad neuronal aumenta si la excitotoxina permanece en el medio durante un tiempo prolongado, provocando una entrada de calcio elevada y continuada. Si la incubación es de 20 minutos un determinado porcentaje de células serían capaces de resistir el choque, pero mueren si la incubación es de mayor duración. También es necesario tener en cuenta que las incubaciones de 20 minutos se realizan en tampón, de composición conocida, y las de 24 horas se realizan en medio de cultivo, de composición mucho más compleja y no totalmente definida.

Los choques excitotóxicos de larga duración tienen como consecuencia evidente una caída en la densidad del cultivo, ya que las células muertas por necrosis se despegan de la placa, vertiendo su contenido al medio extracelular. Este

porcentaje de neuronas no puede ser contabilizado por el método de medida de viabilidad empleado en este estudio (método de trypan blue), por lo que la muerte neuronal se encuentra subestimada en el caso de largos periodos de incubación. En la *Figura 3.15 B* se representa la caída en la viabilidad obtenida como resultado de sumar ambos porcentajes (porcentaje de muerte neuronal medida por trypan blue y porcentaje de caída de densidad). Si se compara entonces con la muerte neuronal obtenida en periodos de 24 horas (*Figura 3.15 A*) se observa una gran similitud, que reflejaría el grado de maduración funcional de los receptores NMDA.

Uno de los puntos clave en la cascada molecular inducida por estimulación excitotóxica del receptor NMDA es la generación de especies reactivas del oxígeno (Atlante y cols., 2001). La sobreproducción de ROS está relacionada con la disfunción mitocondrial característica de los procesos de degeneración neuronal, tanto agudos como la isquemia (Lee y cols., 1999), como procesos neurodegenerativos crónicos, tal es el caso de la EA (Eckert y cols., 2003). Nosotros hemos detectado una generación transitoria de ROS tras un choque excitotóxico. La producción de ROS disminuye a partir de las 3 horas tras el choque. La causa de este descenso sería doble: las neuronas muertas liberan las ROS generadas al medio extracelular, desapareciendo su señal en el soma celular; y, por otra parte, las neuronas que sobreviven al choque recuperan su estado redox inicial, potenciando mecanismos antioxidantes que recuperen el estado inicial natural de la célula. Aquellos agentes que impidan la generación excesiva de ROS en respuesta a choques neurotóxicos serán potenciales fármacos neuroprotectores.

Varios autores han informado del efecto neuroprotector de concentraciones subtóxicas de glutamato frente a excitotoxicidad (Wood y Bristow, 1998; Baskys y Adamchik, 2001; Ogita y cols., 2003). Las incubaciones de 24 horas con NMDA nos han permitido observar que este efecto también se puede obtener empleando NMDA en cultivos de neuronas de hipocampo. Otros autores obtienen resultados similares empleando otros cultivos primarios (Lee y cols., 2005), deduciendo que la

desensibilización del receptor NMDA y la actividad sináptica desencadenan mecanismos propios de neuroprotección frente a estímulos excitotóxicos. Desde hace tiempo se conoce que la actividad fisiológica del receptor NMDA es vital para un correcto desarrollo y supervivencia neuronales (Horvath y cols., 1997; Hansen y cols., 2004). La actividad sináptica y la estimulación no excitotóxica de los receptores NMDA desencadena la activación de mecanismos de supervivencia neuronal. Entre estos mecanismos se encuentra la vía de señalización de CREB, factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en supervivencia neuronal (Walton y cols., 1999; Sala y cols., 2000; Hardingham y cols., 2002). La activación de los receptores NMDA, tanto a niveles fisiológicos (sinápticos) como patológicos (extrasinápticos) estimulan la fosforilación de CREB (Lee y cols., 2005); sin embargo es la estimulación subtóxica la que mantiene los niveles de pCREB elevados, permitiendo la expresión de genes implicados en la neuroprotección, como BDNF (Hardingham y cols., 2002). Nuestros resultados confirman que existe una conexión entre la activación de este factor de transcripción y el grado y duración de la estimulación del receptor NMDA (*Figura 3.19*). Además, los bloqueadores del receptor NMDA (MK-801, N20C) revierten este efecto, demostrando así la vinculación entre ambos procesos y, a la inversa, su capacidad de bloqueo. Hemos identificado a PKA y AMPc como piezas clave en la fosforilación de CREB en neuronas de hipocampo, a diferencia de otros autores (Lee y cols., 2005) que no observaron su implicación en este proceso. PKA es una diana farmacológica de importancia creciente en trastornos de la memoria (Arnsten y cols., 2005) y requiere de la actividad adenilato ciclasa, acoplada a receptores metabotrópicos. La vía de señalización PKA-CREB se encuentra profundamente implicada en procesos de memoria y aprendizaje, y en la generación de LTP en el hipocampo (Vitolo y cols., 2002). Calmodulina también puede estimular a la enzima adenilato ciclasa, lo que acoplaría la entrada de calcio vía receptores NMDA a la activación de PKA (Carlezon, Jr. y cols., 2005).

Otro de los objetivos de este estudio ha sido identificar en la librería de N-alquilglicinas fármacos orientados a frenar la muerte neuronal que se produce en EA. La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, clínicamente caracterizado por un paulatino deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales, que se traduce en pérdida de la memoria, incapacidad del individuo afectado para hacer por sí mismo las actividades vitales rutinarias, pudiendo presentarse también un cuadro de ansiedad, irritabilidad, depresión o alucinaciones. Es la tercera causa de mortalidad entre adultos mayores de 65 años en los países desarrollados, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Boyd, 2000). Teniendo en cuenta además el aumento de la esperanza de vida media, que se ha duplicado durante el siglo XX, y el hecho de que la incidencia de la EA aumenta con la edad, así como sus devastadores efectos, parece evidente que la EA representa un grave problema de salud pública y presumiblemente va a ser una de las patologías más relevantes del siglo XXI en el mundo occidental.

Son múltiples los factores que llevan a la pérdida de neuronas en la corteza cerebral e hipocampo durante el desarrollo de esta enfermedad. En consecuencia, también son múltiples las dianas terapéuticas aunque, sin duda, las más interesantes son las que prevengan la muerte neuronal por apoptosis y ofrezcan neuroprotección. En la actualidad, la búsqueda y validación preclínica de neuroprotectores eficaces, con baja toxicidad, y mínimos efectos secundarios es un objetivo fundamental para aminorar los déficits cognitivos asociados a las enfermedades neurodegenerativas como la EA.

Las características histológicas típicas de EA son la presencia en el cerebro de placas de amiloide y marañas de neurofibrillas. Aún no está claro si la deposición de amiloide en la patogénesis de la EA es un componente primario o un marcador importante de un proceso patogénico subyacente que se desarrolla de manera independiente. Los experimentos realizados *in vitro* han demostrado que el péptido amiloide puede ser neurotóxico (Bruce y cols., 1996; Puttfarcken y cols., 1996; Klein

y cols., 1999; Diana y cols., 2000; Wei y cols., 2000) y puede perturbar la señalización intracelular de calcio (Sheehan y cols., 1997). Los péptidos amiloides producen un aumento en la generación de ROS en varios modelos celulares (Smith y cols., 1997; Smith y cols., 1998; Sponne y cols., 2003). Por tanto, se ha postulado que, con independencia de lo que cause la deposición de amiloide, una vez producida esta deposición el amiloide puede acelerar el daño celular a través de la aparición de estrés oxidativo, entre otros mecanismos (Parks y cols., 2001). De hecho, a pesar de que la EA se caracterice principalmente por un déficit colinérgico, la transmisión glutamatérgica también se ve afectada, y ambos tipos de neuronas, colinérgicas y glutamatérgicas, degeneran igualmente en las regiones cerebrales afectadas (Hardy y cols., 1987; Palmer y Gershon, 1990).

Las bases moleculares de los diversos trastornos mentales, así como las zonas cerebrales dañadas, son diferentes, pero existen varios puntos comunes. Así, el estrés oxidativo es un importante factor en la neuropatología de enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, la excesiva activación de los receptores de glutamato produce igualmente degeneración neuronal. De alguna manera no bien conocida estos dos mecanismos, estrés oxidativo y sobreestimulación de receptores de glutamato, convergen e interaccionan para constituir una vía común final de vulnerabilidad neuronal en el cerebro (Coyle y Puttfarcken, 1993). La excitotoxicidad es, por tanto, una diana primaria en la terapia contra las enfermedades neurodegenerativas.

Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo indican que la sensibilidad neuronal a la excitotoxicidad y a la degeneración provocada por péptido β -amiloide aumentan de forma paralela a lo largo de los días *in vitro*. Esto puede ser indicativo de una posible relación entre ambos mecanismos de muerte neuronal, o bien de un aumento general de la sensibilidad frente la toxicidad de cualquier tipo de insulto. En consecuencia, una posible vía para abordar el estudio de la neurodegeneración mediada por el péptido β A sería investigar su protección por

antagonistas de receptores de glutamato, concretamente del subtipo NMDA, implicados de forma mayoritaria en excitotoxicidad. De hecho, recientemente se ha descubierto que memantina, un antagonista selectivo de los receptores tipo NMDA, reduce significativamente la progresión de los síntomas de la EA en pacientes con diagnóstico moderadamente grave (Marx, 2000; Sonkusare y cols., 2005), lo que puede constituir una vía complementaria para aminorar los efectos de esta enfermedad. Independientemente de la actuación directa de estos antagonistas sobre la muerte inducida por péptidos amiloideos, son capaces de frenar la degeneración secundaria que se produce, por excitotoxicidad, en etapas avanzadas de la enfermedad.

La *Figura 4.1* muestra comparativamente la muerte neuronal provocada por la incubación durante 24 horas bien con NMDA 100 μ M, bien con péptido β -amiloide 10 μ M, a 7 y a 14 DIV. En ambos casos las neuronas de hipocampo de rata se muestran más sensibles frente a NMDA que frente a amiloide, y además se observa que la capacidad neurotóxica de ambos compuestos parece aumentar de forma paralela con los días de cultivo *in vitro*.

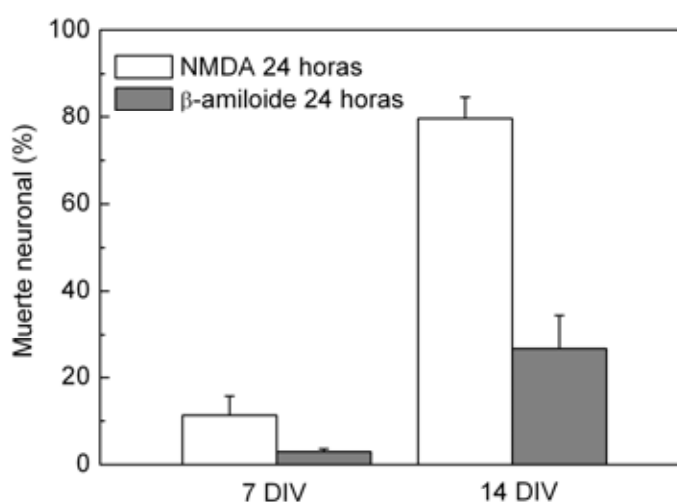


Figura 4.1. Muerte neuronal inducida por NMDA o péptido β -amiloide humano (1-40) 24 horas en neuronas de hipocampo de cerebro de rata mantenidas en cultivo 7 y 14 DIV. Las neuronas se incubaron durante 24 horas a 37 °C con medio al que se añadió NMDA 100 μ M o péptido β -amiloide humano 10 μ M.

En ambos casos la sensibilidad neuronal aumenta 7-8 veces de 7 a 14 DIV, lo que puede indicar la posible relación entre ambos procesos.

Existen varios bloqueadores específicos del receptor de NMDA, entre los que destaca MK-801 (dizolcipina). Este antagonista tiene unas propiedades como son su alta afinidad (en el intervalo de concentración nM) y la irreversibilidad de su unión, que hacen que se disocie muy poco del receptor una vez unido a él. Desde un punto de vista clínico, esto es un inconveniente, pues se traduce en un bloqueo total y constante tanto de los receptores sobreactivados que están provocando la muerte neuronal, como de los receptores que se activan fisiológicamente para llevar a cabo las funciones de las sinapsis excitadoras. De ahí que estos fármacos produzcan efectos secundarios psicotrópicos no deseados y perjudiciales cuando se emplean en clínica. Además, la administración crónica de memantina puede llegar a aumentar la muerte neuronal (Ikonomidou y cols., 2000). Es necesario por tanto encontrar nuevos bloqueadores del receptor de NMDA que sean selectivos, moderadamente potentes y químicamente estables.

El péptido β -amiloide requiere de incubaciones de larga duración para provocar muerte neuronal en el cultivo de neuronas de hipocampo. A la concentración empleada por nosotros (10 μ M), no hemos observado un aumento en excitotoxicidad mediada por NMDA por preincubación con péptido β -amiloide. Esto contrasta con estudios realizados en otros sistemas neuronales (Mattson y cols., 1992). Las diferencias pueden ser debidas al tipo celular, a la concentración empleada y al solvente utilizado (DMSO). Con respecto al porcentaje de muerte inducida por péptido β -amiloide, se observa de forma general una menor sensibilidad de las neuronas en comparación con el choque excitotóxico con NMDA. De 7 a 10 DIV la muerte inducida por amiloide no es significativa, aumentando luego y

estabilizándose en un valor de un 30 %. En este caso la caída neuronal no es significativa hasta los 18 DIV.

Un aspecto relevante en la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide es el solvente empleado en su disolución, ya que afecta de manera significativa al grado de agregación del péptido. Varios autores han mostrado que cuando el péptido se disuelve en DMSO se ve disminuida su capacidad de agregación, lo que tiene como consecuencia una menor toxicidad (Busciglio y cols., 1992). Si el péptido se prepara en agua se generan gran cantidad de agregados, ya que es insoluble en medio acuoso, y por tanto su toxicidad es mayor (Busciglio y cols., 1992). Nosotros hemos encontrado un grado de toxicidad adecuado para realizar ensayos de toxicidad y protección para fármacos disolviendo el péptido en DMSO, por lo que decidimos emplearlo como solvente. Si los péptidos β -amiloideos se disuelven inicialmente en solventes orgánicos, se ve impedida su capacidad posterior de agregación (Shen y Murphy, 1995). Sin embargo, la generación de oligómeros solubles sí que sería posible. Estudios recientes indican que son estos pequeños agregados solubles los responsables de la degeneración selectiva en EA (Kim y cols., 2003).

La concentración de amiloide empleada en todos los ensayos fue de 10 μ M. Esta concentración está en el límite inferior de sensibilidad de las neuronas corticales humanas (Mattson y cols., 1992). En nuestro caso dicha concentración se ha mostrado efectiva a la hora de desencadenar el proceso de degeneración neuronal, y creemos que se ajusta más fielmente a las condiciones naturales que se pueden presentar en las cercanías de las placas de amiloide, aunque no se puede descartar que se alcance una mayor concentración de forma localizada.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es determinar la capacidad de protección de diferentes N-alquilglicinas frente a distintos choques neurotóxicos, hemos determinado el tiempo del cultivo *in vitro* adecuado para ensayar dicha capacidad protectora frente al insulto neurotóxico de diferentes compuestos. A efectos comparativos decidimos emplear un ensayo de 24 horas de duración a 14

DIV. Se consigue así una sensibilidad máxima frente a NMDA y frente al péptido, teniendo en cuenta que este compuesto necesita de un periodo de varias horas para provocar la muerte neuronal. Por otro lado, hemos seleccionado como concentración de ensayo para las N-alquilglicinas 10-100 μM , pues se pretende que los bloqueadores tengan una moderada afinidad (para evitar problemas como los que provoca MK-801, mencionados anteriormente). Esa concentración debe producir un efecto significativo para que la(s) molécula(s) en estudio sean consideradas en futuros ensayos clínicos.

De la misma forma que los procesos de excitotoxicidad cursan con generación de especies reactivas del oxígeno, la toxicidad del péptido β -amiloide también se encuentra vinculada al estrés oxidativo (Smith y cols., 1998; Christen, 2000). El estrés oxidativo inducido por amiloide se encuentra asociado a disfunciones mitocondriales (Miranda y cols., 2000; Parks y cols., 2001; Abramov y cols., 2004). Nosotros hemos observado un aumento en la generación de ROS, más lento que el producido por una concentración excitotóxica de NMDA, pero también transitorio, que concuerda con el observado por otros autores (Sponne y cols., 2003). Los compuestos que bloqueen esta generación de especies reactivas del oxígeno o con capacidad antioxidante serían buenos fármacos frente a la toxicidad del amiloide.

La muerte neuronal inducida por el péptido β -amiloide observada en nuestro cultivo es morfológicamente de tipo necrótico, lo que contrasta con las numerosas observaciones de otros autores que apuntan hacia procesos apoptóticos (Loo y cols., 1993; Eckert y cols., 2003). Aunque serían necesarios estudios adicionales para determinar con exactitud el tipo de muerte que se está produciendo en el cultivo, la presencia de muerte por necrosis indicaría un desbalance brusco de la homeostasis celular, lo que concuerda con la apertura de canales iónicos (Quist y cols., 2005).

Las N-alkilglicinas ensayadas muestran diferente actividad frente a la incubación de 20 min y de 24 horas con NMDA, destacando el efecto protector de N20C. Por el contrario, esta N-alkilglicina es la que menor efecto tiene frente a β -amiloide. Frente a amiloide en cambio destaca N612C, con un 54 % de protección, aunque es la menos efectiva frente a NMDA (*Tabla 4.1*).

Compuesto	IC ₅₀ frente NMDA (μ M)	% neuroprotección <i>in vitro</i> excitotoxicidad	% neuroprotección <i>in vitro</i> amiloide
N20C	13,1 \pm 1,1	60	27
N612C	-	20	54
MK-801	0,025 \pm 0,008 *	93	10
Memantina	0,3 \pm 0,1 *	70 *	-

Tabla 4.1. Valores de IC₅₀ y porcentajes máximos de neuroprotección de las N-alkilglicinas N20C y N612C y de antagonistas conocidos del receptor NMDA. Valores de IC₅₀ obtenidos en experimentos de voltage-clamp en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan NR1/NR2A. La concentración de compuestos es de 10 μ M para excitotoxicidad, y 100 μ M para amiloide.

(*) Valores tomados de Planells-Cases y cols., 2002.

Además de la especificidad y de una moderada afinidad, es deseable que los bloqueadores sean químicamente estables y por tanto no susceptibles de hidrólisis por acción de enzimas celulares. Comparando la protección que producen las N-alkilglicinas frente a NMDA 20 minutos y 24 horas, se observa que en el segundo choque excitotóxico la protección es un 15-20 % menor en todos los casos. La principal diferencia entre ambos ensayos es el tiempo de incubación, y es posible que las N-alkilglicinas sean menos estables químicamente durante largos periodos de tiempo, o bien que su capacidad neuroprotectora no sea tan efectiva en choques de 24 horas.

Existen varios puntos de conexión entre el estrés oxidativo y la excitotoxicidad por glutamato, como indican los experimentos que han demostrado que la disfunción mitocondrial es uno de los primeros eventos que tiene lugar tras una exposición a altas concentraciones de glutamato (Ankarcrona y cols., 1995; Schinder y cols., 1996). La toxicidad de amiloide también se encuentra estrechamente relacionada con el estrés oxidativo, en concreto con la peroxidación lipídica de la membrana neuronal (Mark y cols., 1997; Mattson y cols., 1997). Algunos autores han querido encontrar en este punto un mecanismo de acción común entre ambas vías de neurodegeneración, y han postulado una posible interacción entre el péptido β -amiloide y el receptor NMDA, de forma directa o indirecta a través de 4-hidroxinonenal (HNE), un aldehído que es producto de la peroxidación lipídica (Lu y cols., 2001). Sería interesante establecer en futuros estudios la capacidad neurotóxica de este compuesto y la posible protección por antagonistas de los receptores NMDA.

Entre los trómeros de N-alquilglicina ensayados hemos identificado a N612C como un compuesto neuroprotector frente a varios insultos, como es la incubación con péptido β -amiloide, pero también en sistemas *in vivo* de excitotoxicidad (Montoliu y cols., 2002). N612C no bloquea el canal del receptor NMDA, como N20C, pero sí tiene una capacidad de bloqueo de la muerte neuronal en patologías que cursan con la sobreactivación de este receptor.

En el cultivo primario de neuronas de hipocampo hemos observado que N612C es capaz de potenciar la vía de señalización de pCREB, mediante un mecanismo aún desconocido, en respuesta a estimulación por NMDA (*Figura 4.2*). Por tanto, el mecanismo hipotético de su capacidad neuroprotectora involucra la activación de la fosforilación de CREB o la inhibición de fosfatasas.

Además N612C no bloquea de forma significativa el aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por péptido β -amiloide, lo que

concuerta con una actuación a un nivel diferente al de la cascada de muerte neuronal inducida por el péptido. N612C podría actuar potenciando la viabilidad neuronal en respuesta a estímulos neurodegenerativos no agudos, lo que convertiría a este fármaco en un compuesto con una elevada potencialidad farmacológica. Pero aún han de llevarse a cabo experimentos que determinen con exactitud su mecanismo de actuación.

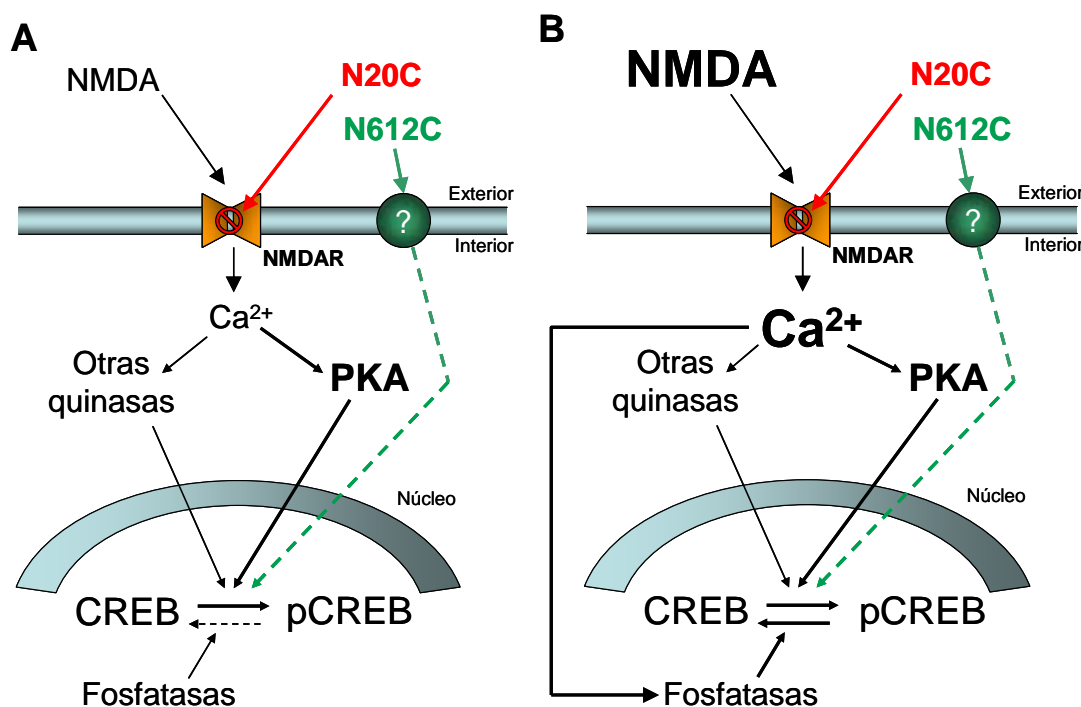


Figura 4.2. Esquema del posible mecanismo de actuación de las N-alquilglicinas N20C y N612C sobre las variaciones en los niveles de pCREB inducidas por NMDA. (A) Estimulación sostenida de la fosforilación de pCREB inducida por concentraciones subtóxicas (10 μ M) de NMDA. (B) Estimulación transitoria de la fosforilación de pCREB inducida por concentraciones tóxicas (200 μ M) de NMDA. En ambos casos se indican los posibles puntos de actuación de N20C (rojo) y N612C (verde).

Finalmente hemos realizado estudios sobre la función de Zn^{2+} y p75 en los sistemas de muerte neuronal desarrollados en el cultivo primario de neuronas de hipocampo. Se sabe que la expresión de p75 aumenta en neuronas tras insultos cerebrales como isquemia o epilepsia (Roux y cols., 1999). Sin embargo no existe consenso sobre si la inducción de p75 juega un papel beneficioso o dañino. La

exposición de neuronas en cultivo a Zn^{2+} induce la expresión de p75 (Park y cols., 2000), y se sabe que la homeostasis de Zn^{2+} se encuentra alterada en ciertos procesos neurodegenerativos (Mocchegiani y cols., 2005), como la EA. Zn^{2+} provoca neurodegeneración en cultivos primarios de neuronas, como hemos observado en este estudio, y permea a través del canal del receptor NMDA. También penetra en el interior celular a través de otros subtipos de receptores de glutamato (Weiss y Sensi, 2000). Por otra parte, p75 ha sido durante muchos años un candidato ideal como receptor de membrana del péptido β -amiloide (Yaar y cols., 1997; Yaar y cols., 2002), y se postulaba que mediaba la muerte apoptótica inducida por el péptido. Además, en ciertos sistemas modelo se han observado variaciones en su expresión tras incubación con βA (Rabizadeh y cols., 1994; Zhang y cols., 2003), aunque existe controversia sobre si este cambio en la expresión tiene carácter protector o proapoptótico (Zhang y cols., 2003; Costantini y cols., 2005). Nosotros no hemos observado cambios en la expresión de p75 tras incubaciones con péptido β -amiloide, lo que nos indica que en neuronas de hipocampo esta inducción no se produce, o bien requiere la forma agregada del péptido para producirse. En cambio sí se producen cambios en su expresión tras incubación con Zn^{2+} , y este ion está implicado en la formación de placas de amiloide (Cuajungco y Lees, 1997). Zn^{2+} no varía la expresión de subunidades del receptor NMDA, lo que le descarta en los procesos de excitotoxicidad asociados a EA avanzada. En cualquier caso, la neurotoxicidad por Zn^{2+} y la señalización apoptótica a través de p75 son dianas terapéuticas a tener en cuenta.

En resumen, hemos puesto a punto un cultivo neuronal y lo hemos empleado para caracterizar diversos estímulos neurotóxicos implicados en procesos neurodegenerativos. También hemos determinado la capacidad neuroprotectora de N-alquilglicinas sintetizadas mediante química combinatoria. De estos resultados se dedujo que a partir de la librería de trímeros de N-alquilglicina se pueden obtener

varios tipos de moléculas biológicamente activas. Entre ellas se han identificado trímeros que son buenos bloqueadores del receptor NMDA, como N20C, y trímeros protectores frente a estímulos neurodegenerativos, como N612C. A partir de los péptidos más activos pueden obtenerse derivados estructurales que mejoren sus características clínicas (mayor capacidad protectora, menor toxicidad, mayor permeabilidad hematoencefálica, etc.).

5. Conclusiones

Conclusiones

Las **conclusiones** de la presente Tesis Doctoral son:

1. Hemos puesto a punto un cultivo primario de neuronas de hipocampo de cerebro de rata, que nos permite realizar estudios hasta 3-4 semanas *in vitro*.
2. Se ha analizado la evolución de la excitotoxicidad mediada por glutamato y NMDA a lo largo de los DIV, lo que nos permite concluir que: a 7 DIV la muerte neuronal provocada por glutamato y NMDA no es significativa; a 14 DIV, la muerte provocada por NMDA y glutamato es similar y está mediada principalmente a través de los receptores NMDA; y a 21 DIV, la excitotoxicidad mediada por NMDA y glutamato se diferencian, aumentando la muerte neuronal que se produce vía otros receptores no-NMDA.
3. La muerte inducida por NMDA a una concentración saturante de 200 μM a 14 DIV en neuronas de hipocampo es dependiente de Ca^{2+} , produce una morfología necrótica en las células y cursa con la generación de especies reactivas del oxígeno.
4. NMDA induce la activación de la vía de supervivencia neuronal de CREB, de forma dependiente del tiempo y de la concentración de este agonista. Una concentración subtóxica de NMDA induce fosforilación (activación) de CREB sostenida en el tiempo, mientras que una concentración excitotóxica de NMDA induce fosforilación transitoria. Esto es consistente con que concentraciones subtóxicas de NMDA tienen efecto neuroprotector frente a choque excitotóxico inducido por NMDA a alta concentración.

5. Hemos ensayado varias N-alquilglicinas, obtenidas a partir de química combinatoria, frente a excitotoxicidad mediada por NMDA y glutamato en neuronas de hipocampo de cerebro de rata. Varias de ellas, destacando N20C, son bloqueadores selectivos del receptor de NMDA, con una moderada afinidad, y mayor efecto protector en choques excitotóxicos de varios minutos de duración que en choques excitotóxicos de varias horas. N20C bloquea el canal del receptor NMDA, y protege de la generación de especies reactivas del oxígeno y de los cambios en la fosforilación de CREB inducidos por NMDA.

6. La sensibilidad de las neuronas de hipocampo de cerebro de rata a la neurodegeneración inducida por el péptido β -amiloide (1-40) humano es dependiente de los días de cultivo *in vitro*. El aumento en la sensibilidad a la neurodegeneración inducida tanto por el péptido β -amiloide (1-40) humano como por NMDA con los días de cultivo *in vitro* podría indicar una relación, directa o indirecta, entre ambos insultos neurotóxicos.

7. Hemos ensayado varias N-alquilglicinas frente a neurodegeneración inducida por el péptido β -amiloide humano en neuronas de hipocampo de cerebro de rata. Hemos identificado una de ellas, N612C, como fármaco altamente neuroprotector ante este estímulo neurotóxico. N612C no bloquea el canal del receptor NMDA, no protege de la generación de especies reactivas del oxígeno inducida por péptido β -amiloide, pero sí afecta a los cambios en la fosforilación de CREB inducidos por NMDA.

8. Las N-alquilglicinas obtenidas con actividad neuroprotectora pueden ser utilizadas para obtener derivados estructurales con mejores características clínicas (mayor capacidad protectora, menor toxicidad o mayor permeabilidad hematoencefálica).

9. Zn^{2+} provoca muerte neuronal parcialmente vía receptores NMDA e induce la expresión de p75, posible receptor de superficie de péptido β -amiloide. Zn^{2+} es un punto común entre ambos inductores de muerte neuronal, a tener en cuenta en futuros ensayos de neuroprotección.

6. Materiales

Animales

Para la preparación de neuronas de hipocampo se emplearon ratas hembra Wistar preñadas, cuyos embriones se encontraban en un periodo de gestación E17-E19. Fueron suministradas por el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura. Se sacrificaron por dislocación cervical tras anestesarlas con triclorometano. Se extrajeron los embriones, que fueron puestos en hielo inmediatamente. Los cuerpos de las ratas adultas y los restos de material biológico no empleado se congelan y llevan al Servicio de Animalario, donde se incineran.

Placas de cultivo y su tratamiento con poli-D-lisina

Para el cultivo de neuronas se emplearon placas individuales de 35 × 10 mm, placas de 24 pocillos y placas de 48 pocillos (Falcon). El día anterior a la siembra se trataron con poli-D-lisina 0,2 mg/ml (disuelta en agua y almacenada a -20 °C).

Si las neuronas se van a emplear en experimentos de microscopía con sondas fluorescentes, se siembran sobre cubreobjetos de vidrio colocados en placas de 35 mm.

Medios de cultivos, sueros y suplementos

Para la realización de los cultivos neuronales se empleo medio mínimo esencial con sales de Earle, adquirido en Gibco. Para suplementar este medio, se emplearon dos tipos de suero: suero de caballo y suero fetal bovino (Sigma). Ambos sueros fueron pretratados a 56 °C durante 30 minutos. Glucosa, glutamina y gentamicina sulfato fueron, asimismo, proporcionados por Sigma.

Agonistas y antagonistas

Todos los agonistas y antagonistas comerciales empleados fueron adquiridos en Sigma, excepto ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) y disodio 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), que fueron suministrados por Tocris.

Péptidos β -amiloides

El péptido β -amiloide (1-40) humano fue suministrado por Tocris (nº de catálogo 1191). El péptido β -amiloide (1-40) humano, cuya secuencia de aminoácidos es DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV, se disolvió en DMSO o en DMSO:H₂O al 50 % a una concentración de 1 mM, se repartió en partes alícuotas y se almacenó a -20 °C.

El péptido β -amiloide (1-42) humano fue suministrado por Bachem (nº de catálogo H-1368.1000). El péptido β -amiloide (1-42) humano, cuya secuencia de aminoácidos es DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA, se disolvió en DMSO:H₂O al 66,7 % a una concentración de 1 mM, se repartió en partes alícuotas y se almacenó a -20 °C.

Sondas fluorescentes

Todas las sondas fluorescentes empleadas fueron adquiridas en Molecular Probes, y utilizadas según las indicaciones del proveedor.

Otros compuestos químicos

Todos los demás compuestos empleados se adquirieron en Sigma, siempre que no se especifique lo contrario.

Anticuerpos

Las casas comerciales que suministraron los anticuerpos se detallan en la *Tabla 7.1*, en el apartado de Métodos.

Material de vidrio y plástico

Todo el material necesario en la cabina de flujo laminar fue esterilizado en autoclave a 121° C durante 30 minutos. Las pipetas Pasteur que se emplearon para homogeneizar los hipocampos fueron, antes de ser autoclavadas, pretratadas con Sigmacote (Sigma), solución de silicona en heptano, que crea una fina película que recubre el vidrio, minimizando así el rozamiento con el material biológico y provocándole el menor daño posible.

Aparatos

Para llevar a cabo este estudio hemos empleado los aparatos que pertenecen a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la UEX y que constituyen el equipo básico de la unidad de cultivos, como cabina de flujo laminar, incubador de CO₂, microscopio óptico, autoclave, baños termostáticos, etc.

Las fotografías de neuronas fueron tomadas con una cámara Canon acoplada a un microscopio Nikon Diaphot 300.

Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con una cámara Cool-Snap acoplada a un microscopio Zeiss Axoplat de la Unidad de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UEX. Se emplearon los filtros apropiados en cada caso para medir la fluorescencia.

Los registros de voltage-clamp se llevaron a cabo en un set que consta de una cámara de registro (volumen = 0,2 ml) acoplada a un sistema de perfusión continua multicanal gravitacional (1 ml/min), dos microelectrodos conectados a un amplificador TURBO TEC-10CX npi, y un sistema informático de registro de la información.

Análisis estadístico de los datos y ajuste de curvas dosis respuesta

Los datos del presente trabajo se expresan como media aritmética \pm desviación estándar. Como norma general cada experimento se realizó por duplicado y como mínimo en tres cultivos distintos de neuronas ($n \geq 6$).

Las curvas dosis respuesta se ajustaron con la ecuación logistic del programa Origin 7.0 de MicroCal:

$$\frac{A}{A_{m\acute{a}x}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[agonista]}{EC_{50}} \right)^{n_H}}$$

donde A y $A_{m\acute{a}x}$ son el efecto que produce el agonista a cada concentración y el efecto máximo, respectivamente; EC_{50} , la concentración de agonista a la que se produce la mitad del efecto, y n_H , el coeficiente de Hill, que es una estimación de los sitios de unión (Levitzki, 1984).

Para la comparación de medias se empleó el test ANOVA de una vía. Se considera que entre las medias existe una diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$.

N-alkilglicinas

Las N-alkilglicinas son unas moléculas cuya fórmula se especifica en la *Figura 1.8*. R₁, R₂ y R₃ aportan la diversidad a la molécula y son iguales o diferentes, de manera independiente, y entre los siguientes 22 radicales: ciclopropilo, sec-butilo, 2-metoxietilo, 3-metilbutilo, ciclohexilo, 2-(N-pirrolidinil) etilo, 2-(metilcarbonilamino) etilo, 3-(2-oxo-N-pirrolidinil) propilo, 2-(2-piridil) etilo, 2-feniletilo, 2-(2-tetrahidrofuril) etilo, 2-(N-imidazolil) etilo, 2-(4-metoxifenil) etilo, 2-(3,4-dimetoxifenil) etilo, 2-(2,4-diclorofenil) etilo, 2-[2-(N-metil) pirrolidinil] etilo, 2-(4-aminosulfonilfenil) etilo, 2-(morfolino) etilo, 3-(N,N-dietilamino) propilo, 3,3-difenilpropilo, 3-(N,N-dimetilamino) propilo y 2-(N,N-dietilamino) etilo.

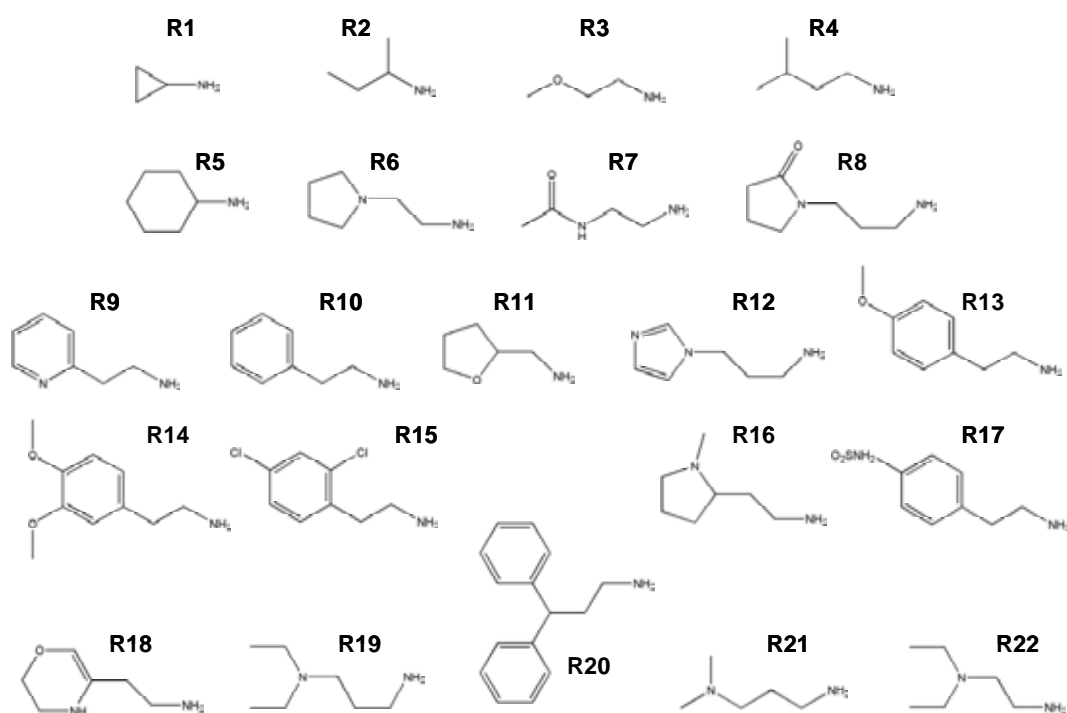


Figura 6.1. Fórmulas de los radicales empleados en la síntesis de la librería de N-alkilglicinas.

La librería de N-alkilglicinas fue sintetizada mediante síntesis en fase sólida (Masip y cols., 2005) por Diver Drugs SL., y amablemente suministradas por el Dr. Ángel Messeguer (*Figura 6.2, Figura 6.3*).

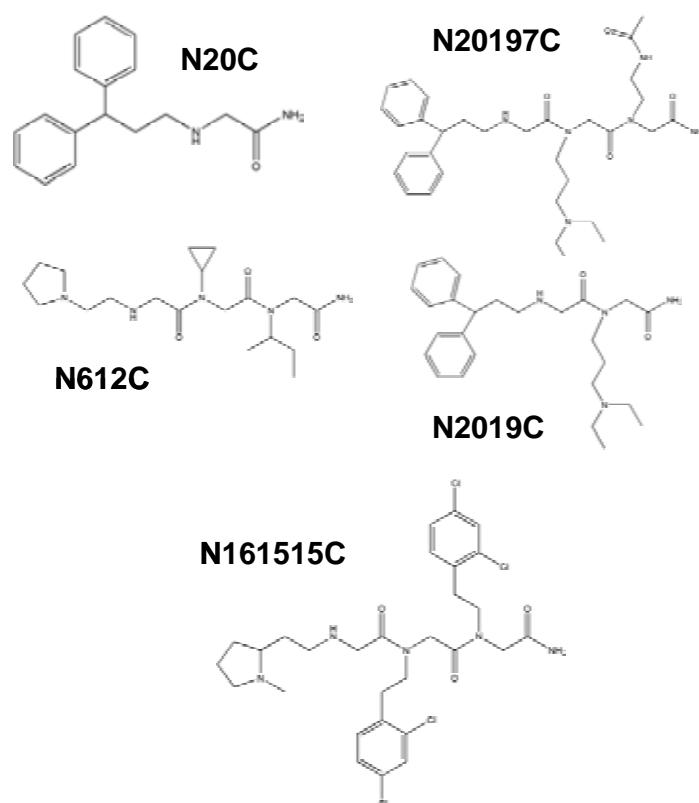


Figura 6.2. Estructura de las N-alkilglicinas empleadas.

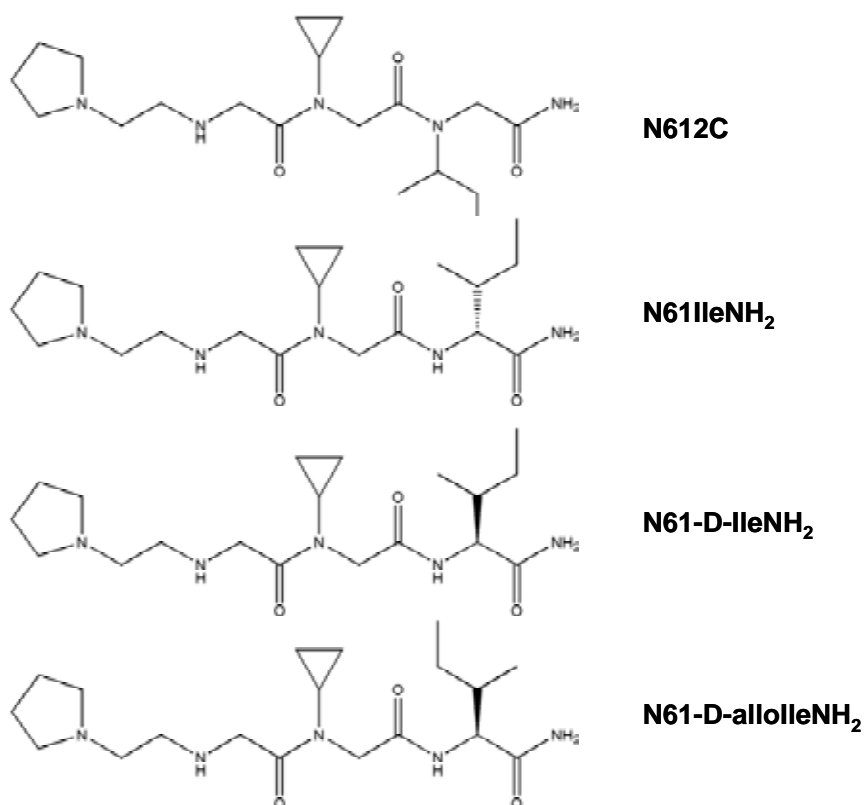


Figura 6.3. Estructura de N612C y sus derivados.

7. Métodos

1. Cultivo de neuronas de hipocampo de embriones de rata

Preparación del cultivo neuronal

Se toma una rata Wistar preñada en el día 17-19 de gestación, se anestesia con cloroformo, se sacrifica por dislocación cervical y se extraen los embriones. Éstos se decapitan y se extraen los cerebros, que se depositan en una solución básica salina (BSS) estéril sin Ca^{2+} a 4 °C. Se retiran las meninges de los cerebros y se diseccionan los hipocampos, que se disponen en BSS estéril sin Ca^{2+} . A continuación se incuban 15 minutos a 37 °C con 0,025 % de tripsina. Tras el tratamiento con tripsina se lavan 3 veces con BSS estéril sin Ca^{2+} , durante 5 minutos cada una, para eliminar la tripsina restante y asegurarnos que se acaba la digestión proteolítica. Tras estos lavados, los hipocampos se homogeneizan de forma mecánica en aproximadamente 2 ml de BSS con pipetas pasteur previamente siliconizadas con Sigmacote para evitar el rozamiento de las células con la superficie de vidrio. Primero se emplea una pipeta con el extremo normal y a continuación se usa otra con la punta cerrada parcialmente a la llama. La homogeneización se lleva a cabo suavemente, hasta que no se aprecien grumos de tamaño significativo. Este paso es el más crítico a la hora de obtener un buen cultivo neuronal.

La suspensión que se obtiene de neuronas se centrifuga a $200 \times g$ durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado, que contiene las células, se resuspende en aproximadamente 1-2 ml de medio de cultivo. La densidad de células de la suspensión se determina mediante recuento en un hemocitómetro. Después de contar el número de neuronas disponibles, se añade el volumen de medio adecuado y se siembran en las placas de cultivo. En el caso de las placas de 35 mm de diámetro se coloca una anilla de 1 cm de diámetro en el centro, cuyo objetivo es reducir la superficie de siembra, no teniendo por tanto que emplear un excesivo número de neuronas en cada placa. La densidad de siembra osciló entre 160.000 y 225.000

células por cm². Se emplearon placas de 48 pocillos, de 24 pocillos o de 35 mm en función del tipo de experimento que pretendía realizar.

Mantenimiento del cultivo neuronal

Transcurridas 24 horas después de la siembra, se reemplaza por completo el medio de cultivo por medio 10/10 fresco, quitando, si procede, las anillas a las placas. A los 4 días de la siembra se retira la mitad del medio de cultivo y se sustituye por medio 10/FUDR, de forma que la concentración final de 5-fluoro-2'-desoxiuridina es de 80 µM. FUDR es un compuesto antimitótico que impide la proliferación de las células gliales, cuyo crecimiento excesivo comprometería la viabilidad del cultivo neuronal. Posteriormente el medio se va renovando al 50 % aproximadamente cada 3 ó 4 días, alternándose la utilización de medio 10 y medio 10/FUDR. En estas condiciones el cultivo puede mantenerse hasta 3 semanas para la realización de experimentos. Por encima de este tiempo, el cultivo comienza a degenerar.

2. Medida de la viabilidad neuronal

La medida de la viabilidad neuronal nos permite conocer la muerte neuronal que provocan los insultos neurotóxicos que se llevan a cabo con incubaciones en presencia de agonistas de los receptores de glutamato o de péptido β -amiloide. Asimismo, a modo de control, se ha seguido la maduración (crecimiento celular, establecimiento de conexiones dendríticas y axonales, etc.) de los cultivos hasta que alcanzan los 14 días *in vitro* (DIV). Para medir la viabilidad neuronal en los cultivos se emplearon dos métodos distintos que se detallan a continuación.

Método de reducción de MTT a formazán

Este método se basa en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán por acción de actividades deshidrogenasas mitocondriales, y por tanto es una medida de las células viables. Este método fue puesto a punto inicialmente para linfocitos (Mosmann, 1983), pero posteriormente se empleó para células neuronales (Manthorpe y cols., 1986; Balazs y cols., 1988a; Balazs y cols., 1988b; Eimerl y Schramm, 1991).

Para realizar el ensayo de reducción del MTT se reemplaza el medio de cultivo por BSS y se incuban las células con MTT 150 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos a 37 °C. Tras la incubación se aspira el sobrenadante y el precipitado azul-violeta de formazán que queda en el fondo de la placa se disuelve con 1 ml de DMSO. La cantidad de formazán se calcula midiendo la absorción a 495 y 650 nm, empleando DMSO como blanco. Los resultados se expresan como la diferencia entre la absorción a 495 y a 650 nm.

Con objeto de determinar el tiempo de incubación idóneo se realizó una cinética de reducción del MTT a formazán, incubando a diferentes tiempos desde 5 a 60 minutos y determinando su absorción. Los resultados se muestran en la

Figura 7.1. Se observa que el aumento en los valores de absorción es lineal hasta los 20 minutos de incubación, perdiendo la linealidad a partir de ese tiempo. Por ello se adoptó como tiempo de incubación adecuado 15 minutos.

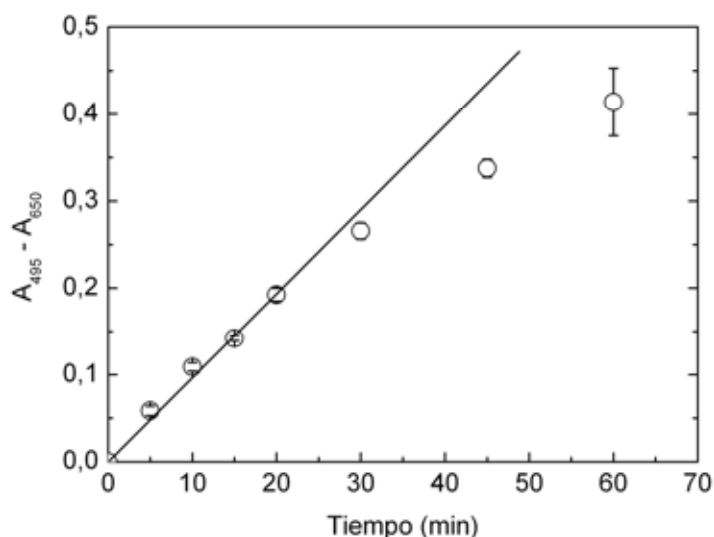


Figura 7.1. Medida de la reducción de MTT a formazán por las neuronas de hipocampo a diferentes tiempos de incubación. Se emplearon neuronas de hipocampo a 8 DIV. Las células se incubaron con solución salina a la que se añadió MTT 150 $\mu\text{g/ml}$, manteniéndolas a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo señalado en cada caso.

Método de exclusión del colorante trypan blue

Este método se basa en la incorporación o no del colorante trypan blue, claramente observable por inspección visual. Mientras las células vivas no incorporan el colorante por mantener su membrana intacta, las células muertas sí lo incorporan por estar rota la membrana plasmática, tiñéndose de azul todas las estructuras subcelulares, especialmente los núcleos.

Este método se ha empleado tanto para determinar el porcentaje de células muertas tras un insulto citotóxico, como para la determinación del número de células cuando se prepara el cultivo. En este último caso, se toman 10 μl de la suspensión de neuronas y se mezclan en un tubo eppendorf con 10 μl de trypan blue al 0,4 %. Tras incubar 4 minutos aproximadamente a temperatura ambiente se ponen

10 μ l en el hemocitómetro y se cuentan las células viables (no teñidas por trypan blue) en las 25 celdas centrales del hemocitómetro. Se adoptó como criterio para considerar dentro de las celdas aquellas células cuyos somas están enteramente o la mayor parte dentro de las líneas que demarcan las celdas, evitando contar dos veces la misma célula en celdas vecinas. El número que se obtiene se multiplica por 200 (2 de la dilución de 10 μ l de células en 10 μ l de trypan blue y 100 de la relación de las 25 celdas centrales con respecto a la superficie total que ocupan los 10 μ l puestos en el hemocitómetro). El número final obtenido es el número de neuronas en 10 μ l de suspensión.

Si se emplea el método de exclusión de trypan blue para determinar la muerte tras un insulto neurotóxico, se sustituye en primer lugar el medio de cultivo de las placas o pocillos por BSS mediante varios lavados. Se añade trypan blue 0,4 % en proporción 1:1 (v/v). Se incuba durante 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lava el exceso de colorante con BSS hasta que desaparece el color azul. Se observa al microscopio óptico la placa y se seleccionan al azar varios campos hasta contar un mínimo de 500 células por placa, contabilizando por separado las células muertas (teñidas) y las vivas (no teñidas). En todos los casos se expresó el resultado como porcentaje de muerte neuronal. En algunos casos las células se contaron en experimentos ciegos, esto es, la persona que cuenta las neuronas no conoce el tratamiento que ha sufrido la placa.

3. Tratamientos de excitotoxicidad en cultivos neuronales

Tratamientos con glutamato y agonistas relacionados

Con el objetivo de simular las condiciones de sobreestimulación de neuronas por glutamato que se dan en situaciones patológicas (como la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas), hemos llevado a cabo experimentos *in vitro* con las neuronas de hipocampo incubándolas en presencia de agonistas de los receptores de glutamato. Se ha seguido, básicamente, el método descrito en publicaciones anteriores (Ferrer-Montiel y cols., 1998b; Valera y cols., 2002).

Para llevar a cabo el tratamiento de excitotoxicidad hemos empleado dos métodos diferentes. El primero de ellos consiste en incubar las neuronas en presencia de una solución salina a la que se añade el(los) agonista(s) y/o el(los) bloqueador(es) objeto de estudio. Se elimina gradualmente el medio de cultivo de las placas y se sustituye gradualmente por la solución básica salina adecuada para la condición en estudio. Se incuban las células con esta solución durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C), y pasado ese tiempo se sustituye, también gradualmente, por medio 10 suplementado con MK-801 a una concentración de 10 µM. Se devuelven las placas al incubador y se mantienen a 37 °C durante 18-24 horas. La adición de MK-801 se realiza para evitar muerte neuronal adicional como consecuencia del glutamato liberado por las neuronas muertas durante el choque excitotóxico (MK-801 es un bloqueador selectivo para los receptores NMDA, que son los que más muerte neuronal provocan por su alta permeabilidad a Ca²⁺). Pasado ese tiempo se procede a determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de trypan blue. Todas las condiciones se ensayan por duplicado en cada experimento y cada experimento se ha realizado al menos por triplicado en tres cultivos distintos.

En todos los experimentos se evalúa la muerte neuronal de dos pocillos a los que no se les cambia el medio de cultivo por solución salina, como control del grado de muerte celular en cada cultivo (a 14 DIV, $2,7 \pm 1,8$ %). Además, otros dos pocillos son tratados con solución salina a la que se han añadido CaCl_2 2 mM y glicina 100 μM . En este caso las neuronas no sufren ningún choque excitotóxico, pues no se incuban con ningún agonista. Estas placas constituyen un control para evaluar el efecto del cambio de medio por solución salina, la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, y el posterior cambio de solución salina de nuevo por medio, que no afectan a la viabilidad de las neuronas, como se pone de manifiesto al comprobar que la muerte neuronal es prácticamente igual a la que se observa en los pocillos de neuronas no tratadas (a 14 DIV, $3,4 \pm 3,1$ %).

El segundo método consiste en incubar a las neuronas con el(los) agonista(s) y/o el(los) bloqueador(es) objeto de estudio durante periodos que oscilan desde 1 hasta varios días, para evaluar la toxicidad de los agonistas en incubaciones de larga duración y la capacidad neuroprotectora de los bloqueadores en dichas condiciones. Para ello se retira aproximadamente la mitad del medio de incubación de cada pocillo y se añade un volumen igual de medio 10 suplementado con el(los) agonista(s) y/o el(los) bloqueador(es). Este tipo de incubación requiere, por tanto, que el medio se prepare a una concentración de agonista(s) y/o bloqueador(es) doble de la concentración final. Se devuelven las placas al incubador y se mantienen a 37 °C durante el resto del ensayo. Pasado ese tiempo se procede a determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de trypan blue.

4. Tratamiento de despolarización con K⁺ 90 mM

Se elimina gradualmente el medio de cultivo de las placas y se sustituye gradualmente por solución básica salina modificada, con las siguientes concentraciones: NaCl 50,9 mM; KCl 89,6 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,33 mM; glucosa 10 mM; Tes 5 mM, pH 7.4. A esta solución salina con alto potasio se le añade CaCl₂ 2 mM. Se incuban las células en esta solución durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-22 °C), y pasado ese tiempo se procede a determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de trypan blue. Todas las condiciones se ensayan por duplicado en cada experimento, y cada experimento se ha realizado al menos por triplicado en tres cultivos distintos.

5. Tratamiento con péptido β -amiloide

Para llevar a cabo esta serie experimental se retira aproximadamente la mitad del medio de incubación de cada pocillo y se añade un volumen igual de medio 10 suplementado con el péptido β -amiloide con o sin el(los) bloqueador(es) objeto de estudio. Se devuelven las placas al incubador y se mantienen a 37 °C de 24 horas a 6 días, dependiendo del tipo de ensayo. Pasado ese tiempo se procede a determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de trypan blue.

Durante el periodo de incubación no se cambia el medio de los pocillos sometidos al tratamiento. Por eso en todos experimentos se evalúa la muerte neuronal de dos pocillos a los que no se les cambia el medio de cultivo, como control del grado de muerte celular en estas condiciones. Además, otros dos pocillos son tratados con DMSO, el vehículo en el que está disuelto el péptido β -amiloide, a la concentración final que queda en el medio de cultivo. Estas placas constituyen un control para evaluar cómo afecta la incubación con DMSO a la viabilidad de las neuronas. El tiempo de incubación en este control es igual al del tratamiento con péptido β -amiloide de mayor duración en cada experimento.

El cultivo de neuronas de hipocampo a 14 DIV muestra una alta sensibilidad a DMSO, como se aprecia en la *Figura 7.2*. Es necesario tener esto en cuenta a la hora de realizar incubaciones de larga duración con péptido β -amiloide o con otros compuestos disueltos en DMSO. Cuando las neuronas de hipocampo son incubadas con DMSO 0,1 % (v/v) no se observa muerte neuronal adicional si se compara con los controles no tratados. La muerte neuronal va aumentando a concentraciones superiores, siendo ya de un 15-20 % a las concentraciones finales que se alcanzan en el medio de cultivo cuando se disuelve el stock de péptido β A (DMSO 0,5-1 %). Este dato deberá ser tomado en cuenta a la hora de determinar la sensibilidad real del cultivo a péptido β A. En los ensayos nunca se empleó una concentración final de DMSO superior al 1 %.

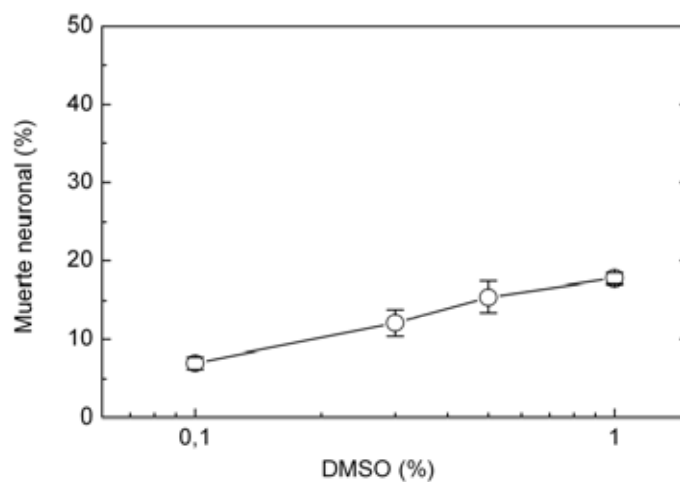


Figura 7.2. Sensibilidad del cultivo primario de neuronas de hipocampo a DMSO. Se emplearon neuronas de hipocampo a 14 DIV. Las células se incubaron medio de cultivo suplementado con una concentración variable de DMSO, manteniéndolas a 37 °C durante 24 horas antes de medir la viabilidad neuronal por trypan blue.

6. **Tripsinización de las células en cultivo para su almacenamiento**

Se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS estéril. Se añaden 150 μ l de tripsina por pocillo y se incuba durante 2 minutos a 37 °C, agitando periódicamente la placa para favorecer el proceso de digestión proteolítica. La acción de la tripsina se detiene añadiendo 3 veces el volumen de medio de cultivo precalentado a 37 °C (450 μ l).

Se homogeneiza suavemente la suspensión celular y se deposita en un tubo eppendorf, se centrifuga durante 5 min a 2000 $\times g$ y se elimina el sobrenadante. Tras este proceso se lavan las células con PBS y se almacenan a -20 °C o a -80 °C, en función del análisis que se vaya a realizar con ellas posteriormente.

7. Análisis mediante inmunodetección de proteínas (*western-blotting*)

Preparación de extractos proteicos totales

El precipitado celular es lisado a 4 °C durante 15 min por adición de tampón de lisis para extractos proteicos. Este lisado es sometido posteriormente a 1 min de agitación en vórtex y a 10-15 min de sonicación. Para eliminar las posibles impurezas, se centrifuga durante 10 min a 10000 rpm a 4 °C y se recoge el sobrenadante.

Medida de la concentración de proteína

La concentración proteica de los distintos extractos fue determinada mediante colorimetría utilizando el kit *Coomassie Plus Protein assay reagent (Pierce)* y albúmina de suero bovino como estándar para establecer la recta patrón. Para ello se toman concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (1-5 µg) y se diluyen en agua hasta un volumen final de 800 µl. Para descartar la posible señal del tampón de lisis, se añade también 3 µl del mismo. Las muestras, por su parte, se preparan con 3 µl de extracto proteico y 797 µl de agua. En todos los casos se añade 400 µl de reactivo de Coomasie, se homogeneiza la mezcla, y se mide la absorción a 595 nm. Con los valores de absorción de albúmina de suero bovino se establece una recta patrón que permite, mediante regresión lineal, determinar la concentración de proteína de las muestras problema.

Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa

De 10 a 15 µg de extractos proteicos se mezclan con el volumen adecuado de tampón de carga para extractos proteicos, se incuban a 100 °C durante 5 min y se

separan en función de su peso molecular mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) al 7-10 % (p/v), dependiendo del peso molecular de la proteína problema (Laemmli, 1970). Para ello se emplea un set *MiniProtean III* de *Bio-Rad Laboratories*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la electroforesis, las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μm mediante transferencia húmeda, en tampón de transferencia a 80 mA y 4 °C durante 14 horas, o mediante transferencia semi-seca a 10-15 V durante 30 min a temperatura ambiente. También en este caso se siguen las instrucciones del fabricante del set de transferencia.

Inmunodetección

Tras la transferencia, las membranas son teñidas con el colorante de unión reversible *Ponceau S* con el fin de comprobar la eficiencia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras.

El protocolo posterior varía en función del anticuerpo primario que vaya a utilizarse, siguiendo en todo caso las instrucciones del proveedor. De manera general la inmunodetección requiere de un paso inicial de bloqueo de la membrana, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la misma. Para ello se emplea leche desnatada en polvo, a una concentración de 3-5 % (p/v). Posteriormente se incuba con el anticuerpo primario, durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Más tarde se incuba la membrana con el anticuerpo secundario, y finalmente se emplea el método de detección adecuado al anticuerpo secundario utilizado. Entre todos estos pasos, se lava la membrana de nitrocelulosa varias veces con tampón para eliminar el exceso de leche o anticuerpos. En la *Tabla 7.1* se indica, para cada anticuerpo primario, la dilución empleada y el tampón adecuado. En todos los casos se empleó una solución de anticuerpo secundario anti-rabbit (1:5000) conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), suministrado por *Jackson ImmunoResearch*.

Para el revelado se añade el sustrato quimioluminiscente basado en el luminol *Supersignal® West Femto Trial Kit* (Pierce) durante 5 min. Las bandas correspondientes a las proteínas inmunorreactivas se detectan por su emisión de quimioluminiscencia utilizando el sistema de análisis de imágenes *Molecular Imager FX* (Bio-Rad Laboratories).

En todos los casos se utilizó la inmunodetección de actina como control interno de la carga proteica de cada calle, y para poder normalizar los valores obtenidos de cantidad de proteína en la cuantificación.

Anticuerpo primario	Dilución	Solución de incubación	Peso molecular de la proteína	Casa comercial
Actina	1:1000	TBST 0,2%	42 kDa	SIGMA
CREB	1:200	PBS + leche 3 %	43 kDa	Santa Cruz Biotech.
NR1	1:1000	TBST 0,2%	120 kDa	SIGMA
NR2A	1:100	TBST 0,2%	180 kDa	Chemicon Intern.
NR2B	1:200	TBST 0,2%	180 kDa	Chemicon Intern.
p75	1:1000	TBS + leche 3 %	75 kDa	Upstate Biotech.
pCREB	1:1000	PBS + leche 3 %	43 kDa	Upstate Biotech.

Tabla 7.1. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunodetección. Se indica el nombre de la proteína a la que se une el anticuerpo primario, la dilución de ensayo, el tampón empleado en la incubación, el peso molecular de la proteína y la casa comercial que suministró el anticuerpo. TBST 0,2%: Tampón TBS + Tween-20 0,2 % (v/v)

Separación de los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa

Para poder volver a emplear la misma membrana de nitrocelulosa frente a diferentes anticuerpos primarios, ésta se somete a un tratamiento moderadamente fuerte que rompa las interacciones entre el anticuerpo y su antígeno. Para ello se incubaba la membrana con una solución tampón que contiene SDS y β -mercaptoetanol a alta concentración (*Stripping Buffer*) durante 30 min a 55 °C con agitación.

Posteriormente se realizan numerosos lavados (8-10) con TBST 0,2 % a temperatura ambiente, para eliminar los restos del tampón de stripping, que entorpecerían la unión de nuevos anticuerpos. Una vez que se han eliminado totalmente los restos del tampón, la membrana puede utilizarse de nuevo comenzando por el paso de bloqueo.

8. Análisis de expresión de genes mediante RT-PCR

Extracción de RNA total

La obtención de RNA total a partir de cultivos celulares se realiza empleando el kit RNeasy® de *QIAGEN* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el RNA, se determina su concentración mediante absorción espectrofotométrica a 260 nm así como la presencia de proteínas contaminantes estableciendo la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

Transcripción reversa (RT)

El análisis de la expresión de genes mediante PCR consta de una primera reacción en la que se sintetizan DNA complementarios a partir del conjunto de RNAm celulares. Esto se lleva a cabo mediante el proceso denominado transcripción reversa (RT, *Reverse Transcription*). Para ello se toma 1 µg de RNA total en un volumen de 13 µl de agua DEPC, se añade 1 µl del cebador oligo-dT 50 µM (*Roche*) y se eliminan las estructuras secundarias del RNAm incubando a 65 °C durante 5 min. La muestra se pasa inmediatamente a hielo y se incuba otros 5 min. A continuación se añaden los siguientes reactivos: 2 µl de tampón de RT 10x, 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl dNTPs 100 mM (cada uno a una concentración de 25 mM), 0,5 µl de inhibidor de RNasa 20 U/µl (*Ambion*) y 0,5 µl de transcriptasa reversa M-MLV 100 U/µl (*Ambion*). La reacción se incuba primero a 42 °C durante 1 h y a continuación a 70 °C durante 15 min. Las muestras se depositan inmediatamente en hielo 10 min y se repite el proceso de RT una segunda vez, añadiendo otros 0,5 µl de transcriptasa reversa a cada tubo. La amplificación del DNA complementario se realiza por PCR empleando el producto de la RT como molde, tal y como se describe a continuación.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación por PCR del DNA complementario correspondiente al gen de interés se toman 3 µl de la mezcla de RT y se le añaden 5 µl de tampón de PCR 10x, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTPs 100 mM (cada uno a una concentración de 25 mM), 50 pmoles de cada cebador y 0,5 µl de Taq-polimerasa 5 U/µl (*Ecogen*), en un volumen final de 50 µl. La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de p75^{NTR} fueron 5' AAGGGGCGGGGCATTGTGGTAGG 3' y 5' CCGTGTTGGCTTCAGGCTTATGC 3'. El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C seguida de una repetición de 30 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, un paso de hibridación de los cebadores con el molde a 60 °C 1 min y un paso de extensión de la cadena naciente a 72 °C 2 min. Una vez completado el número de ciclos, se realiza una extensión final de 5 min a 72 °C. La amplificación de β-actina se realiza como control de la integridad y concentración del RNA y se lleva a cabo empleando las mismas condiciones de PCR que las del gen con el que se compara. Los cebadores empleados en este caso fueron 5' ATTTGGCACCACACTTTCTACA 3' y 5' TCACGCACGATTTCCCTCTCA 3'. Una vez terminada la amplificación, se toma una alícuota de la reacción, se le añade tampón de carga para ácidos nucleicos, y se aplica en geles de agarosa a una concentración comprendida entre el 1 y el 2 % (p/v). La electroforesis se lleva a cabo en tampón TBE que contiene 0,2 µg/ml del agente intercalante fluorescente bromuro de etidio. Las bandas amplificadas por PCR se detectan por su emisión de fluorescencia utilizando el sistema de análisis de imágenes *Gel Doc 1000* (*Bio-Rad Laboratories*).

9. Voltage clamp en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan subunidades de los receptores de glutamato

Inyección de RNA en ovocitos de Xenopus laevis

A ranas adultas de la especie *Xenopus laevis* se las anestesia por hipotermia en agua helada en presencia de tricaina al 0,2 % durante 15-20 min y son colocadas sobre una superficie de hielo para perdurar el efecto anestésico. Se les extraen los ovocitos, que se desfoliculan mediante incubación en tampón Frog's Barths Medium sin Ca^{2+} en presencia de colagenasa al 2 %, durante 1-2 h con agitación a 19-21 °C. Posteriormente se elimina la colagenasa mediante lavados repetidos con tampón Frog's Barths Medium sin Ca^{2+} y se mantienen los ovocitos en un incubador a 18-19 °C durante 1-2 horas.

Tras esta incubación se transfieren los ovocitos a tampón Frog's Barths Medium con Ca^{2+} y seleccionan los ovocitos vivos, en estadio de maduración V y VI, que no presenten ninguna alteración morfológica. A estos ovocitos se les inyecta, mediante un nanoinyector automático Drummond, una cantidad fija de 10 ng de RNA mensajero por ovocito. Los ovocitos se devuelven al incubador y se mantienen durante 3 días para permitir que expresen el RNA inyectado. Los ovocitos se colocan en una placa de 24 pocillos (1 ovocito/pocillo), manteniéndolos en un incubador a 17-19 °C durante 3 días para permitir que expresen el RNA inyectado.

Medida de la corriente en ovocitos de Xenopus laevis

Se realizó el estudio electrofisiológico de las corrientes iónicas de la célula completa activadas por el agonista, mediante la técnica del pinzamiento del voltaje de la membrana con dos microelectrodos ("two microelectrode voltage clamp") (Ferrer-Montiel y cols., 1996; Ferrer-Montiel y Montal, 1999). Transcurridos 3 días

tras la inyección del RNA mensajero, el ovocito se deposita en un set de voltage clamp, que consta de una cámara de registro (volumen = 0,2 ml) acoplada a un sistema de perfusión continua multicanal gravitacional (1 ml/min), dos microelectrodos conectados a un amplificador TURBO TEC-10CX npi, y un sistema informático de registro de la información.

Los electrodos se recubren mediante finos capilares rellenos de KCl 3 M y se introducen en el interior del ovocito. Mediante uno de los electrodos (electrodo de potencial) se fija la diferencia de potencial de la membrana del ovocito en -80mV, y mediante el otro electrodo (electrodo de corriente) se mide la corriente que se produce a través de la membrana tras la aplicación de agonistas/antagonistas apropiados. El sistema de perfusión va alternando secuencialmente el medio de incubación del ovocito, siendo la solución base Standard Ringer's solution. A esta solución se le añadirán los iones necesarios, el agonista (y coagonistas) apropiados del receptor en estudio, y los antagonistas cuya capacidad de bloqueo se desea determinar. Los cambios de corriente se registran y analizan mediante el programa informático Pulse v8.61 HEKA.

Receptores expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se emplearon receptores NMDA heteroméricos mediante la inyección simultánea de los RNA mensajeros de las subunidades NR1 y NR2A de origen humano o de rata, en una relación 1:3 (p/p). Los receptores NMDA fueron activados por la aplicación de L-glutamato 100 μ M/L-glicina 10 μ M, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de N-alquilglicinas.

También se utilizó GluR1, que es un clon de DNA que codifica un receptor AMPA funcional de cerebro humano. Los receptores AMPA fueron activados por la aplicación de kainato 100 μ M. La respuesta frente a los agonistas se evocó mediante la aplicación de un pulso de 10 segundos en presencia o ausencia de N-alquilglicinas.

10. Sondas fluorescentes

Protocolo de tinción con DAPI: visualización de la cromatina nuclear

4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (*Figura 7.3*) es una molécula que forma complejos fluorescentes con ácidos nucleicos de doble cadena, intercalándose entre los pares de bases.

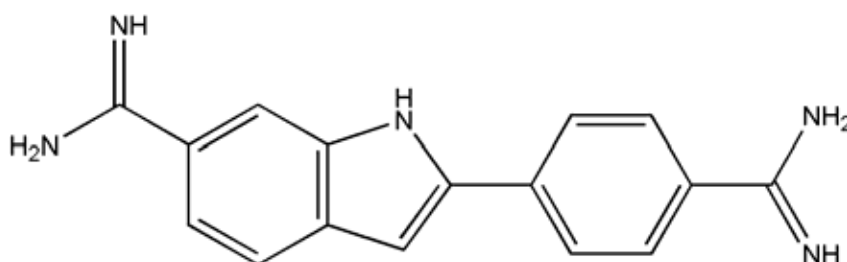


Figura 7.3. Estructura química de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Esta unión aumenta fuertemente su fluorescencia, siendo sus máximos de excitación y emisión de 358 nm y 461 nm, respectivamente. DAPI permea con facilidad la membrana plasmática, siendo útil para visualizar la morfología y grado de condensación de la cromatina nuclear.

Para llevar a cabo el experimento, se procede a realizar el tratamiento de citotoxicidad de la forma habitual, y tras el tiempo fijado se incuban las células con una solución de DAPI 2 μM en tampón PBS, durante 5 min en la oscuridad. Se retira la solución y se sustituye por tampón PBS sin DAPI. Se observa al microscopio y se toman imágenes representativas.

Como control positivo de apoptosis se incubó a las neuronas durante 18-24 h con estaurosporina 30 nM en medio de cultivo, y luego se tiñeron con DAPI de la forma descrita anteriormente.

Protocolo de tinción con 5-(γ-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato: medida de la generación de especies reactivas del oxígeno

La sonda fluorescente 5-(γ-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato ($C_{25}H_{14}Cl_2O_9$) no presenta carga al estar esterificados los grupos con carga (Figura 7.4). Su carácter hidrofóbico, en estas condiciones, le permite difundir a través de las membranas biológicas. Una vez dentro de la célula, esterasas inespecíficas rompen el enlace éster, quedando la molécula cargada, y por consiguiente, dificultando su salida de la célula. La sonda se disuelve en DMSO para su uso.

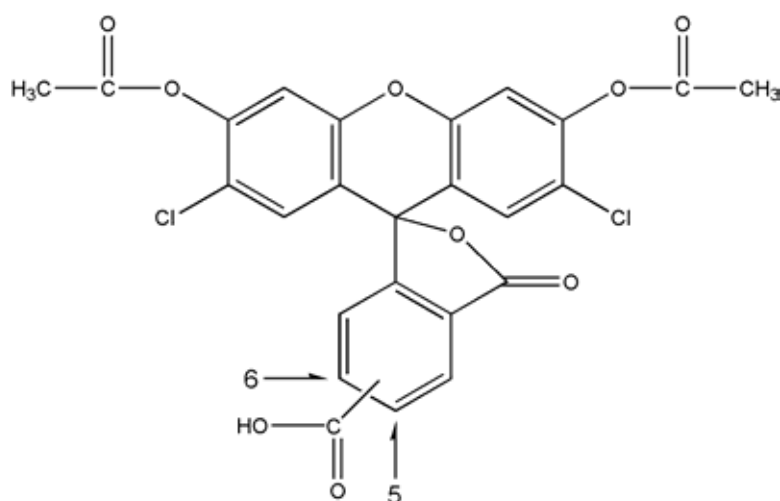


Figura 7.4. Estructura química de 5-(γ-6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFD).

Tras la hidrólisis de los enlaces éster y por oxidación la molécula es fluorescente con unos máximos de excitación y emisión de 494 nm y 525 nm, respectivamente. A mayor oxidación mayor fluorescencia. Con esta sonda podremos seguir la generación de especies reactivas del oxígeno. Aquellas células que hayan sufrido un ataque neurotóxico, mostrarán más fluorescencia que aquellas que estén bajo condiciones control.

Para llevar a cabo el experimento, las neuronas fueron sembradas en cubreobjetos de cristal colocados en placas de 35 mm y a 14 DIV se someten a

incubación con las soluciones deseadas (control, NMDA, NMDA/MK-801, etc.). Se analizan las neuronas bajo el microscopio transcurridas varias horas desde que se inició el choque excitotóxico. Quince minutos antes de cada tiempo se añade la sonda fluorescente a la placa a una concentración de 1 μ M y se mantiene a 37 °C. Cumplido el tiempo se lava la sonda con PBS, se toma el cubreobjetos con una pinza y se deposita en un portaobjetos. Se observa al microscopio y se toman diferentes imágenes. Se cuenta en cada imagen el número de células sin fluorescencia (que representarían las neuronas que han sobrevivido al choque excitotóxico) y las células con fluorescencia (que representan las neuronas que han iniciado el proceso de muerte neuronal, representado por la generación masiva de especies reactivas del oxígeno). El experimento se realizó en al menos tres cultivos diferentes, y con un valor de $n \geq 6$.

11. Tratamientos con Zn²⁺

El tratamiento de muerte neuronal inducida por Zn²⁺ es similar al tratamiento de excitotoxicidad. A las neuronas a 14 DIV se les sustituye el medio de cultivo por una solución de BSS suplementada con CaCl₂ 1,8 mM y MgCl₂ 0,813 mM y ZnSO₄ a concentración variable durante 15 min a temperatura ambiente (20-22 °C). Transcurrido ese tiempo se sustituye la solución de Zn²⁺ por medio 10 fresco suplementado con MK-801, y las placas se devuelven al incubador. 18-24 horas después se determina la viabilidad por el método de exclusión de trypan blue.

Para el tratamiento de inducción de p75 se sigue el mismo proceso indicado anteriormente pero 4 horas tras la incubación se tripsinizan las células y se continua con el protocolo de inmunodetección.

8. Apéndices

Composición de tampones y soluciones

- *Frog's Barths Medium con Ca^{2+}* : NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄·7H₂O 0,82 mM, CaCl₂·2H₂O 0,4 mM, Ca(NO₃)₂·4H₂O 0,33 mM, Hepes-Na 10 mM pH 7,2, piruvato sódico 0,055 % (p/v), gentamicina 0,001 % (p/v)
- *Frog's Barths Medium sin Ca^{2+}* : NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄·7H₂O 0,82 mM, Hepes-Na 10 mM pH 7,2, piruvato sódico 0,055 % (p/v), gentamicina 0,001 % (p/v)
- *Solución de colorante Ponceau S*: ponceau S 0,5 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)
- *Standard Ringer's Solution*: NaCl 115 mM, KCl 3 mM, BaCl₂ 2 mM, Hepes-Na 10 mM pH 7,4
- *Tampón BSS (solución básica salina)*: NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 0,33 mM, glucosa 10 mM, Tes 5 mM pH 7,4
- *Tampón BSS con alta concentración de K^+* : NaCl 50,9 mM, KCl 89,6 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 0,33 mM, glucosa 10 mM, Tes 5 mM pH 7,4
- *Tampón de carga para ácidos nucleicos 5x*: azul de bromofenol 0,25 % (p/v), azul de xileno 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)
- *Tampón de carga para extractos proteicos 5x*: Tris-HCl 62,2 mM pH 6,8, SDS 10 % (p/v), glicerol 50 % (v/v), azul de bromofenol 0,025 % (p/v), β-mercaptoetanol 20 % (v/v)

- *Tampón de electroforesis:* Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 % (v/v)
- *Tampón de lisis para extractos proteicos:* Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, sacarosa 270 mM, β -glicerol-fosfato 10 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, Triton X-100 1 % (v/v), ortovanadato sódico 0,1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 % (v/v), inhibidores de proteasas COMPLETE™ (*Roche*)
- *Tampón de PCR 10x:* Tris-HCl 670 mM pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 160 mM, Tween-20 0,1 % (v/v)
- *Tampón de RT 10x:* Tris-HCl 500 mM pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl_2 30 mM, DTT 50mM
- *Tampón de transferencia húmeda:* Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20 % (v/v)
- *Tampón de transferencia semi-seca:* Tris mM, glicina mM, metanol 20 % (v/v)
- *Tampón PBS:* NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,2
- *Tampón TBE:* Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3
- *Tampón TBS:* Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 75 mM
- *Tampón Stripping Buffer:* Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7, SDS 1 %, β -mercaptoetanol 100 mM

Composición del medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle

Sales inorgánicas	mg/L	mM
CaCl ₂ • 2H ₂ O	264	1.8
KCl	4000	5.37
MgSO ₄ • 7H ₂ O	200	0.81
NaCl	6800	116.36
NaHCO ₃	2200	26.19
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	158	1.01

Vitaminas	mg/L	μM
Ácido pantoténico	1	4.2
Cloruro de colina	1	7.16
Ácido fólico	1	2.27
i-Inositol	2	11.1
Nicotinamida	1	8.19
Piridoxal HCl	1	4.91
Riboflavina	0.1	0.27
Tiamina HCl	1	2.96

Aminoácidos	mg/L	mM
L-Arginina • HCl	126	0.6
L-Cisteína	24	0.1
L-Glutamina	292	2
L-Histidina HCl • H ₂ O	42	0.2
L-Isoleucina	52	0.4
L-Leucina	52	0.4
L-Lisina • HCl	73	0.4
L-Metionina	15	0.1
L-Fenilalanina	32	0.19
L-Treonina	48	0.4
L-Triptófano	10	0.05
L-Tirosina	36	0.2
L-Valina	46	0.39

Otros compuestos	mg/L	mM
D-glucosa	1000	5.55
Rojo fenol	10	0.03

Composición de medios de cultivo suplementados

- *Medio 10/10*: medio mínimo esencial suplementado con glucosa 22 mM, suero de caballo 10 % (v/v), suero fetal bovino 10 % (v/v), glutamina 1 mM y gentamicina sulfato 0,1 mg/ml
- *Medio 10*: medio mínimo esencial suplementado con glucosa 22 mM, suero de caballo 10 % (v/v), glutamina 1 mM y gentamicina sulfato 0,1 mg/ml
- *Medio 10/FUDR*: medio mínimo esencial suplementado con glucosa 22 mM, suero de caballo 10 % (v/v), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUDR) 160 μ M, uridina 400 μ M, glutamina 1 mM y gentamicina sulfato 0,1 mg/ml

9. Bibliografía

Bibliografía

- Abramov, A.Y., Canevari, L. y Duchen, M.R. (2004) Beta-Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons Through Activation of NADPH Oxidase. *J. Neurosci.* **24**, 565-575
- Afifi, A.K. y Bergman, S.A. (1999) Sistema Límbico. Neuroanatomía funcional. Texto y atlas. Mac-Graw-Hill Interamericana Editores, México. 423-457
- Alvarez, A.R., Godoy, J.A., Mullendorff, K., Olivares, G.H., Bronfman, M. y Inestrosa, N.C. (2004) Wnt-3a Overcomes Beta-Amyloid Toxicity in Rat Hippocampal Neurons. *Exp. Cell Res.* **297**, 186-196
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. y Murtagh, F.R. (1995) An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Uber Eine Eigenartige Erkankung Der Hirnrinde". *Clin. Anat.* **8**, 429-431
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. y Nicotera, P. (1995) Glutamate-Induced Neuronal Death: a Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function. *Neuron* **15**, 961-973
- Arnsten, A.F., Ramos, B.P., Birnbaum, S.G. y Taylor, J.R. (2005) Protein Kinase A As a Therapeutic Target for Memory Disorders: Rationale and Challenges. *Trends Mol. Med.* **11**, 121-128
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E. y Passarella, S. (2001) Glutamate Neurotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondria. *FEBS Lett.* **497**, 1-5
- Balazs, R., Gallo, V. y Kingsbury, A. (1988a) Effect of Depolarization on the Maturation of Cerebellar Granule Cells in Culture. *Brain Res.* **468**, 269-276
- Balazs, R., Jorgensen, O.S. y Hack, N. (1988b) N-Methyl-D-Aspartate Promotes the Survival of Cerebellar Granule Cells in Culture. *Neuroscience* **27**, 437-451
- Bartus, R.T., Dean, R.L., III, Beer, B. y Lippa, A.S. (1982) The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science* **217**, 408-414
- Baskys, A. y Adamchik, Y. (2001) Neuroprotective Effects of Extracellular Glutamate Are Absent in Hippocampal Organotypic Cultures Treated With the Amyloid Peptide A β (25-35). *Brain Res.* **907**, 188-194
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. y Schubert, D. (1994) Hydrogen Peroxide Mediates Amyloid Beta Protein Toxicity. *Cell* **77**, 817-827
- Bevan, P., Ryder, H. y Shaw, I. (1995) Identifying Small-Molecule Lead Compounds: the Screening Approach to Drug Discovery. *Trends Biotechnol.* **13**, 115-121
- Blevins, T., Mirshahi, T., Chandler, L.J. y Woodward, J.J. (1997) Effects of Acute and Chronic Ethanol Exposure on Heteromeric N-Methyl-D-Aspartate Receptors Expressed in HEK 293 Cells. *J. Neurochem.* **69**, 2345-2354

- Boyd, B. (2000) Ongoing Progress in the Alzheimer's Disease Arena. *Drug News Perspect.* **13**, 425-438
- Bradley, E.K., Kerr, J.M., Richter, L.S., Figliozzi, G.M., Goff, D.A., Zuckermann, R.N., Spellmeyer, D.C. y Blaney, J.M. (1997) NMR Structural Characterization of Oligo-N-Substituted Glycine Lead Compounds From a Combinatorial Library. *Mol. Divers.* **3**, 1-15
- Bruce, A.J., Malfroy, B. y Baudry, M. (1996) Beta-Amyloid Toxicity in Organotypic Hippocampal Cultures: Protection by EUK-8, a Synthetic Catalytic Free Radical Scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2312-2316
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C. y Glabe, C. (1992) Assembly and Aggregation Properties of Synthetic Alzheimer's A4/Beta Amyloid Peptide Analogs. *J. Biol. Chem.* **267**, 546-554
- Burns, A., Tomlinson, B.E. y Mann, D.M. (1997) Observations on the Brains of Demented Old People. B.E. Tomlinson, G. Blessed and M. Roth, *Journal of the Neurological Sciences* (1970) **11**, 205-242 and Observations on the Brains of Non-Demented Old People. B.E. Tomlinson, G. Blessed and M. Roth, *Journal of Neurological Sciences* (1968) **7**, 331-356. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **12**, 785-790
- Busciglio, J., Lorenzo, A. y Yankner, B.A. (1992) Methodological Variables in the Assessment of Beta Amyloid Neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* **13**, 609-612
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. y Yankner, B.A. (1995) Beta-Amyloid Fibrils Induce Tau Phosphorylation and Loss of Microtubule Binding. *Neuron* **14**, 879-888
- Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S. y Nestler, E.J. (2005) The Many Faces of CREB. *Trends Neurosci.* **28**, 436-445
- Castillo, J., Davalos, A. y Noya, M. (1997) Progression of Ischaemic Stroke and Excitotoxic Aminoacids. *Lancet* **349**, 79-83
- Choi, D.W. (1987) Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **7**, 369-379
- Choi, D.W. (1994) Calcium and Excitotoxic Neuronal Injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 162-171
- Choi, D.W. (1988) Glutamate Neurotoxicity and Diseases of the Nervous System. *Neuron* **1**, 623-634
- Christen, Y. (2000) Oxidative Stress and Alzheimer Disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 621S-629S
- Clayton, D.A. y Browning, M.D. (2001) Deficits in the Expression of the NR2B Subunit in the Hippocampus of Aged Fisher 344 Rats. *Neurobiol. Aging* **22**, 165-168
- Copani, A., Koh, J.Y. y Cotman, C.W. (1991) Beta-Amyloid Increases Neuronal Susceptibility to Injury by Glucose Deprivation. *Neuroreport* **2**, 763-765
- Costantini, C., la-Bianca, V., Formaggio, E., Chiamulera, C., Montresor, A. y Rossi, F. (2005) The Expression of P75 Neurotrophin Receptor Protects Against the Neurotoxicity of Soluble Oligomers of Beta-Amyloid. *Exp. Cell Res.*

- Coyle, J.T. y Puttfarcken, P. (1993) Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders. *Science* **262**, 689-695
- Cuajungco, M.P. y Lees, G.J. (1997) Zinc Metabolism in the Brain: Relevance to Human Neurodegenerative Disorders. *Neurobiol. Dis.* **4**, 137-169
- Davies, P. y Maloney, A.J. (1976) Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *Lancet* **2**, 1403
- Diana, A., Eriksson, C., Winblad, B. y Schultzberg, M. (2000) IL-1beta and ICE mRNA Are Not Altered Upon Beta-Amyloid(25-35) Induced Neurotoxicity in Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 237-246
- Dickson, D.W. (2004) Apoptotic Mechanisms in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration: Cause or Effect? *J. Clin. Invest* **114**, 23-27
- Drews, J. y Ryser, S. (1997) The Role of Innovation in Drug Development. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1318-1319
- Eckert, A., Keil, U., Marques, C.A., Bonert, A., Frey, C., Schussel, K. y Muller, W.E. (2003) Mitochondrial Dysfunction, Apoptotic Cell Death, and Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1627-1634
- Eimerl, S. y Schramm, M. (1991) Acute Glutamate Toxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells: Agonist Potency, Effects of PH, Zn²⁺ and the Potentiation by Serum Albumin. *Brain Res.* **560**, 282-290
- Enz, A. y Gentsch, C. (2004) Co-Administration of Memantine Has No Effect on the in Vitro or Ex Vivo Determined Acetylcholinesterase Inhibition of Rivastigmine in the Rat Brain. *Neuropharmacology* **47**, 408-413
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. y Zollner, H. (1991) Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128
- Ferrer-Montiel, A.V., Merino, J.M., Blondelle, S.E., Perez-Paya, E., Houghten, R.A. y Montal, M. (1998a) Selected Peptides Targeted to the NMDA Receptor Channel Protect Neurons From Excitotoxic Death. *Nat. Biotechnol.* **16**, 286-291
- Ferrer-Montiel, A.V., Merino, J.M., Planells-Cases, R., Sun, W. y Montal, M. (1998b) Structural Determinants of the Blocker Binding Site in Glutamate and NMDA Receptor Channels. *Neuropharmacology* **37**, 139-147
- Ferrer-Montiel, A.V. y Montal, M. (1999) Engineering the NMDA Receptor Channel Lining. *Methods Mol. Biol.* **128**, 167-178
- Ferrer-Montiel, A.V., Sun, W. y Montal, M. (1996) A Single Tryptophan on M2 of Glutamate Receptor Channels Confers High Permeability to Divalent Cations. *Biophys. J.* **71**, 749-758
- Fontana, G., Valenti, L. y Raiteri, M. (1997) Gp120 Can Revert Antagonism at the Glycine Site of NMDA Receptors Mediating GABA Release From Cultured Hippocampal Neurons. *J. Neurosci. Res.* **49**, 732-738

- Garrido, J.L., Godoy, J.A., Alvarez, A., Bronfman, M. y Inestrosa, N.C. (2002) Protein Kinase C Inhibits Amyloid Beta Peptide Neurotoxicity by Acting on Members of the Wnt Pathway. *FASEB J.* **16**, 1982-1984
- Giovannelli, L., Scali, C., Fausone-Pellegrini, M.S., Pepeu, G. y Casamenti, F. (1998) Long-Term Changes in the Aggregation State and Toxic Effects of Beta-Amyloid Injected into the Rat Brain. *Neuroscience* **87**, 349-357
- Goodman, Y. y Mattson, M.P. (1994) Secreted Forms of Beta-Amyloid Precursor Protein Protect Hippocampal Neurons Against Amyloid Beta-Peptide-Induced Oxidative Injury. *Exp. Neurol.* **128**, 1-12
- Greenlee, W., Clader, J., Asberom, T., McCombie, S., Ford, J., Guzik, H., Kozlowski, J., Li, S., Liu, C., Lowe, D., Vice, S., Zhao, H., Zhou, G., Billard, W., Binch, H., Crosby, R., Duffy, R., Lachowicz, J., Coffin, V., Watkins, R., Ruperto, V., Strader, C., Taylor, L. y Cox, K. (2001) Muscarinic Agonists and Antagonists in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Farmaco* **56**, 247-250
- Haass, C. y De Strooper, B. (1999) The Presenilins in Alzheimer's Disease--Proteolysis Holds the Key. *Science* **286**, 916-919
- Hansen, H.H., Briem, T., Dziatko, M., Siffringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., Bittigau, P. y Ikonomidou, C. (2004) Mechanisms Leading to Disseminated Apoptosis Following NMDA Receptor Blockade in the Developing Rat Brain. *Neurobiol. Dis.* **16**, 440-453
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y. y Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs Oppose Synaptic NMDARs by Triggering CREB Shut-Off and Cell Death Pathways. *Nat. Neurosci.* **5**, 405-414
- Hardy, J. y Allsop, D. (1991) Amyloid Deposition As the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 383-388
- Hardy, J., Cowburn, R., Barton, A., Reynolds, G., Lofdahl, E., O'Carroll, A.M., Wester, P. y Winblad, B. (1987) Region-Specific Loss of Glutamate Innervation in Alzheimer's Disease. *Neurosci. Lett.* **73**, 77-80
- Hardy, J. y Gwinn-Hardy, K. (1998) Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Science* **282**, 1075-1079
- Hardy, J. y Selkoe, D.J. (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **297**, 353-356
- Harkany, T., Hortobagyi, T., Sasvari, M., Konya, C., Penke, B., Luiten, P.G. y Nyakas, C. (1999) Neuroprotective Approaches in Experimental Models of Beta-Amyloid Neurotoxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **23**, 963-1008
- Hogan, J.C., Jr. (1997) Combinatorial Chemistry in Drug Discovery. *Nat. Biotechnol.* **15**, 328-330
- Horvath, Z.C., Czopf, J. y Buzsaki, G. (1997) MK-801-Induced Neuronal Damage in Rats. *Brain Res.* **753**, 181-195

- Houghten, R.A., Wilson, D.B. y Pinilla, C. (2000) Drug Discovery and Vaccine Development Using Mixture-Based Synthetic Combinatorial Libraries. *Drug Discov. Today* **5**, 276-285
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S., Brown, F., Wetzell, R., Wood, S.J., Camilleri, P. y Roberts, G.W. (1995) Aggregation State and Neurotoxic Properties of Alzheimer Beta-Amyloid Peptide. *Neurodegeneration*. **4**, 23-32
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. y Cole, G. (1996) Correlative Memory Deficits, Abeta Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* **274**, 99-102
- Hynd, M.R., Scott, H.L. y Dodd, P.R. (2004) Glutamate-Mediated Excitotoxicity and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* **45**, 583-595
- Ikonomidou, C., Stefovskaja, V. y Turski, L. (2000) Neuronal Death Enhanced by N-Methyl-D-Aspartate Antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 12885-12890
- Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T. y Tohyama, M. (2001) The Unfolded Protein Response and Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1536**, 85-96
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. y . (1993) Molecular Characterization of the Family of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 2836-2843
- Jordan, J., Cena, V. y Prehn, J.H. (2003) Mitochondrial Control of Neuron Death and Its Role in Neurodegenerative Disorders. *J. Physiol Biochem.* **59**, 129-141
- Kandel, E.R. y Siegelbaum, S.A. (2000) Synaptic Integration. Principles of Neural Science, 4ª Edición.
- Karp, S.J., Masu, M., Eki, T., Ozawa, K. y Nakanishi, S. (1993) Molecular Cloning and Chromosomal Localization of the Key Subunit of the Human N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 3728-3733
- Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T. y Tohyama, M. (2004) Induction of Neuronal Death by ER Stress in Alzheimer's Disease. *J. Chem. Neuroanat.* **28**, 67-78
- Keller, J.N., Pang, Z., Geddes, J.W., Begley, J.G., Germeyer, A., Waeg, G. y 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**, 273-284
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257
- Kim, H.J., Chae, S.C., Lee, D.K., Chromy, B., Lee, S.C., Park, Y.C., Klein, W.L., Krafft, G.A. y Hong, S.T. (2003) Selective Neuronal Degeneration Induced by Soluble Oligomeric Amyloid Beta Protein. *FASEB J.* **17**, 118-120
- Kirshenbaum, K., Barron, A.E., Goldsmith, R.A., Armand, P., Bradley, E.K., Truong, K.T., Dill, K.A., Cohen, F.E. y Zuckermann, R.N. (1998) Sequence-Specific Polypeptoids: a Diverse Family of

- Heteropolymers With Stable Secondary Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 4303-4308
- Klein, A.M., Kowall, N.W. y Ferrante, R.J. (1999) Neurotoxicity and Oxidative Damage of Beta Amyloid 1-42 Versus Beta Amyloid 1-40 in the Mouse Cerebral Cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **893**, 314-320
- Kleinman, A. y Cohen, A. (1997) Psychiatry's Global Challenge. *Sci. Am.* **276**, 86-89
- Koh, J.Y., Yang, L.L. y Cotman, C.W. (1990) Beta-Amyloid Protein Increases the Vulnerability of Cultured Cortical Neurons to Excitotoxic Damage. *Brain Res.* **533**, 315-320
- Koppal, T., Subramaniam, R., Drake, J., Prasad, M.R., Dhillon, H. y Butterfield, D.A. (1998) Vitamin E Protects Against Alzheimer's Amyloid Peptide (25-35)-Induced Changes in Neocortical Synaptosomal Membrane Lipid Structure and Composition. *Brain Res.* **786**, 270-273
- Kruman, I.I. y Mattson, M.P. (1999) Pivotal Role of Mitochondrial Calcium Uptake in Neural Cell Apoptosis and Necrosis. *J. Neurochem.* **72**, 529-540
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. y . (1992) Molecular Diversity of the NMDA Receptor Channel. *Nature* **358**, 36-41
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lee, B., Butcher, G.Q., Hoyt, K.R., Impey, S. y Obrietan, K. (2005) Activity-Dependent Neuroprotection and CAMP Response Element-Binding Protein (CREB): Kinase Coupling, Stimulus Intensity, and Temporal Regulation of CREB Phosphorylation at Serine 133. *J. Neurosci.* **25**, 1137-1148
- Lee, J.M., Zipfel, G.J. y Choi, D.W. (1999) The Changing Landscape of Ischaemic Brain Injury Mechanisms. *Nature* **399**, A7-14
- Lerma, J. (1997) Receptores Postsinápticos De Neurotransmisores. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **91**, 271-277
- Levitzki, A. (1984) Receptors: A quantitative approach. pp. 1-142
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van, S.M., Gwinn-Hardy, K., Paul, M.M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P. y Hutton, M. (2000) Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy and Progressive Motor Disturbance in Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein. *Nat. Genet.* **25**, 402-405
- Lipton, S.A. y Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory Amino Acids As a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**, 613-622
- Lockhart, B.P., Benicourt, C., Junien, J.L. y Privat, A. (1994) Inhibitors of Free Radical Formation Fail to Attenuate Direct Beta-Amyloid25-35 Peptide-Mediated Neurotoxicity in Rat Hippocampal Cultures. *J. Neurosci. Res.* **39**, 494-505

- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J. y Cotman, C.W. (1993) Apoptosis Is Induced by Beta-Amyloid in Cultured Central Nervous System Neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 7951-7955
- Lorenzo, A. y Yankner, B.A. (1994) Beta-Amyloid Neurotoxicity Requires Fibril Formation and Is Inhibited by Congo Red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 12243-12247
- Lu, C., Chan, S.L., Haughey, N., Lee, W.T. y Mattson, M.P. (2001) Selective and Biphasic Effect of the Membrane Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2,3-Nonenal on N-Methyl-D-Aspartate Channels. *J. Neurochem.* **78**, 577-589
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R. y Avila, J. (2001) Decreased Nuclear Beta-Catenin, Tau Hyperphosphorylation and Neurodegeneration in GSK-3beta Conditional Transgenic Mice. *EMBO J.* **20**, 27-39
- Manthorpe, M., Fagnani, R., Skaper, S.D. y Varon, S. (1986) An Automated Colorimetric Microassay for Neuronotrophic Factors. *Brain Res.* **390**, 191-198
- Mark, R.J., Fuson, K.S. y May, P.C. (1999) Characterization of 8-Epiprostaglandin F2alpha As a Marker of Amyloid Beta-Peptide-Induced Oxidative Damage. *J. Neurochem.* **72**, 1146-1153
- Mark, R.J., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Uchida, K. y Mattson, M.P. (1997) A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid Beta-Peptide. *J. Neurochem.* **68**, 255-264
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E. y Portera-Cailliau, C. (1998) Neurodegeneration in Excitotoxicity, Global Cerebral Ischemia, and Target Deprivation: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis. *Brain Res. Bull.* **46**, 281-309
- Marx, J. (2000) Alzheimer's Congress. Drug Shows Promise for Advanced Disease. *Science* **289**, 375-377
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C. y Kroemer, G. (1998) The Permeability Transition Pore Complex: a Target for Apoptosis Regulation by Caspases and Bcl-2-Related Proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261-1271
- Masip, I., Cortes, N., Abad, M.J., Guardiola, M., Perez-Paya, E., Ferragut, J., Ferrer-Montiel, A. y Messeguer, A. (2005) Design and Synthesis of an Optimized Positional Scanning Library of Peptoids: Identification of Novel Multidrug Resistance Reversal Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1923-1929
- Mattson, M.P. (1990) Antigenic Changes Similar to Those Seen in Neurofibrillary Tangles Are Elicited by Glutamate and Ca²⁺ Influx in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* **4**, 105-117
- Mattson, M.P., Barger, S.W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V.L. y Rydel, R.E. (1993a) Beta-Amyloid Precursor Protein Metabolites and Loss of Neuronal Ca²⁺ Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* **16**, 409-414
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. y Rydel, R.E. (1992) Beta-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity. *J. Neurosci.* **12**, 376-389

- Mattson, M.P., Fu, W., Waeg, G. y Uchida, K. (1997) 4-Hydroxynonenal, a Product of Lipid Peroxidation, Inhibits Dephosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau. *Neuroreport* **8**, 2275-2281
- Mattson, M.P. y Goodman, Y. (1995) Different Amyloidogenic Peptides Share a Similar Mechanism of Neurotoxicity Involving Reactive Oxygen Species and Calcium. *Brain Res.* **676**, 219-224
- Mattson, M.P., Tomaselli, K.J. y Rydel, R.E. (1993b) Calcium-Destabilizing and Neurodegenerative Effects of Aggregated Beta-Amyloid Peptide Are Attenuated by Basic FGF. *Brain Res.* **621**, 35-49
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F. y Inestrosa, N.C. (2000) The Role of Oxidative Stress in the Toxicity Induced by Amyloid Beta-Peptide in Alzheimer's Disease. *Prog. Neurobiol.* **62**, 633-648
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F. y Malavolta, M. (2005) Brain, Aging and Neurodegeneration: Role of Zinc Ion Availability. *Prog. Neurobiol.*
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J. y Cotman, C.W. (1989) The Excitatory Amino Acid Receptors: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties in the Function of the Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 365-402
- Monaghan, D.T. y Cotman, C.W. (1985) Distribution of N-Methyl-D-Aspartate-Sensitive L-[3H]Glutamate-Binding Sites in Rat Brain. *J. Neurosci.* **5**, 2909-2919
- Monsonego, A. y Weiner, H.L. (2003) Immunotherapeutic Approaches to Alzheimer's Disease. *Science* **302**, 834-838
- Montoliu, C., Humet, M., Canales, J.J., Burda, J., Planells-Cases, R., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., Perez-Paya, E., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A. y Felipo, V. (2002) Prevention of in Vivo Excitotoxicity by a Family of Trialkylglycines, a Novel Class of Neuroprotectants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 29-36
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. y Seeburg, P.H. (1994) Developmental and Regional Expression in the Rat Brain and Functional Properties of Four NMDA Receptors. *Neuron* **12**, 529-540
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. y Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* **256**, 1217-1221
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakanishi, S. (1991) Molecular Cloning and Characterization of the Rat NMDA Receptor. *Nature* **354**, 31-37
- Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63
- Mudher, A. y Lovestone, S. (2002) Alzheimer's Disease-Do Tauists and Baptists Finally Shake Hands? *Trends Neurosci.* **25**, 22-26
- Muir, K.W. y Lees, K.R. (1995) Clinical Experience With Excitatory Amino Acid Antagonist Drugs. *Stroke* **26**, 503-513

- Muller, W.E., Mutschler, E. y Riederer, P. (1995) Noncompetitive NMDA Receptor Antagonists With Fast Open-Channel Blocking Kinetics and Strong Voltage-Dependency As Potential Therapeutic Agents for Alzheimer's Dementia. *Pharmacopsychiatry* **28**, 113-124
- Murphy, D.E., Schneider, J., Boehm, C., Lehmann, J. y Williams, M. (1987) Binding of [3H]3-(2-Carboxypiperazin-4-Yl)Propyl-1-Phosphonic Acid to Rat Brain Membranes: a Selective, High-Affinity Ligand for N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 778-784
- Ogita, K., Okuda, H., Yamamoto, Y., Nishiyama, N. y Yoneda, Y. (2003) In Vivo Neuroprotective Role of NMDA Receptors Against Kainate-Induced Excitotoxicity in Murine Hippocampal Pyramidal Neurons. *J. Neurochem.* **85**, 1336-1346
- Olney, J.W. (1969) Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated With Monosodium Glutamate. *Science* **164**, 719-721
- Palmer, A.M. y Gershon, S. (1990) Is the Neuronal Basis of Alzheimer's Disease Cholinergic or Glutamatergic? *FASEB J.* **4**, 2745-2752
- Park, J.A., Lee, J.Y., Sato, T.A. y Koh, J.Y. (2000) Co-Induction of P75NTR and P75NTR-Associated Death Executor in Neurons After Zinc Exposure in Cortical Culture or Transient Ischemia in the Rat. *J. Neurosci.* **20**, 9096-9103
- Parks, J.K., Smith, T.S., Trimmer, P.A., Bennett, J.P., Jr. y Parker, W.D., Jr. (2001) Neurotoxic Abeta Peptides Increase Oxidative Stress in Vivo Through NMDA-Receptor and Nitric-Oxide-Synthase Mechanisms, and Inhibit Complex IV Activity and Induce a Mitochondrial Permeability Transition in Vitro. *J. Neurochem.* **76**, 1050-1056
- Paschen, W. (1999) Calcium Neurotoxicity. *J. Neurochem.* **72**, 2625-2626
- Patel, M., Day, B.J., Crapo, J.D., Fridovich, I. y McNamara, J.O. (1996) Requirement for Superoxide in Excitotoxic Cell Death. *Neuron* **16**, 345-355
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. y Cotman, C.W. (1991) In Vitro Aging of Beta-Amyloid Protein Causes Peptide Aggregation and Neurotoxicity. *Brain Res.* **563**, 311-314
- Planells-Cases, R., Montoliu, C., Humet, M., Fernandez, A.M., Garcia-Martinez, C., Valera, E., Merino, J.M., Perez-Paya, E., Messeguer, A., Felipe, V. y Ferrer-Montiel, A. (2002) A Novel N-Methyl-D-Aspartate Receptor Open Channel Blocker With in Vivo Neuroprotectant Activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 163-173
- Puttfarcken, P.S., Manelli, A.M., Neilly, J. y Frail, D.E. (1996) Inhibition of Age-Induced Beta-Amyloid Neurotoxicity in Rat Hippocampal Cells. *Exp. Neurol.* **138**, 73-81
- Qiu, Z. y Gruol, D.L. (2003) Interleukin-6, Beta-Amyloid Peptide and NMDA Interactions in Rat Cortical Neurons. *J. Neuroimmunol.* **139**, 51-57
- Querfurth, H.W. y Selkoe, D.J. (1994) Calcium Ionophore Increases Amyloid Beta Peptide Production by Cultured Cells. *Biochemistry* **33**, 4550-4561

- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J. y Lal, R. (2005) Amyloid Ion Channels: A Common Structural Link for Protein-Misfolding Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 10427-10432
- Rabizadeh, S., Bitler, C.M., Butcher, L.L. y Bredesen, D.E. (1994) Expression of the Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor Enhances Beta-Amyloid Peptide Toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 10703-10706
- Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M.P., Laferla, F.M., Rohn, T.T. y Cotman, C.W. (2004) Caspase-Cleavage of Tau Is an Early Event in Alzheimer Disease Tangle Pathology. *J. Clin. Invest* **114**, 121-130
- Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A. y Kennedy, T.E. (1999) P75 Neurotrophin Receptor Expression Is Induced in Apoptotic Neurons After Seizure. *J. Neurosci.* **19**, 6887-6896
- Sala, C., Rudolph-Correia, S. y Sheng, M. (2000) Developmentally Regulated NMDA Receptor-Dependent Dephosphorylation of CAMP Response Element-Binding Protein (CREB) in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **20**, 3529-3536
- Sanchez-Perez, A.M., Montoliu, C. y Felipo, V. (2003) Trialkylglycines: a New Family of Compounds With in Vivo Neuroprotective Activity. *CNS. Drug Rev.* **9**, 263-274
- Scarpini, E., Scheltens, P. y Feldman, H. (2003) Treatment of Alzheimer's Disease: Current Status and New Perspectives. *Lancet Neurol.* **2**, 539-547
- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C. y Montal, M. (1996) Mitochondrial Dysfunction Is a Primary Event in Glutamate Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**, 6125-6133
- Schoepp, D.D. y Conn, P.J. (1993) Metabotropic Glutamate Receptors in Brain Function and Pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 13-20
- Segura, T., Galindo, M.F., Rallo-Gutierrez, B., Cena, V. y Jordan, J. (2003) [Pharmacological Targets in Neurodegenerative Diseases]. *Rev. Neurol.* **36**, 1047-1057
- Selkoe, D.J. (1996) Amyloid Beta-Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* **271**, 18295-18298
- Selkoe, D.J. (1998) The Cell Biology of Beta-Amyloid Precursor Protein and Presenilin in Alzheimer's Disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 447-453
- Selkoe, D.J. (1989) Biochemistry of Altered Brain Proteins in Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 463-490
- Sennvik, K., Benedikz, E., Fastbom, J., Sundstrom, E., Winblad, B. y Ankarcrona, M. (2001) Calcium Ionophore A23187 Specifically Decreases the Secretion of Beta-Secretase Cleaved Amyloid Precursor Protein During Apoptosis in Primary Rat Cortical Cultures. *J. Neurosci. Res.* **63**, 429-437
- Sheehan, J.P., Swerdlow, R.H., Parker, W.D., Miller, S.W., Davis, R.E. y Tuttle, J.B. (1997) Altered Calcium Homeostasis in Cells Transformed by Mitochondria From Individuals With Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* **68**, 1221-1233

- Shen, C.L. y Murphy, R.M. (1995) Solvent Effects on Self-Assembly of Beta-Amyloid Peptide. *Biophys. J.* **69**, 640-651
- Siesjo, B.K. (1981) Cell Damage in the Brain: a Speculative Synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **1**, 155-185
- Smith, M.A., Hirai, K., Hsiao, K., Pappolla, M.A., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Tabaton, M. y Perry, G. (1998) Amyloid-Beta Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated With Oxidative Stress. *J. Neurochem.* **70**, 2212-2215
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S. y Perry, G. (1997) Widespread Peroxynitrite-Mediated Damage in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **17**, 2653-2657
- Smyth, P.G. y Berman, S.A. (2002) Markers of Apoptosis: Methods for Elucidating the Mechanism of Apoptotic Cell Death From the Nervous System. *Biotechniques* **32**, 648-50, 652, 654
- Sommer, B. (2002) Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: Ten Years on. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 87-92
- Sonkusare, S.K., Kaul, C.L. y Ramarao, P. (2005) Dementia of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders--Memantine, a New Hope. *Pharmacol. Res.* **51**, 1-17
- Sponne, I., Fifre, A., Drouet, B., Klein, C., Koziel, V., Pincon-Raymond, M., Olivier, J.L., Chambaz, J. y Pillot, T. (2003) Apoptotic Neuronal Cell Death Induced by the Non-Fibrillar Amyloid-Beta Peptide Proceeds Through an Early Reactive Oxygen Species-Dependent Cytoskeleton Perturbation. *J. Biol. Chem.* **278**, 3437-3445
- Standridge, J.B. (2004) Pharmacotherapeutic Approaches to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clin. Ther.* **26**, 615-630
- Stephan, A., Laroche, S. y Davis, S. (2001) Generation of Aggregated Beta-Amyloid in the Rat Hippocampus Impairs Synaptic Transmission and Plasticity and Causes Memory Deficits. *J. Neurosci.* **21**, 5703-5714
- Stout, A.K., Raphael, H.M., Kanterewicz, B.I., Klann, E. y Reynolds, I.J. (1998) Glutamate-Induced Neuron Death Requires Mitochondrial Calcium Uptake. *Nat. Neurosci.* **1**, 366-373
- Suh, Y.H. y Checler, F. (2002) Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and Alpha-Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rev.* **54**, 469-525
- Tymianski, M., Wallace, M.C., Spigelman, I., Uno, M., Carlen, P.L., Tator, C.H. y Charlton, M.P. (1993) Cell-Permeant Ca²⁺ Chelators Reduce Early Excitotoxic and Ischemic Neuronal Injury in Vitro and in Vivo. *Neuron* **11**, 221-235
- Valera, E., Fernandez-Salguero, P.M., Planells-Cases, R., Messeguer, A., Van Den, N.W., Carreno, C., Ferrer-Montiel, A. y Merino, J.M. (2002) Neuroprotection Against Excitotoxicity by N-Alkylglycines in Rat Hippocampal Neurons. *Neuromolecular. Med.* **2**, 271-280
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C.S., Laws, S.M., Gandy, S.E. y Martins, R.N. (2004) The Role of Beta Amyloid in Alzheimer's Disease: Still a Cause of Everything or the Only One Who Got Caught? *Pharmacol. Res.* **50**, 397-409

- Vitolo, O.V., Sant'Angelo, A., Costanzo, V., Battaglia, F., Arancio, O. y Shelanski, M. (2002) Amyloid Beta -Peptide Inhibition of the PKA/CREB Pathway and Long-Term Potentiation: Reversibility by Drugs That Enhance CAMP Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13217-13221
- Walton, M., Woodgate, A.M., Muravlev, A., Xu, R., During, M.J. y Dragunow, M. (1999) CREB Phosphorylation Promotes Nerve Cell Survival. *J. Neurochem.* **73**, 1836-1842
- Watkins, J.C., Krogsgaard-Larsen, P. y Honore, T. (1990) Structure-Activity Relationships in the Development of Excitatory Amino Acid Receptor Agonists and Competitive Antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 25-33
- Weaver, C.E., Jr., Wu, F.S., Gibbs, T.T. y Farb, D.H. (1998) Pregnenolone Sulfate Exacerbates NMDA-Induced Death of Hippocampal Neurons. *Brain Res.* **803**, 129-136
- Wei, H., Leeds, P.R., Qian, Y., Wei, W., Chen, R. y Chuang, D. (2000) Beta-Amyloid Peptide-Induced Death of PC 12 Cells and Cerebellar Granule Cell Neurons Is Inhibited by Long-Term Lithium Treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **392**, 117-123
- Weiss, J.H. y Sensi, S.L. (2000) Ca²⁺-Zn²⁺ Permeable AMPA or Kainate Receptors: Possible Key Factors in Selective Neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **23**, 365-371
- Wenk, G.L., Quack, G., Moebius, H.J. y Danysz, W. (2000) No Interaction of Memantine With Acetylcholinesterase Inhibitors Approved for Clinical Use. *Life Sci.* **66**, 1079-1083
- White, R.J. y Reynolds, I.J. (1996) Mitochondrial Depolarization in Glutamate-Stimulated Neurons: an Early Signal Specific to Excitotoxin Exposure. *J. Neurosci.* **16**, 5688-5697
- Wirhsh, O., Multhaup, G. y Bayer, T.A. (2004) A Modified Beta-Amyloid Hypothesis: Intraneuronal Accumulation of the Beta-Amyloid Peptide--the First Step of a Fatal Cascade. *J. Neurochem.* **91**, 513-520
- Wong, E.H., Knight, A.R. y Woodruff, G.N. (1988) [3H]MK-801 Labels a Site on the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Complex in Rat Brain Membranes. *J. Neurochem.* **50**, 274-281
- Wood, A.M. y Bristow, D.R. (1998) N-Methyl-D-Aspartate Receptor Desensitisation Is Neuroprotective by Inhibiting Glutamate-Induced Apoptotic-Like Death. *J. Neurochem.* **70**, 677-687
- Yaar, M., Zhai, S., Fine, R.E., Eisenhauer, P.B., Arble, B.L., Stewart, K.B. y Gilchrest, B.A. (2002) Amyloid Beta Binds Trimers As Well As Monomers of the 75-KDa Neurotrophin Receptor and Activates Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 7720-7725
- Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P.F., Doyle, S.M., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E. y Gilchrest, B.A. (1997) Binding of Beta-Amyloid to the P75 Neurotrophin Receptor Induces Apoptosis. A Possible Mechanism for Alzheimer's Disease. *J. Clin. Invest* **100**, 2333-2340
- Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K.J. y Mishina, M. (1992) Cloning, Expression and Modulation of a Mouse NMDA Receptor Subunit. *FEBS Lett.* **300**, 39-45
- Yankner, B.A. (1996) Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron* **16**, 921-932

- Yankner, B.A., Duffy, L.K. y Kirschner, D.A. (1990a) Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid Beta Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides. *Science* **250**, 279-282
- Yankner, B.A., Caceres, A. y Duffy, L.K. (1990b) Nerve Growth Factor Potentiates the Neurotoxicity of Beta Amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 9020-9023
- Young, A.B. y Fagg, G.E. (1990) Excitatory Amino Acid Receptors in the Brain: Membrane Binding and Receptor Autoradiographic Approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 126-133
- Zhang, Y., Hong, Y., Bounhar, Y., Blacker, M., Roucou, X., Tounekti, O., Vereker, E., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Goodyer, C.G. y LeBlanc, A. (2003) P75 Neurotrophin Receptor Protects Primary Cultures of Human Neurons Against Extracellular Amyloid Beta Peptide Cytotoxicity. *J. Neurosci.* **23**, 7385-7394